

Г. А. Анненков, Е. Е. Сафронова, Л. М. Губерничева,  
Н. М. Волкова

## ОБНАРУЖЕНИЕ ФЕНИЛАЛАНИНГИДРОКСИЛАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В ЛЕЙКОЦИТАХ И ФИБРОБЛАСТАХ ЧЕЛОВЕКА

Институт медицинской генетики АМН СССР, Москва

Показано, что фенилкетонурия возникает не только вследствие наследственной недостаточности фермента фенилаланингидроксилазы (ФАГ), но и как результат мутационных изменений по меньшей мере 6 других ферментов, контролирующих синтез восстановленной формы биоптерина — кофактора, необходимого для реакции гидроксилирования фенилаланина [1,2]. Оказалось, что лечение таких атипичных форм фенилкетонурии должно быть иным, чем в случае классической фенилкетонурии. Считается установленным, что активность ФАГ выявляется только в печени и почках человека [2,3], хотя имеются данные об обнаружении ее в культивируемых фибробластах [4,5]. Дифференциальная диагностика наиболее часто встречающихся форм фенилкетонурии основана на определении активности ферментов в биоптатах печени. При этом анализы у больных желательнее проводить одновременно с исследованием тех же ферментов у их родителей. Однако получение биоптатов печени часто затруднительно, особенно при необходимости обследования маленьких детей или практически здоровых родителей. Необходим поиск новых объектов и методов анализа [6]. В данной работе сделана попытка использовать для выявления активности ФАГ ранее не применявшийся в подобных анализах метод обработки клеток тритоном X-100, существенно повышающим солиubilизацию ряда клеточных ферментов [7, 8], а также сравнительно недавно опубликованный и пока мало применявшийся количественный метод Эйлинг [9]. Этот метод основан на регистрации накопления окисленной формы птеридинового кофактора, эквивалентного количеству новообразованного тирозина. Измеряется начальная скорость реакции, что очень существенно при работе с такими нестойкими молекулами, как ФАГ и птеридиновый кофактор [10, 11].

### М а т е р и а л и м е т о д ы и с с л е д о в а н и я

Гепаринизированная кровь доноров (15—20 мл) отстаивалась в узких пробирках  $2\frac{1}{2}$  ч при 37 °С. Слой плазмы с лейкоцитами отсасывали, клетки осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин, затем дважды промывали физиологическим раствором. Для лизиса примешанных эритроцитов к осадку добавляли 1 мл физиологического раствора и 3 мл воды, перемешивали в течение 1 мин, далее для восстановления изотоничности добавляли 1 мл 3,6% раствора NaCl. Эти процедуры в зависимости от количества примешанных эритроцитов повторяли 2—5 раз. Фракцию лейкоцитов, освобожденную промывкой от растворенных эритроцитарных белков, осаждали центрифугированием. Затем лейкоциты ресуспендировали в 3 объемах буферного раствора (0,01 М трис-HCl; 0,15 М KCl; 10 мМ β-меркаптоэтанол; 1% тритона X-100; pH 7,4) и гомогенизировали 2 мин на холоду в системе тефлон — стекло. Гомогенат центрифугировали при 48 000 g в течение 30 мин на холоду (центрифуга VAC-25 Janetzki).

Использовали культивируемые эмбриональные фибробласты человека 7—17 пассажей, снятие клеток проводили на 7—8-й день культивирования. Методика выращивания клеток и приготовления их суспензии описана нами ранее [12]. Гомогенизацию проводили так же, как описано выше для лейкоцитов.

Концентрацию фенилаланина в сыворотке крови определяли с помощью автоматического аминокислотного анализатора «TSM Technicon Auto Analyzer 11», согласно стандартной программе.

Для определения активности ФАГ по Эйлинг приготовление реактивов и составление реакционной смеси проводили точно в соответствии с [9]. Для динамического определения скорости реакции использовали автоматический анализатор скоростей ферментативных реакций ЛКВ-8600. Кинетику реакции регистрировали в течение 1 или 2 мин при 25 °С.

Определение активности ФАГ радиохимическим методом проводили в соответствии с [13]. Фракции  $^{14}\text{C}$ -фенилаланина и  $^{14}\text{C}$ -тирозина разделяли методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Силуфол» (ВНР) в системе растворителей  $n$ -бутанол — ацетон —  $\text{NH}_4\text{OH}$  — вода (20 : 20 : 10 : 4). Хроматограммы разрезали на полоски шириной 0,5 см, которые помещали во флаконы с 3 мл сцинтилляционной жидкости ЖС-8. Активность подсчитывали на счетчике «Intertechnik SL-30».

Концентрацию белка в гомогенатах определяли методом прямой спектрофотометрии пептидных связей при 210 нм [14], используя спектрофотометр «Hitachi-139».

Использованные реактивы: L-фенилаланин фирмы «Calbiochem»; трис, каталаза и НАД·Н фирмы «Serva»; L-( $^{14}\text{C}$ -U)-фенилаланин активностью 522 мКи/мМ фирмы «Amersham»; кофактор (6,7-диметил, 2-амино, 4-гидрокси, 5, 6, 7, 8-тетрагидроптеридин), любезно предоставленный нам проф. А. Кнаппом и доц. У. Гриммом из Института медицинской генетики ГДР, за что пользуемся случаем выразить им глубокую признательность. Остальные реактивы были отечественного производства категорий х. ч. и о. ч.

### Результаты и обсуждение

Анализ 3 образцов лейкоцитов от здоровых доноров был проведен без добавления тритона в среду гомогенизации. Активность ФАГ не была выявлена, что совпадает с данными литературы об отсутствии ФАГ в клетках крови. В 5 других образцах, гомогенизированных в среде с 1% содержанием тритона Х-100, была выявлена активность ФАГ (табл. 1).

Однако проявление активности, измеряемой по накоплению окисленной формы кофактора, а не непосредственно по превращению фенилаланина в тирозин, можно было объяснить не функционированием ФАГ, а действием других гидроксилаз, также зависимых от птеридинового кофактора (прежде всего тирозин- и триптофангидроксилаз) и обеспечивающих, по некоторым данным [15], около 5% от общего пула гидроксилирования фенилаланина. Возможно протекание и других птеридинзависимых процессов, например неферментативного гидроксилирования фенилаланина с участием перекиси птеридинового кофактора, которое достигает 8% от общего объема гидроксилирования фенилаланина в печени [18].

Для проверки обоснованности этих возражений мы использовали два подхода.

1. Было проведено исследование лейкоцитов у гомо- и гетерозигот по гену фенилкетонурии (образцы крови были любезно предоставлены нам проф. К. С. Ладодо и канд. мед. наук Е. П. Рубаковой из Института педиатрии и питания АМН СССР). Пробанд — девочка 7 лет, которая на протяжении нескольких лет лечится по поводу классической фенилкетонурии средней тяжести. Мать — облигатная гомо- или гетерозигота — не имеет выраженных признаков заболевания; отец, также предполагаемый гетерозиготный носитель гена  $\text{Ph}^-$ , объективно здоров. Проведенное определение содержания аминокислот в крови членов семьи показало, что концентрация фенилаланина в сыворотке крови дочери и матери соответствуют таковой

у гомозигот по гену Rh<sup>-</sup>, а у отца не превышает нормы, что обычно для гетерозигот. Результат определения активности ФАГ в лейкоцитах полностью совпал с данными аминокислотного анализа: у дочери и матери активность не выявлялась, у отца она достигала 0,08 нМ/мин на 1 мг белка, что составляет 36 % от определенной нами нормы. Примерно 30 % от активности ФАГ обычно обнаруживается и в печени гетерозигот [2, 16]. Такие случаи известны из литературы. Согласно одной из гипотез, они объясняются действием модифицирующей пары генов, определяющих степень повреждения клеток мозга при фенилкетонурии [17].

Корреляция уровней выявлявшейся нами активности ФАГ в лейкоцитах с наличием одного или двух мутантных генов Rh<sup>-</sup> свидетельствует против существенного участия иных, чем ФАГ, ферментов в реакциях общего пула окисления кофактора.

2. Провели определение активности ФАГ в лейкоцитах радиохимическим методом, т. е. прямым измерением превращения меченого фенилаланина в тирозин. Как видно из табл. 1, при использовании этого метода выявлялась очень слабая реакция ФАГ в лейкоцитах, что также дает основание связывать измеряемое методом Эйлинг нарастание количества окисленного кофактора по крайней мере частично с гидроксильрованием фенилаланина, а не с иными процессами, сопровождающимися окислением птеридинового кофактора.

Далее было предпринято изучение активности ФАГ в культивируемых фибробластах, которые также могут служить объектом для проведения диагностических анализов при фенилкетонурии. Культивируемые эмбриональные фибробласты человека гомогенизировали с тритоном X-100 и без него, анализы проводили методом Эйлинг и радиохимическим методом (табл. 2).

С помощью обоих методов была обнаружена активность ФАГ в фибробластах, что коррелирует с ранее упоминавшимися данными литературы

Т а б л и ц а 1  
Активность ФАГ в лейкоцитах человека

№ опыта	Способ гомогенизации	Содержание белка в гомогенате, мг %	Активность фермента
Метод Эйлинг			
1	Без тритона	2,2	0
2	» »	7,25	0
3	» »	7,5	0
4	С 1% тритона	16,0	0,13
5	То же	27,75	0,15
6	» »	30,75	0,22
7	» »	26,0	0,34
8	» »	6,25	0,23
В среднем (n=5)			0,21
Радиохимический метод			
1	Без тритона	2,6	0
2	С 1% тритона	19,0	1,8
3	То же	17,5	2,16

П р и м е ч а н и е. Активность ФАГ выражали при использовании метода Эйлинг в нМ/мин на 1 мг белка, радиохимического метода — в нМ/мин на 1 мг белка.

Т а б л и ц а 2  
Активность ФАГ в культивируемых фибробластах человека

№ опыта	Метод определения	Способ гомогенизации	Содержание белка в гомогенате, мг %	Активность ФАГ, нМ/мин на 1 мг белка
1	Эйлинг	Без тритона	5,8	60,0
2	»	С 1% тритона	19,0	90,0
3	Радиохимический	Без тритона	2,0	0
4	То же	То же	2,7	0
5	» »	С 1% тритона	47,0	16,0

Из сравнения табл. 1 и 2 видно, что обработка тритоном значительно увеличивала переход клеточных белков в раствор; очевидно, при этом в растворе оказывается и ФАГ в концентрациях, доступных определению. Более высокая активность при использовании метода Эйлинг, чем при исследовании радиохимическим методом, объясняется тем, что в первом случае скорость реакции измеряли в течение первых 1—2 мин, когда она наибольшая, а во втором измерения проводили в течение 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub> ч, но результат пересчитывали на 1 мин, как и в методе Эйлинг. Очевидно, что при радиохимическом определении цифры должны быть намного ниже. Кроме того, низкая активность ФАГ, определяемая радиохимическим методом, могла быть следствием обычно малых молярных концентраций субстрата и кофактора, использованных, согласно работе [12]. Обработка клеток и приготовление гомогенатов требовали значительных затрат времени, что могло обусловить некоторое снижение активности фермента независимо от способа ее последующего определения. Несомненно, что оба метода определения активности ФАГ требуют усовершенствования. Одним из путей повышения их эффективности представляется оптимизация условий реакции, в частности концентраций субстрата и кофактора, поскольку сопоставление данных литературы свидетельствует о значительной вариабельности этих параметров (и получаемых результатов) у разных авторов.

Полученные данные позволяют сделать некоторые заключения. В лейкоцитах и фибробластах крови человека выявлена фенилаланингидроксилазная активность. Эта активность в исследованных клетках полностью или преимущественно связана с мембранами и может быть солубилизирована обработкой клеток тритоном X-100. Представляется чрезвычайно перспективным изучение возможности определения активности фенилаланингидроксилазы в лейкоцитах (вместо биоптатов печени) для выявления гомо- и гетерозигот по гену Ph<sup>-</sup>.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Curtius H.-Ch., Niederwieser A., Viscontini M. et al. — Clin. Chim. Acta, 1979, v. 93, p. 251—262.
2. Bartholome K. — Hum. Genet., 1979, v. 51, p. 42—54.
3. Kaufman S., Holtzman N., Milstein Sh. et al. — New Engl. J. Med., 1975, v. 293, p. 785—790.
4. Bartholome K., Ertel E. — Lancet, 1976, v. 11, p. 862—863.
5. Cassano V., Krooth R., Worthly T. — Amer. J. Hum. Genet., 1978, v. 30, p. 90.
6. Choo K., Cotton R., Danks D. et al. — Biochem. J., 1979, v. 181, p. 285—294.
7. Тутельян В. А. — Вестн. АМН СССР, 1978, № 3, с. 22—29.
8. Tucker-Pian Ch., Bakay B., Nyhan W. — Bioch. Genet., 1979, v. 17, p. 995—1005.
9. Ayling J., Pirson R., Pirson W. et al. — Analyt. Biochem., 1973, v. 51, p. 80—90.
10. Raiha N. — Pediatr. Res., 1973, v. 7, p. 1—4.
11. Woo S., Gillam S., Woolf L. — Biochem. J., 1974, v. 139, p. 741—749.
12. Сафронова Е. Е., Губерниева Л. М., Волкова Н. М. и др. — Биохимия, 1978, т. 43, с. 268—273.
13. Hoffbauer R., Schrempf G. — Lancet, 1976, v. 1, p. 194.
14. Toombs M., Souter F., Maclaran N. — Biochem. J., 1959, v. 73, p. 167—171.
15. Kaufman S. — Biochem. Med., 1976, v. 15, p. 42—54.
16. Grimm U., Knapp A., Schlenzka K. et al. — Acta biol. med. germ., 1977, B. 36, p. 1179—1182.
17. Kutter D. — Arch. Suisses de Neurol. Neurochir. Psych., 1978, v. 123, p. 3—35.
18. Woolf L., Jakubovic A., Chan-Henry E. — Biochem. J., 1971, v. 125, p. 569—574.

Поступила 16/VI 1980 г.

#### DETECTION OF PHENYLALANINE HYDROXYLASE ACTIVITY IN HUMAN LEUKOCYTES AND FIBROBLASTS

Annenkov H. A., Safronova E. E., Gubernieva L. M., Volkova N. M.

Institute of Medical Genetics AMS USSR, Moscow

The data obtained indicate to the presens of phenylalanine hydroxylase activity in human leucocytes and fibroblasts. The following methods were used: estimation of accumulation of the oxidized form of the pteridine cofactor after Ayling and coworkers and radiochemical method. Probably this activity is connected with cell membranes and can be solubilized by treatment of cells by Tritone X-100. The possibility of estimation of phenylalanine hydroxylase activity in leucocytes instead of liver bioptates for discrimination of homo — and heterozygotes with PKU gene is assumptive.

*Н. И. Лемонджава, А. В. Труфанов*

## **АКТИВНОСТЬ КРЕАТИНФОСФОКИНАЗЫ, АСТ И АЛТ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ НЕКОТОРЫХ ВИДАХ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ОБЕЗЬЯН**

Институт экспериментальной патологии и терапии АМН СССР, Сухуми

В спонтанной патологии обезьян, содержащихся в условиях неволи, большой удельный вес занимают такие заболевания, как бактериальная дизентерия и стрептококковые инфекции. В связи с этим вопросы определения тяжести патологического процесса и контроля за течением этих заболеваний имеют важное значение в практической и экспериментальной работе с обезьянами.

Для дизентерии весьма характерно поражение желудочно-кишечного тракта вплоть до развития в нем некротических процессов. Кроме того, патологическому изменению подвергаются печень, поджелудочная железа, миокард. Дизентерийные токсины, воздействуя непосредственно на кровеносные сосуды, вызывают повышение их проницаемости, что приводит к развитию тканевой гипоксии [1]. При дизентерии страдают все основные виды обмена: углеводный [2, 3], белковый [2, 4, 5], витаминный [6, 7]. Гемолитические стрептококки могут вызвать разнообразные септические заболевания, миокардиты, острый ревматизм и т. д.

Принимая во внимание то обстоятельство, что многие органы и ткани, вовлекаемые в патологический процесс при дизентерии и стрептококковых инфекциях, содержат такие ферменты, как аминотрансферазы и креатинфосфокиназу (КФК), и что уровень их в крови в случае возникновения этих заболеваний может изменяться, мы провели изучение активности трех сывороточных ферментов: КФК, АСТ и АЛТ у обезьян, экспериментально зараженных дизентерией и гемолитическим стрептококком. Аминотрансферазы принимают активное участие в реакции переаминирования, которая, как установлено, имеет универсальное распространение. В противоположность этому КФК принимает участие в переносе фосфорильной группы с креатинфосфата на АДФ. КФК в основном локализуется в мышечной и нервной тканях [8]. Разумеется, изменение уровней трех названных ферментов в сыворотке крови у обезьян при дизентерии и стрептококковой инфекции не могло быть специфичным, однако оно позволило бы объективно судить о тяжести патологического процесса и сделать соответствующие прогностические оценки.

### **М е т о д и к а**

Определение активности КФК, АСТ и АЛТ в сыворотке крови проведено на 6 макаках резусах, зараженных бактериальной дизентерией, и на 41 обезьяне того же вида, зараженных гемолитическим стрептококком [9]. Для получения модели дизентерии обезьян заражали вирулентной культурой Sh. flexner 2a в количестве 75 млрд. микробных клеток в 1 мм<sup>3</sup>. Микробную культуру вводили обезьянам через рот [10]. Кровь для исследования ферментов брали у животных паточак (до заражения, на 3-й день после заражения, в период лечения иодиолом и антибиотиками, сразу после окончания лечения и через 4 мес после заражения). Условия взятия крови во всех случаях были одинаковыми. Из 41 обезьяны, зараженных гемолитическим стрептококком, у 20 животных (1-я группа) активность ферментов определяли в ранние сроки заражения, а у 21 (2-я группа) — в отдаленные сроки (спустя 4 мес после заражения). Из 20 обезьян 1-й группы 10 животных до заражения подвергали 4-кратной иммунизации, а 10 других (контрольных) заражали без предварительной иммунизации. Определение активности ферментов в ранние сроки после заражения проводили в стандартных условиях (на 4-й день после иммунизации или заражения). Активность АСТ и АЛТ определяли по Т. С. Пасхиной [11], активность КФК — по Мюллеру, Волленбергеру и Ковариковой [12]. Полученные данные подвергали вариационно-статистической обработке (тест Стьюдента) и исследовали методом корреляционного анализа по Спирмену [13].

До заражения дизентерией активность КФК в сыворотке крови у обезьян равнялась  $2,14 \pm 0,51$  ед/мл (рис. 1), после заражения она достигала  $5,2 \pm 0,9$  ед/мл ( $P < 0,02$ ). В период лечения зараженных обезьян это увеличение составляло в среднем  $6,8 \pm 0,69$  ед/мл ( $P < 0,001$ ). Сразу после окончания лечения (иодиолом, а затем антибиотиками бициллином и стрептомицином) активность КФК приближалась к исходному уровню —  $2,5 \pm 0,29$  ед/мл ( $P > 0,05$ ), однако спустя 4 мес после заражения вновь увеличивалась, достигая в среднем  $9,0 \pm 1,09$  ед/мл ( $P < 0,001$ ). Последнее, на наш

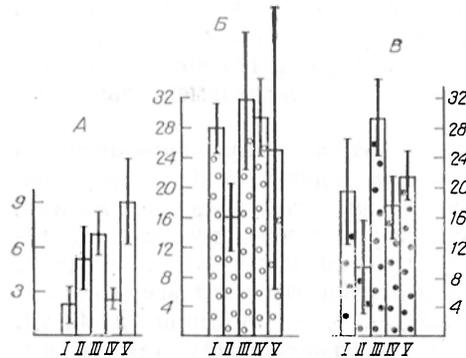


Рис. 1. Активность КФК (А), АСТ (Б) и АЛТ (В) в сыворотке крови обезьян при экспериментальной дизентерии.

По оси абсцисс: I — до заражения, II — сразу после заражения, III — по время лечения, IV — сразу после окончания лечения, V — через 4 мес после заражения; по осям ординат — активность фермента (в ед/мл).

взгляд, свидетельствует о том, что и по истечении 4 мес после заражения бактериальной дизентерией полное выздоровление обезьян все еще не наступало. Следует отметить, что, по данным патологоанатомических исследований, у обезьян, зараженных дизентерией, имелись дистрофические изменения в миокарде, что, возможно, и явилось причиной повышения активности КФК в сыворотке крови. Бактериологическое обследование обезьян, проведенное спустя 4 мес после их заражения дизентерией, выявило в кале у всех животных присутствие шигелл, что также являлось подтверждением продолжающегося патологического состояния.

Активность АСТ и АЛТ в сыворотке крови после заражения обезьян дизентерией снижалась и составляла соответственно  $16,0 \pm 1,85$  ед/мл ( $P < 0,001$ ) и  $9,4 \pm 2,36$  ед/мл ( $P < 0,02$ ).

Согласно данным литературы [14], в остром периоде дизентерии у людей отмечается снижение содержания ряда кишечных ферментов. Это согласуется с результатами, полученными нами на обезьянах. Так, сразу после заражения обезьян дизентерийными микробами мы наблюдали снижение активности АСТ в сыворотке крови. Во время лечения обезьян уровень АСТ в сыворотке повышался ( $31,7 \pm 3,57$  ед/мл), однако по отношению к исходному показателю ( $28,0 \pm 1,24$  ед/мл) выявленное различие было статистически недостоверно. Активность АЛТ во время лечения повышалась более значительно ( $29,41 \pm 2,4$  ед/мл;  $P < 0,02$ ) по сравнению с контрольной величиной ( $19,7 \pm 1,99$  ед/мл). После лечения содержание этих ферментов в сыворотке нормализовалось (см. рис. 1).

При заражении гемолитическим стрептококком увеличение активности КФК у иммунизированных обезьян на 4-й день заражения было статистически недостоверным ( $6,94 \pm 1,9$  ед/мл;  $P > 0,05$ ) по сравнению с таковой у обезьян до заражения ( $3,4 \pm 0,61$  ед/мл). В дальнейшем (на 7-й день) уровень КФК возвращался к исходному (см. таблицу). Активность КФК в сыворотке крови при заражении неиммунизированных обезьян гемолитическим стрептококком увеличивалась с  $3,27 \pm 0,67$  до  $9,22 \pm 1,22$  ед/мл ( $P < 0,001$ ) и оставалась повышенной на 7-й день после заражения ( $6,15 \pm 0,99$  ед/мл;  $P < 0,05$ ). Увеличение содержания КФК в сыворотке при заражении обезьян гемолитическим стрептококком, очевидно, было связано с диффузным поражением миокарда по типу острого миокардита [10]. Изменение активности АСТ и АЛТ при заражении гемолитическим стрептококком было статистически недостоверным (см. таблицу).

При изучении активности КФК, АСТ и АЛТ в сыворотке крови у 21 обезьяны через 4 мес после заражения стрептококками в большинстве слу-

чаев выявлялось повышение уровня КФК в среднем до  $9,9 \pm 1,22$  ед/мл ( $P < 0,001$ ). Активность АСТ оставалась в пределах нормы ( $21,5 \pm 1,7$  ед/мл;  $P > 0,05$ ), а содержание АЛТ снижалось до  $13,45 \pm 1,7$  ед/мл ( $P < 0,005$ ).

По данным литературы [9], у иммунизированных обезьян в отличие от контрольных животных патологические изменения на ЭКГ после заражения стрептококками не обнаруживались.

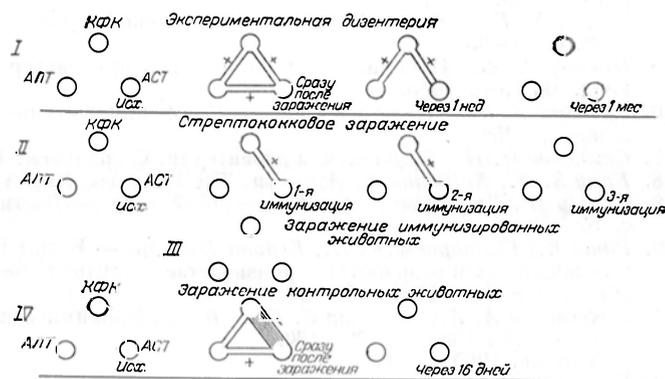
Активность некоторых сывороточных энзимов в ед/мл в сыворотке крови при заражении обезьян гемолитическими стрептококками ( $M \pm m$ )

Энзим	Исходный показатель	День заражения			
		4-й	7-й	17-й	54-й
КФК	$3,27 \pm 0,07$ $n=10$	$9,22 \pm 1,22$ $n=4$	$6,15 \pm 0,99$ $n=5$	$4,23 \pm 0,6$ $n=7$	$2,03 \pm 0,35$ $n=10$
Глутамико-щавелевоуксусная трансминаза	$14,7 \pm 2,26$ $n=10$	$17,2 \pm 4,05$ $n=5$	$15,2 \pm 3,0$ $n=5$	$16,0 \pm 1,19$ $n=8$	$15,5 \pm 4,64$ $n=9$
Глутамико-пировиноградная трансминаза	$24,2 \pm 1,78$ $n=10$	$19,0 \pm 8,14$ $n=5$	—	$22,5 \pm 6,0$ $n=5$	$20,33 \pm 2,14$ $n=9$

Корреляционный анализ при экспериментальной дизентерии показал, что сразу после заражения появляется прямая связь между активностью 3 изучаемых ферментов ( $\rho=0,7$ ;  $P < 0,05$ ). В период лечения зависимость

Рис. 2. Корреляционная зависимость между активностью КФК, АСТ и АЛТ в сыворотке крови у обезьян при экспериментальной дизентерии и заражении гемолитическим стрептококком.

I — характер корреляционных связей до заражения и после заражения дизентерией; II — до (контроль) и после троекратной иммунизации; III — после заражения иммунизированных обезьян; IV — до и после заражения неиммунизированных обезьян. — отрицательная корреляция; + положительная корреляция. Две линии —  $P < 0,05$ , три линии —  $P < 0,025$ , четыре линии —  $P < 0,01$ , пять линий —  $P < 0,005$ , шесть линий —  $P < 0,0025$ , семь линий —  $P < 0,0005$ .



сохраняется между содержанием КФК и АЛТ ( $\rho=0,7$ ;  $P < 0,05$ ), а также между уровнями КФК и АСТ ( $\rho=0,7$ ;  $P < 0,05$ ). После лечения эта зависимость исчезает (рис. 2).

У обезьян, иммунизированных гемолитическим стрептококком, сразу после 1-й и 2-й иммунизации выявлялась положительная корреляционная зависимость между активностью КФК и АСТ в сыворотке крови ( $\rho=0,05$ ,  $P < 0,05$ ). После 3-й иммунизации эта связь отсутствовала. У обезьян, зараженных гемолитическим стрептококком после иммунизации, корреляционная связь между уровнями 3 ферментов не выявлялась. У неиммунизированных обезьян после заражения гемолитическим стрептококком выявлялась обратная корреляционная связь между активностью аминотрансфераз и КФК. При этом корреляция была намного больше выражена между содержанием АСТ и КФК ( $\rho=0,83$ ;  $P < 0,0005$ ). Что касается изменений абсолютного уровня активности ферментов у этих обезьян, то отмечалось повышение только активности КФК. Таким образом, при заражении обезьян дизентерией концентрация КФК в сыворотке крови увеличивается. Продолжающееся увеличение этого показателя спустя длительное время

после заражения свидетельствует о наличии у обезьян патологического процесса в миокарде. У этих же обезьян отмечается снижение активности аминотрансфераз, уровень которых повышается во время лечения и нормализуется после его окончания. Определение активности КФК, АСТ и АЛТ в сыворотке крови у обезьян, зараженных дизентерией, может быть использовано для контроля за эффективностью проводимого лечения, а также для установления полного выздоровления обезьян.

Активность КФК в сыворотке крови у неиммунизированных обезьян после их заражения гемолитическим стрептококком увеличивается и продолжает оставаться на высоком уровне в отдаленные сроки после заражения (спустя 4 мес), что свидетельствует о наличии у животных патологического процесса.

Изучение корреляционных взаимоотношений между уровнями активности КФК, АСТ и АЛТ является весьма существенным дополнением к определению абсолютных величин этих показателей и позволяет установить наличие патологических изменений в организме обезьян, не определяемых обычным способом. Таким образом, проведение корреляционного анализа, по нашему мнению, расширяет возможности энзимодиагностики в случае заражения обезьян дизентерией и стрептококковой инфекцией.

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Разин П. С.* Материалы к патологической анатомии дизентерии у детей раннего возраста, леченных антибиотиками, и изучение их действия в эксперименте на животных. Дис. канд. Куйбышев, 1957.
2. *Титов М. Б.* Функция печени при острой дизентерии. Дис. канд. Львов, 1959.
3. *Фиженко-Болдырева Л. В.* — Сборник трудов Харьковск. НИИ вакцин и сывороток, 1955, т. 22, с. 21—32.
4. *Ганиев У. Г.* — В кн.: Вопросы инфекционной патологии Узбекистана. Ташкент, 1959, с. 88—95.
5. *Пиковер В. В.* Проницаемость капилляров при бактериальной дизентерии. Дис. канд. Фрунзе, 1955.
6. *Крюкова Э. В.* Геморрагический синдром при кишечных инфекциях. Дис. канд. Донецк, 1954.
7. *Степанов П. Н.* Хроническая дизентерия. Свердловск, 1947.
8. *Kiby S. A., Nollmann E. A.* — In: *The Enzymes*. New York, 1962, v. 6, p. 515.
9. *Келлер В., Джикидзе Э. К., Кюнемунд О.* и др. — Вестн. АМН СССР, 1977, № 8, с. 52—59.
10. *Рауш К., Кавтарадзе К. Н., Кетти И.* и др. — В кн.: Использование лабораторных животных в разработке, производстве и контроле биологических медицинских препаратов. М., 1976, с. 26—27.
11. *Покровский А. А., Аптекарь С. Г.* — В кн.: Биохимические методы исследования в клинике. М., 1969, с. 129—130.
12. — Там же, 1969, с. 112—115.
13. *Гублер Е. В., Генкин А. А.* Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. Л., 1973.
14. *Сеппи И. В.* Дизентерия (Клиника, диагностика, лечение). М., 1963, с. 37—69.

Поступила 21/II 1979 г.

#### ACTIVITIES OF CREATINE PHOSPHOKINASE, ASPARTATE- AND ALANINE AMINOTRANSFERASES IN MONKEY BLOOD SERUM IN SOME INFECTIONS

*N. I. Lemondzhava, A. V. Trufanov*

Institute of Experimental Pathology and Therapy, Academy of  
Medical Sciences of the USSR, Sukhumi

An increase in creatine phosphokinase (CPK) activity as well as a decrease in activities of aspartate aminotransferase (AAT) and alanine aminotransferase (ALT) were observed in monkey blood serum under conditions of experimental infection of the animals with dysentery. Contrary to the non-immunized animals, the activity of CPK was increased but the activities of AAT and ALT were unaltered in blood serum of the immunized monkeys. Estimation of the enzymatic activity might be used for diagnosis of experimental dysentery and streptococcal infection.

И. П. Джея, А. И. Толейкис, А. К. Прашкявичюс

## ВЛИЯНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИНФАРКТА МИОКАРДА НА СКОРОСТЬ ОКИСЛЕНИЯ НАД·Н И 3-ОКСИБУТИРАТА В МИТОХОНДРИЯХ СЕРДЦА

Лаборатория биохимии Научно-исследовательского института физиологии и патологии сердечно-сосудистой системы, кафедра биологической и органической химии Каунасского медицинского института

Для сердечной мышцы кетонные тела являются более предпочтительным субстратом окисления, чем жирные кислоты и глюкоза [1, 2]. 3-Оксибутират в сердце окисляется под действием 3-оксибутиратдегидрогеназы, прочно связанной с внутренней мембраной митохондрий [3].

В нашей лаборатории было показано, что при экспериментальном инфаркте миокарда (ЭИМ) [4] и аутолизе [5] скорость окисления 3-оксибутирата в митохондриях сердца значительно снижается. По данным авторов [6], скорость окисления 3-оксибутирата в митохондриях сердца при атеросклеротической ишемии миокарда снижается в большей степени по сравнению с другими НАД-зависимыми субстратами. Активность 3-оксибутиратдегидрогеназы при аутолизе уменьшается быстрее, чем активность других дегидрогеназ [7]. Однако причины этих изменений оставались неясными.

Настоящая работа посвящена изучению возможных механизмов снижения скорости окисления 3-оксибутирата в митохондриях сердца при ЭИМ.

### Методика

В работе были использованы кролики массой 2,5—3,5 кг. ЭИМ воспроизводили временной окклюзией (60 мин) передней нисходящей ветви левой венечной артерии [8, 9]. Операции производили под тиопенталовым наркозом. Степень ишемии контролировали электрокардиографически. Митохондрии выделяли в среде, содержащей 0,3 М сахарозу и 0,01 М ЭДТА рН 7,5. Осадок митохондрий суспендировали в среде 0,3 М сахарозы и 0,02 М трис-НСI рН 7,5.

Скорость потребления кислорода митохондриями регистрировали полярографически. Среда инкубации содержала 0,25 М сахарозу, 0,01 М КСI, 0,005 М  $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_4$  и 0,001 М ЭДТА рН 7,2. Концентрации субстратов и других добавок были следующие: 10 мМ 3-оксибутират, 0,4 мМ АДФ, 0,4 мкМ карбонилцианидхлорфенилгидразон и 0,9—1,1 мг/мл белка митохондрий. При изучении скорости окисления НАД·Н в среду добавляли 1,2 мМ АДФ, затем митохондрии и, когда истощались эндогенные субстраты, 2 мМ НАД·Н.

Активность 3-оксибутиратдегидрогеназы измеряли, как описано [10] с некоторыми модификациями. Суспензию выделенных митохондрий (35—45 мг/мл белка) разводили до концентрации белка 1,25 мг/мл средой, содержащей 50 мМ трис-НСI рН 8,2, и подвергали ультразвуковой обработке в два цикла по 15 с с интервалом 1 мин между ними на ультразвуковом диспергаторе УЗДН-1 УН.2 (сила тока 0,3 А, частота 22 кГц) при охлаждении в сосуде со льдом. Инкубационная смесь для определения активности 3-оксибутиратдегидрогеназы содержала 50 мМ трис-НСI рН 8,2, 6 мМ дитиотрейтол, 3% этанол, 2 мМ НАД, 0,3 мкМ ротенон и 0,125 мг/мл белка разрушенных ультразвуком митохондрий. Реакцию начинали добавлением 20 мМ 3-оксибутирата. Скорость образования НАД·Н измеряли на спектрофотометре «Specord UV Vis» при 340 нм. Коэффициент молярной экстинкции для НАД·Н принимали равным  $6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  [11].

Белок определяли биуретовым методом [12] с применением диэтилового эфира для экстракции малорастворимых в детергентах нейтральных липидов [13]: в пробирку вносили 0,05 мл суспензии митохондрий, добавляли 0,95 мл 0,33% дезоксихолата и инкубировали в термостате в течение 5 мин при 37 °С. Затем добавляли 4 мл биуретового реактива [12] и снова инкубировали в течение 15 мин при 37 °С. После этого наливали 4 мл диэтилового эфира, пробирку закрывали пробкой, энергично встряхивали в течение 2 мин и центрифугировали на центрифуге ЦЛК-1 в течение 3 мин при 1000 об/мин. Верхний слой эфира отсасывали и измеряли оптическую плотность водного слоя на ФЭК-56 М (фильтр № 5) против контроля. В контрольную пробирку вносили 2 мл 0,33% дезоксихолата и 8 мл биуретового реактива. Диэтиловым эфиром ее не экстрагировали. Концентрацию белка вычисляли по калибровочному графику, построенному с использованием альбумина сыворотки человека.

При оценке результатов исследований применяли критерий *t* Стьюдента. Статистически достоверными считали результаты при  $P < 0,05$ .

Таблица 1  
Влияние ЭИМ на скорость окисления 3-оксибутирата и параметры окислительного фосфорилирования в митохондриях сердца

Условия опытов	Число опытов	Зона сердца	$V_2$	$V_3$	$V_4$	$V_5$	$V_3/V_2$	$V_3/V_4$	АДФ/О
Контроль 1 сут после ЭИМ	5	—	$18,9 \pm 1,78$	$258 \pm 27,4$	$20,1 \pm 1,17$	$260 \pm 26,6$	$13,6 \pm 0,65$	$12,6 \pm 0,69$	$2,98 \pm 0,08$
	6	Интактная Инфарктная	$21,5 \pm 1,83$ $32,7 \pm 3,35$ -73,0% <0,01	$250 \pm 17,6$ $145 \pm 12,9$ -44,0% <0,01	$23,8 \pm 1,97$ $38,0 \pm 1,63$ +89,1% <0,001	$263 \pm 15,6$ $158 \pm 13,2$ -39,0% <0,01	$11,8 \pm 0,65$ $4,68 \pm 0,59$ -65,6% <0,001	$10,6 \pm 0,48$ $3,83 \pm 0,34$ -69,6% <0,001	$2,94 \pm 0,07$ $2,33 \pm 0,09$ -22,0% <0,002
P									

Примечание. Здесь и в табл. 2, скорость окисления выражена в наномолах кислорода в 1 мин на 1 мг, процентные изменения даны по сравнению с контролем;  $V_2$  — скорость окисления в присутствии субстрата до добавления АДФ,  $V_3$  — после добавления АДФ,  $V_4$  — после окончания фосфорилирования АДФ,  $V_5$  — скорость разобщенного дыхания.

## Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены данные о влиянии ЭИМ на скорость окисления 3-оксибутирата и параметры окислительного фосфорилирования. Как видно из представленных данных, в митохондриях из инфарктной зоны сердца значительно увеличивается скорость окисления  $V_2$  и  $V_4$ , причем увеличение  $V_4$  выражено в большей степени, чем  $V_2$ . Скорость  $V_3$  и  $V_5$  снижается почти в одинаковой степени. В митохондриях инфарктной зоны значительно снижается дыхательный контроль как по Ларди ( $V_3/V_2$ ), так и по Чансу ( $V_3/V_4$ ). Больше увеличение скорости  $V_4$ , чем  $V_2$ , и соответственно большее снижение соотношения  $V_3/V_4$ , чем  $V_3/V_2$ , вероятно, связано с активацией митохондриальной АТФ-азы. Часто используемый коэффициент дыхательного контроля по Чансу следует интерпретировать с осторожностью, так как его изменение может быть связано с активацией митохондриальной АТФ-азы. Таким образом, дыхательный контроль по Ларди более объективно отражает состояние сопряженности окислительного фосфорилирования.

Коэффициент АДФ/О в митохондриях из инфарктной зоны сердца изменяется в меньшей степени, чем другие параметры (табл. 1). Увеличение скорости  $V_2$  и снижение коэффициентов  $V_3/V_2$  и АДФ/О свидетельствуют, что при ЭИМ значительно нарушается сопряженность окислительного фосфорилирования. Как показали наши предыдущие исследования [14], сниженная способность митондриев из инфарктной зоны сердца трансформировать энергию в значительной мере обусловлена увеличением  $H^+$ -проводимости внутренней мембраны. В свою очередь  $H^+$ -проводимость внутренней мембраны может увеличиваться под действием фосфолипаз [15] и продуктов перекисного окисления липидов [16].

В митохондриях из интактной зоны сердца не обнаружено статистически достоверных изменений по сравнению с контролем (см. табл. 1), хотя обнаружена тенденция к увеличению скорости  $V_2$  и  $V_4$  и снижению коэффициентов дыхательного контроля  $V_3/V_2$  и  $V_3/V_4$ .

В дальнейших опытах была предпринята попытка выяснить, что обуславливает снижение максимальной скорости ( $V_5$ ) окисления 3-оксибутирата в митохондриях из инфарктной зоны сердца. Возможными факторами, лимитирующими окисление 3-оксибутирата в поврежденных ЭИМ митохондриях, могли быть следующие: нарушение транспорта электронов в дыхательной цепи; снижение активности 3-оксибутиратдегидрогеназы; снижение содержания НАД в митохондриях; нарушение транспорта 3-оксибутирата в митохондриях.

Т а б л и ц а 2

Влияние ЭИМ на активность 3-оксибутиратдегидрогеназы и скорость окисления НАД·Н и 3-оксибутирата+НАД в митохондриях сердца

Условия опытов	Число опытов	Зона сердца	Активность 3-оксибутиратдегидрогеназы, нмоль НАД·Н/мин/мг	Скорость окисления 3-оксибутирата+НАД (1 мМ)	Скорость окисления НАД·Н	
					$V_3$	$V_5$
					интактные митохондрии	митохондрии, разрушенные ультразвуком
Контроль 1 сут после ЭИМ	5 6	—	195±11,2	276±23,4	215±18,2	564±38,8
		Интактная	185±10,4	302±10,8	206±21,3	425±28,5 -24%
P		Инфарктная	146±6,43 -25% <0,001	199±11,8 -27,9% <0,05	186±14,9	308±21,2 -45,4% <0,001

П р и м е ч а н и е. Суспензию выделенных митохондрий разводили 4 раза средой, содержащей 0,25 М сахарозу; 0,01 М КСl, 0,005 КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>, 0,001 М ЭДТА, рН 7,2 и подвергали ультразвуковой обработке (см. методику).

Исследования показали, что выделенные в наших условиях опытов интактные митохондрии сердца кролика окисляют добавленный НАД·Н со значительной скоростью (табл. 2). Окисление полностью блокировалось ротеноном. Последующее добавление цитохрома с индуцировало лишь незначительное окисление НАД·Н. Это свидетельствует, что окисление экзогенного НАД·Н происходит через НАД·Н-оксидазную систему внутренней мембраны, а активность НАД·Н-цитохром *b*<sub>5</sub>-редуктазной системы в наружной мембране митохондрий сердца [17, 18] выражена незначительно.

Дыхательный контроль при окислении НАД·Н был приблизительно равен 1,5. Разрушенные ультразвуком интактные митохондрии окисляли НАД·Н в 2,6 раза быстрее, чем неразрушенные (см. табл. 2). Эти данные свидетельствуют, что часть экзогенного НАД·Н может проникать в митохондрии, хотя и с недостаточной скоростью для обеспечения максимальной активности НАД·Н-оксидазы.

Полученные нами результаты согласуются с данными литературы [20--22], которые показывают, что в отличие от митохондрий печени [19] митохондрии сердца окисляют экзогенный НАД·Н со значительной скоростью. Причины сравнительно большой скорости окисления экзогенного НАД·Н интактными митохондриями сердца неясны, так же как и вопрос об осуществлении этого процесса *in vivo*.

Как видно из табл. 2, при ЭИМ скорость окисления НАД·Н в неразрушенных митохондриях их инфарктной зоны сердца значительно не изменяется. В разрушенных ультразвуком митохондриях выявляются более четкие различия между интактными и поврежденными ЭИМ митохондриями. Статистически достоверные изменения наблюдаются также в митохондриях из интактной зоны сердца (см. табл. 2). Если сравнить скорость окисления НАД·Н в разрушенных ультразвуком митохондриях из инфарктной зоны сердца (см. табл. 2) с максимальной скоростью окисления 3-оксибутирата в тех же митохондриях (см. табл. 1), то можно сделать вывод, что перенос элек-

тронов в дыхательной цепи не может лимитировать скорость окисления 3-оксибутирата.

Добавление в инкубационную среду НАД (см. табл. 2) увеличивает максимальную скорость окисления 3-оксибутирата в поврежденных ЭИМ митохондриях и снижает разницу между контролем и опытом. Полного восстановления скорости окисления не происходит. Данный эксперимент показывает существование недостатка НАД в митохондриях из инфарктной зоны сердца. Это согласуется с данными других авторов [23, 24], показавших, что в инфарктной зоне сердца содержание НАД значительно снижается. Снижение содержания НАД в поврежденных ЭИМ митохондриях может быть обусловлено выходом НАД в комплексе с  $Ca^{2+}$  из дезэнергизованных митохондрий [17] и последующим разрушением НАД-глюкогидролазой [25]. Как было показано [24], активность НАД-глюкогидролазы в инфарктной зоне не изменяется, но ишемическая дезорганизация клетки способствует расщеплению НАД этим ферментом.

Как видно из табл. 2, в митохондриях из инфарктной зоны сердца снижается активность 3-оксибутиратдегидрогеназы. Видно, что скорость окисления 3-оксибутирата в поврежденных ЭИМ митохондриях (см. табл. 1) снижается в гораздо большей степени, чем активность 3-оксибутиратдегидрогеназы (см. табл. 2). Неспособность добавленного НАД полностью восстановить скорость окисления 3-оксибутирата в митохондриях инфарктной зоны сердца (см. табл. 2) может быть связана со снижением активности 3-оксибутиратдегидрогеназы.

Известно, что 3-оксибутиратдегидрогеназа является мембранным ферментом и ее активность зависит от фосфолипидного окружения в мембране [3, 10]. Снижение ее активности при ЭИМ (см. табл. 2) может быть связано с изменением фосфолипидного окружения в мембране [15].

Снижение концентрации субстрата в инкубационной среде до 5 мМ (вместо 10 мМ) не изменяет максимальной скорости окисления 3-оксибутирата (данные не представлены). Это свидетельствует, что транспорт 3-оксибутирата через митохондриальную мембрану не является лимитирующим звеном его окисления.

Полученные данные свидетельствуют, что при ЭИМ снижение максимальной скорости окисления 3-оксибутирата в митохондриях из инфарктной зоны сердца в первую очередь связано со снижением содержания НАД. При добавлении НАД скорость окисления 3-оксибутирата, вероятно, лимитируется активностью 3-оксибутиратдегидрогеназы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Olson R. E. — Nature, 1962, v. 195, p. 597.
2. Bassenge E., Wendt V. E., Schollmeyer P. et al. — Am. J. Physiol., 1965, v. 208, p. 162.
3. Lehninger A. L., Sudduth H. C., Wise J. B. — J. biol. Chem., 1960, v. 6, p. 373.
4. Толейкис А. И., Гудонавичене К. Л., Прашклявичюс А. К. — Кн.: Биофизика мембран. Каунас, 1973, с. 606.
5. Джея П. П., Кальвенас А. А., Баласявичюс Р. В. — В кн.: Теоретические и практические аспекты ишемической болезни сердца и артериальной гипертонии. М., 1977, вып. 1, с. 88.
6. Skinner F. P., Scott R. F., Morrison E. S. et al. — J. molec. cell. Cardiol., 1973, v. 5, p. 515.
7. Zimmerman H. — Acta histochem. (Jena), 1961, Bd 111, Suppl., S. 164.
8. Косицкий Г. И. — В кн.: Московский мед. ин-т. 2-й. Научная конф. по проблеме «Атеросклероз, коронарная недостаточность». Материалы. М., 1963, с. 27.
9. Виткис А. С. Экспериментальный инфаркт миокарда, эффективность его предупреждения и стимуляция восстановительных процессов. Дис. докт. Каунас, 1968.
10. Sekuzu J., Jurishuk P., Green D. E. — J. biol. Chem., 1963, v. 218, p. 975.
11. Kornberg A., Horecker B. L. — Biochem. Prep., 1953, v. 3, p. 27.
12. Gornal A. G., Bardawill C. J., David M. M. — J. biol. Chem., 1949, v. 177, p. 751.
13. Layne E. — Meth. Enzymol., 1957, v. 3, p. 447.
14. Джея П. П., Толейкис А. И., Барткене В. С. и др. — В кн.: Проблемы ишемической болезни сердца. Вильнюс, 1976, с. 281.
15. Сороковой В. И., Владимиров Ю. А. — В кн.: Биофизика. М., 1975, т. 5, с. 12.
16. Владимиров Ю. А., Оленев В. И., Суслова Т. Б. и др. — Там же, с. 56.
17. Лейкин Ю. Н., Виноградов А. Д. — В кн.: Митохондрии. М., 1974, с. 55.

18. Hadman R., Suranyi E. M., Luft R. et al. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1962, v. 8, p. 314.
19. Lehninger A. L. — J. biol. Chem., 1951, v. 190, p. 345.
20. Arcos J. C., Argus M. F., Sardesai V. M. et al. — Biochemistry (Wash.), 1964, v. 3, p. 2041.
21. Boxer G. E., Devlin T. M. — Science, 1961, v. 134, p. 1495.
22. Rasmussen U. F. — FEBS Letters, 1969, v. 2, p. 157.
23. Фролькис Р. А., Лихтенштейн И. Е. — Пат. физиол., 1975, № 2, с. 13.
24. Nunez R., Calva E., Marsch M. et al. — Am. J. Physiol., 1976, v. 234, p. 1173.
25. Приходько А. З., Цейтлин Л. А., Северин С. Е. — Биохимия, 1974, т. 39, с. 123.

Поступила 24/VII 1979 г.

## EFFECT OF EXPERIMENTAL MYOCARDIAL INFARCTION ON THE RATE OF NADH AND 3-HYDROXYBUTYRATE OXIDATION IN HEART MITOCHONDRIA

*P. P. Dzheya, A. I. Toleykis, A. K. Prashkyavichus*

Institute of Physiology and Pathology of Cardiovascular System, Medical School, Kaunas

The rate of oxidation of NADH and 3-hydroxybutyrate was studied in heart mitochondria after short-term (60 min) occlusion of coronary artery and the subsequent reperfusion. Addition of NAD increased the rate of 3-hydroxybutyrate oxidation, lowered in mitochondria of impaired tissue, but no complete restoration occurred. The 3-hydroxybutyrate dehydrogenase activity was decreased by 25%. The rate of NADH oxidation in ultrasonicated mitochondria from the infarction zone exceeded 2-fold the rate of 3-hydroxybutyrate oxidation. These data suggest that deficiency of NAD limited primarily the rate of 3-hydroxybutyrate oxidation in heart mitochondria under conditions of experimental myocardial infarction. The level of 3-hydroxybutyrate dehydrogenase activity appears to restrict the rate of 3-hydroxybutyrate oxidation after addition of NAD.

УДК 615.272.4:577.152.1].015.4:612.397.81

*В. В. Слободская, А. В. Титов, И. М. Терешин*

## ГИПОХОЛЕСТЕРИНЕМИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ХОЛЕСТЕРИНОКСИДАЗЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Всесоюзный научно-исследовательский технологический институт антибиотиков и ферментов, Ленинград

В настоящее время имеется большое число гипохолестеринемических средств, воздействующих на разные стороны обмена холестерина [1], однако они далеко не всегда оказывают нормализующее действие на уровень холестерина при гиперхолестеринемии. Учитывая распространенность атеросклероза и важную роль холестерина в развитии этого заболевания [2, 3], поиск средств и способов снижения уровня холестерина в крови является одной из актуальных задач современной медицины.

Одним из возможных путей снижения содержания холестерина в крови может явиться окисление его в холестерон посредством холестериноксидазы, которая продуцируется некоторыми микроорганизмами [4,5]. Этот фермент окисляет холестерин не только в водных растворах в присутствии детергентов [4,6], но и в сыворотке крови человека [7], а также в гомогенатах атеросклеротически измененной аорты человека [8].

Основываясь на этих данных, мы исследовали возможность нормализации уровня холестерина в крови посредством холестериноксидазы при экспериментальной гиперхолестеринемии.

### Методика

В опытах использовали препараты холестериноксидазы, выделенные из мицелия *Actinomyces lavendulae* во Всесоюзном научно-исследовательском технологическом институте антибиотиков и ферментов. Растворы фермента активностью 2 Е на 1 мг белка хранили на холоду. Активность препаратов определяли по [9], принимая за 1 Е такое количество фермента, которое при 25 °С окисляет 1 мкмоль холестерина за 1 мин.

При изучении окисления холестерина в сыворотке крови к 1 мл сыворотки добавляли растворы фермента до конечной концентрации 0,008—0,064 Е/мл. Пробы инкубировали в течение 2 ч при 37 °С [4], после чего определяли содержание холестерина по [10]. В качестве контроля служили сыворотки, к которым добавляли раствор фермента, инактивированного нагреванием.

Опыты *in vivo* ставили на 40 морских свинках с гиперхолестеринемией и 18 голубях. Гиперхолестеринемию вызывали добавлением к обычному рациону вивария в течение 30—45 сут по 1 желтку куриного яйца на животное в день. Животных разделили на две равные группы. Голубям опытных групп фермент вводили внутривенно, морским свинкам — внутримышечно в дозах 0,6—0,3 Е на животное. В контрольных группах вводили 0,85% NaCl. Холестерин в сыворотке крови определяли по Баумену и Вольфу [10]. Результаты опытов подвергали статистической обработке по Стьюденту — Фишеру [11].

## Результаты и обсуждение

Результаты проведенных опытов показали, что добавлением холестериноксидазы к сыворотке крови человека снижает в ней уровень холестерина (табл. 1), что согласуется с данными Имшенецкого и соавт. Степень

Таблица 1  
Окисление холестерина в сыворотке крови при добавлении холестериноксидазы и инкубации проб в течение 2 ч при 37 °С

Источник сыворотки	Количество холестериноксидазы, Е/мл	Содержание холестерина, мг на 100 мл		
		инактивированный фермент	активный фермент	изменение
Человек	0,008	232±12	221±9	-11
	0,016	232±12	208±7	-24
	0,032	232±12	190±9	-42
	0,064	232±12	176±7	-56
Интактный голубь	0,016	165±6	152±5	-13
Голубь с гиперхолестеринемией	0,016	296±7	272±14	-24
Интактная морская свинка	0,016	64±3	58±2	-6
Морская свинка с гиперхолестеринемией	0,016	242±10	186±8	-56

Примечание. Величины являются средними из 5—6 опытов.

окисления холестерина находилась в прямой зависимости от концентрации фермента в реакционной смеси. При добавлении холестериноксидазы в количестве 0,008 Е/мл уровень холестерина снизился на 20 мг на 100 мл, а при увеличении концентрации до 0,064 Е/мл — на 65 мг на 100 мл. Холестериноксидаза окисляла холестерин и в сыворотке крови животных. Добавление одинаковых количеств фермента к сыворотке интактных животных и морских свинок с гиперхолестеринемией приводило к неодинаковому снижению уровня холестерина (см. табл. 1). В то время как при добавлении фермента (0,016 Е/мл) к сыворотке интактных животных содержание холестерина снижалось только на 6—13 мг на 100 мл %, в сыворотке животных с гиперхолестеринемией оно уменьшалось на 24—56 мг на 100 мл.

Эксперименты с сывороткой крови давали основание предположить, что гипохолестеринемическое действие холестериноксидазы более выражено у животных с высоким уровнем холестерина в крови. В I серии опытов на голубях исходный уровень холестерина значительно (в 6 раз) превосходил его концентрацию у интактных животных. Однократное внутривенное введение фермента вызывало снижение содержания холестерина в крови (табл. 2), а в результате двукратного введения уровень холестерина снизился в среднем на 44%. У животных контрольной группы также содержащихся на обычном рационе вивария, но не получавших фермента, уровень холестерина в крови также снизился, однако степень этого снижения была значительно меньшей (16% по отношению к исходным величинам).

Во II серии опытов на голубях исходный уровень холестерина (230 мг на 100 мл) был значительно ниже, чем в I. В результате двукратной инъекции фермента содержание холестерина в крови снизилось и приближалось

к норме (см. табл. 2), в то время как в контрольной группе оно оставалось повышенным (209 мг на 100 мл).

В опытах на морских свинках вначале была испытана доза 0,6 Е фермента на животное. Уровень холестерина в крови после однократного и двукратного введения препарата в такой дозе снизился, однако при этом наблюдалась гибель животных. После первой инъекции погибло 1 животное из 4, а после второй — еще 2. Эти результаты указывали на то, что доза, равная 0,6 Е на животное, является токсичной.

Таблица 2

Влияние внутривенного введения холестериноксидазы на уровень холестерина в крови голубей с гиперхолестеринемией

Группа животных	Число животных	Содержание холестерина, мг на 100 мл			Изменение уровня холестерина, %
		до введения	число инъекций		
			1	2	
Опытная	5	915±158	582±117	505±98	-44±3*
Контрольная	4	960±270	845±240	790±220	-16±6
Опытная	5	230±32	176±8	155±12	-33±5*
Контрольная	4	235±28	221±22	209±16	-11±2

\* Различия между опытной и контрольной группой статистически значимы ( $P < 0,05$ ).

Доза фермента 0,3 Е на животное не вызывала их гибели в течение 30 сут наблюдения после 2—6 инъекций препарата. Двукратное введение препарата в этой дозе животным с гиперхолестеринемией вызывало снижение уровня холестерина в крови на 16% по сравнению с исходным; в контрольной группе оно составляло 3% (табл. 3). Увеличение кратности введения до 4 увеличило степень снижения содержания холестерина до 30%. У животных контрольной группы, не получавших фермента, за этот срок уровень холестерина снизился на 13%.

Таблица 3

Содержание холестерина в крови морских свинок с гиперхолестеринемией под влиянием внутримышечного введения холестериноксидазы (0,3 Е на животное)

Группа животных	Число животных	Содержание холестерина, мг на 100 мл					Изменение уровня холестерина, %	
		до введения	число инъекций					
			1	2	3	4		5
Опытная	8	385±32	344±26	325±21	—	—	—	-16±4*
Контрольная	8	370±26	363±25	358±23	—	—	—	-3±2
Опытная	8	416±22	346±25	308±28	281±23	264±16	—	-36±3*
Контрольная	6	230±17	210±15	216±20	200±7	200±12	—	-13±2
Опытная	5	150±17	140±13	—	98±12	—	85±11	-43±5*
Контрольная	5	140±11	134±12	—	110±12	—	121±12	-13±3

\* Различия между опытной и контрольной группой статистически значимы ( $P < 0,05$ ).

Последняя серия опытов была проведена на животных, у которых уровень холестерина в крови превышал его концентрацию у интактных животных в 2 раза. В результате 5-кратного введения фермента уровень холестерина в крови снизился в среднем на 43%, в то время как в контрольной группе на 13%. При этом у 2 животных опытной группы содержание холестерина в крови достигло нормального уровня, а у 3 из 5 приблизилось к нему.

Результаты проведенных опытов показывают, что холестериноксидаза, выделенная из *Actinomyces lavendulae*, окисляет холестерин в сыворотке крови не только человека, но и исследованных нами животных. Степень окисления холестерина находится в прямой зависимости от исходного уровня холестерина. В сыворотке крови животных с гиперхолестеринемией

окисляется значительно большее количество холестерина, чем в сыворотке интактных животных. Эти различия можно объяснить тем, что холестериноксидаза окисляет только незэтерифицированный холестерин [12], которого у животных с гиперхолестеринемией больше, чем у интактных [13].

В опытах *in vivo* на двух видах животных были получены результаты, однозначно указывающие на то, что под влиянием холестериноксидазы уровень холестерина в крови при гиперхолестеринемии снижается. Степень его снижения находится в прямой зависимости от длительности применения фермента. Посредством относительно небольшого числа инъекций удается нормализовать или приблизить к норме уровень холестерина в крови животных с гиперхолестеринемией. Следует отметить, что использованные нами препараты холестериноксидазы недостаточно устойчивы при комнатной температуре. Вероятно, они малоустойчивы и в организме. Есть основание полагать, что повышение устойчивости фермента приведет к усилению его гипохолестеринемического действия.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Машковский М. Д. Лекарственные средства. М., 1977.
2. Мясников А. Л. Атеросклероз. М., 1960.
3. Фенотипирование гиперлипопротендемии / Климов А. Н., Никульчева Н. Г., Маграчева Е. Я. и др. М., 1975.
4. Никитин Л. Е. Разложение холестерина микобактериями. Дис. канд. М., 1971.
5. Жукова А. И., Козлова В. К. — Микробиология, 1970, т. 39, с. 428.
6. Smith A. G., Brooks C. J. N. — J. Chromatogr., 1974, v. 101, p. 373.
7. Ившенецкий А. А., Ефимочкина Е. Ф., Никитин Л. Е. и др. — Докл. АН СССР, 1965, т. 161, с. 701.
8. Ившенецкий А. А., Ефимочкина Е. Ф., Назарова Т. С. и др. — Там же, 1969, т. 186, с. 205.
9. Roschlau P., Bernt E., Gruber W. — Z. klin. Chem. klin. Biochem., 1974, Bd 12, S. 403.
10. Bowmen R., Wolf R. C. — Clin. Chem., 1962, v. 8, p. 302.
11. Бельский М. А. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Л., 1973.
12. Takayuki Uwajima, Hitoshi Nagi, Osamu Terada. — J. agricult. biol. Chem., 1974, v. 38, p. 1149.
13. Ловягина Т. И. Липопротеиды и атеросклероз. Дис. докт. Л., 1974.

Поступила 8/IV 1979 г.

#### HYPOCHOLESTEROLEMIC EFFECT OF CHOLESTEROL OXIDASE IN VITRO

V. V. Slobodskaya, A. V. Titov, I. M. Tereshin

All-Union Technologic Institute of Antibiotics and Enzymes,  
Leningrad

Cholesterol oxidase, isolated from *Actinomyces lavendulae*, oxidized cholesterol in blood serum of guinea-pigs and pigeons *in vitro*. The rate of oxidation was distinctly higher in blood serum of hypercholesterolemic animals as compared with the controls. Parenteral administration of cholesterol oxidase (1 UN/kg) into hypercholesterolemic animals led to a decrease and normalization of the cholesterol content in blood.

А. Д. Таганович

## ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ АТФ-АЗЫ И СОДЕРЖАНИЯ НЕЭСТЕРИФИЦИРОВАННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В МИТОХОНДРИЯХ СЕРДЦА И ПЕЧЕНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ МИТРАЛЬНОГО КЛАПАНА

Кафедра биохимии Минского медицинского института

К настоящему времени достаточно подробно изучен метаболизм при хронической сердечно-сосудистой недостаточности как следствии изометрического типа гиперфункции сердца [1, 2]. При изотоническом типе, возникающем в случае всех клапанных пороков, изменения метаболизма изучены крайне недостаточно. Это связано с трудностями исследования обменных процессов миокарда и других органов и систем в клинике и моделирования клапанных пороков в эксперименте. Известно, что в основе развития хронической недостаточности кровообращения лежит нарушение энергетического обмена в миокарде [3—5]. В пользу этого свидетельствуют морфологические изменения в митохондриях сердца при этой патологии [6—8] и нарушение тканевого дыхания, а также сопряженного с ним процесса окислительного фосфорилирования [3]. В то же время активность митохондриальной АТФ-азы, являющейся важнейшим регулятором продукции и утилизации макроэргов в митохондриях [9], изучена недостаточно. В литературе имеются единичные работы, посвященные исследованию активности этого фермента при хронической недостаточности кровообращения [10, 11]. Основным энергетическим субстратом для митохондрий сердца являются неэстерифицированные жирные кислоты (НЭЖК) [3, 12]. По данным ряда исследователей, изменение их количественного и качественного состава может влиять на активность целого ряда мембраносвязанных ферментов [13—16].

Целью настоящей работы было исследование активности АТФ-азы и содержания НЭЖК в митохондриях сердца и печени при экспериментальном декомпенсированном пороке митрального клапана.

### Методика

Опыты проводили на кроликах-самцах массой 2,5—3,5 кг, содержавшихся на стандартной диете. Животным после интубации под тиопенталовым наркозом после вскрытия грудной клетки (по пятому межреберью слева) через верхушку левого желудочка вводили перфоратор и в створке митрального клапана проделывали два отверстия. Кроликов забивали через 2—3 мес после операции. В опытную группу было отобрано 8 кроликов с выраженной сердечно-сосудистой недостаточностью, о развитии которой судили по изменению ЭКГ, имеющейся тахикардии и тахипноэ, а на вскрытии — по наличию асцита и полнокровию внутренних органов. Контрольную группу составили животные, которым под наркозом производили вскрытие грудной клетки без перфорации створок митрального клапана.

Митохондрии сердца и печени выделяли обычным методом [17]. В них изучали следующие показатели: уровень НЭЖК [18], который выражали в микрограммах на 1 мг белка; активность эндогенной (латентной)  $Mg^{2+}$ -стимулируемой АТФ-азы, 2,4-динитрофенол (ДНФ)- и  $Mg^{2+}$ -ДНФ-стимулируемой АТФ-азы, определяемых по приросту  $P_H$  [19] за 3 мин инкубации при 37 °С. Состав инкубационной среды: 0,3 М сахараза, 0,1 М трис рН 7,4,  $2,5 \cdot 10^{-3}$  М  $MgCl_2$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$  М 2,4-ДНФ;  $2,3 \cdot 10^{-3}$  М АТФ, 0,8—2 мг митохондриального белка. Общий объем инкубационной среды составлял 1,05 мл. Активность АТФ-азы выражали в микроатомах  $P_H$  на 1 мг белка в 1 мин. Белок митохондрий определяли методом Лоури [20].

Полученные результаты обработаны статистически методом непрямых разностей.

### Результаты и обсуждение

В митохондриях сердца при хронической недостаточности кровообращения обнаружено снижение активности  $Mg^{2+}$ -стимулируемой АТФ-азы, 2,4-ДНФ- и  $Mg^{2+}$ -ДНФ-стимулируемой АТФ-азы, которое было статисти-

Таблица 1

Активность АТФ-азы (в мккатом на 1 мг белка в 1 мин) в митохондриях при хронической сердечно-сосудистой недостаточности

Орган	Латентная активность АТФ-азы		Активация Mg <sup>2+</sup>		Активация 2,4-ДНФ		Активация Mg <sup>2+</sup> +2,4-ДНФ	
	К	О	К	О	К	О	К	О
Сердце	0,108±0,008	0,099±0,016	0,170±0,016	0,113±0,005*	0,129±0,018	0,077±0,005*	0,243±0,014	0,166±0,013*
	0,046±0,015	0,051±0,005	0,106±0,005	0,100±0,006	0,044±0,005	0,037±0,003	0,121±0,005	0,140±0,015
Печень								

Примечание. \* Различия между опытной и контрольной группой статистически достоверны. К — контроль, О — опыт.

чески достоверным (табл. 1). Наиболее низкой была активность АТФ-азы при активации ДНФ (разница между НЭЖК и опытом 67%). Суммарное количество НЭЖК в митохондриях сердца увеличилось с 10,6 до 13 мкг на 1 мг белка (табл. 2).

В митохондриях печени подопытных животных наблюдалось снижение содержания НЭЖК с 7,9 до 6,49 мкг на 1 мг белка (см. табл. 2), при этом активность АТФ-азы не изменялась (см. табл. 1).

Согласно имеющимся представлениям [21, 22], митохондриальная АТФ-аза — это фермент, активируемый Mg<sup>2+</sup> и обладающий разными свойствами в различных условиях. В литературе часто упоминается об АТФ-азе, стимулируемой ДНФ, и АТФ-азе, стимулируемой Mg<sup>2+</sup>. Окончательных доказательств того, что митохондрии содержат более чем один белок, гидролизующий АТФ, пока не получено. При этом, помимо расщепления АТФ, этот фермент может синтезировать ее за счет электрохимического градиента протонов на мембране митохондрий [22, 23].

Хорошо известно, что АТФ-аза чувствительна ко многим физическим и химическим факторам, которые вызывают структурные изменения в митохондриальной мембране или в самом ферменте. Ее активность заметно ингибируют олигомицин [9, 21], избыток АДФ [21]. Ненасыщенные жирные кислоты также могут активировать АТФ-азу митохондрий [24]. По данным других авторов, они снижают активность этого фермента [25]. Показано [26], что действие жирных кислот на активность АТФ-азы зависит от их дозы. Так, линолеат в концентрации 0,08 мкМ незначительно стимулировал латентную АТФ-азу и подавлял АТФ-азу, активированную 2,4-ДНФ.

Следует отметить что НЭЖК вызывают различные нарушения состояния митохондрий и тканевого дыхания в печени, сердце и других органах: разобщение окислительного фосфорилирования, торможение транспорта через митохондриальную мембрану ряда метаболитов и катионов некоторых щелочных металлов [27], индуцированное высокоамплитудного набухания митохондрий [28]. Кроме того, известно, что НЭЖК ингибируют перенос электронов в дыхательной цепи, которое может быть снято добавлением в систему альбумина [27].

В последнее время появились работы, указывающие на влияние жирных кислот на другие мембраносвязанные ферменты, в том числе липидрастворимую мембраносвязанную Ca<sup>2+</sup>-АТФ-азу [14], Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФ-азу мозга крысы [13], АТФ-азу сердца [15, 16, 29]. Было установлено [29], что ингибирование зависит от концентрации и длины углеводородной цепочки жирных кислот. Ненасыщенные жирные кислоты в большей степени ингибируют АТФ-азу, чем насыщенные. Механизм подобного подавления активности, по мнению ав-

торов, является результатом конформационного изменения фермента [13], которое может быть вызвано в конечном счете изменением жидко-кристаллического состояния мембраны, в которую встроена АТФ-аза.

Нами обнаружено снижение активности  $Mg^{2+}$  стимулируемой АТФ-азы, 2,4-ДНФ- и  $Mg^{2+}$  + ДНФ-стимулируемой АТФ-азы в митохондриях сердца. Известно, что магний обеспечивает связывание АТФ с ферментом [28], следовательно, снижение чувствительности к магнию может быть обусловлено конформационными изменениями в области активного центра фермента. 2,4-ДНФ шунтирует поток протонов и снимает потенциал с митохондриальной мембраны [9], следовательно, обнаруженное снижение чувствительности к ДНФ может быть вызвано изменением структуры мембраны или мембранного потенциала в условиях сердечной недостаточности. В пользу последнего свидетельствует и выявленное увеличение содержания НЭЖК в митохондриях миокарда, которое может являться следствием обнаруженных деструктивных процессов в митохондриях сердца при его недостаточности [6—8]. В этом случае активация клеточного липолиза приведет к расщеплению фосфолипидов, входящих в состав мембран и молекулы АТФ-азы [30]. В свою очередь повышение уровня НЭЖК в митохондриях сердца может вызвать ингибирование АТФ-азы, что подтверждает данные, полученные *in vitro* о подавлении активности АТФ-азы жирными кислотами. В пользу последнего предположения свидетельствуют результаты, полученные нами в митохондриях печени подошвчатых животных, в которых активность АТФ-азы не изменилась, а количество свободных жирных кислот снизилось по сравнению с контролем.

Таким образом, при хронической недостаточности кровообращения, возникшей в результате порока митрального клапана, у кроликов в митохондриях сердца отмечается снижение активности  $Mg^{2+}$ -стимулируемой АТФ-азы, 2,4-ДНФ- и  $Mg^{2+}$  + ДНФ-стимулируемой АТФ-азы, а также увеличение количества НЭЖК. В митохондриях печени при этом обнаружено снижение уровня НЭЖК. Выявленные изменения могут свидетельствовать о нарушениях энергетического и липидного обмена при данной патологии, для выяснения причин которых необходимы дополнительные исследования.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Меерсон Ф. З. Гиперфункция. Гипертрофия. Недостаточность сердца. М., 1968.
2. Меерсон Ф. З. Адаптация сердца к большой нагрузке и сердечная недостаточность. М., 1975.
3. Степанян Е. П., Баркан И. П. Энергетика оперированного сердца. М., 1971.
4. Schwartz A., Lee K. — *Circulat. Res.*, 1962, v. 10, N 3, Pt 1, p. 321—332.
5. Wollenberger A., Kleitke B. G. — *Exp. molec. Path.*, 1963, v. 2, p. 251—260.
6. Волленбергер А., Шульце В. — В кн.: Физиология и патология сердца. М., 1963, с. 126—141.
7. Малиновский И. П., Шахламов В. А., Голованов Ю. П. и др. — *Арх. пат.*, 1971, № 3, с. 58—65.
8. Schwartz A., Sordahl L., McCollum W. — *Recent Advanc. Stud. cardiac Structure a. Metabolism*, 1972, v. 1, p. 12—18.
9. Скулачев В. П. Трансформация энергии в биомембранах. М., 1972.
10. Sulakhe P. V., Dhalla N. S. — *J. clin. Invest.*, 1971, v. 50, p. 1019—1027.
11. Swinghedaaw B., Bouveret P., Hatt P. Y. — *J. molec. cell. Cardiol.*, 1973, v. 5, p. 441—459.
12. Obie L. H. — *Am. Heart J.*, 1969, v. 77, p. 100—122.
13. Armed K., Thomas B. S. — *J. biol. Chem.*, 1971, v. 246, p. 103.
14. Furuyama S., Doi N., Sagiya H. et al. — *Life Sci.*, 1976, v. 19, p. 605.
15. Lamers J. M., Hulsmann W. C. — *J. molec. cell. Cardiol.*, 1977, v. 9, p. 34.

Т а б л и ц а 2

Содержание НЭЖК (в мкг на 1 мг белка) в митохондриях сердца и печени при хронической сердечно-сосудистой недостаточности

Группа животных	Сердце	Печень
Контрольная	10,67±0,34	7,90±0,31
Опытная	13,0±0,41*	6,49±0,3*

\* Различия статистически достоверны.

16. Wood J. M., Bush B., Pitts R. J. et al. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1977, v. 74, p. 677.
17. Hogeboom G. H., Shneider W. C., Palade G. H. — J. biol. Chem., 1948, v. 172, p. 259.
18. Falholff K., Lund B., Falholff W. — Clin. chim. Acta, 1973, v. 46, p. 45—111.
19. Kallner A. — Ibid., 1975, v. 59, p. 35—39.
20. Lowry O. H., Rosenbrough N. F., Farr A. L. et al. — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265—275.
21. Рэкер Э. Биоэнергетические механизмы. М., 1967.
22. Racker E. — Trends biochem. Sci., 1976, v. 1, p. 323—325.
23. Kagawa Y. — J. molec. cell Cardiol., 1977, v. 9, p. 20.
24. Cereijo-Santalo R. — Canad. J. Biochem., 1967, v. 45, p. 897—909.
25. Dow D. S. — Biochemistry (Wash.), 1967, v. 6, p. 2915.
26. Waattjes W. J., Van Den Bergh S. G. — In Energys Transductr, 1971, p. 413—419.
27. Шеев Т., Людвиг П., Панопорт С. — В кн.: Митохондрии. Аккумуляция энергии и регуляция ферментативных процессов. М., 1977, с. 18—23.
28. Ленинджер А. Митохондрия. Молекулярные основы структуры и функции. М., 1966.
29. Miller H. M., Woodhouse S. M. — Aus. J. exp. Biol. med. Sci., 1977, v. 55, p. 741—752.
30. Lenaz G. — Acta vitaminol. enzymol., 1973, v. 27, p. 62—95.

Поступила 22/III 1979 г.

#### ALTERATIONS IN ATPASE ACTIVITY AND IN CONTENT OF UNESTERIFIED FATTY ACIDS IN HEART AND LIVER MITOCHONDRIA UNDER CONDITIONS OF EXPERIMENTAL MITRAL VALVE INSUFFICIENCY

A. D. Taganovich

State Medical School, Minsk

Total content of unesterified fatty acids and activity of ATPases/latent, stimulated by  $Mg^{2+}$ , 2,4-DNP,  $Mg^{2+}$  and 2,4-DNP/were studied in heart and liver mitochondria of rabbits with decompensated mitral valvular disease. The activities of  $Mg^{2+}$ , DNP-,  $Mg^{2+}$  and DNP-stimulated ATPases were decreased in heart mitochondria. At the same time, content of unesterified fatty acids was increased. Content of the fatty acids was decreased in liver mitochondria and activity of ATPase was unaltered. Possible mechanisms of the alterations observed are discussed.

УДК 616.61-008.64-036.12-053.2-08:616-78-07:616.153.96-074

В. И. Гудим, П. Сигалла, В. С. Иванова, К. Олдаг

#### СОДЕРЖАНИЕ МОЛЕКУЛ СРЕДНЕЙ МАССЫ В КРОВИ ДЕТЕЙ С ХРОНИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ В УСЛОВИЯХ ЛЕЧЕНИЯ КРАТКОСРОЧНЫМ ГЕМОДИАЛИЗОМ

Патофизиологический отдел Центрального научно-исследовательского института гематологии и переливания крови, Москва, Детская клиника «Шарите» секции медицины Университета им. Гумбольдта, ГДР

Симптоматология уремического синдрома неоднозначна и включает следующие основные факторы: задержка воды и метаболитов, нарушение электролитного баланса и накопление большого количества так называемых уремических токсинов. Применять гемодиализа позволило уменьшать уремическую интоксикацию и тем самым улучшать состояние больных хронической почечной недостаточностью (ХПН).

К известным веществам, которые накапливаются при уремии в крови больных ХПН, принадлежат прежде всего низкомолекулярные (НМВ), такие как мочевины, креатинин, производные гуанидина, фенола, ароматических кислот, сульфаты и др. В последние годы в литературе широко дискутируется вопрос о роли веществ со средней молекулярной массой middle molecule (ММ 5000—500) в развитии уремического синдрома.

Так, было показано [1, 2], что хотя перитонеальный диализ малоэффективен в отношении удаления НМВ, у больных крайне редко наблюдались случаи проявления нейропатии. Очевидно, при перитонеальном диализе удаляются вещества с более высокой ММ, чем при гемодиализе. Высокую реабилитацию у больных с ХПН можно достигнуть увеличением проницае-

мости мембраны и удлинением времени гемодиализа, что также способствует более полному удалению ММ [3, 4].

Задачей данного исследования является изучение концентрации ММ в крови детей и подростков в условиях регулярного краткосрочного гемодиализа и сравнение этого уровня с концентрацией ММ в крови здоровых доноров.

### Методика

Исследовали сыворотку 18 детей и подростков ХПН с терминальной стадией заболевания почек (креатинин  $11,6 \pm 1,3$  мг%; мочевина  $77,6 \pm 18,5$  мг%) в возрасте от 3 до 17 лет. Все они получали курс гемодиализа в клинике «Шарите» (ГДР) (2—4 ч 3 раза в неделю; капиллярный диализатор HF АК-4 с диализующей поверхностью  $1,3 \text{ м}^2$ ). Сыворотку собирали до и после гемодиализа, хранили при  $-20^\circ\text{C}$  до момента использования. В качестве контроля была использована сыворотка 9 здоровых взрослых доноров.

Фракцию ММ выделяли ультрафильтрацией и гель-хроматографией. Для ультрафильтрации применяли пластины ХМ 50 (фирма «Амикон»). Ультрафильтраты ( $\text{ММ} < 50\ 000$ ) подвергали гель-хроматографии на сефадексе G-25 фирмы «Фармация» с использованием колонки  $2,6 \times 100$  (фирма ЛКБ). В качестве элюирующего раствора применяли трис-НСl ( $0,05 \text{ М} + 0,1 \text{ М КСl}$ , pH 7,5;  $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$  буфер  $0,025 \text{ М}$  pH 7,4 и  $0,02 \text{ М}$  раствор NaCl pH 7,4). С помощью насоса (ДС-2, VEB Mi.W, Leipzig) получали постоянную скорость элюции  $1,4 \text{ мл/мин}$ . На колонку наносили образец ультрафильтрата объемом 5 мл, соответствующий 5—20 мл сыворотки. Фракции собирали по 6,7 мл при помощи коллектора фирмы ЛКБ Ultrac-7000. Измеряли коэффициент экстинкции отдельных фракций при длине волны 210 нм на Specord UV—Vis (VEB, Carl Zeiss, Jena) или спектрофотометре Perkin — Elmer-402. Во фракциях, полученных по адсорбционной кривой, рассчитывали соотношение  $V_3/V_0$  и коэффициент  $K_d$  и сравнивали эти величины с соответствующими величинами веществ-маркеров: голубого декстрана (ММ — 2 000 000), бацитрацина (1450 д), витамина  $\text{B}_{12}$  (1350 д) и мочевой кислоты (195 д). Белок определяли по калибровочной кривой, построенной по альбумину (VEB, Berlin—Chemie) в разведении 1, 2, 4, 6 и 8 мг% при измерении коэффициента экстинкции в ультрафиолетовой области (длина волны 210 нм). Линейная зависимость была получена в 1—6 мг% белка.

### Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены хроматограммы разделения на сефадексе G-25 уремической сыворотки до и после гемодиализа, а также сыворотки здоровых доноров и веществ-маркеров. Получены качественно аналогичные

Таблица 2

Коэффициенты $V_3/V_0$ и $K_d$ для фракций и веществ-маркеров	$V_3/V_0$	$K_d$	Число опытов	F <sub>3</sub> , мг %		$\Delta$ , %	Время диализа, Г	$\Delta$ , % в 1 ч
				до гемодиализа	после гемодиализа			
Бацитрацин	$1,663 \pm 0,025$	$0,167 \pm 0,006$	2	165	104	37	3,0	12
Витамин $\text{B}_{12}$	$2,072 \pm 0,088$	$0,294 \pm 0,032$	8	127	99	22	2,5	9
Мочевая кислота	$3,863 \pm 0,291$	$0,777 \pm 0,133$	5	149	62	58	4,0	15
F <sub>1</sub>	$1,293 \pm 0,079$	$0,080 \pm 0,021$	22	158	97	39	3,5	11
F <sub>3а</sub>	$2,047 \pm 0,200$	$0,290 \pm 0,054$	16	160	90	44	3,5	13
F <sub>3в</sub>	$2,448 \pm 0,268$	$0,404 \pm 0,075$	15	190	150	21	2,0	11
F <sub>5</sub>	$4,560 \pm 0,480$	$0,985 \pm 0,141$	15					
				$158 \pm 21$	$100 \pm 29$	$37 \pm 14$		$11,8 \pm 2,0$

адсорбционные кривые хроматограмм уремической сыворотки и сыворотки здоровых доноров, которые различались лишь по концентрации белка: пик F<sub>1</sub> соответствовал веществам с ММ 5 000—50 000; в пике F<sub>3</sub> отчетливо намечались 2 подфракции — F<sub>3а</sub> и F<sub>3в</sub>, затем пик F<sub>5</sub>.

В табл. 1 представлены данные  $K_d$  и  $V_3/V_0$  для различных фракций. Во всех сыворотках положение соответствующих фракций, рассчитанное по соотношению  $V_3/V_0$ , было идентичным. Так, фракция F<sub>3а</sub> представляла

собой группу веществ с ММ 1350 д; фракция  $F_{3B}$  — 1000 д. Общий пик  $F_{(3a+3b)}$  представлял собой фракции ММ и соответствовал ММ 3000—800 д. Пик  $F_5$  содержал НМВ (менее 200 г).

На рис. 2 представлено содержание белка во фракциях  $F_1$ ,  $F_3$  и  $F_5$  в сыворотке больных ХПН до и после гемодиализа, а также в сыворотке здоровых доноров. Содержание белка во фракциях  $F_1$  и  $F_5$ , полученных из нормальной и уремической сывороток, было практически одинаковым. Однако содержание фракции  $F_3$  в уремической сыворотке до гемодиализа в 7—10 раз было выше, чем в сыворотке здоровых доноров.

Влияние гемодиализа на концентрацию

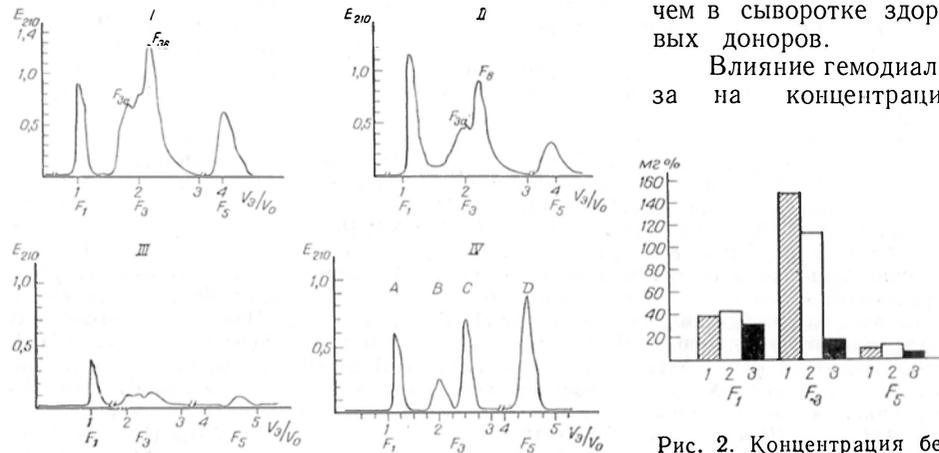


Рис. 1. Хроматограммы разделения ультрафильтров на сефадексе g-25.

I и II — сыворотки больных ХПН соответственно до и после гемодиализа; III — сыворотки здоровых доноров; IV — хроматограммы веществ-маркеров: А — голубой декстран; В — бацитрацин, С — витамин  $B_{12}$ ; D — мочевая кислота. Колонка  $2,6 \times 100$  см; 0,02 М раствор NaCl, pH 7,4; объем фракций 6,7 мл.

Рис. 2. Концентрация белка во фракциях  $F_1$ ,  $F_3$  и  $F_5$  сыворотки больных ХПН и у здоровых доноров.

1 и 2 — содержание белка в сыворотке больных ХПН до и после гемодиализа соответственно; 3 — содержание белка в сыворотке здоровых доноров.

фракции  $F_3$  показано в табл. 2, где сыворотку 6 больных изучали до и непосредственно после гемодиализа. Хотя после гемодиализа снижение фракции  $F_3$  не было однозначным у различных больных, гемодиализ приводил к снижению концентрации ММ в среднем на 37% ( $P < 0,05$ ). При пересчете этой разницы на 1 ч гемодиализа значение  $\Delta$  составляло  $11,8 \pm 2\%$  в 1 ч.

Для выделения фракции ММ обычно применяют ионообменную и гель-хроматографию, иногда в сочетании с ультрафильтрацией [5—8]. Выбор метода выделения ММ зависит прежде всего от поставленной цели. Для изучения качественного состава ММ применяют аналитические методы разделения уремической сыворотки и сыворотки здоровых доноров, диализата и мочи здоровых доноров для сопоставления состава различных субстанций, которые экскретируются в мочу или могут задерживаться и (или) образовываться и поступать в кровь при нарушении экскреторной функции почек.

Задачей наших исследований было изучить роль ММ в биологических экспериментах, поэтому нами был выбран метод препаративного разделения, сочетающего ультрафильтрацию и гель-хроматографию на сефадексе G-25, с разрешающей способностью разделения 500—5000. Применение ультрафильтрации позволило отделить основную часть белков с ММ более 50 000. С помощью сефадекса G-25 нам удалось выделить фракцию ММ (800—3000) и изучить ее концентрацию по белку при ХПН в норме.

Концентрацию белка определяли по калибровочной кривой, построенной по альбумину. Хотя известно, что измерение абсолютной концентрации белков и пептидов по кривой, построенной по альбумину, дает некоторую ошибку, в своих исследованиях мы проводили параллельные разделения сыворотки больных и здоровых доноров, и нас больше интересовали относительные величины сравнения содержания соответствующих фракций в норме и при ХПН у больных.

Измерение концентрации белка после разделения производили при 210 нм, поскольку в состав ММ могли входить пептиды, липиды и карбогидратные группы [6], которые имеют адсорбционный максимум при этой длине волны [9]. Содержание же белка во фракции  $F_3$  было очень низким и имелись значительные колебания в норме и при уремии, поэтому мы не смогли бы их уловить, если бы измеряли фракции при длине волны 280 или 254 нм.

При изучении роли ММ в биологических экспериментах мы столкнулись с трудностями выбора элюирующего буфера при гель-хроматографии. После лиофилизации элюатов с использованием трис- и фосфатного буферов получали очень высокие концентрации солей, которые трудно удаляются при ультрафильтрации на пластинах фирмы «Амикон» УМ 05; кроме того, имела место большая потеря белка (до 60—80%). Поэтому в дальнейших экспериментах мы использовали лишь 0,02 М раствор хлористого натрия рН 7,4.

Наши результаты показывают, что наряду с НМВ, такими, как креатинин и мочевины, в уремической сыворотке детей накапливается значительное количество веществ со средней молекулярной массой. Уровень их в 7—10 раз превышает таковой у здоровых доноров. Несмотря на значительные колебания, концентрация ММ в сыворотке больных ХПН до гемодиализа составляет в среднем  $138 \pm 30$  мг%, что соответствует данным других авторов [6]. Широкое распределение в наших экспериментах при элюировании пика  $F_3$  показывает его гетерогенность даже при препаративном разделении. При аналитическом разделении фракция ММ разделяется еще на 15—20 пиков с большими качественными и количественными колебаниями у разных больных ХПН, что, вероятно, связано с различной степенью образования и разрушения их почкой в период обследования [10]. Ряд авторов утверждают, что концентрация ММ может повышаться при инфекции, обезвоживании, изменяться при различных схемах гемодиализа [11].

В наших исследованиях у детей была терминальная стадия заболевания почек и все они получали регулярное лечение гемодиализом с использованием капиллярного диализатора НФАК-4 с поверхностью 1,3 м<sup>2</sup>. Снижение концентрации ММ после гемодиализа у отдельных больных было весьма непостоянным, однако при пересчете разницы ( $\Delta$ , %) на 1 ч гемодиализа и на 1 кг массы тела получалась почти постоянная величина  $-0,46 \pm 0,06$  мг% на 1 кг массы тела в 1 ч. Это дает основание предполагать, что удаление ММ из сыворотки больных ХПН в данных условиях зависит от времени гемодиализа. Однако применение диализаторов с большей диализующей поверхностью при краткосрочном гемодиализе будет способствовать более полному удалению из крови больных ХПН как НМВ, так и ММ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Babb A. L., Johansen P. J., Strand M. J. et al. — Proc. Europ. Dialysis Transplant. Ass., 1973, v. 10, p. 247—251.
2. Shilipeter G., Goen S. T. — Trans. Am. Soc. Artif. Organs, 1965, 11.
3. Grof J., Menyhart J.: Donausymposium nephrologie, Linz/Donau, 1977, p. 91.
4. Winchester J. — Dialys. a. Transplant., 1977, v. 6, N 9, p. 46.
5. Bergström J., Asaba H., Gordon A. et al. — In: International Congress of Nephology. 6-th. Proceedings. Basel, 1976, p. 600.
6. Dzurik R., Hupkova V., Černacen P. et al. — Clin. chim. Acta, 1973, v. 46, p. 77.
7. Koch K. M., Reichwein B., Passbinder W. et al. Renal Insufficiency. Stuttgart, 1976, p. 212.
8. Migone L., Dall' Aglio C. B. — Clin. Nephrol., 1975, v. 3, p. 82.
9. Richterich R. — Chemia kliniczna. Teoria i praktyka. Warszawa, 1971.
10. Goubeoud G., Leber H. W., Schott H. H. et al. — Proc. Europ. Dialysis Transplant. Ass., 1977, v. 13, p. 371.

Поступила 22/V 1979 г.

# CONTENT OF MIDDLE MASS MOLECULES IN BLOOD OF CHILDREN WITH CHRONIC KIDNEY INSUFFICIENCY UNDER CONDITIONS OF SHORT-TERM TREATMENT WITH HEMODIALYSIS

V. I. Gudim, P. Sigalla, V. S. Ivanova, K. Oldag

Department of Pathophysiology, Central Institute of Hematology and Blood Transfusion, Moscow, Children Hospital «Sharite», Department of Medicine II, Humboldt State University, GDR

Blood serum from children and young patients with chronic kidney insufficiency at the terminal step as well as from healthy donors was fractionated using ultrafilters «Amicon» XM-50 and Sephadex G-25. Three fractions were obtained:  $F_1$  — molecular mass 50, 000-5,000,  $F_2$  — 3,000-800 (fraction of middle mass molecules, MM) and  $F_3 < 200$ . Amount of protein in the MM fraction exceeded 7-10-fold the protein content in the same fraction of donor blood serum. Hemodialysis decreased dissimilarly the MM concentration in blood serum of various patients but the content of this fraction was decreased approximately by 37% after the treatment; the constant value was obtained as a result of calculation per an hour of hemodialysis and per kg of body mass. These data suggest that elimination of the MM fraction from blood serum of patients with chronic kidney insufficiency depends on the period of the short-term hemodialysis.

УДК 612.613.81.33

Я. И. Векслер, К. М. Магомедова, В. М. Луговец

## ОСОБЕННОСТИ АЗОТИСТОГО ОБМЕНА В ГОЛОВНОМ И СПИННОМ МОЗГЕ ПРИ ТЯЖЕЛОЙ ФИЗИЧЕСКОЙ РАБОТЕ У ЖИВОТНЫХ В СОСТОЯНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Кафедра биохимии Дагестанского медицинского института, Махачкала

В литературе отсутствуют сведения об особенностях обмена веществ в центральной нервной системе при работе пораженного алкоголем организма, хотя этот вопрос представляет определенный интерес. Мы предприняли сравнительное исследование метаболической реакции центральной нервной системы на тяжелую физическую работу у интактных животных и животных в состоянии хронической алкогольной интоксикации. Предметом изучения явилась система образования и связывания аммиака, занимающая одно из центральных мест в регуляции и интеграции азотистого метаболизма нервной ткани.

### Методика

Наблюдения проведены на белых крысах-самцах массой 150—180 г. Хроническое алкогольное отравление вызвали ежедневным пероральным введением 5% раствора этилового спирта из расчета 1 мл 96° этанола на 1 кг массы тела в течение 30—45 дней. Спустя 1 сут после заключительного приема спирта животных заставляли выполнять тяжелую физическую работу — плавать до утомления в воде индифферентной температуры (30—32 °C) с грузом, составляющим 10—12% от массы тела. Груз прикрепляли у основания хвоста. Это вынуждало крыс активно двигаться до полного утомления, так как прекращение движений влекло за собой погружение под воду и гибель животных. Преимуществом модели было и то, что в этом случае в работу вовлекалась вся скелетная мускулатура, благодаря чему развивающееся утомление носило генерализованный характер, охватывая обширные области головного и спинного мозга.

Для дифференцировки вызванных утомлением сдвигов в центральной нервной системе и изменений, являющихся следствием периода вработывания и адаптации к физической нагрузке, мы, как и многие другие авторы [1—5], проводили исследования в динамике — через 15 мин от начала плавания, на высоте развития утомления и в восстановительном периоде — спустя 1 ч после прекращения работы. Одновременно аналогичные наблюдения проводили над животными, не получившими алкоголь (контрольная группа). В соответствующие сроки крыс умерщвляли мгновенным погружением в жидкий воздух. В головном и спинном мозге определяли содержание свободного аммиака фенол-гипохлоритным методом Броуна, Дуда [6], глутамина по А. И. Силаковой и соавт. [7], дикарбоновых аминокислот и ГАМК методом электрофореза по Дозе [8], мочевины по Бухнер [9] и амидных групп суммарных белков по Гершенович и Кричевской [3]. Белок определяли по Лоури [10]. Данные обрабатывали статически по методу малой выборки [11].

Т а б л и ц а 1

Изменения некоторых показателей азотистого обмена головного и спинного мозга при развитии утомления у контрольных животных ( $n=20$ )

Объект исследования	Условия опыта	Аммиак	Глутамин	Аспарат	Глутамат	ГАМК	Мочевина	Амидные группы суммарных белков, мкг на 1 мг белка		
		мг %								
Головной мозг	Интактные животные	0,52±0,01	6,15±0,09	37,41±0,92	113,1±1,6	18,00±0,27	30,0±0,80	5,00±0,04	1,80±0,04	3,20±0,07
	15 мин плавания	0,94±0,03	12,10±0,20	40,22±0,64	99,0±2,1	23,11±0,63	32,6±0,73	4,61±0,08	1,69±0,04	2,92±0,09
	Утомление	2,50±0,05	10,90±0,10	34,80±0,71	77,0±1,0	23,05±0,53	49,2±0,88	3,80±0,08	0,72±0,02	3,08±0,07*
	1 ч отдыха после утомления	1,50±0,04	10,70±0,15	35,00±0,83	100,0±0,9	21,05±0,39		4,30±0,09	1,40±0,08	2,90±0,11
Спинной мозг	Интактные животные	0,61±0,02	5,70±0,07	39,82±0,91	91,0±1,5	8,62±0,23	26,0±0,52	4,50±0,07	1,50±0,06	3,00±0,11
	15 мин плавания	0,85±0,02	9,40±0,09	45,00±0,77	84,8±0,5	14,55±0,44	33,6±0,94	4,20±0,64*	1,60±0,02*	2,60±0,57
	Утомление	4,63±0,10	5,80±0,07*	30,05±0,64	81,4±0,8	16,03±0,28	24,5±0,48*	1,70±0,04	0,78±0,02	0,92±0,03
	1 ч отдыха после утомления	2,80±0,04	8,20±0,09	24,02±0,48	76,0±2,3	16,3±0,65		1,82±0,06	1,22±0,04	0,60±0,04

Пр и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2 звездочкой показаны статистически недостоверные различия ( $P > 0,05$ ) с исходными данными (до плавания).

Т а б л и ц а 2

Изменение некоторых показателей азотистого обмена в головном и спинном мозге при развитии утомления в состоянии хронической алкогольной интоксикации ( $n=7$ )

Объект исследования	Условия опыта	Аммиак	Глутамин	Аспарат	Глутамат	ГАМК	Мочевина	Амидные группы суммарных белков, мкг на 1 мг белка		
		мг %								
Головной мозг	До плавания	0,56±0,04	5,98±0,21	33,66±0,66	132,2±0,9	28,27±0,65	19,42±0,40	2,99±0,15	1,34±0,08	1,65±0,10
	15 мин плавания	1,64±0,09	14,05±0,21	15,36±0,18	54,4±0,3	12,14±0,28	28,85±0,80	3,24±0,03	1,52±0,03	1,72±0,03*
	Утомление	1,85±0,06	9,65±0,14	19,06±0,40	45,8±0,4	6,00±0,21	22,55±0,81	2,91±0,03*	0,82±0,04	2,09±0,04
	1 ч отдыха после утомления	1,33±0,04	10,77±0,18	20,17±0,28	53,3±0,3	8,90±0,17	24,91±0,77	4,04±0,12	2,05±0,06	1,99±0,12

Объект исследования	Условия опыта	мг%							Амидные группы суммарных белков, мкг на 1 мг белка	
		Аммиак	Глутамин	Аспаргат	Глутамат	ГАМК	Мочевина			
Спинальный мозг	До плавания 15 мин плавания Утомление 1 ч отдыха после утомления	0,58±0,04	4,73±0,28	31,19±0,82	112,8±1,3	11,53±0,77	22,12±0,86	3,03±0,05	1,90±0,10	1,14±0,13
		2,33±0,09	13,97±0,23	26,95±0,28	65,6±0,2	7,19±0,18	30,99±0,77	2,18±0,04	0,92±0,03	1,26±0,04
		3,46±0,10	10,75±0,17	20,68±0,37	21,3±0,5	6,44±0,33	29,64±0,84	1,99±0,02	0,51±0,05	1,48±0,06
		2,19±0,06	11,01±0,16	21,63±0,31	33,6±0,3	6,72±0,27	34,57±0,62	3,74±0,10	1,51±0,06	2,23±0,21

## Результаты и обсуждение

Исследования показали, что у контрольных животных (не получавших алкоголя) уже в первые 15 мин плавания происходило накопление аммиака в тканях спинного (на 39,3%) и особенно головного (на 80,7%) мозга (табл. 1). Заметно увеличивалось содержание мочевины (на 8,6% в головном и на 29,2% в спинном мозге), значительно возрастал уровень ГАМК (соответственно на 28,3 и 63,6%), глутамина и аспартата и наблюдалось дезамидирование суммарных белков мозга с некоторым изменением коэффициента лабильности амидных связей (особенно в спинном мозге).

Развитие утомления у контрольных животных сопровождалось резким увеличением содержания в головном мозге преформированного аммиака (до 380% от исходного), глутамина, мочевины и ГАМК, в то время как в спинном мозге содержание глутамина и мочевины существенно не менялось (различия недостоверны), а уровень аммиака и ГАМК возрастал в еще большей степени (соответственно до 659 и 86% от исходного). Количество аспартата в головном мозге почти не изменялось, а в спинном — резко снижалось. Происходили глубокие изменения в амидированности белков центральной нервной системы с изменением соотношения лабильных и прочно связанных амидных групп (коэффициента лабильности). При этом коэффициент лабильности в головном мозге снижался с 0,56 до 0,23, а в спинном мозге, напротив, возрастал с 0,50 до 0,84; количество амидного азота в суммарных белках уменьшалось в головном мозге на 24%, а в спинном мозге на 68,2%. Аналогичные данные приводились и ранее [2, 12].

Иная картина наблюдалась у животных в состоянии хронической алкогольной интоксикации (табл. 2). Как мы показывали [13, 14], в результате хронической (в отличие от острой) алкогольной интоксикации достоверно снижается содержание свободного аммиака в тканях центральной нервной системы, уменьшается содержание глутамина (особенно в спинном мозге) и мочевины (главным образом в головном мозге), снижается активность глутаминсинтетазы, повышаются уровень АСТ, глутамата и ГАМК, активность аспартат-аминотрансферазы. Резко уменьшается амидированность белков головного и спинного мозга, увеличивается показатель лабильности амидных групп. Данные, касающиеся головного мозга, находят подтверждение в работах других авторов [15—22]. Наши данные несколько расходятся с данными Н. М. Форняк [23], которая наблюдала повышение содержания аммиака в головном мозге кроликов при пероральном введении 96° этанола в дозе 2—2,5 мл/кг в течение 30 дней. Однако методика введения алкоголя (при помощи металлического зонда), разовая доза и вид подопытного животного принципиально отличались от выбранных нами. При этом следует иметь в виду, что

в отличие от крыс кролики проявляют отвращение к алкоголю [24]. В отношении спинного мозга подобные сведения в литературе отсутствуют. Наши исследования показали (см. табл. 2), что при выполнении тяжелой физической работы у животных, длительно употреблявших алкоголь, складываются иные взаимоотношения в системе образования и связывания аммиака, отличные от таковых у крыс, не принимавших алкоголь. Если и в головном, и в спинном мозге первые минуты работы характеризуются более быстрым и резким накоплением аммиака в нервной ткани, то затем наступает и быстрое истощение этой реакции и на высоте развития утомления образование аммиака не только не достигает того высокого уровня, который наблюдается у контрольных животных, но и намного отстает от него. Аналогичная картина наблюдается в случае глутамина: в первые 15 мин плавания у «алкогольных» животных его содержание в мозге нарастает в значительно большей степени, чем у контрольных крыс, однако в дальнейшем эта реакция истощается, интенсивность синтеза падает и уровень глутамина резко снижается. Обращает на себя внимание значительно более резкое снижение содержания и в головном, и в спинном мозге глутамата и аспартата: в процессе выполнения работы оно в обоих отделах центральной нервной системы резко падает, достигая таких значений, которые никогда не наблюдаются у животных, не принимавших алкоголь.

Весьма характерны и изменения в динамике ГАМК. Если у контрольных животных плавание до утомления характеризуется значительным накоплением ГАМК в тканях головного и особенно спинного мозга, то у крыс в состоянии хронической алкогольной интоксикации содержание ГАМК в обоих отделах центральной нервной системы, напротив, резко падает — соответственно до 21,2 и 55,8% от исходного уровня.

Демонстративны различия и в реакции амидных групп суммарных белков мозга. У контрольных животных наблюдается значительное дезамидирование белков, особенно в тканях спинного мозга. У крыс в состоянии хронической алкогольной интоксикации интенсивность такого дезамидирования резко снижается, особенно на высоте развития утомления, а в восстановительном периоде намечается даже увеличение амидирования белков. Этот процесс касается главным образом прочно связанных амидных групп: у контрольных животных происходит снижение их относительного количества, а у «алкогольных», напротив, значительное нарастание их.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о существенном изменении характера метаболической реакции центральной нервной системы на выполнение физической работы и развитие утомления у животных в состоянии хронической алкогольной интоксикации.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Арбуханова М. С.* Энергетический обмен головного и спинного мозга при утомлении. Дис. канд. Махачкала, 1972.
2. *Векслер Я. И., Атабегова Н. Г., Луговой В. М.* и др. — В кн.: Актуальные проблемы стресса. Кишинев, 1976, с. 44—55.
3. *Гершенович З. С., Кричевская А. А.* — Биохимия, 1960, т. 25, № 2, с. 310—317.
4. *Рогодаев К. И.* — В кн.: Стресс и его патогенетические механизмы. Кишинев, 1973, с. 34—35.
5. *Рогозкин В. А.* — Укр. биохим. ж., 1959, т. 31, № 4, с. 489—494.
6. *Brown R. H., Duda G., Korke S. P.* et al. — Arch. Biochem., 1957, v. 66, p. 301.
7. *Силакова А. И., Труш Г. П., Явилякова А.* — Вопр. мед. химии, 1962, № 5, с. 538—544.
8. *Dose K.* — Biochem. Z., 1957, Bd 329, S. 416.
9. *Buchner H.* — Cancer Res., 1955, v. 15, p. 365.
10. *Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L.* et al. — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265.
11. *Ойвин И. А.* — Пат. физиол., 1960, № 4, с. 76—78.
12. *Луговой В. М.* Азотистый обмен головного и спинного мозга при утомлении. Дис. канд. Махачкала, 1974.
13. *Магомедова К. М., Векслер Я. И.* — Изв. Сев.-Кавказ. науч. центра высш. школы. Естеств. науки, 1979, № 1, с. 84—86.
14. *Векслер Я. И., Магомедова К. М.* — В кн.: Всесоюзный симпозиум по медицинской энзимологии. 3-й. Тезисы. Астрахань, 1979, с. 27.

15. Сытинский И. А. — Ж. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева, 1976, т. 22, № 2, с. 137—143.
16. Сытинский И. А., Благова О. Е., Коновалова Н. Н. и др. — В кн.: Физиология и биохимия медиаторных процессов. М., 1976, с. 123—124.
17. Сытинский И. А., Коновалова Н. Н., Никитина З. С. — Фармакол. и токсикол., 1977, № 3, с. 361—365.
18. Сытинский И. А. — В кн.: Метаболизм белков центральной нервной системы. Днепропетровск, 1975, с. 32—34.
19. Сытинский И. А., Безбородов А. М., Благова О. Е. и др. — В кн.: Вопросы биохимии мозга. Ереван, 1978, т. 13, с. 303—311.
20. Благова О. Е. Корреляция между содержанием моноаминов и гамма-аминомасляной кислоты и динамикой изменения вызванных потенциалов некоторых структур головного мозга крыс при интоксикации этанолом. Дис. канд. Л., 1979.
21. Roach M. K., Reese W. N. — Biochem. Pharmacol., 1972, v. 21, p. 2013—2018.
22. Sulton J., Simmonds M. A. — Ibid., 1973, v. 22, p. 1685—1691.
23. Форняк Н. М. Белковый обмен в головном мозгу кроликов при остром и хроническом алкогольном отравлении. Дис. канд. Львов, 1966.
24. Стрельчук И. В. Алкоголь — враг нервной системы. М., 1967.

Поступила 30/XI 1979 г.

## THE CHARACTERISTICS OF NITROGENOUS METABOLISM IN BRAIN AND SPINAL CORD UNDER CONDITIONS OF HEAVY PHYSICAL LOADING OF ANIMALS, SUBJECTED TO CHRONICAL ALCOHOL INTOXICATION

Ya. I. Vexler, K. M. Magomedova, V. M. Lugovets

Chair of Biochemistry, Dagestan Medical School, Makhachkala

Development of the fatigue state in rats, subjected to prolonged alcohol intoxication, after swimming with meight led to dissimilar alterations in the system of ammonia formation and binding in brain and spinal cord as compared with control animals under the same conditions of loading. Within the first minutes of the heavy loading the faster and more distinct accumulation of ammonia was observed, then the rapid exhaustion of the reaction occured and the ammonia production was markedly decreased in the state of fatigue. Impairments in brain protein deamidation and decrease in content of urea were found. At the same time, dynamics of  $\gamma$ -aminobutyric acid, dicarboxylic amino acids and their amides was altered.

УДК 616.316.5-002-092.9-085.355:577.152.34

А. Ф. Коваленко, А. П. Левицкий

## ВЛИЯНИЕ КАЛЛИКРЕИНОПОДОБНОГО ФЕРМЕНТА САЛИВАИНА НА ТЕЧЕНИЕ ОСТРОГО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПАРОТИТА

Кафедра хирургической стоматологии Одесского медицинского института им. Н. И. Пирогова

Слюнные железы являются органом с наиболее высоким содержанием калликреиноподобных ферментов [1, 2]. Учитывая важную роль этих ферментов в патогенезе воспаления [3—6], можно предположить, что активация калликреинов должна занимать важное место в механизме развития сиалоаденитов. Отсутствие в литературе такой информации побудило исследовать роль калликреина в патогенезе воспаления околоушной железы при травматическом паротите.

### Методы

Эксперименты проведены на 34 белых крысах 3—4-месячного возраста, которых разделили на 6 групп: 1-я — интактные животные; 2-я — двусторонний травматический паротит+0,5 мл 0,85% раствора NaCl; 3-я — введение в ложе нетравмированной железы 0,2 мл раствора калликреиноподобного фермента слюны саливаина; 4-я — двусторонний травматический паротит+0,5 мл раствора саливаина; 5-я — двусторонний травматический паротит+0,2 мл раствора саливаина; 6-я — двусторонний травматический паротит+0,2 мл раствора саливаина и 0,2 мл трасилола.

Препарат саливаина получен из слюны крыс по методу [7] и детально охарактеризован в предыдущей работе [8]. В настоящем исследовании использовали растворы саливаина концентрации 0,2 мг/мл с удельной радиоактивностью 11,2 Е на 1 мг белка (по гидролизу  $\alpha$ -бензоил-L-аргинин-этилового эфира). Раствор саливаина вводили

сразу после травматизации железы однократно. Трасилол вводили в дозе 1000 КИЕ в ложе околоушной железы.

Травматический паротит вызывали следующим образом: у крыс под наркозом делали стандартный срединный разрез кожи шеи; околоушные железы выделяли из фасции и захватывали специальным пинцетом, в котором минимальный зазор между браншами составлял 0,5—0,8 мм, что обеспечивает равномерное сдавливание паренхимы железы. Производили 3 сдавливания, каждое продолжительностью 10 с. Ложе железы засыпали порошкообразной смесью стрептоцида и пенициллина, рану наглухо зашивали. Спустя 24 ч возникал отек железы с очагами кровоизлияний и некроза. Вокруг железы нередко наблюдался фибринозный отек. Лишь спустя 1 нед появлялись очаги регенерации.

Через 24 ч после травматизации железы или введения саливаина животных забивали, выделяли околоушные железы, взвешивали и готовили гомогенат из расчета 20 мг ткани на 1 мл физиологического раствора. После центрифугирования при 2000 g в течение 15 мин при 4 °С в надосадочной жидкости определяли казеинолитическую активность при рН 7,6 методом Кунитца в модификации А. П. Левицкого [8], активность щелочной фосфатазы [9] с использованием в качестве субстрата п-нитрофенилфосфата. Результаты исследования подвергали статистической обработке по Стьюденту [9].

## Результаты и обсуждение

На рис. 1 видно, как травма, так и саливаин, вызывает нерезкое, но статистически достоверное увеличение массы околоушной железы (по-видимому, за счет отека и кровоизлияний). Комбинация этих патогенных факторов резко увеличивает степень патологических изменений в околоушной железе за счет усиления отека и обширных геморрагий. Степень патологических изменений коррели-

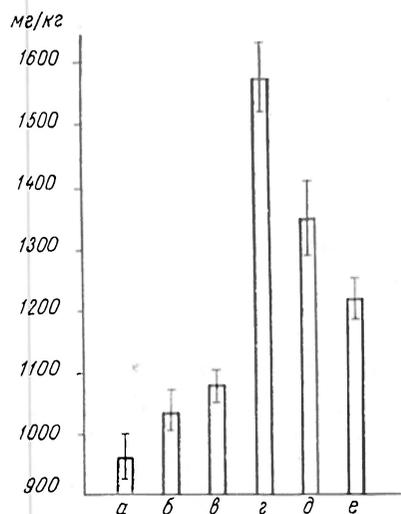


Рис. 1. Влияние саливаина на отек околоушной слюнной железы при травматическом паротите (1-е сутки). Здесь и на рис. 2: а — контроль; б — травма желез; в — саливаин (0,2 мл); г — травма + 0,5 мл саливаина; д — травма + 0,2 мл саливаина; е — травма + 0,2 мл саливаина и 0,2 мл трасилола.

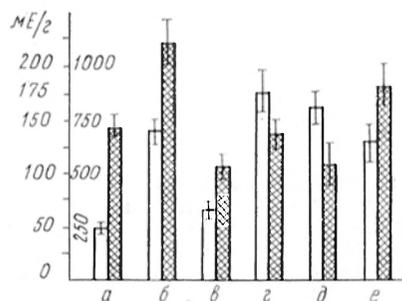


Рис. 2. Влияние саливаина на казеинолитическую активность (светлые столбцы) и активность щелочной фосфатазы (заштрихованные столбцы) околоушной слюнной железы крыс при травматическом паротите (1-е сутки).

По оси ординат: слева — казеинолитическая активность; справа — активность щелочной фосфатазы (в ME/g).

рует с количеством введенного саливаина. Одновременное введение ингибитора протеаз трасилола достоверно снижает эффект калликреина.

Согласно данным рис. 2, механическая травма железы вызывает трехкратное повышение протеолитической активности и 1,5-кратное повышение активности фосфатазы. При введении саливаина в ложе нетравмированной железы активность протеаз повышается незначительно, но достоверно ( $P < 0,05$ ), а активность щелочной фосфатазы достоверно снижается. Комбинация двух факторов существенно повышает активность протеолитических ферментов в ткани железы и снижает до нормы активность щелочной фосфатазы. Введение ингибитора протеаз устраняет эффект саливаина.

Проведенное исследование свидетельствует о том, что калликреиноподобные ферменты слюнных желез могут играть существенную роль

в патогенезе воспалительных заболеваний этих органов. Реализация патогенных эффектов калликреиноподобных ферментов может происходить посредством их воздействия на мембраны, что приводит к развитию отека и повреждению лизосом. В то же время полученные результаты указывают на целесообразность применения антикалликреиновых препаратов (ингибиторов калликреина типа трасилола, контрикала, гордокса и т. д.) в терапии сиалоаденитов и прежде всего в их профилактике при различных оперативных вмешательствах на слюнных железах.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Левицкий А. П.* Пищеварительные ферменты слюнных желез. Автореф. дис. докт. Одесса, 1974.
2. *Вовчук С. В.* Гипотензивные ферменты слюнных желез. Автореф. дис. канд. Одесса, 1975.
3. *Пасхина Т. С.* — В кн.: Молекулярные основы патологии. Под ред. В. Н. Ореховича. М., 1966, с. 128—178.
4. *Пасхина Т. С.* — В кн.: Современные вопросы эндокринологии. М., 1972, вып. 4, с. 108—122.
5. *Пасхина Т. С.* — В кн.: Кинины и кининовая система крови. (Биохимия, фармакология, патфизиология, методы исследования, роль в патологии). М., 1976, с. 3—11.
6. *Веремеенко К. Н.* Кининовая система. Киев, 1977.
7. *Horsu-Narvi V. K., Riekkinen P. V., Exfors T. O.* — Acta odontol. scand., 1967, v. 25, p. 657—667.
8. *Вовчук С. В., Левицкий А. П., Барабаш Р. Д.* — Ж. эволюц. биохим., 1974, № 5, с. 510—512.
9. *Левицкий А. П., Марченко А. И., Рыбак Т. Л.* — Лабор. дело, 1973, № 10, с. 624—625.
10. *Монцевичюте-Эринчена Е. В.* — Пат. физиол. 1964, № 4, с. 71—78.

Поступила 9/VI 1979 г.

#### ROLE OF KALLIKREIN IN PATHOGENESIS OF PAROTIDITIS

*A. F. Kovalenko, A. P. Levitsky*

N. I. Pirogov Medical School, Research Institute of Stomatology,  
Odessa

Mechanical trauma of rat parotid gland led to an increase in the size of the gland (due to edema) with simultaneous activation of unspecific proteases, which were estimated at pH 7.6 using casein as a substrate. Administration of kallikrein-like salivary enzyme salivain into non-traumatized parotid gland caused also the same alterations. Complex application of two factors (trauma and salivain) resulted in distinct increase of the gland edema and the proteolytic activity. Administration of trasilol (inhibitor of proteases) decreased the pathogenic effects of salivain. After administration of salivain the alkaline phosphatase activity was shown to decrease in the parotid salivary gland.

УДК 547.962.2-02:576.311

*С. А. Рисин, Н. Н. Пенкратова*

#### ВЛИЯНИЕ НЕФРАКЦИОНИРОВАННЫХ ГИСТОНОВ НА ИЗОЛИРОВАННЫЕ ЛИЗОСОМЫ ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ

Проблемная лаборатория при кафедре патологической физиологии Минского медицинского института

Мембранные эффекты гистонов, продемонстрированные в ряде исследований [1—5], свидетельствуют о том, что биологическая роль гистонов в клетках эукариотов, по-видимому, не ограничивается внутригеномными функциями. Весьма вероятно, что они принимают участие в регуляции функциональной активности субклеточных структур путем изменения проницаемости биологических мембран. Есть основания предполагать, что обсуждаемые эффекты могут играть существенную роль и в условиях патологии, например в случае дестабилизации хроматина при действии повреждающих агентов, выхода гистонов в цитозол клетки, попадания свободных

гистонов в кровеносное русло при опухолевом росте [6] или массивной деструкции тканей иной природы. Учитывая изложенное, представляется необходимым дальнейшее изучение различных проявлений действия гистонов на мембранные структуры клеток. В данном сообщении приводятся некоторые результаты исследования их влияния на изолированные лизосомы.

### Методика

Суммарные гистоны получали из печени мышей линии СЗН/Sp обоего пола, из тимуса теленка и цельных куриных эмбрионов разного возраста путем экстракции соляной кислотой при рН 1,0 дезоксирибонуклеопротеида, выделенного из предварительно очищенных клеточных ядер [7]. Препараты давали типичный спектр погло-

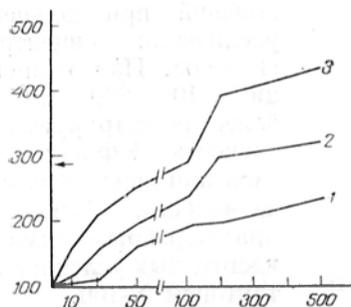


Рис. 1. Влияние гистонов на СА КФ-азы изолированных лизосом печени мышей линии СЗН/Sp.

По оси абсцисс — концентрация гистонов (в мкг/мл); по оси ординат — активность КФ-азы (инкубация взвеси лизосом без гистона) (в % к контролю, принятому за 100%). Суммированы результаты 3—4 экспериментов. 1 — гистоны тимуса теленка; 2 и 3 — гистоны 5- и 9-дневных куриных эмбрионов соответственно. Стрелкой отмечен уровень активности, выявляемый при обработке лизосом в соответствующих условиях 0,2% тритоном X-100 (общая активность КФ-азы) (в % к контролю).

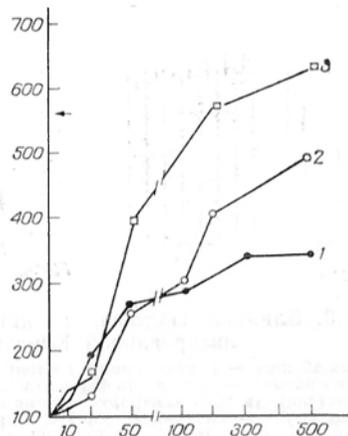


Рис. 2. Влияние гистонов на СА КФ-азы изолированных лизосом.

1 — гистоны печени мышей линии СЗН/Sp; 2 и 3 — гистоны 5- и 9-дневных куриных эмбрионов соответственно. Стрелкой указан уровень активности фермента, выявляемый в супернатанте после 10-минутной инкубации лизосом в среде, содержащей 0,2% тритона X-100 (в % к контролю). Другие обозначения см. рис. 1.

щения в УФ-области, были свободны от примеси триптофансодержащих белков (по данным определения триптофана [8] и результатам исследования спектров флуоресценции [9]).

Лизосомы выделяли из печени мышей линии СЗН/Sp обоего пола методом дифференциального центрифугирования с использованием в качестве среды выделения 0,25 М раствора сахарозы 0,001 М ЭДТА [10]. О влиянии гистонов на проницаемость мембран лизосом судили по результатам исследования свободной (СА) и неседиментируемой (НА) активности кислой фосфатазы (КФ-азы, КФ 3.1.3.2) после воздействия на изолированные лизосомы *in vitro*. С этой целью суспензии свежевыделенных лизосом (200—300 мкг белка) инкубировали в 0,05 М ацетатном буфере рН 5,0 с гистонами концентраций 0,25—500 мкг/мл и без них (контрольные пробы) в течение 10 мин при 37 °С. Объем инкубационной смеси 1 мл. По окончании инкубации определяли СА и НА КФ-азы. Для исследования НА лизосомы после инкубации отделяли центрифугированием при 10 000 *g* в течение 30 мин и использовали полученный супернатант. Общую активность КФ-азы препаратов изолированных лизосом определяли в присутствии неионного детергента тритона X-100 в концентрации 0,2%. Определение активности фермента проводили спектрофотометрически с использованием хромогенного субстрата *p*-нитрофенилфосфата (пНФФ) [11]. Активность фермента выражали в микромолях пНФФ в 1 мин на 1 мг белка. Белок определяли по Лоури и соавт. [12]. Активность фермента, выявляемую после воздействия гистонов, выражали в процентах к контролю (инкубация лизосом без гистонов), принятому за 100%. Для солиubilизации кислой фосфатазы изолированные лизосомы подвергали многократному (12 раз) замораживанию при —78 °С с последующим оттаиванием при 37 °С или обработке тритоном X-100 в концентрации 0,2%. Несольюбилизованный материал осаждали центрифугированием при 10 000 *g* в течение 30 мин.

### Результаты и обсуждение

Общая активность кислой фосфатазы изолированных лизосом печени мышей линии СЗН/Sp равнялась  $12,0 \pm 2,77$  мкМ пНФФ на 1 мг белка в

1 мин. Свободная активность составляла  $47,0 \pm 5,0\%$  от общей активности фермента. НА, выявляемая после 10-минутной инкубации свежeweделенных лизосом в 0,04 М ацетатном буфере pH 5,0, составляла  $10,0 \pm 2,0\%$  от общей активности. Эти данные свидетельствуют о том, что в ходе препаративной процедуры проницаемость мембран лизосом не была существенно нарушена [10].

При исследовании влияния гистонов на СА КФ-азы (рис. 1) выявлено повышение ее, зависящее от концентрации препаратов в среде. При концентрации 0,25—5,0 мкг/мл гистоны существенно не изменяли СА фермента. Начиная с концентрации 10—25 мкг/мл (отношение гистон : белок лизосом — 1 : 30 — 1 : 10), наблюдался выраженный подъем СА, резко возраставший при дальнейшем увеличении концентрации гистонов. При концентрации 100—200 мкг/мл и более регистрируемая активность КФ-азы достигала или даже превышала активность, выявляемую при обработке лизосом в идентичных условиях 0,2% тритоном X-100.

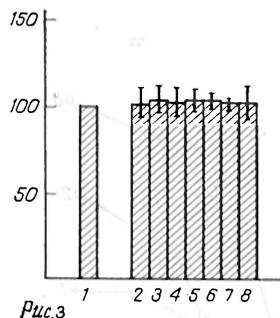


Рис. 3. Влияние гистонов на активность солюбилизированной КФ-азы.

По оси абсцисс — концентрация гистонов в среде (в мкг/мл); по оси ординат — активность фермента (инкубация фермента без гистона) (в % к контролю, принятому за 100%). 1 — контроль; 2—8—активность КФ-азы в присутствии гистонов в концентрации 5, 10, 25, 50, 100, 200 и 500 мкг/мл соответственно.

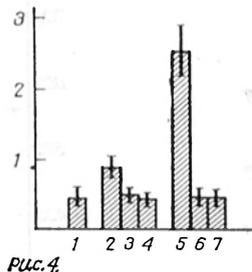


Рис. 4. Зависимость действия гистонов на изолированные лизосомы от сохранности их макромолекулярной структуры.

По оси ординат — неседеминтируемая активность кислой фосфатазы (в микромолях пНФФ на 1 мг белка в 1 мин). 1 — контроль; 2 и 5 — латинские гистоны 9-дневных куриных эмбрионов в концентрациях соответственно 25 и 50 мкг/мл; 3 и 6 — гистоны в соответствующих концентрациях, подвергнутые триптическому гидролизу; 4 и 7 — контрольные значения содержания трипсина в гидролизате.

Однако особенности постановки экспериментов по определению СА фермента не исключали и другого объяснения природы этого явления. В частности, увеличение СА КФ-азы, особенно при относительно низких концентрациях гистона в среде, могло быть связано с изменением проницаемости лизосомальных мембран для низкомолекулярного субстрата без существенного изменения ее для фермента. Кроме того, повышение СА могло быть и следствием активации самой КФ-азы гистонами.

В целях дальнейшего анализа было проведено сопоставление влияния возрастающих концентраций гистонов на СА и НА КФ-азы изолированных лизосом (см. рис. 1 и 2). Характер зависимости уровней СА и НА от концентрации гистонов в среде оказался однотипным. Результаты исследования НА КФ-азы подтвердили вывод о том, что гистоны существенно повышают проницаемость мембран лизосом для крупномолекулярных белков, локализованных в матриксе, так как в этих экспериментах исключалось возможное влияние гистонов на проницаемость мембран для субстрата ферментативной реакции. Результаты специальных экспериментов показали, что гистоны даже в максимальных концентрациях не изменяют активности предварительно солюбилизированной свободной КФ-азы (рис. 3), что позволило исключить возможное значение такого механизма в повышении СА и НА фермента. При исследовании НА КФ-азы было установлено, что гистоны в концентрации 200 мкг/мл и выше оказывают более выраженное мембранотропное действие по сравнению с 0,2% раствором тритона X-100 (см. рис. 2).

В специальных экспериментах нами показано, что регистрируемые мембранные эффекты гистонов зависят от сохранности их макромолекулярной структуры, так как продукты ферментативного гидролиза препаратов не вызывали таких эффектов (рис. 4). Обращает на себя внимание различная степень выраженности мембранотропного действия гистонов при использовании препаратов, выделенных из различных источников.

Результаты исследования подтверждают представления о том, что гистоны как агенты с выраженным мембранотропным действием могут существенно влиять на функциональную активность и структурную целостность лизосомального аппарата клеток.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Hollar M., Rzeszycki W.* — Biochim. biophys. Acta, 1965, v. 97, p. 144—146.
2. *Нечасов Г. А., Демин Н. Н., Ашмарин И. П.* — Докл. АН СССР, 1972, т. 202, № 1, с. 232—235.
3. *Третьяков А. В., Янушка А. Л., Рязанов Е. М.* — Цитология, 1974, № 4, с. 481—485.
4. *Янушка А. Л., Третьяков А. В.* — Там же, № 5, с. 645—647.
5. *Хиллар М., Уонг Д. С., Столиц Д.* — Биохимия, 1977, № 4, с. 589—596.
6. *Daskalov D., Gavasova J.* — Experientia (Basel), 1978, v. 34, p. 522—523.
7. *Дадыков И. Г.* Влияние нефракционированных гистонов на опухолевые клетки, перевиваемость и развитие асцитной гепатомы 22а. Автореф. дис. канд. Минск, 1974.
8. *Goodwin T. W., Morton R. A.* — Biochem. J., 1946, v. 40, p. 628—632.
9. *Конев С. В.* Электронно-возбужденные состояния биополимеров. Минск, 1965.
10. *Покровский А. А., Тутельян В. А.* Лизосомы. М., 1976.
11. *Chin-Cheng Wang, Touster O.* — Arch. Biochem, 1976, v. 172, p. 191—201.
12. *Lowry A. N., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al.* — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265—275.

Поступила 30/XI 1979 г.

#### EFFECT OF UNFRACTIONATED HISTONES ON LYOSOMES, ISOLATED FROM MOUSE LIVER TISSUE

S. A. Risin, N. N. Penkratova

Problem Laboratory, Chair of Pathophysiology, Medical School,  
Minsk

Total histones increased the permeability of lysosomal membranes for enzymes of matrix in the preparation of isolated lysosomes, where free and nonsedimented activity of acid phosphatase was estimated. The phenomenon depended on concentration of histones in a mixture. Histones apparently destructed the lysosomal membranes at concentration of 100 mg/ml and higher, since the level of free and nonsedimented activity of acid phosphatase approximated and even exceeded the enzymatic activity after treatment of the lysosomes with 0.2% Triton X-100. These properties of histones depended on their macromolecular structure. Histones did not affect the activity of the solubilized enzyme.

УДК 616-002.5-092.9-07:[616.36+616.24]-008.939.15-074

В. И. Малюк, Л. Э. Скульбашевский, А. В. Максимова

#### ДИНАМИКА ЖИРНО-КИСЛОТНОГО СОСТАВА ЛИПИДОВ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ И ЛЕГКИХ МОРСКИХ СВИНОК ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТУБЕРКУЛЕЗЕ

Киевский научно-исследовательский институт туберкулеза и грудной хирургии  
им. акад. Ф. Г. Яновского

Жирно-кислотный состав липидов митохондриальных мембран тесно связан с функционированием этих органелл [1]. С другой стороны, жирные кислоты являются естественными регуляторами сопряжения окислительного фосфорилирования [2—5]. Исследования жирно-кислотного состава липидов при туберкулезе немногочисленны, и они проведены на нефракционированных тканях [6, 7]. Известно, что липидный состав внутриклеточных структур неодинаков [8]. Сведений о жирно-кислотном составе митохондрий при туберкулезе в доступной литературе мы не обнаружили.

## Методика

Работа проведена на 49 морских свинок массой 200—250 г. Поскольку состав липидов организма, в частности жирно-кислотный состав митохондрий, зависит от характера питания [9], животных содержали на стандартной диете (овес, свекла, морковь). Исследование проводили в зимний период (январь — февраль). Подопытных животных разделили на 3 группы. Животным первых 2 групп (22 свинки) подкожно вводили по 0,001 мг микобактерий туберкулеза штамма Н 37 «СССР» в 0,5 мл 0,85% раствора хлористого натрия в правую паховую область. Свинок 1-й группы забивали на 4-й неделе, 2-й группы — на 7-й неделе после заражения. 3-я группа (27 животных) служила контролем. Этим животным забивали одновременно с зараженными. Сразу после забоя извлекали печень и легкие, измельчали ножницами на холоду, гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком, в соотношении со средой выделения (0,25 М сахараза, 0,001 М ЭДТА, рН 7,5) 1 : 5. Митохондрии получали с помощью дифференциального центрифугирования. Жирные кислоты липидов митохондрий переводили в метиловые эфиры по методу [10]. Разделение метиловых эфиров жирных кислот проводили с помощью газового хроматографа ЛХМ-7А. Колонку из нержавеющей стали длиной 188 см наполняли 15% диэтиленгликольсукцинатом (ДЭГС) на хроматоне N-AW. Температура колонки повышалась в режиме линейного программирования от 175 до 220 °С со скоростью 2° в 1 мин, температура дозатора 320 °С, детектор — пламенно-ионизационный, температура 320 °С. Газ-носитель — азот, скорость тока 50 мл/мин. Идентификацию пиков на хроматограмме проводили с помощью стандартных метиловых эфиров жирных кислот. Типовой состав жирных кислот вычисляли по опубликованным ранее методам [11, 9].

## Результаты и обсуждение

Результаты приведены в табл. 1 и 2. Жирно-кислотный состав митохондрий, выделенных из ткани печени и легких, оказался неодинаковым (см. табл. 1). В митохондриях легких было значительно выше относительное содержание  $C_{16:0}$  (на 107%) и  $C_{18:3}$  (на 96%) и ниже содержание  $C_{18:1}$  и  $C_{18:2}$  (на 35 и 78% соответственно). Эти различия определяют особенности типового состава (см. табл. 2), которые состоят в преобладании в митохондриях легких насыщенных, а в митохондриях печени — ненасыщенных жирных кислот. В последних количество двойных связей также неодинаково: в митохондриях легких преобладают моноеновые, а в митохондриях печени — полиеновые кислоты. Различаются митохондрии и по длине и углеродной цепи жирных кислот — в митохондриях печени резко преобладают кислоты с 18 атомами углерода (их почти 80%), тогда как в митохондриях легких они составляют лишь около 50% всех жирных кислот. В условиях туберкулезной инфекции жирно-кислотный состав митохондрий существенно изменялся, причем в легких и печени по-разному. Так, в легких (см. табл. 1) на 4-й неделе после заражения повышалось относительное содержание  $C_{16:0}$  (на 62%),  $C_{18:1}$  (на 74%),  $C_{18:2}$  (на 78%) и уменьшалось содержание  $C_{18:1}$  (на 41%) и  $C_{18:3}$  (на 67%). Соответственно изменялся типовой состав и число углеродных атомов в цепи жирных кислот (см. табл. 2). Относительное содержание насыщенных кислот несколько уменьшалось, а ненасыщенных — возрастало. Последнее зависело в основном от увеличения моноеновых кислот ( $C_{18:1}$ ), о чем свидетельствует повышение коэффициентов  $K_5$  и  $K_7$ , в то время как содержание полиеновых кислот изменялось незначительно; что касается числа углеродных атомов в цепи, то можно отметить лишь некоторое уменьшение относительного содержания кислот с 18 атомами углерода.

Увеличение длительности туберкулезного процесса сопровождалось углублением изменений жирно-кислотного состава. На 7-й неделе заболевания относительное содержание  $C_{16:0}$ ,  $C_{18:1}$  и  $C_{18:2}$  еще больше увеличилось (на 50, 84, 122% соответственно), а содержание  $C_{14}$  и  $C_{18:3}$  уменьшилось на 64 и 47%. Это нашло отражение и в типовом составе. Продолжало уменьшаться содержание насыщенных и возрастать содержание ненасыщенных жирных кислот. Причем на данном этапе это зависело от увеличения как моноеновых, так и полиеновых кислот, хотя рост последних, несомненно, превалировал. Число атомов углерода в цепи не отличалось от контрольных величин.

Таким образом, в митохондриях, выделенных из ткани легких, по мере развития специфического процесса отмечалось прогрессирующее повыше-

ние относительного содержания ненасыщенных и снижение содержания насыщенных жирных кислот.

В митохондриях ткани печени (см. табл. 1) также наблюдались отчетливые изменения, но они имели иной характер. Так, на 4 неделе после заражения значительно повышалось содержание  $C_{18:0}$  (на 74%) и снижалось содержание  $C_{18:1}$  и  $C_{18:3}$  (на 60 и 44% соответственно). Это обусловило характерное изменение типового состава с повышением доли насыщенных и уменьшением доли ненасыщенных кислот, так что их содержание уравнивалось. Особенно резко уменьшалось содержание моноеновых кислот, тогда как полиеновые снижались значительно более умеренно. Коэффициент  $K_7$ , характеризующий соотношение моноеновых и полиеновых кислот, снижался до 0,16 при 0,42 в контроле. Изменялся и углеродный состав с повышением доли  $C_{18}$ .

На 7-й неделе жирно-кислотный состав по средним величинам существенно не отличался от контроля, за исключением достоверного снижения содержания арахидоновой кислоты (на 33%). Однако вариабельность состава у различных животных одной серии увеличивалась. Вместе с тем изменения типового состава, отмеченные на 4-й неделе, оставались без существенных изменений. Отмечались лишь сглаживание диспропорции между моно- и полиеновыми кислотами и возврат коэффициента углеродно-го состава к исходной величине.

Следовательно, в митохондриях печени влияние специфического процесса проявлялось в повышении доли насыщенных и уменьшении ненасыщенных жирных кислот.

Таким образом, изменения в митохондриях печени и легких имели разнонаправленный характер, что, по-видимому, отражает как их функциональные различия, так и различия в протекании специфического туберкулезного процесса в данных органах.

Оценивая полученные данные, следует прежде всего отметить лабильность жирно-кислотного состава митохондрий. Уместно указать в этой связи, что рассмотрению подверглись лишь основные жирные кислоты, постоянно регистрируемые при разделении. Мы не касались минорных жирных кислот, содержание которых еще более изменчиво. Развитие туберкулезного процесса вызывало выраженные изменения как индивидуаль-

Т а б л и ц а 1

Жирные кислоты митохондрий морских свинок при экспериментальном туберкулезе ( $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ )

Группа	Жирные кислоты						
	$C_{14:0}$	$C_{16:0}$	$C_{18:0}$	$C_{18:1}$	$C_{18:2}$	$C_{18:3}$	$C_{20:4}$
Контроль	2,8±0,3 (12) 4,1±2,1 (5)	23,6±1,8 (14) 11,4±1,2** (23)	15,3±1,7 (13) 20,6±2,6 (17)	10,4±1,5 (12) 16,1±1,1** (18)	6,8±1,0 (14) 30,4±1,4** (27)	4,9±0,9 (10) 2,5±0,4** (22)	5,0±0,5 (13) 5,8±0,4 (25)
Туберкулез 4 нед	1,1±0,5 (7) 0,3±0,1 (4)	38,0±2,2* (9) 11,2±2,2 (12)	9,0±1,2* (9) 35,8±2,9* (10)	18,1±1,2* (9) 6,4±0,2* (10)	12,1±1,5* (10) 31,9±1,9 (12)	1,6±0,3* (10) 1,4±0,2* (10)	6,1±1,0 (10) 5,8±0,2 (12)
Туберкулез 7 нед	0,96±0,2* (8) 0,7±0,5 (5)	35,3±3,7* (8) 16,7±5,0 (6)	11,3±3,7 (8) 30,0±7,3 (6)	19,1±0,9* (9) 11,4±3,1 (5)	15,1±1,4* (7) 28,3±2,6 (7)	2,6±0,4* (9) 1,9±0,4 (6)	4,8±0,7 (9) 3,9±0,6* (7)

П р и м е ч а н и е. Л — легкие, П — печень. В скобках — число животных.

\* Различия статистически достоверны по отношению к контролю ( $P < 0,05$ ); \*\* между показателями в легких и печени.

ного, так и типового состава жирных кислот в митохондриях органов с увеличением относительного содержания ненасыщенных кислот в легких, а насыщенных — в печени. Таким образом, на митохондриях легких еще более четко прослеживается закономерность, отмеченная на нефракционированной ткани легких [6, 7]. С другой стороны, мы не могли подтвердить данные [12] об увеличении ненасыщенных жирных кислот в фосфолипидах печени. Напротив, в наших опытах наблюдалось отчетливое их уменьшение. Возможно, это зависело от разнонаправленности в изменениях жирнокислотного состава липидов различных клеточных органелл.

Т а б л и ц а 2

Типовой состав жирных кислот в митохондриях органов морских свинок при экспериментальном туберкулезе

Орган	Показатели типового состава	Контроль	Экспериментальный туберкулез	
			4 нед	7 нед
Легкие	K <sub>1</sub> НЖК/ОЖК	0,61	0,56	0,53
	K <sub>2</sub> НЕЖК/ОЖК	0,39	0,44	0,47
	K <sub>3</sub> сумма C <sub>18</sub> жирных кислот/ОЖК	0,54	0,47	0,54
	K <sub>4</sub> НЕЖК/НЖК	0,65	0,78	0,88
	K <sub>5</sub> МЖК/НЖК	0,25	0,37	0,40
	K <sub>6</sub> ПЖК/НЖК	0,40	0,41	0,47
	K <sub>7</sub> МЖК	0,62	0,91	0,85
Печень	K <sub>1</sub> НЖК/ОЖК	0,38	0,51	0,51
	K <sub>2</sub> НЖК/ОЖК	0,60	0,49	0,49
	K <sub>3</sub> сумма C <sub>18</sub> жирных кислот/ОЖК	0,77	0,81	0,76
	K <sub>4</sub> НЖК/НЖК	1,52	0,96	0,95
	K <sub>5</sub> МЖК/НЖК	0,39	0,13	0,24
	K <sub>6</sub> ПЖК/НЖК	1,07	0,82	0,71
	K <sub>7</sub> МЖК/ПЖК	0,42	0,16	0,33

Примечание. НЖК, НЕЖК, ОЖК, МЖК, ПЖК — ненасыщенные, общие, моноеновые и полиеновые жирные кислоты соответственно.

Показано, что скорость обмена жирных кислот в фосфолипидах, являющихся основой митохондриальных мембран, различна [13]. С наибольшей скоростью обновляются моноеновые кислоты, значительно медленнее — полиеновые, особенно арахидоновая. Полученные нами данные дают основание полагать, что эти различия сохраняются и в условиях туберкулезного процесса. Об этом свидетельствуют резкие изменения содержания олеиновой кислоты в митохондриях обоих изучаемых органов, в то время как содержание арахидоновой кислоты было значительно более стабильным.

Структура фосфолипидов митохондрий, в том числе их жирно-кислотный состав, играет важную роль в осуществлении основных функций этих субклеточных части — окислительном фосфорилировании, транспорте ионов, механохимических изменениях [14]. Поэтому обнаруженные нами значительные изменения жирно-кислотного состава митохондрий могут существенно отражаться на их биоэнергетических функциях. Не менее выраженное влияние указанные изменения могут оказывать (особенно в печени на синтез белка, поскольку показано, что снижение содержания ненасыщенных жирных кислот в мембранах митохондрий тормозит этот процесс [15]

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ленинджер А. — В кн.: Митохондрии. Структура и функции. М., 1966, с. 247—249
2. Левачев М. М., Мишукова Е. А., Сивкова В. Г. и др. — Биохимия, 1965, т. 30 с. 864—866.
3. Woitczak L., Boguska K., Sarsala M. et al. — In: Mitochondria: Structure and Function. London, 1969, p. 79—85.
4. Скулачев В. П. Трансформация энергии в биомембранах. М., 1972.

5. Шеев Т., Людвиг П., Папопорт С. М. — В кн.: Митохондрии. Аккумуляция энергии и регуляция ферментативных процессов. М., 1977, с. 18—23.
6. Kondo et al. Цит. Алимова Е. К., Аствацатурьян А. Т., Жаров Л. В. Липиды и жирные кислоты в норме и при ряде патологических состояний. М., 1975, с. 139.
7. Алимова Е. К., Аствацатурьян А. Т., Жаров Л. В. — Там же, с. 140—141.
8. Gloster J., Harris P. — *Cardiovasc. Res.*, 1970, v. 4, p. 1—5.
9. Покровский А. А. Роль биохимии в развитии науки о питании. М., 1974, с. 63—69.
10. Ланкин В. З., Садовникова И. П. — *Вопр. мед. химии*, 1971, № 3, с. 331—335.
11. Вережагин А. Г. Биохимия триглицеридов. М., 1972, с. 83—85.
12. Serizawa H. — *Med. J. Shinshu Univ.*, 1959, v. 4, p. 279.
13. Trewhella M. A., Collins F. D. — *Biochim. biophys. Acta*, 1973, v. 296, p. 34.
14. Jolliot A. — *Ann. biol.*, 1972, v. 11, p. 351.
15. Marzuki S., Cabon G. S., Crowfoot P. D. et al. — *Arch. Biochem.*, 1975, v. 169, p. 591—600.

Поступила 16/VII 1979 г.

## DYNAMICS OF FATTY ACID COMPOSITION OF LIPIDS IN MITOCHONDRIA OF GUINEA PIG LIVER AND LUNG TISSUES UNDER CONDITIONS OF EXPERIMENTAL TUBERCULOSIS

V. I. Matyuk, L. Z. Skul'bashevsky, A. V. Maximova

F. G. Yanovsky Institute of Tuberculosis and of Thoracal Surgery, Kiev

Composition of fatty acids was distinctly different in lipids of guinea pig liver and lung mitochondria; unsaturated polyenic acids containing 18 carbon atoms prevailed in lipids of liver mitochondria, saturated fatty acids dominated in lipids of lung mitochondria and monoenic acids were found among unsaturated fatty acids of the fraction. Experimental tuberculosis was accompanied by dissimilar alterations in fatty acid composition of lipids from mitochondria of these tissues: content of saturated fatty acids was increased in liver mitochondria and the content of unsaturated fatty acids — in lung mitochondria.

УДК 612.351.11:577.152.165'133]:612.6.03

В. В. Федуров

## АКТИВАЦИЯ ВКЛЮЧЕНИЯ <sup>14</sup>C-п-ОКСИБЕНЗОАТА И 2-<sup>14</sup>C-МЕВАЛОНАТА В УБИХИНОН В РЕГЕНЕРИРУЮЩЕЙ ПЕЧЕНИ КРЫС

Центральная научно-исследовательская лаборатория Киевского медицинского института им. Богомольца

Важнейшим контролируемым звеном в многостадийных процессах биосинтеза стероидов, полиизопреноидных спиртов и убихинонов у животных является 3-окси-3-метилглутарил-КоА — редуктаза (КФ 1.1.1.34), катализирующая образование их общего предшественника — мевалоновой кислоты [1—3]. Наряду с этим установлена определенная регуляторная роль ферментов в последующих этапах биосинтеза [4—7]. В развитие упомянутых исследований в данной работе изучали включение <sup>14</sup>C-п-оксисбензоата и 2-<sup>14</sup>C-мевалоната в убихинон и стероиды в нормальной и регенерирующей печени крыс, часть из которых получали специфические ингибиторы [4].

### Методика

В работе использованы 2-<sup>14</sup>C-мевалонат (Франция) с удельной активностью 36 мКи/ммоль, равномерно меченная <sup>14</sup>C-п-оксисбензойная кислота, полученная щелочным плавлением [8] из <sup>14</sup>C-тирозина (ЧССР) с удельной активностью 315 мКи/ммоль, (<sup>14</sup>C-метил-)-D,L-метионин (СССР) с удельной активностью 46 мКи/ммоль. Применяли свежерегенерированные органические растворители отечественного производства. Хроматографические сорбенты и пленки «Силуфол» получены из ЧССР. Убихинон-9 выделяли из органов крыс и многократно перекристаллизовывали из этанола [9]. 0,4% эмульсию твина-80 (ФРГ) на физиологическом растворе готовили с помощью микроизмельчителя РТ-2. Эмульсию убихинона-9 (1 мг в 1 мл) получали следующим образом: в стаканчик микроизмельчителя вносили раствор этого соединения в эфире, последний осторожно упаривали. Непосредственно на пленку убихинона добавляли твин-80, тщательно перемешивали стеклянной палочкой, приливали необходимое количество физиологического раствора и гомогенизировали в течение 2½ мин при 60 °С.

Полученная эмульсия устойчива в течение нескольких дней. Холестерин получен из Ленинградского мясокомбината, бычью желчь собирали от только что забитых животных и хранили в холодильнике.

Опыты поставлены на белых беспородных крысах-самцах со средней массой 180—220 г, содержащихся на стандартном рационе вивария. Удаление  $\frac{2}{3}$  печени и ложную операцию производили, как описано ранее [4, 10]. В опытах *in vivo* 0,5 мкКи  $^{14}\text{C}$ -п-оксибензоата или 5 мкКи 2- $^{14}\text{C}$ -мевалоната вводили в хвостовую вену в 0,2 мл физиологического раствора. Животных декапитировали через 2 и 4 ч, быстро извлекали печень и выделяли неомыляемые липиды, а из последних — убихинон и стеринны [4].

В опытах *in vitro* 0,5 мкКи  $^{14}\text{C}$ -п-оксибензоата или 5 мкКи 2- $^{14}\text{C}$ -мевалоната и 5 мкКи ( $^{14}\text{C}$ -метил)-D,L-метионина вводили в среду для инкубации срезов. Получение срезов и условия их инкубации детально описаны ранее [4]. Части животных сразу после субтотальной гепатэктомии вводили (в расчете на 100 г массы тела): внутривенно по 0,1 мг циклогексимида (фирма «Koch-Light Lab.», Англия) или 1 мг бромистого этидия фирма «Calbiochem», США); внутривенно через день по 1 мл эмульсии твина-80 или по 1 мл эмульсии убихинона-9; ежедневно с кормом за 4 сут до операции холестерин (2%) или внутрь желудка холестерин в сочетании с желчью (125 мг и 0,5 мл соответственно) [4].

Об эффективности включения  $^{14}\text{C}$  в убихинон и стеринны судили по их удельной радиоактивности, которую выражали в распадах в минуту на 1 мг. В опытах на крысах, которым вводили эмульсии твина-80 или убихинона-9, об эффективности биосинтеза судили по включению метки на 1 г срезов. Выделение и хроматографическое разделение от сопутствующих веществ убихинона-9 и стериннов и их количественное определение описаны ранее [4]. Так как  $^{14}\text{C}$ -п-оксибензоат и ( $^{14}\text{C}$ -метил)-D, L-метионин включаются преимущественно в убихинон-9, то в этом случае его очистку производили по сокращенной программе: сразу после выделения убихинонов на колонке их хроматографировали только на пленках «Силуфол», пропитанных 5% вазелиновым маслом, в 95% водном ацетоне [4]. Радиоактивность подсчитывали в 10 мл сцинтиллятора ЖС-107 для убихинонов и в 10 мл сцинтиллятора ЖС-8 для стериннов счетчиком «Isocar/300» (фирмы «Nuclear Chicago», США) и вводили поправку на эффективность счета. Статистическую обработку материала проводили по [12].

## Результаты и обсуждение

При внутривенном введении  $^{14}\text{C}$ -п-оксибензоата и 2- $^{14}\text{C}$ -мевалоната крысам включение обеих меток в убихинон в регенерирующих долях печени через 1—2 сут после субтотальной гепатэктомии заметно повышается, тогда как включение метки из 2- $^{14}\text{C}$ -мевалоната в стеринны не изменяется (табл. 1). Следует отметить более эффективное включение  $^{14}\text{C}$ -п-оксибензоата в этот кофермент в оставшихся долях печени по сравнению с интактной, возможно, вследствие более интенсивного поглощения ими этого соединения. Скорость включения  $^{14}\text{C}$ -п-оксибензоата и 2- $^{14}\text{C}$ -мевалоната в убихинон, но не в стеринны срезами регенерирующей печени также достоверно выше, чем в контроле (табл. 2). Обнаруженное в опытах *in vivo* и *in vitro* ускоренное включение меток в убихинон из двухпредшественников, один из которых является непосредственным [13] несомненно, свидетельствует об активации биосинтеза этого вещества в регенерирующей печени.

Т а б л и ц а 1  
Включение метки из внутривенно введенных  $^{14}\text{C}$ -п-оксибензоата и 2- $^{14}\text{C}$ -мевалоната в убихинон и стеринны в нормальной и регенерирующей печени крыс

Срок после гепатэктомии, ч	Включение $^{14}\text{C}$ -п-оксибензоата в убихинон, расп. мин $^{-1}$ × мкг $^{-1}$ · 10 $^3$	Включение 2- $^{14}\text{C}$ -мевалоната, расп. мин $^{-1}$ · мг $^{-1}$ · 10 $^3$	
		в убихинон	в стеринны
0	24,4 ± 4,99 (4)	2,3 ± 0,26 (4)	4,5 ± 0,56 (4)
24	79,5 ± 20,33 (4)*	8,8 ± 1,19 (4)*	5,3 ± 0,38 (4)
48	49,8 ± 6,10 (4)*	9,3 ± 1,33 (4)*	4,7 ± 0,46 (4)
72	37,8 ± 7,60 (2)	5,3 ± 0,96 (4)*	5,7 ± 0,63 (4)
Интактные крысы	4,8 ± 1,78 (4)	2,2 ± 0,09 (4)	5,4 ± 0,59 (4)

\*  $P \leq 0,05$  по сравнению с животными, которым метку вводили сразу после гепатэктомии.

П р и м е ч а н и е. Здесь и табл. 2 и 3 в скобках — число определений.

Предварительное введение животным с удаленными долями печени циклогексимида — ингибитора биосинтеза белка в цитоплазме [14] — подав-

ляет эту активацию включения меток более существенно в случае  $^{14}\text{C}$ -п-оксibenзоата (см. табл. 2). Очевидно, активация включения обоих предшественников в убихинон в 1-е сутки регенерации печени частично обусловлена ускоренным новообразованием ферментов, катализирующих синтез этого соединения. Заключительные этапы превращения мевалоновой кислоты в пирофосфаты полиизопреноидных спиртов, присоединение последних к п-оксibenзоату с образованием полипренилфенолов и далее убихинонов осуществляются ферментами, локализованными на внутренней мембране

Т а б л и ц а 2

Включение  $^{14}\text{C}$ -п-оксibenзоата и  $2\text{-}^{14}\text{C}$ -мевалоната в убихинон и стерины срезами нормальной и регенерирующей печени интактных и обработанных различными ингибиторами крыс

Срок регенерации, ч	Ингибитор	Включение $^{14}\text{C}$ -п-оксibenзоата в убихинон, расп. мин $^{-1}$ × мкг $^{-1}$ · 10 $^3$	Включение $2\text{-}^{14}\text{C}$ -мевалоната, расп. мин $^{-1}$ · мг $^{-1}$ · 10 $^3$	
			в убихинон	в стерины
0 Удаленные доли	—	35,1 ± 14 (3)	6,5 ± 1,06 (6)	79,1 ± 17 (6)
	Холестерин	107 ± 24,4 (6)*	36,1 ± 24,4 (6)	36,1 ± 9,89 (6)*
	Холестерин + желчь	39,8 ± 19,1 (3)	92,1 ± 63,7 (3)	5,6 ± 2,02 (3)*
24 Точная перация	—	39,3 ± 6,13 (3)	9,7 ± 1,85 (3)	141 ± 4,18 (3)
	—	132 ± 1,60 (4)*	26,2 ± 5,35 (5)*	170 ± 50,2 (5)
	Циклоксимид	20,1 ± 4,50 (3)**	16,9 ± 2,42 (4)	68,3 ± 25,7 (4)
	Холестерин + желчь	427 ± 1,24 (3)**	154 ± 91,8 (3)	51,2 ± 8,03 (3)
48 Точная перация	—	397 ± 119 (3)	46,7 ± 18,7 (3)	8,79 ± 2,00 (3)*
	—	15,0 ± 2,85 (3)	10,3 ± 2,59 (4)	158 ± 39,47 (4)
	—	320 ± 70,5 (4)*	36,2 ± 4,61 (6)*	139 ± 17,9 (5)
	Бромистый этидий	593 ± 57,5 (5)**	97,6 ± 35,38 (4)*	174 ± 15,7 (4)
	Холестерин + желчь	528 ± 89,3 (3)*	333 ± 36,64 (3)**	62,8 ± 18,6 (3)*
72 Точная перация	—	341 ± 124 (3)*	26,4 ± 2,42 (3)*	15,9 ± 0,37 (3)*
	—	32,8 ± 11,1 (3)	15,6 ± 1,54 (3)	242 ± 127 (3)
	—	177 ± 55,7 (5)*	31,9 ± 6,39 (5)*	266 ± 61,5 (5)
	Бромистый этидий	316 ± 69,4 (5)*	18,1 ± 3,25 (3)	160 ± 23,1 (3)
	Холестерин + желчь	282 ± 77,4 (3)*	61,2 ± 27,1 (3)	50,1 ± 26,7 (3)**
		393 ± 334 (3)	112 ± 78,7 (3)	51,6 ± 2,96 (3)**

\*  $P \leq 0,05$  по сравнению со срезами из ложнорегенерирующей печени.

\*\*  $P \leq 0,05$  по сравнению со срезами из регенерирующей печени интактных крыс.

митохондрий [15, 16]. Принимая во внимание определенную автономность елоксинтезирующей системы этих органелл [17], было важно определить влияние предварительной обработки животных специфическим ингибитором этой системы на скорость включения меток в убихинон. Как видно из табл. 2, введение бромистого этидия, препятствующего транскрипции информации митохондриальной ДНК [17], даже несколько усиливает включение  $^{14}\text{C}$ -оксibenзоата и  $2\text{-}^{14}\text{C}$ -мевалоната в убихинон срезами регенерирующей печени. По-видимому, кодирование ферментов, катализирующих синтез убихинона в митохондриях, осуществляется не ДНК этих органелл, а ядерной ДНК [4].

Скармливание крысам холестерина или холестерина в сочетании желчью вызывает торможение включения  $2\text{-}^{14}\text{C}$ -мевалоната в стерины несколько стимулирует включение обоих предшественников в убихинон срезами удаленных и регенерирующих долей печени (см. табл. 2). Эта активация особенно заметна при введении только холестерина. По-видимому,

у животных этой группы. кроме активации ферментов, ответственных за биосинтез убихинона, происходит также перераспределение субстратов полиизопреноидного синтеза. Это осуществляется на стадии образования короткоцепочечных полипренилпирофосфатов, которые могут превращаться либо в сквален и далее в стерины, либо в полипренилпирофосфат типа соланезола, необходимого для синтеза боковой цепи убихинона [2, 18]. Так как введение животным холестерина и желчных кислот вызывает ретроингибирование их эндогенного синтеза в нескольких пунктах [1, 2], то, по-видимому, одновременно происходит увеличение свободного фонда предшественников, используемых для образования убихинона [19]. Заметим, что валовый синтез этого кофермента примерно в 40 раз ниже, чем стерина [13].

Т а б л и ц а 3

Влияние внутривенного введения крысам эмульсии убихинона-9 на скорость включения  $^{14}\text{C}$ -п-оксибензоата и ( $^{14}\text{C}$ -метил)-метионина в убихинон срезами регенерирующих 2-е суток долей печени

Вводный препарат	Коэффициент регенерации	Содержание убихинона, мкг/г сырых	Включение $^{14}\text{C}$ -п-оксибензоата		Включение 2 ( $^{14}\text{C}$ -метил)-метионина	
			расп. мин $^{-1}$ · мг $^{-1}$ · 10 $^3$ ×	расп. мин $^{-1}$ × г $^{-1}$ · 10 $^6$	расп. мин $^{-1}$ × мг $^{-1}$ · 10 $^3$	расп. мин $^{-1}$ × г $^{-1}$ · 10 $^3$
Эмульсия твина-80 (5)	2,07 ± 0,14	53,5 ± 10,1	488 ± 88,6	24,9 ± 4,29	11,6 ± 2,03	0,49 ± 0,03
Эмульсия убихинона (6)	2,19 ± 0,14	191 ± 28,6	144 ± 37,7	28,0 ± 8,59	3,45 ± 0,30	0,62 ± 0,12
<i>P</i>	>0,05	<0,05	<0,05	>0,05	<0,05	>0,05

Выше подчеркивалось, что биогенез стерина у животных контролируется по типу обратной связи [1, 2]. Активация включения меток в убихинон в регенерирующей печени представляет удобную возможность проверить наличие подобного механизма регуляции и при образовании этого соединения. Как видно из табл. 3, внутривенное введение убихинона-9 крысам с субтотальной гепатэктомией вызывает более чем трехкратное повышение концентрации этого вещества в оставшихся долях, не влияет на скорость их регенерации, а также на скорость включения  $^{14}\text{C}$ -п-оксибензоата и ( $^{14}\text{C}$ -метил)-метионина срезами печени. Снижение удельной активности убихинона в этом случае объясняется разбавлением метки экзогенным фондом. Иными словами, биосинтез убихинона не регулируется по типу обратной связи на уровне включения п-оксибензоата или метильных групп метионина. Однако этот вывод будет правомерным только при абсолютной уверенности в том, что экзогенный убихинон проникает во внутреннее пространство митохондрий и вступает в контакт с ферментами, катализирующими биосинтез убихинона. Так как это соединение практически нерастворимо в воде [20], то оно не может проникать в эти органеллы путем простой диффузии. Правда, имеются данные, что введенный в кровь или кишечник убихинон появляется внутри митохондрий [19]. Во всяком случае результаты наших опытов наряду с аналогичными данными, полученными на интактных животных [11], ставят перед экспериментаторами интересный вопрос о механизмах гомеостаза убихинона в органах животных. Не исключена возможность того, что активность или количество ферментов, катализирующих определенные стадии биосинтеза убихинона в митохондриях, зависит от скорости образования этих органелл. В пользу такого предположения можно привести и факт значительной активации биогенеза митохондрий в печени на ранних стадиях ее регенерации [17, 21, 22].

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Rodwell V. W., McNamara D. J. — *Advanc. Enzymol.*, 1973, v. 38, p. 373.
2. Beytia E. D., Porter J. W. — *Ann. Rev. Biochem.*, 1976, v. 45, p. 113.

3. *Aiyar A. S., Olson R. E.* — *Eur. J. Biochem.*, 1972, v. 27, p. 60.
4. *Федуров В. В.* — *Вопр. мед. химии*, 1978, № 2, с. 232.
5. *Федуров В. В.* — В кн.: *Структура, биосинтез и превращения липидов в организме животного и человека*. Л., 1978, с. 81.
6. *Wiss O.* — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1976, v. 68, p. 353.
7. *Wiss O., Wiss V.* — *Helv. chim. Acta*, 1977, v. 60, p. 2566.
8. *Ho L., Nilsson L. G., Skelton F. S. et al.* — *J. organ. Chem.*, 1973, v. 38, p. 1059.
9. *Crane F. L., Barr H.* — *Meth. Enzymol.*, 1971, v. 18, p. 137.
10. *Higgins G. M., Anderson R. M.* — *Arch. Path.*, 1931, v. 12, p. 186.
11. *Ranganathan S., Ramasarma T.* — *Biochem. J.*, 1975, v. 148, p. 35.
12. *Монцевичуте-Эрингене Е. В.* — *Пат. физиол.*, 1964, № 4, с. 71.
13. *Olson R. E.* — *Vitam. a. Horm.*, 1966, v. 24, p. 551.
14. *Галкин А. П.* — В кн.: *Молекулярная биология*. Киев, 1976, вып. 12, с. 44.
15. *Motose K., Rudney H.* — *J. biol. Chem.*, 1972, v. 247, p. 3930.
16. *Trumpower B. L., Hauser R. M., Olson R. E.* — *Ibid.*, 1974, v. 249, p. 3041.
17. *Kroon A. M., De Vries H.* — *Im: Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts*. Amsterdam, 1971, p. 181.
18. *Федуров В. В.* — В кн.: *Молекулярная биология*. Киев, 1977, вып. 16, с. 64.
19. *Ramasarma T.* — *J. Sci. indust. Res.*, 1968, v. 27, p. 147.
20. *Федуров В. В.* — *Успехи совр. биол.*, 1976, т. 82, с. 3.
21. *Федуров В. В., Кузьменко И. В.* — *Вопр. мед. химии*, 1974, № 2, с. 173.
22. *Malkin L. I.* — *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, 1970, v. 67, p. 1695.

Поступила 22/VII 1979 г.

## STIMULATION OF INCORPORATION OF <sup>14</sup>C-P-HYDROXYBENZOATE AND 2-<sup>14</sup>C-MEVALONATE INTO UBIQUINONE IN REGENERATING RAT LIVER TISSUE

V. V. Fedurov

Central Research Laboratory, Medical School, Kiev

Incorporation of <sup>14</sup>C-p-hydroxybenzoate and 2-<sup>14</sup>C-mevalonate into ubiquinone in vivo and in vitro was distinctly increased in regenerating rat liver lobes within 1st and 2nd day after partial hepatectomy, whereas incorporation of 2-<sup>14</sup>C-mevalonate into sterols was unaltered. The stimulation observed was partially due to an increase in the rate of biosynthesis of the enzymes, catalysing the incorporation of the label into the ubiquinone. Preliminary administration of cholesterol or cholesterol with bile into rats caused an inhibition of the multistep biosynthesis of sterols at several sites and stimulated the ubiquinone synthesis. Intravenous administration of ubiquinone-9 emulsion was accompanied by more than 3-fold increase in concentration of the substance in regenerating liver tissue and did not cause any effect on the rate of incorporation of <sup>14</sup>C-p-hydroxybenzoate and <sup>14</sup>C-methyl methionine into slices, obtained from this tissue.

УДК 612.115.3:615.425

В. П. Мищенко, Ю. М. Гольденберг, Т. В. Новосельцева

## ИЗМЕНЕНИЯ СВЕРТЫВАЕМОСТИ КРОВИ И ФИБРИНОЛИЗА ПОД ВЛИЯНИЕМ АНТИОКСИДАНТА ИОНОЛА

Кафедра нормальной физиологии Медицинского стоматологического института, Полтава

Известно, что антиоксиданты тормозят развитие перекисного окисления липидов в биологических мембранах. Эти их свойства используются при лечении ряда патологических состояний, в частности атеросклероза [1, 2]. В генезе атеросклероза существенная роль принадлежит нарушению свертываемости крови и фибринолиза [3—7]. Литературные данные о влиянии антиоксидантов на гемокоагуляцию немногочисленны и противоречивы. Так, α-токоферол препятствует развитию тромбоза [8, 9]. Витамины С и Р, метионин не оказывают существенного влияния на уровень антикоагулянтов в крови [10, 11]. Антиоксидант ионол (2,6-ди-третбутил-4-метилфенол) в этом отношении совершенно не изучен. Вместе с тем этот препарат используется в клинике для лечения онкологических больных [12] и при экспериментальном атеросклерозе перекисно-липидного происхождения [13]. Это дает возможность высказать предположение, что успех антиоксидантной терапии обусловлен не только ингибированием перекисного окисления ли-

пидов мембран, но и связан с изменением их гемокоагулирующих и фибринолитических свойств.

Выяснению этой стороны механизма действия ионола на свертываемость крови и фибринолиз посвящена данная работа.

### Методика

Исследования проводили *in vitro* на крови человека, а также *in vivo* на 30 белых крысах линии Вистар массой от 150 до 200 г, которые были разделены на 2 группы: контрольную (20 крыс) и опытную (10 крыс), и 8 собаках. В опытах *in vitro* ионол добавляли в кровь из расчета 1 мг/мл; крысы и собаки получали ионол ежедневно с пищей в дозе 50 мг на 1 кг массы в течение 30 дней. Кровь для исследования брали у людей из локтевой вены, у крыс — из сердца, у собак — из вены голени. Полученные порции крови центрифугировали при 1500 об/мин в течение 10 мин (для получения плазмы, богатой тромбоцитами) и при 3000 об/мин в течение 30 мин (для получения плазмы, обедненной тромбоцитами). Все коагулологические тесты определяли в бестромбоцитной и тромбоцитной плазме, а также при добавлении в бестромбоцитную плазму эритроцитов. У крыс, забитых после опыта, определяли, кроме того, активность тканевых гемокоагулирующих соединений в сердце и аорте.

Коагулирующие свойства крови оценивали по следующим тестам: тромбоэластографии, времени свертывания плазмы [14], потреблению протромбина [15], толерантности плазмы к гепарину [16, 17], тромбиновому времени [18], протромбиновому времени (способ ЛИПК), активности фибриназы [19], концентрации фибриногена [20], фибриногену В [21], фибринолизу зуглобулиновой фракции для оценки ферментативного процесса [22]. Гемокоагулирующие свойства эритроцитов и тканей определяли на бестромбоцитной субстратной гомологичной плазме по следующим тестам: времени рекальцификации, потреблению протромбина, толерантности к гепарину, тромбиновому времени, активности фибриназы и фибринолизу. Все данные обработаны статистически.

### Результаты и обсуждение

Как показали исследования, ионол, добавленный к плазме, лишенной всех форменных элементов, практически не влияет на показатели свертываемости крови и фибринолиза (рис. 1). Однако если в плазме имеются

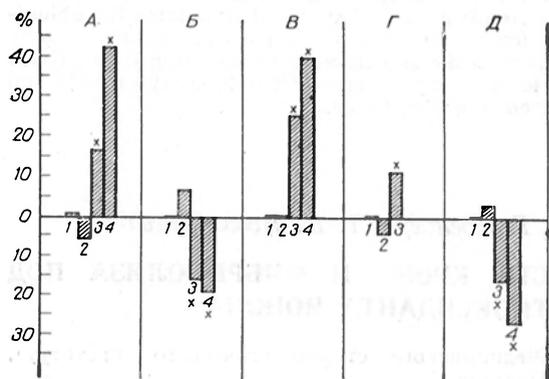


Рис. 1. Влияние ионола на некоторые показатели свертываемости крови людей *in vitro*.

А — время рекальцификации; Б — потребление протромбина; В — тромбиновое время; Г — толерантность плазмы к гепарину; Д — лизис зуглобулинов плазмы. 1 — контроль; 2 — бестромбоцитная плазма; 3 — тромбоцитная плазма; 4 — бестромбоцитная плазма с эритроцитами. Звездочкой отмечены достоверные изменения.

тромбоциты, то под влиянием ионола удлиняются время рекальцификации в обычной и гепаринизированной плазме, тромбиновое время, уменьшаются потребление протромбина и время растворения зуглобулиновой фракции плазмы. Указанные изменения свидетельствуют о том, что ионол снижает гемокоагулирующие и повышает фибринолитические свойства тромбоцитной плазмы. Аналогичные и еще более выраженные изменения наступают в плазме, к которой добавляют эритроциты, инкубированные в присутствии ионола. Показатели тромбоэластограммы также свидетельствуют о том, что ионол снижает

коагуляционные свойства тромбоцитной плазмы (см. таблицу).

Выявленные изменения свертываемости крови и фибринолиза *in vitro* во многом обнаружены и в опытах *in vivo* как на крысах, так и на собаках. У собак через 30 дней после ежедневного приема ионола в бестромбоцитной и тромбоцитной плазме, а также при добавлении в бестромбоцитную плазму эритроцитов удлинялось время рекальцификации обычной и гепаринизированной плазмы, уменьшилось потребление протромбина, сокращалось время лизиса зуглобулинов (рис. 2). В этих опытах обращает на себя внима-

ние также тот факт, что в пробах, содержащих форменные элементы крови (тромбоциты и эритроциты), изменения изучаемых показателей были более существенными, чем в плазме, лишенной их. По всей видимости, гемокоагулирующие и фибринолитические свойства плазмы во многом обусловлены взаимодействием ее прокоагулянтов, фибринолитических компонентов с мембранами клеток крови или тканей, через которые она течет (сосуды, сердце). Мембраны указанных субстратов могут освобождать или адсорби-

Влияние ионола на показатели тромбоэластограммы (ТЭГ) у людей

Изучаемый субстрат	Статистический показатель	Показатель ТЭГ											
		R, с		T, с		МА, с		K, с		Ci, с		E	
		К	О	К	О	К	О	К	О	К	О	К	О
Тромбоцитная плазма	M	35,9	39,4	134,7	209,5	27,1	18,1	26,5	42,9	0,43	0,28	37,5	23,1
	m	—	3,2	—	24,4	—	4,1	—	6,5	—	0,06	—	3,7
	P	—	<0,2	—	<0,05	—	<0,05	—	<0,05	—	<0,05	—	<0,01

Примечание. R — время реакции, T — общее время свертывания, МА — максимальная амплитуда, K — время образования сгустка, Ci — коагуляционный индекс, E — максимальная эластичность сгустка, К — контроль, О — опыт.

ровать на своей поверхности гемокоагулирующие и фибринолитические компоненты и регулировать свертывающую активность плазмы и крови в целом. Вследствие такой возможности коагуляционные и фибринолитические свойства плазмы, несомненно, будут зависеть от активности этих соединений в тканях сердечно-сосудистой системы.

Нами изучена гемокоагулирующая и фибринолитическая активность сердца и аорты крыс интактных и получавших ионол. Как показали результаты исследований, добавление экстракта тканей сердца и аорты не оказало существенного влияния на тромбиновое время и фибринолиз у интактных крыс. У крыс, получавших ионол, наблюдалось выраженное удлинение тромбинового времени и повышение фибринолитической активности (рис. 3). Таким образом, ткани стали обладать выраженными антикоагулянтными и фибринолитическими свойствами. Это, несомненно, отразилось и на свертывающей способности крови опытной группы животных.

Наконец, не исключено, что ионол снижает синтез некоторых факторов свертывания крови. Так, в наших опытах под влиянием ионола уменьшилась концентрация суховоздушного фибрина (в 1 мл плазмы) у собак с 24,1 до 11,6±3,7 мг ( $P<0,01$ ), у крыс с 7,2±1,1 до 4,2±0,5 мг ( $P<0,02$ ), а также фибриназная активность у крыс с 53,0±7,0 до 18,5±3,1 с ( $P<0,01$ ).

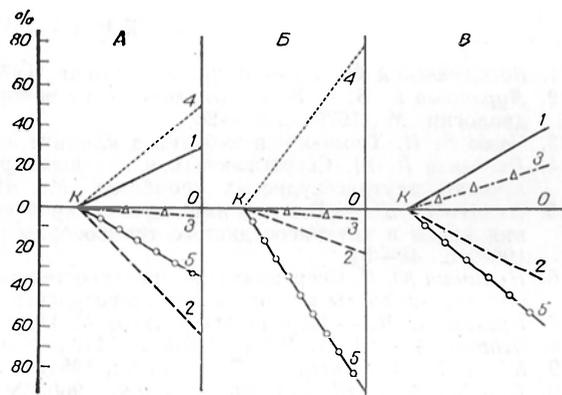


Рис. 2. Влияние ионола на некоторые показатели свертываемости крови собак.

A — бестромбоцитная плазма; B — тромбоцитная плазма; B — бестромбоцитная плазма с эритроцитами. K — контроль (исходные данные); O — опыт (через 30 дней после ежедневного приема ионола). 1 — время рекальцификации; 2 — потребление протромбина; 3 — тромбиновое время; 4 — толерантность плазмы к гепарину; 5 — фибринолиз.

По-видимому, ионол в значительной мере оказывает воздействие на клеточный метаболизм. В частности, под влиянием его могут изменяться состав и свойства фосфолипидов мембран, в том числе обладающих тромбопластическими свойствами (сфингомиелин, фосфатидилхолин). Антиоксиданты снижают уровень этих фосфолипидов в мембранах [23, 24], в связи с чем изменяются вязкость липидов мембран, липид-белковые взаимодействия, условия структурных переходов в мембранах. Наконец, под влиянием антиоксидантов (в том числе ионола) уменьшается активность ферментов, требующих использования в качестве фактора сфингомиелина и фосфатидилхолина [2], что, несомненно, приводит к ослаблению тромбопластических свойств мембран тромбоцитов, эритроцитов, тканей сердца и сосудов.

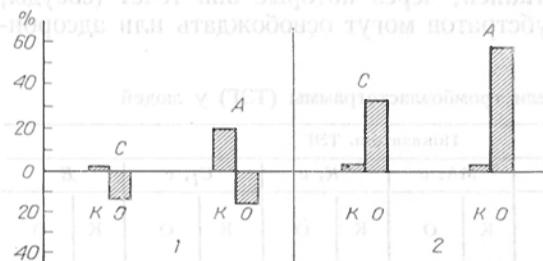


Рис. 3. Влияние ионола на активность факторов гемокоагуляции в тканях сердца и аорты крыс.

1 — тромбиновое время; 2 — фибринолиз. К — контроль (экстракты интактных крыс); О — опыт (экстракты тканей через 30 дней после кормления ионолом); С — сердце; А — аорта.

Таким образом, обнаруженные нами гипокоагуляционные и фибринолитические свойства антиоксиданта ионола делают перспективным его применение для лечения не только онкологических заболеваний, атеросклероза, но и других патологических процессов, обусловленных активацией перекисного окисления липидов и свертывающей системы крови.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Воскресенский О. Н. — *Вопр. мед. химии*, 1973, № 1, с. 87—90.
2. Бурлакова Е. Б. — В кн.: Биологические мембраны и проблемы современной кардиологии. М., 1979, с. 22—26.
3. Чазов Е. И. Тромбозы и эмболии в клинике внутренних болезней. М., 1966.
4. Панченко В. М. Свертывающая и противосвертывающая система в патогенезе и лечении внутрисосудистых тромбозов. М., 1967.
5. Халфен Э. Ш. — В кн.: Симпозиум по проблеме «Механизмы реакций свертывания крови и внутрисосудистого тромбообразования». Тезисы докладов. Саратов, 1968, с. 48—51.
6. Никитин Ю. П. Свертывающие, противосвертывающие и фибринолитические свойства стенки аорты в норме и при атеросклерозе. Автореф. дис. докт. Томск, 1968.
7. Кузник Б. И. — *Кардиология*, 1975, № 11, с. 66—72.
8. Ochsen A. — *J. A. M. A.*, 1950, v. 144, p. 831.
9. Nilson M. G., Parry E. W. — *Lancet*, 1954, v. 266, p. 486—488.
10. Бышевский А. Ш. — *Вопр. питания*, 1968, № 5, с. 17—22.
11. Бышевский А. Ш. Витамины и гемокоагуляция. Свердловск, 1978.
12. Франкфурт О. С., Липчина А. П., Бунто Т. В. и др. — *Бюлл. экспер. биол.*, 1967, № 8, с. 86.
13. Девяткина Т. А. — *Докл. АН СССР*, 1978, т. 242, с. 449—452.
14. Bergerhof H. D., Roka L. Z. — *Vitam. Horm. u. Fermentforsch.*, 1954, Bd 6, S. 25—28.
15. Котовацкова М. А., Федорова З. Д. — *Лабор. дело*, 1961, № 1, с. 18.
16. Балуда В. П., Маларовский В. П., Ойвин И. А. Лабораторные методы исследования свертывающей системы крови. М., 1962.
17. Poller L. — *Angiology*, 1952, v. 5, p. 21.
18. Szirmai E. — *Пробл. гематол.*, 1957, № 6, с. 38—44.
19. Балуда В. П., Жукова Н. А., Рукавенкова Ж. Н. — *Лабор. дело*, 1965, № 7, с. 417—419.
20. Рутберг Р. А. — Там же, 1961, № 6, с. 6—7.
21. Kowarsyk H., Buluk K. — *Acta physiol. pol.*, 1954, v. 5, p. 35—38.
22. Cotine H., Alions A. — *Brit. J. Surg.*, 1948, v. 35, p. 338.
23. Аристархова С. А., Архипова Г. В., Бурлакова Е. Б. и др. — *Докл. АН СССР*, 1976, т. 228, № 1, с. 215—218.
24. Бурлакова Е. Б., Джалыбова М. И., Молочкина Е. М. — Там же, т. 227, № 4, с. 991.

Поступила 18/IX 1979 г.

## EFFECT OF ANTIOXIDANT IONOLE ON BLOOD COAGULATION AND FIBRINOLYSIS

V. P. Mischenko, Yu. M. Gol'denberg, T. V. Novosel'tseva

Chair of Normal Physiology, Medical Stomatologic School, Poltava

An antioxidant ionole (2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol) decreased the coagulation and increased the fibrinolytic properties of blood *in vivo* and *in vitro*. The importance of the antioxidant is considered in relation to its effect on cell metabolism and on membrane permeability; possible application of the drug for treatment of pathologies, caused by activation of lipid peroxidation and of blood coagulation system, is also discussed.

УДК 616.72-002-022.6-092.9-07:616.36-008.939.633.2-074

Н. А. Юсипова, Л. А. Гончарик, А. И. Балаклеевский,  
П. М. Суриков, В. Г. Безкровная, О. А. Лавничук

## ЦИКЛИЧЕСКИЙ 3',5'-АДЕНОЗИНМОНОФOSFAT В ПЕЧЕНИ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Центральная научно-исследовательская лаборатория Минского медицинского института

Циклический 3',5'-аденозинмонофосфат (цАМФ), участвующий в регуляции разнообразнейших внутриклеточных ферментативных реакций [1, 2], существенно влияет на развитие воспалительных и аллергических реакций в организме. В опытах *in vitro* была показана способность цАМФ увеличивать подвижность полиморфноядерных лейкоцитов и макрофагов, подавлять пролиферативный рост клеток, угнетать выделение химических медиаторов воспаления и анафилактогенных соединений из клеток [3—5].

В литературе имеются сообщения о тесной взаимосвязи между содержанием циклических нуклеотидов и некоторыми свойствами лизосом — подвижностью и проницаемостью мембран [6].

Изложенное позволяет предположить, что цАМФ играет роль в патогенезе ревматоидного артрита.

Целью настоящей работы было исследование содержания цАМФ в печени крыс в динамике развития экспериментального ревматоидного артрита (адьювантного артрита). Приводятся также результаты сравнительного изучения содержания цАМФ в плазме крови здоровых людей и больных ревматоидным артритом.

### Методика

Адьювантный артрит воспроизводили у 45 беспородных белых крыс-самцов массой 170—200 г способом, описанным ранее [7]. Контрольную группу составили 32 крысы того же пола и массы, которым вместо адьюванта вводили 0,85% стерильный раствор NaCl.

Крыс декапитировали на 3, 6, 14 и 25-й дни после вмешательства, перфузировавшую ткань печени гомогенизировали в этаноле (из расчета 20 мг ткани на 1 мл этанола). Гомогенаты центрифугировали в течение 20 мин при 3000 об/мин. Надосадки упаривали досуха в вакууме, сухой остаток растворяли в 250 мкл дистиллированной воды. По 50 мкл отбирали для последующего определения содержания цАМФ.

В опытах использовали плазму крови людей, обработанной консервантом (0,1 мл консерванта на 1 мл крови). Состав консерванта: 25 мл 1 М NaOH, 9,3 г ЭДТА в 50 мл дистиллированной воды; рН 7,5—8,0. К 1 мл плазмы добавляли 2 мл этанола, тщательно перемешивали. 2 мл полученной смеси упаривали досуха в вакууме. Сухой остаток растворяли в 250 мкл дистиллированной воды. 50 мкл отбирали для определения цАМФ. Экстракцию цАМФ из ткани и плазмы проводили этанолом, очищенным от альдегидов следующим образом: к 1 л сприта добавляли 2 г азотнокислого серебра и 5 г едкого кали, затем перегоняли. Количество цАМФ определяли радиокомпаративным методом, используя наборы фирмы «Amersham» (Англия).

Счет проб производили на жидкостно-сцинтилляционном счетчике «β-Mate II» (фирма «Beckman», США).

Результаты, полученные в наших опытах, соответствовали данным литературы [8].

## Результаты и обсуждение

Как видно из представленных в табл. 1 данных, содержание цАМФ в печени крыс уже в первые дни развития артрита резко снижалось — на 67% по сравнению с контролем. На 6-й день количество цАМФ незначительно повысилось, но оставалось в среднем в 2 раза ниже по сравнению с контролем и при дальнейшем развитии артрита (вплоть до 25-го дня) изменялось мало. Более чем в 2 раза была снижена концентрация цАМФ

Таблица 1

Содержание цАМФ (в нмоль на 1 г влажной ткани) в печени крыс в ходе развития экспериментального артрита ( $\bar{x} \pm S\bar{x}$ )

Группа животных	День после вмешательства			
	3-й	6-й	14-й	25-й
Контрольная	1311 ± 203 (7)	1360 ± 181 (7)	1380 ± 164 (9)	1326 ± 148 (8)
Крысы с адьювантным артритом	430 ± 58 (10)	680 ± 92 (10)	720 ± 92 (15)	592 ± 108 (10)
<i>P</i>	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

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

Таблица 2

Содержание цАМФ в плазме крови здоровых и больных людей

Группа обследованных	Содержание цАМФ, пмоль/мл
Здоровые	14,9 ± 2,4 (21)
Больные ревматоидным артритом	6,9 ± 1,3 (46)
<i>P</i>	<0,01

в плазме больных ревматоидным артритом по сравнению с донорами (табл. 2). Известно, что цАМФ является тем посредником, благодаря которому реализуется действие на клетку многих биологически активных агентов и провоцируются биохимические реакции, в совокупности составляющие физиологический ответ клетки на раздражение [1--2]. В связи со способностью нуклеотида воздействовать на активность ферментов различных метаболических систем (гликолиза, липолиза, гликогенолиза и др.) изменение его концентрации в клетке может явиться причиной развития многих

патологических реакций.

Для уточнения возможной роли цАМФ в патогенезе ревматоидного артрита наибольший интерес представляют следующие факты.

По данным литературы [6], формирование внутриклеточных микротрубочек (микрочанальцев) связано с фосфорилированием субъединиц тубулина (их структурного белка) цАМФ-зависимыми протеинкиназами. Дефицит цАМФ приводит к нарушению упорядоченной цитоскелетной организации, вызывает ускорение движения лизосом к плазматической мембране и увеличение выхода кислых гидролаз из клетки. Этому способствует повышение проницаемости мембран органелл в указанных условиях [6, 9, 10]. Избыточное выделение лизосомных гидролитических ферментов связывают с дальнейшим развитием деструктивных, воспалительных и патоиммунных реакций при ревматоидном артритe [6, 11--14].

В серии экспериментальных работ по изучению механизма действия митогенных стероидных гормонов на репродуктивные органы [15, 16] была убедительно показана роль лизосом в индукции процессов клеточного размножения, связанная прежде всего с транспортом митогена в составе органелл к ядру и с последующим воздействием гидролаз на синтез ДНК. Известно, что при ревматоидном артритe характерно усиление митотической активности клеток и усиление клеточной пролиферации [17]. Возможно, ускоренное внутриклеточное движение лизосом вследствие недостатка

цАМФ является одним из факторов, способствующих пролиферативному росту клеток при указанном заболевании.

Нарушение процессов сборки микротрубочек, регулирующих движение и распределение в клеточной оболочке гликолипидов, гликопротеинов и гликозаминогликанов, может привести к изменению состава и свойств мембран, а следовательно, и процессов клеточного контакта и межклеточного гликозилирования, тесно связанных с явлениями индуктивного синтеза ДНК, размножением и пролиферацией клеток [18].

Снижение содержания цАМФ при артрите облегчает протекание клеточных реакций гиперчувствительности. Имеются многочисленные сообщения о торможении таких реакций в присутствии указанного соединения. Это свойство нуклеотида связано с его способностью ингибировать выделение гистамина и других анафилактических веществ из клетки в ходе аллергических и иммунологических процессов. Так, под влиянием препаратов, повышающих содержание цАМФ в клетке (теофиллин, глюкоагон), резко снижалось выделение гистамина тканью сердечной мышцы морской свинки с моделированной пассивной анафилаксией [3, 5, 19].

Из изложенного следует, что уменьшение содержания цАМФ при ревматоидном артрите является важным патогенетическим фактором. Поэтому представляется оправданным исследование возможности применения при ревматоидном артрите в качестве лечебных средств препаратов, способствующих внутриклеточному накоплению указанного нуклеотида.

Представляет интерес выяснение возможных причин изменения содержания цАМФ в ткани печени крыс с моделированным артритом, в частности активности аденилатциклазы и фосфодиэстеразы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Думлер И. Л., Этингер Р. Н. — *Вопр. мед. химии*, 1976, № 2, с. 151—161.
2. Robinson G. A., Butcher R. W., Sutherland E. W. — *Cyclic AMP*. New York, 1971, p. 419.
3. Jamatato S. — *Immunology*, 1973, v. 24, p. 77—83.
4. Белозеров А. П., Васильченко В. Н. — В кн.: *Молекулярная биология*. Киев, 1977, вып. 16, с. 34—46.
5. Божков Б. — *Дерматол. и венерол.* (София), 1972, т. 11, с. 209—219.
6. Weissmann G. — *New Engl. J. Med.*, 1972, v. 286, p. 141—147.
7. Юсипова Н. А. — *Вопр. мед. химии*, 1978, № 3, с. 362—267.
8. Steiner A. L., Pagliara A. S., Chase L. R. et al. — *J. biol. Chem.*, 1972, v. 247, p. 1114—1120.
9. Покровский А. А., Тутельян В. А. *Лизосомы*. М., 1976.
10. Deporter D. A. — *Biomedicine*, 1978, v. 28, p. 5—8.
11. *Lysosomes in Biology and Pathology*. Eds. J. T. Dingle, H. B. Fell. Amsterdam, 1969, v. 2, p. 421.
12. Fehr K., Artmann G., Velvart M. et al. — *Arthr. a. Rheum.*, 1977, v. 20, p. 1240—1248.
13. Roughley B. P., Barret A. J. — *Biochem. J.*, 1977, v. 167, p. 629—639.
14. Ghosh P. — *Aust. N. Z. J. Med.*, 1978, v. 8, p. 12—15.
15. Szego C. M., Seelar B. J., Steadman R. A. et al. — *Biochem. J.*, 1971, v. 123, p. 523—528.
16. Szego C. M., Steadman R. A., Seelar B. J. — *Europ. J. Biochem.*, 1974, v. 46, p. 377—386.
17. Jacoby R. K., Jayson M. G. N. — *Ann. rheum. Dis.*, 1976, v. 35, p. 32—36.
18. Туманова С. Ю. — *Биохимия*, 1978, т. 43, с. 387—398.
19. Perper L. J. — *Int. Arch. Allergy*, 1972, v. 43, p. 837—844.

Поступила 19/IX 1979 г.

#### CYCLIC ADENOSINE-3', 5'-MONOPHOSPHATE IN LIVER TISSUE OF RATS WITH EXPERIMENTAL RHEUMATOID ARTHRITIS

N. A. Yusipova, L. A. Goncharik, A. I. Balakleevsky,  
P. M. Surikov, V. G. Bezkravnaya, O. A. Lavnichuk

Medical School, Minsk

Content of cAMP was distinctly decreased in rat liver tissue within the first days of development of experimental rheumatoid arthritis (adjuvant arthritis). Within 6 days the content of cAMP was slightly increased in liver tissue of the arthritic rats but it was lo-

wered 2-fold as compared with controls. The content of cAMP was quite unaltered during subsequent course of the impairment (within 25 days). In blood plasma of patients with rheumatoid arthritis the content of cAMP was decreased more than 2-fold as compared with its concentration in blood of donors. Possible importance of cAMP deficiency in pathogenesis of rheumatoid arthritis is discussed.

УДК 617-001.4-092.9-008.9-085.272.7

*М. А. Зайденберг, Р. Н. Короткина, И. М. Носова,  
Г. Н. Дудникова, С. А. Писаржевский, А. А. Карелин*

## **ВЛИЯНИЕ ВВЕДЕНИЯ $\alpha$ ГМФ НА НЕКОТОРЫЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ТКАНЯХ РАНЫ КРЫС**

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

Участие циклических нуклеотидов в пролиферации и дифференцировке клеток служит предметом активного исследования в течение ряда лет [1, 2]. Вместе с тем роль циклических нуклеотидов в репаративных процессах при заживлении ран изучена недостаточно [3]. В связи с этим в настоящей работе изучали особенности метаболизма тканей и течения раневого процесса у экспериментальных животных после введения  $\alpha$ ГМФ.

### **Методика**

Работа проведена на белых крысах-самцах массой 170—200 г с экспериментальными ранами двух моделей: первая модель — линейная рана кожи спины с имплантированной под кожу нихромовой спиралью для образования чистой грануляционной ткани [4]; вторая модель — рана с дефектом кожи спины размером 2,5×2 см, что позволяло учитывать изменения ее площади по мере заживления. Животных с линейными ранами (первая модель) исследовали на 3, 5, 7 и 10-е сутки, а с вырезанными ранами (вторая модель) — на 3, 5, 7, 10, 14 и 29-е сутки. Все животные были разделены на 3 группы: интактные, контрольные (оперированные) и подопытные. В каждой группе по 6—7 крыс.

Подопытным животным через 20—30 мин после операции внутрибрюшинно вводили  $\alpha$ ГМФ фирмы («Реанал») из расчета 3 мкг на 1 г массы в 0,5 мл 0,14 М раствора NaCl, контрольным животным вводили 0,5 мл 0,14 М раствора NaCl. За 2 ч до забоя крысам внутрибрюшинно инъецировали глицин-1- $C^{14}$  (удельная радиоактивность 47 мКи/ммоль) из расчета 0,6 мКи на 1 г массы животного. У декапитированных животных в тканях раны первой модели (в коже, грануляциях и мышцах) определяли количество [5] и биосинтез коллагена [6]. В мышцах исследовали включение  $^{14}C$ -глицина в саркоплазматические белки [7], актомиозин [8], белки фракции Т [9] и миоальбумин [10], определяли интенсивность глюконеогенеза по включению  $^{14}C$ -глицина в гликоген, активность ЛДГ [11]. На второй модели проводили измерения площади раны и морфологический анализ тканей. Полученные результаты подвергали вариационно-статистической обработке по Стьюденту.

### **Результаты и обсуждение**

Установлено, что в ранах первой модели на 3-й день после операции вокруг нихромовой спирали начинает образовываться грануляционная ткань, содержащая коллаген в несколько большем количестве, чем в прилежащих мышцах (рис. 1). Последние по содержанию коллагена практически не отличаются от мышц интактных животных. В коже раны на 3-и сутки содержание коллагена повышается более чем на 25% ( $P < 0,01$ ). К 5-му дню по сравнению с предшествующим сроком содержание коллагена в исследуемых тканях незначительно увеличивается, а затем — на 7—10-е сутки — в коже и мышцах снижается до уровня интактных животных. В грануляционной ткани содержание коллагена непрерывно возрастает и достигает максимума на 10-й день (см. рис. 1).

При исследовании биосинтеза коллагеновых белков кожи, мышц и грануляций выявляется закономерное повышение удельной радиоактивности с максимумом на 7-е сутки после операции (рис. 2). В последующие дни (к 10-м суткам) величины удельной радиоактивности коллагена снижаются.

При сопоставлении уровней радиоактивности коллагеновых белков необходимо отметить следующее: во-первых, у интактных животных удельная радиоактивность коллагена мышц в 2—2½ раза больше, чем коллагена кожи; во-вторых, у оперированных животных изменения биосинтеза коллагена в коже, мышцах и грануляциях в сопоставимые сроки носят идентичный характер и, в-третьих, уровень радиоактивности коллагена в образующейся грануляционной ткани на 3—4-е сутки после операции близок к величинам радиоактивности коллагена мышц, тогда как на 7—8-е сутки удельная радиоактивность коллагена грануляций всегда выше, чем в мышцах. У подопытных животных на 3—5-е сутки после операции содержание коллагена в исследуемых тканях по сравнению с контрольными величинами

изменяется неодинаково (см. рис. 1): в коже снижается, в мышцах не изменяется, а в грануляциях возрастает на 88 % ( $P < 0,001$ ). К 7-м суткам

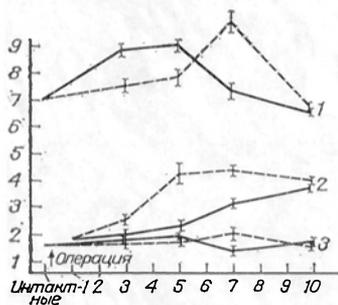


Рис. 1. Изменения содержания оксипролина в тканях раны под влиянием введения цГМФ.

По оси абсцисс — срок после операции (в сут), по оси ординат — содержание оксипролина (в г на 100 г сухой обезжиренной ткани). Сплошная линия — контрольные (оперированные) животные, пунктирная линия — оперированные животные после введения цГМФ. Оксипролин определяли в сухой обезжиренной ткани, 1 — кожа; 2 — грануляция; 3 — мышцы.

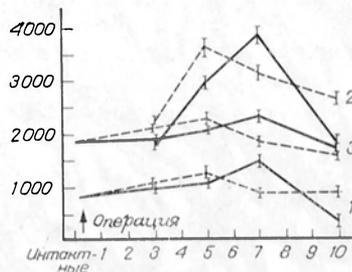


Рис. 2. Влияние введения цГМФ на биосинтез коллагеновых белков в тканях раны.

По оси ординат удельная радиоактивность (имп/мин на 1 мг коллагена), остальные обозначения те же, что на рис. 1.

содержание коллагена в тканях повышается — в мышцах на 41 % ( $P < 0,05$ ), в коже на 58 % ( $P < 0,001$ ), а в грануляциях остается на прежнем уровне. В последующие сроки (к 10-м суткам) содержание коллагена у подопытных

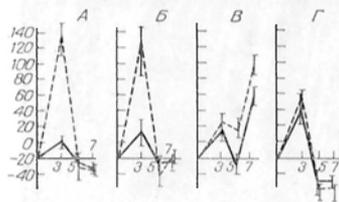


Рис. 3. Влияние введения цГМФ на включение  $^{14}\text{C}$ -глицина в белки саркоплазмы (А), актомиозин (Б), миоальбумин (В) и белки фракции Г (Г).

По оси ординат — разница в % от включения  $^{14}\text{C}$ -глицина в контроле. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

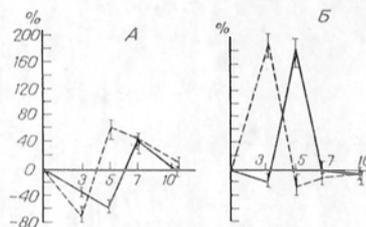


Рис. 4. Влияние введения цГМФ на содержание гликогена (А) и глюкозо-неогенез (Б) в мышечной ткани области раны.

По оси ординат — разница в % от включения  $^{14}\text{C}$ -глицина в контроле. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

и контрольных животных выравнивается. Следует отметить, что у животных, получавших цГМФ, наблюдается ранее увеличение количества коллагена в грануляционной ткани, так что к 5-му дню его содержание достигает более высокого уровня, чем у контрольных животных на 10-й день после операции. При этом количество коллагена у подопытных животных остается неизменно высоким и на 7—10-е сутки.

В отличие от изменений содержания коллагена изменения его биосинтеза после введения цГМФ в коже, мышцах и грануляциях однозначны (см. рис. 2). Активация биосинтеза, наблюдаемая в течение первых 5 дней, на 7-е и 10-е сутки сменяется уменьшением величин удельной радиоактивности. Обращает на себя внимание разнонаправленность изменений биосин-

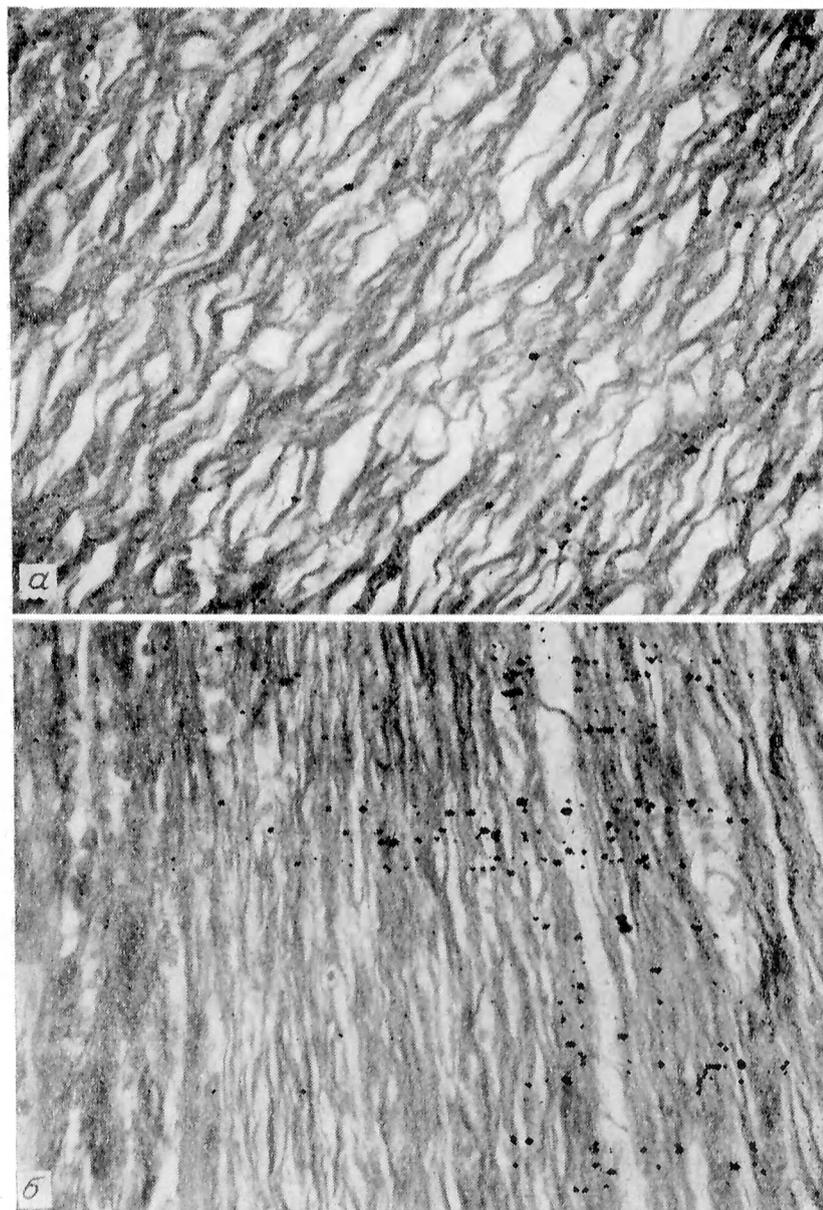


Рис. 5. Рубец на 29-й день после операции.  
а — контроль; б — опыт. Окраска пикрофуксином. Ув. 400.

теза и содержания коллагеновых белков в исследуемых тканях на 7-е сутки после введения цГМФ оперированным животным — снижение величин удельной радиоактивности на фоне повышенного содержания коллагена в тканях. Эти изменения, по-видимому, можно рассматривать либо как результат угнетения биосинтеза на фоне замедленного катаболизма коллагена, либо как разведение метки в результате предшествующего накопления коллагеновых белков в тканях, что в свою очередь также может быть след-

ствием выраженного ингибирования естественного распада вновь образовавшихся молекул коллагена.

Наряду с изменениями биосинтеза коллагена у контрольных животных в мышцах, прилежащих к нихромовой спирали, наблюдали изменения включения меченого предшественника в ряд мышечных белков (рис. 3): активацию включения в белки саркоплазмы и фракции Т и актомиозин на 3-и сутки, а в миоальбумин — на 3-и и 7-е сутки после операции.

У подопытных животных после введения цГМФ по сравнению с контрольными крысами имеет место активация включения меченого предшественника в белки саркоплазмы и актомиозин на 3-и сутки, а в миоальбумин — на 5-е и 7-е сутки после операции. По-видимому, эти изменения следует рассматривать как один из показателей усиления репаративных процессов в мышцах оперированных животных.

Наблюдаемые изменения биосинтеза мышечных белков сопровождаются сдвигами в обмене гликогена мышц. У оперированных животных на 5-е сутки наблюдается активация обмена гликогена, при этом интенсифицируется как образование гликогена (повышается глюконеогенез), так и его распад (уменьшается количество гликогена). К 7—10-м суткам содержание гликогена и уровень глюконеогенеза нормализуются (рис. 4).

У оперированных животных, получавших цГМФ, направленность и мера изменений содержания гликогена и интенсивности глюконеогенеза в мышцах не изменяются, но наступают на несколько дней раньше. Эти данные свидетельствуют об активации обмена гликогена в мышцах с некоторым превалированием распада над синтезом. Это подтверждается также повышением активности (на 25%,  $P < 0,05$ ) у подопытных животных ЛДГ на 3-и сутки после операции, что может указывать на интенсификацию гликолиза.

На основании полученных данных можно заключить, что у животных, которым вводили цГМФ непосредственно после операции, интенсифицируются некоторые метаболические процессы в тканях раны. В частности, имеет место более ранняя активация биосинтеза коллагеновых и ряда мышечных белков, а также ранняя мобилизация энергетических ресурсов, что, видимо, и может стимулировать репаративные процессы в тканях ран. Это подтверждено данными морфологического анализа и измерениями площади раны у контрольных и подопытных животных. Установлено, что у животных, получавших цГМФ, наблюдалось более раннее, чем у контрольных крыс, образование грануляций, клеточный состав которых был богаче. При этом пролиферация и дифференцировка фибробластов также наступали на несколько дней раньше, как и образование коллагеновых волокон, и тем самым ускорялся фибриллогенез в ранах подопытных животных (рис. 5).

Эти изменения морфологического состава тканей коррелировали с почти вдвое повышенной скоростью сокращения раневой поверхности, что в итоге приводило к более быстрому рубцеванию ран.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Seifert W. E., Rudland P. S. — Nature, 1974, v. 248, p. 138—140.
2. Федоров Н. А. — Успехи совр. биол., 1976, т. 82, вып. 1 (4), с. 34—36.
3. Зайденберг М. А., Короткина Р. Н., Носова И. М. и др. — В кн.: Циклазная система и ее роль в регуляции клеточного обмена. Ташкент, 1978, с. 114—115.
4. Зайденберг М. А., Носова И. М., Музыкант Л. И. — Бюлл. экспер. биол., 1976, № 6, с. 677—679.
5. Bergman I., Loxley A. — Analyt. Chem., 1963, v. 35, p. 1961—1965.
6. Hennenan D. U., Nichols G. — Meth. Enzymol., 1975, v. 40, Pt E, p. 304—377.
7. Кадыков В. В. — Вопр. мед. химии, 1963, № 3, с. 311.
8. Опель В. В., Серебряникова Т. П. — Биохимия, 1959, т. 24, № 4, с. 648.
9. Иванов И. И., Юрьев В. А., Новожилков Д. А. — Вопр. мед. химии, 1959, № 4, с. 243.
0. Korner A., Debroy J. — Nature, 1956, v. 178, p. 1067.
1. Wroblewski F., La Due J. S. — Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1955, v. 90, p. 210.

Поступила 24/IX 1979 г.

## EFFECT OF cGMP ADMINISTRATION ON SOME METABOLIC PROCESSES IN TISSUES OF RAT WOUND

*M. A. Zaydenberg, R. N. Korotkina, I. M. Nosova,  
R. N. Dudnikova, S. A. Pisarzhevsky, A. A. Karelin*

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

Administration of cGMP immediately after an operation caused the early activation of collagen biosynthesis in skin, muscles and granulations. Within the 5 day content on collagen was increased two-fold in granulations of experimental animals as compared with controls. Stimulation of the label incorporation into some muscle proteins and intensification of glycogen metabolism were also observed after the cGMP treatment. Morphologic analysis of tissues and measurement of the wound area in dynamics of healing were carried out. The data obtained suggest that administration of cGMP into the operated animals activated metabolism in wound tissues and stimulated their healing.

УДК 616.153.922-008.61-092.9-02:612.014.45

*И. В. Сидоренков, О. А. Днепровская*

## ВЛИЯНИЕ ОБЩЕЙ ВИБРАЦИИ НА СОДЕРЖАНИЕ ГЛЮКОЗЫ И АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗА В КРОВИ И ТКАНЯХ КРОЛИКОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИИ

Кафедра биохимии Медицинского института им. Д. И. Ульянова, Куйбышев

Одной из ответных реакций организма на действие вибрации является нарушение обмена веществ [1—3]. Особый интерес представляет изучение состояния синтеза углеводов при действии вибрации как у интактных животных, так и у кроликов с экспериментальной гиперхолестеринемией. В литературе сведения, посвященные изучению этого вопроса, практически отсутствуют. В связи с изложенным целью настоящего исследования явилось изучение влияния общей вибрации на уровень глюкозы и активность ключевых ферментов глюконеогенеза в плазме крови и тканях интактных животных и кроликов с экспериментальной гиперхолестеринемией.

### Методика

Опыты поставлены на 38 беспородных кроликах массой 3—4 кг, содержащихся в одинаковых условиях. Животные 1-й группы (9 кроликов) получали холестерин с кормежными продуктами в дозе 0,5 г в сутки; кроликов 2-й группы (9 животных) подвергали общей вибрации интенсивностью 80—110 дБ с максимумом частотной характеристики в октавной полосе 125 Гц; животные 3-й группы (9 кроликов) наряду с общей вибрацией в указанных параметрах получали холестерин в дозе 0,5 г в сутки; 4-ю группу составили 11 интактных кроликов. Продолжительность опыта 3—3<sup>1</sup>/<sub>2</sub> мес. По окончании срока опытов определяли активность глюкозо-6-фосфатазы (Г6Ф-азы) по методу [4] и фруктозо-1,6-дифосфатазы (ФДФ-азы) по методу [5] в плазме крови, ткани печени и корковом веществе почек. Определение глюкозы проводили специфическим глюкозооксидазным методом [6] и в цельной крови. Количество глюкозы выражали в миллиграммпроцентах, активность ферментов в крови — в микромолях неорганического фосфора, освобождающегося за 1 ч инкубации в 1 мл плазмы крови, а в тканях — на 10 мг белка экстракта. Количественное определение неорганического фосфора проводили по методу Фиске и Суббароу [7]. Белок в супернатанте определяли биуретовым методом.

### Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что в процессе воздействия вибрации на организм кроликов уровень глюкозы в плазме крови повышается (рис. 1). Содержание глюкозы в цельной крови не изменяется. Это дает основание думать о нарушении проницаемости мембран эритроцитов или изоляции глюкозы тканями, что подтверждают наши данные о снижении количества глюкозы в сердечной (16,8%;  $P=0,008$ ) и скелетной (10,7%;

$P=0,009$ ) мышцах, а также данные литературы о снижении уровня АТФ в мышечной ткани при вибрации [8].

Развитию гипергликемии, по-видимому, способствовало и значительное повышение активности Г6Ф-азы и ФДФ-азы в главных органах глюконеогенеза — печени и почках (см. рис. 1). Что касается гиперхолестеринемии

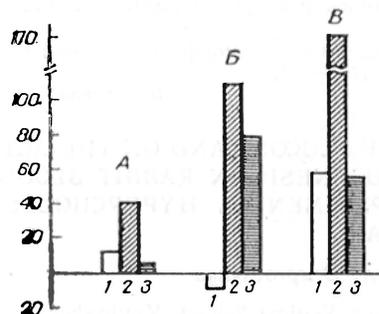


Рис. 1. Изменение уровня глюкозы (А), активности Г6Ф-азы (Б) и ФДФ-азы (В) под влиянием вибрации (в % к контролю). 1 — плазма крови; 2 — печень; 3 — корковый слой почек.

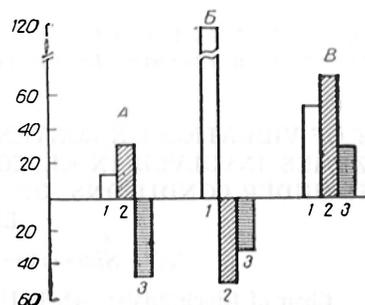


Рис. 2. Изменение уровня глюкозы (А), активности Г6Ф-азы (Б) и ФДФ-азы (В) при гиперхолестеринемии (в % к контролю). Обозначения те же, что на рис. 1.

мии (рис. 2), то повышение содержания глюкозы в плазме крови в этих условиях не сопровождается одновременным повышением Г6Ф-азной активности в печени и почках, хотя активность другого фермента глюконеогенеза — ФДФ-азы значительно повышена. В плазме крови отмечается значительное увеличение активности как Г6Ф-азы, так и ФДФ-азы, что, по-видимому, и обусловило развитие гипергликемии. В этих условиях повышение содержания глюкозы (35,2%;  $P<0,001$ ) в мышце сердца, вероятно, указывает на недостаточное ее окисление. Это находится в полном соответствии с данными литературы о нарушении обмена углеводов при гиперхолестеринемии [9—12].

При изучении действия вибрации на гиперхолестеринемию (рис. 3) нами выявлено снижение содержания глюкозы в тканях сердца (14,8%;  $P=0,02$ ) и скелетных мышц (20,2%;  $P<0,001$ ). Одновременно значительно повышается активность Г6Ф-азы в печени и почках, ФДФ-азы — в печени, что при нормальном уровне глюкозы в крови, видимо, объясняется снижением компенсаторной реакции организма и усилением патологического процесса.

На основании полученных нами данных можно рекомендовать в качестве дополнительного диагностического теста вибрационной болезни определение уровня глюкозы не в цельной крови, а в плазме с одновременным исследованием активности ФДФ-азы.

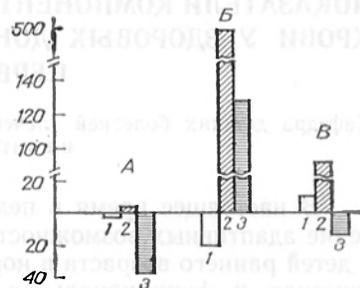


Рис. 3. Изменение количества глюкозы (А), активности Г6Ф-азы (Б) и ФДФ-азы (В) под влиянием вибрации на фоне гиперхолестеринемии (в % к содержанию холестерина).

Обозначения те же, что на рис. 1.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Карпова Н. И. Вибрация и нервная система. Л., 1976.
2. Киселева В. И., Турдиев М. Т. — Мед. ж. Узбекистана, 1971, № 9, с. 45.
3. Миносян С. М. — Ж. exper. и клин. мед., 1974, № 1, с. 50.
4. Swanson M. A. — Meth. Enzymol., 1955, v. 2, p. 541.
5. McGilvery R. W. — Ibid., p. 543.

6. Лукомская И. С., Городецкая В. К. — Биохимия, 1961, т. 23, № 3, с. 477.
7. Fiske С. Н., Subbarow Y. — J. biol. Chem., 1925, v. 66, p. 375.
8. Меньшиков А. А., Баранова Н. П. — Бюлл. exper. биол., 1978, № 7, с. 35.
9. Джавахашвили И. В. — В кн.: Украинская респ. науч. конф. по проблеме «Гипертоническая болезнь, атеросклероз и коронарная недостаточность». Краткое содержание докладов. Львов, 1966, с. 118.
10. Лохвицкая А. Л. — Труды Куйбышев. мед. ин-та, 1964, т. 29, с. 94.
11. Сидоренков И. В. — В кн.: Вопросы биохимии атеросклероза. Куйбышев, 1969, с. 4.
12. Сидоренко И. В. — В кн.: Вопросы биохимии и патоморфологии атеросклероза в эксперименте и клинике. Куйбышев, 1975, с. 3.

Поступила 5/XI 1979 г.

## EFFECT OF VIBRATION ON CONTENT OF GLUCOSE AND ON THE ACTIVITY OF ENZYMES INVOLVED IN GLUCONEOGENESIS IN RABBIT BLOOD AND TISSUES UNDER CONDITIONS OF EXPERIMENTAL HYPERCHOLESTEROLEMIA

I. V. Sidorenkov, O. A. Dneprovskaya

Chair of Biochemistry, D. I. Ul'yanov Medical School, Kuybyshev

Under conditions of experimental hypercholesterolemia vibration caused variable alterations in glucose-6-phosphatase activity and an increase in fructose-1,6-diphosphatase activity in rabbit tissues as well as an increase of glucose content in blood. At the same time, consumption of glucose and carbohydrate metabolism were altered in kidney cortex, heart and skeletal muscles under conditions of combined effect of total-body vibration and hypercholesterolemia.

УДК 612.128:577.152.34

Л. П. Толстых

## ПОКАЗАТЕЛИ КОМПОНЕНТОВ КАЛЛИКРЕИН-КИНИНОВОЙ СИСТЕМЫ КРОВИ У ЗДОРОВЫХ ДОНОШЕННЫХ И НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ ПЕРВЫХ 3 МЕС ЖИЗНИ

Кафедра детских болезней лечебного факультета Куйбышевского медицинского института им. Д. И. Ульянова

В настоящее время в педиатрии актуальной проблемой является изучение адаптивных возможностей и состояния защитных реакций организма у детей раннего возраста в норме и при патологии. Как известно, морфологическая и функциональная незрелость организма недоношенных детей приводит к более замедленной и менее совершенной его адаптации к новым условиям, в процессе которых неизбежно выявляется недостаточность функций различных органов и систем [1].

Одним из показателей состояния реактивности и адаптации организма является калликреин-кининовая система (ККС), играющая большую роль в регуляции баланса гомеостаза, обеспечивающая надежность и многообразие деятельности организма [2—4].

Сведения о ККС у детей раннего возраста немногочисленны, исследования касаются отдельных ее компонентов и проведены с использованием различных методик [5—7]. Мы не встретили работ, посвященных исследованию компонентов ККС у недоношенных детей. Поэтому целью настоящей работы было изучение компонентов ККС в сыворотке крови здоровых детей от 1 до 3 мес жизни, в том числе родившихся преждевременно.

### Методика

Обследовано 45 здоровых детей в возрасте от 1 до 3 мес — 18 доношенных и 27 родившихся преждевременно. Период новорожденности у них, по данным анамнеза, протекал без патологии. Среди доношенных детей в возрасте от 1 до 2 мес было 10, от 2 до 3 мес — 8; мальчиков было 7, девочек — 11. Из 27 недоношенных детей I степень недоношенности констатирована у 15, II степень — у 8, III степень — у 4; в возрасте от 1 до 2 мес было 18, от 2 до 3 мес — 9 детей; мальчиков было 15, дево-

чек — 12. Всех детей обследовали в стационарных условиях, кровь брали в утренние часы перед вторым кормлением. Определяли количественное содержание калликрина и калликриногена в сыворотке крови упрощенным хроматографическим методом А. В. Кринской и Т. С. Пасхиной, который является «пробирочным» вариантом колоночного метода [8]. Для определения общей эстеразной активности крови использовали метод Т. С. Пасхиной и соавт., основанный на определении степени гидролиза N-бензоил-L-аргинин-этилового эфира (БАЭЭ) [9]. Этим методом определяют активность всех ферментов, способных гидролизовать эфирную связь в БАЭЭ с образованием бензоиларгинина (БА). Кининазу I (карбоксипептидазу N) в сыворотке крови определяли спектрофотометрическим методом Фолька [10] по расщеплению гиппурил-L-лизина (ГЛ). Метод описан в отечественной литературе Т. С. Пасхиной и соавт. [11]. Полученные данные обрабатывали методом математической статистики. Расчет показателей проводили на 1 мл сыворотки за 1 мин и на 1 опт. ед. ( $1 A_{280} \approx 1$  мг белка на 1 мл сыворотки крови).

## Результаты и обсуждение

Как видно из таблицы, показатели ККС у здоровых доношенных детей значительно отличаются от показателей у детей, родившихся преждевременно. Наблюдаются статистически достоверное снижение содержания кал-

Показатели компонентов ККС у здоровых детей (доношенных и недоношенных) в возрасте от 1 до 3 мес

Показатель	Доношенные дети (n=18)	Недоношенные дети (n=27)	P
Калликрин:			
мЕ/мл	22,53±2,02	16,83±1,89	0,05
мЕ/опт. ед.	0,33±0,03	0,26±0,03	0,05
Калликриноген:			
мЕ/мл	359,77±15,23	278,35±17,61	0,05
мЕ/опт. ед.	5,25±0,22	4,34±0,27	0,01
БАЭЭ-эстеразная активность:			
мЕ/мл	318,85±22,93	306,42±12,73	0,5
мЕ/опт. ед.	4,65±0,33	4,78±0,19	0,5
Кининаза			
Е/мл	0,210±0,03	0,163±0,036	0,5
Е/опт. ед.	0,003±0,0004	0,0025±0,0005	0,5

ликрина, калликриногена, тенденция к снижению активности кининазы и БАЭЭ-эстеразной активности у недоношенных детей. При сравнении данных о состоянии ККС у недоношенных детей в зависимости от степени зрелости организма (степени недоношенности) в расчете на 1 опт. ед. (на 1 мг белка) сыворотки крови мы не получили статистически достоверной разницы. Не выявлено также достоверных различий между доношенными и недоношенными детьми по возрастным группам и в зависимости от пола всех изученных компонентов.

На основании полученных данных можно заключить, что компоненты ККС у здоровых доношенных детей существенно не отличаются от показателей у детей более старшего возраста [12] и взрослых [13, 14]. У недоношенных детей зарегистрированы более низкие значения компонентов ККС, что может свидетельствовать о снижении у них адаптационных механизмов и общей реактивности организма. Определение в сыворотке крови компонентов ККС позволяет контролировать у детей раннего возраста, особенно родившихся преждевременно, степень нарушения механизмов приспособления и защиты и направленно воздействовать на них путем применения соответствующей терапии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Тур А. Ф. — Педиатрия, 1971, № 10, с. 3—7.
2. Веремеенко К. Н. — Врач. дело, 1972, № 5, с. 4—10.
3. Пасхина Т. С. — Биохимия, 1976, т. 41, с. 1347—1351.
4. Чернух А. М., Гомазков О. А. — Пат. физиол., 1976, № 1, с. 4—15.
5. Федосеева Н. А., Беляков Н. В. — Педиатрия, 1971, № 5, с. 19—21.

6. *Васильева Р. А.* Некоторые вопросы клинико-патогенетической характеристики пневмонии при острых респираторных вирусных инфекциях у детей раннего возраста. Автореф. дис. канд. Киев, 1973.
7. *Теслева З. И.* — В кн.: Съезд анестезиологов и реаниматологов УССР. 2-й. Тезисы докладов. Киев, 1974, с. 265—267.
8. *Кринская А. В., Пасхина Т. С.* — *Вопр. мед. химии*, 1974, № 6, с. 660—663.
9. *Пасхина Т. С., Егорова Т. П., Зыкова В. П.* — В кн.: *Современные методы в биохимии*. М., 1968, т. 2, с. 232—261.
10. *Folk J. E., Piez K. A., Carroll W. R. et al.* — *J. biol. Chem.*, 1960, v. 235, p. 2272—2277.
11. *Пасхина Т. С., Егорова Т. П., Зыкова В. П.* — В кн.: *Современные методы в биохимии*. М., 1968, т. 2, с. 232—261.
12. *Федосеева П. А.* Роль некоторых биологически активных веществ в патогенезе бронхиальной астмы у детей. Автореф. дис. канд. М., 1972.
13. *Пасхина Т. С., Бондарь З. А., Кринская А. В.* — *Клин. мед.*, 1975, № 8, с. 9—15.
14. *Байбурсян Е. Д.* Калликреин-кининовая система мочи и крови у больных гипертонической болезнью и хроническим пиелонефритом. Автореф. дис. канд. Куйбышев, 1978.

*Поступила 5/XI 1979 г.*

## THE PATTERNS OF THE KALLIKREIN-KININ SYSTEM IN BLOOD OF HEALTHY AND PREMATURE CHILDREN WITHIN THE FIRST THREE MONTHS OF POSTNATAL PERIOD

*L. P. Tolstykh*

Chair of Paediatrics, D. I. Ul'yanov Medical School, Kuuybyshev

Components of the kallikrein-kinin system were similar in blood of healthy 1-3 months old children, born without any anomalies, and in blood of older children or adults. The content of the components of this system was decreased in blood of premature children of the same age. In the early postnatal period the components of the kallikrein-kinin system did not differ depending on sex and age of the children.

УДК 577.153.3

*О. В. Есырев и М. П. Даниленко*

## ПОЯВЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ Na, К-АТФ-АЗЫ МОЗГА К АЦЕТИЛХОЛИНУ ПОСЛЕ ТЕПЛОВОЙ ОБРАБОТКИ МЕМБРАННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Институт физиологии АН Казахской ССР, Алма-Ата

Известно, что ацетилхолин (АХ) вызывает ингибирование Na, К-АТФ-азы сарколеммы сердечной и скелетных мышц [1, 2], а также различных фракций головного мозга животных [3, 4]. В то же время при старении препаратов сарколеммы отмечена смена тормозящего эффекта АХ на активирующий [2]. Это позволяет предположить, что реакция Na, К-АТФ-азы на воздействие АХ зависит от перестроек, происходящих в мембране при хранении препаратов фермента в других условиях, при которых может изменяться структурное состояние мембраны. Считают, что очистка Na, К-АТФ-азы приводит к ослаблению или даже полному устранению эффектов ряда нейромедиаторов (АХ, адреналина, норадреналина) на активность этого фермента [5—7]. Однако, подвергая тепловому воздействию частично очищенные мембранные препараты Na, К-АТФ-азы из мозга собаки и быка, исходно не чувствительные к АХ, мы обнаружили появление индуцированных ответов ферментативной активности на действие данного агента.

### Методика

Препараты Na, К-АТФ-азы выделяли из серого вещества мозга собаки и быка, используя два метода [8, 9], и хранили в среде (СХ), содержащей 0,25 М сахарозу и 0,03 М гистидин рН 7,2 при —12 °С. АТФ-азную активность определяли по накоплению Р<sub>н</sub> [10]. Среда инкубации (СИ) в конечном объеме (1 мл) содержала: 3 мМ АТФ; 3—5 мМ MgCl<sub>2</sub>; 130 мМ NaCl; 20 мМ KCl; 1 мМ ЭГТА; 50 мМ трис-HCl рН 7,4 и 10<sup>-6</sup>—10<sup>-2</sup> М АХ (кроме особо оговоренных вариантов). Инкубацию проводили при

37 °С. Реакцию начинали добавлением белка (5—10 мкг) и останавливали через 10 мин смешиванием СИ с 0,5 мл 16,5% трихлоруксусной кислоты. Мембранные препараты, выделенные по методу [8], обладали низкой АТФ-азной активностью (40—60 мкмоль Р<sub>и</sub> на 1 мг белка в 1 ч), около 50% которой было нечувствительной к уабаину. АТФ-азная активность препаратов, полученных по методу [9], полностью ингибировалась уабаином (10<sup>-4</sup> М) и составляла 160—180 мкмоль Р<sub>и</sub> на 1 мг белка в 1 ч. Белок определяли биуретовым методом в присутствии 1% дуоксихолата натрия.

### Результаты и обсуждение

При изучении нативных (не подвергавшихся предварительной обработке) мембранных препаратов, выделенных обоими методами, обнаружилось отсутствие эффекта АХ (10<sup>-6</sup>—10<sup>-2</sup> М) на активность Na, К-АТФ-азы. В процессе хранения в течение 3 мес при -12 °С чувствительность ферментативной активности этих препаратов к медиатору не изменялась. Изменение активности Na, К-АТФ-азы под действием АХ (10<sup>-6</sup>—10<sup>-5</sup> М) проявлялось в тех случаях, когда микросомы предварительно выдерживали при 22 и 37 °С в СХ, при этом реакция Na, К-АТФ-азы из мозга собаки и быка, полученной одним из названных или разными способами, была одинаковой. Более высокие концентрации медиатора (10<sup>-4</sup>—10<sup>-2</sup> М) практически не оказывали влияния как в присутствии, так и в отсутствие ЭГТА. Индуцированные эффекты АХ не снимались d-губокурарином (10<sup>-6</sup>—10<sup>-5</sup> М) и атропином (10<sup>-4</sup> М); эзерин также не изменял ответа Na, К-АТФ-азы на действие медиатора. Результаты экспериментов приведены в таблице.

Зависимость характера действия АХ (10<sup>-6</sup> М) на Na, К-АТФ-азу от способа предварительной обработки мембранных препаратов (за 100 принята активность интактных препаратов)

Температура и время предынкубации	Способ предынкубации			
	в СИ с АХ	в СХ без АХ (СИ с АХ)	в СХ с АХ (СИ без АХ)	в СХ с АХ (СИ с АХ)
22 °С; 30 мин	—	115±2,1 (15)	124±1,0 (15)	130±1,4 (16)
37 °С; 60 мин	100±1,6 (10)	84±1,1 (16)	80±0,9 (15)	76±1,2 (16)

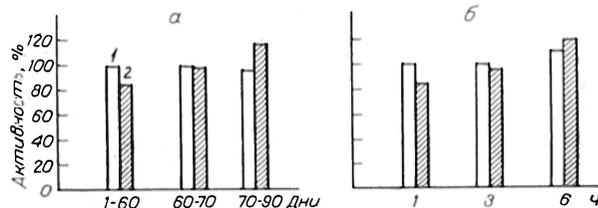
Примечание. В скобках указано число измерений.

Свежевыделенные препараты Na, К-АТФ-азы, выдержанные в СХ при 22 °С в течение 30 и 60 мин, реагировали на АХ повышением ферментативной активности. Стимулирующий эффект усиливался, когда препараты предынкубировали в СХ с АХ при той же температуре (в подобных экспериментах определение АТФ-азной активности проводили в СИ, не содержащей медиатора). Максимальное активирование Na, К-АТФ-азы (30%) было отмечено в том случае, когда тепловую обработку мембран проводили в СХ в присутствии АХ с последующим добавлением его в СИ. После 60-минутной выдержки микросом при 37 °С стимулирующее действие медиатора сменялось ингибированием Na, К-АТФ-азной активности, которое углублялось параллельно активированию при 22 °С в соответствующих условиях (см. таблицу). При 22 °С более эффективной оказалась 30-минутная выдержка при любом из описанных способов предынкубации, а при 37 °С — 60-минутная. После предварительной обработки препаратов в СИ в присутствии АХ при 37 °С с последующим определением в ней АТФ-азной активности эффект медиатора вообще не проявлялся.

В процессе хранения наблюдалось изменение индуцированных ответов Na,К-АТФ-азы на воздействие АХ. На рисунке, а показана смена ингибирующего эффекта медиатора активирующим на 70—90-й день хранения препаратов, выделенных по методу [9]. Интересно, что обратимость действия АХ на Na,К-АТФ-азную активность при старении обнаруживалась при всех видах предварительной обработки мембран. Подобная фазность ответов Na,К-АТФ-азы отмечалась и при искусственном «старении» препаратов при 37 °С (см. рисунок, б). Следует подчеркнуть, что микросомаль-

ные препараты, выделенные нами из мозга собаки и быка по методу [9], отличались высокой термостабильностью. Так, АТФ-азная активность в контроле после выдерживания в течение 1½ и 3 ч при 37 °С не изменялась, а через 6 ч наблюдалось даже активирование фермента, в то время как препараты из мозга быка, полученные авторами данного метода, начинали инактивироваться уже после 1 ч предынкубации при данной температуре. Подобное активирование Na,К-АТФ-азы было показано ранее [11] на высокоочищенном препарате из почечной ткани, выдержанном при 37 °С в течение 3 ч.

Рядом авторов показано, что при очистке Na,К-АТФ-азы нарушается ее способность реагировать с нейромедиаторами [5, 6], в связи с этим исследование



Изменение чувствительности Na, К-АТФ-азы к АХ при хранении мембранных препаратов (а) и их искусственном старении при 37 °С (б).

АХ ( $10^{-6}$  М) добавляли только в СИ; препараты преинкубировали в СХ при 37 °С в течение 1 ч. 1 — контроль; 2 — в присутствии АХ.

проводят преимущественно на неочищенных препаратах фермента [7]. Согласно нашим данным, фермент, выделенный с помощью детергента и хаотропных агентов, был полностью нечувствителен к АХ в различные сроки хранения. Однако мы наблюдали появление эффектов медиатора после предварительной выдержки микросом в СХ с АХ или без него. Описанные условия тепловой обработки не приводили к изменению Na,К-АТФ-азной активности в контроле. Это говорит о том, что использованные нами способы предынкубации были достаточно мягкими и затрагивали только какие-то механизмы регуляции Na,К-АТФ-азы.

Эффекты АХ не снимались d-тубокурарином и атропином, что указывает на отсутствие опосредованного действия медиатора на Na,К-АТФ-азу через холинорецепторы. Возможность участия ацетилхолинэстеразы в модификации АТФ-азной активности ацетилхолином также можно исключить, поскольку эзерин не изменял реакции ферментного препарата на АХ. Как видно из таблицы, температура и длительность предварительной обработки мембран, а также присутствие АХ могут регулировать характер влияния медиатора (активирующего или ингибирующего) на активность Na, К-АТФ-азы. Кроме того, АХ, вероятно, вступает в конкурентные взаимоотношения с ионами СИ (возможно с  $Mg^{2+}$  [4]) за регуляторные центры Na, К-АТФ-азы. Так, предынкубация микросом с АХ в СИ была неэффективной (см. таблицу), одномоментное действие медиатора и ионов на выдержанные при 22 °С или 37 °С препараты фермента при запуске реакции приводило к появлению эффекта АХ. Этот эффект был более выражен, когда препараты Na, К-АТФ-азы предынкубировали с АХ в СХ, содержащей только сахарозу и буфер. Максимальное влияние медиатора на Na, К-АТФ-азную активность достигалось тогда, когда предынкубированный с АХ фермент реагировал с ним и в СИ. В последнем случае, по-видимому, имеет место поддержание исходной действующей концентрации медиатора в СИ, предотвращающее его «отмывку» из центров связывания.

Особый интерес представляет тот факт, что эффективными оказались только низкие концентрации АХ ( $10^{-6}$ — $10^{-5}$  М), тогда как на менее очищенных препаратах Na, К-АТФ-азы [3] было показано усиление действия АХ с повышением его концентрации. Это может быть обусловлено существованием участков на мембране с низким и высоким сродством к медиатору. Обработывая препараты детергентом и хаотропными агентами, мы, по-видимому, устранили участки действия высоких концентраций АХ, в то время как малые концентрации медиатора могут влиять либо непосредственно на молекулу Na, К-АТФ-азы, либо на ее окружение, вызывая изменение конформационного состояния фермента. При этом возможно иницииро-

вание такими концентрациями АХ совместно с действием температуры, генерализованных структурных перестроек в мембране [12].

Обнаруженное нами явление смены индуцированных эффектов АХ на противоположные при старении препаратов Na, K-АТФ-азы согласуется с данными, опубликованными ранее [2], о 50—60 % активации Na, K-АТФ-азы сарколеммы на 5-й день хранения вместо обычного ингибирования. Рядом авторов отмечена модификация чувствительности фермента к норадреналину [7] и дитиозритритзависимому ингибитору, обнаруженному в АТФ фирмы «Sigma» [13] при хранении мембранных препаратов. Анализируя литературные и собственные данные, можно заключить, что ответ Na, K-АТФ-азной активности на действие перечисленных соединений зависит от структурного состояния мембран, которое изменяется в процессе старения. Это отчасти подтверждается тем, что обратимость эффектов АХ была смоделирована нами при выдерживании препаратов Na, K-АТФ-азы при 37 °С в течение 3—6 ч.

Авторы выражают благодарность В. А. Ткачуку (кафедра биохимии Московского университета) за ценные замечания, сделанные при чтении рукописи.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ткачук В. А., Успанова Ж. К., Попова И. А. — Докл. АН СССР, 1973, т. 211, № 4, с. 989—992.
2. Ткачук В. А., Лопина О. Д., Болдырев А. А. — Биохимия, 1975, т. 40, № 5, с. 1032—1038.
3. Глебов Р. Н., Дмитриева Н. М. — Там же, 1974, т. 39, с. 822—827.
4. Кометиани З. П., Джаршивили Т. Я., Цакадзе Л. Г. — Там же, 1975, т. 40, № 5, с. 1039—1046.
5. Болдырев А. А. Биохимические аспекты электромеханического сопряжения. М., 1977.
6. Болдырев А. А., Твердислов В. А. — В кн.: Биофизика. М., 1978, т. 10.
7. Аксентев С. Л., Конев С. В., Лыскова Т. И. и др. — Биохимия, 1978, т. 43, № 10, с. 1893—1899.
8. Nakao T., Tashima Y., Nagano K. et al. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1965, v. 19, p. 755—758.
9. Klodos I., Ottolenghi P., Boldyrev A. — Analyt. Biochem., 1975, v. 67, p. 397—403.
10. Rathbun W. B., Bethlach M. V. — Ibid., 1969, v. 28, p. 436—445.
11. Barnett R. E., Palazzoto J. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1974, v. 242, p. 69—76.
12. Конев С. В., Аксентев С. Л. — Биохимия, 1977, т. 42, № 2, с. 187—197.
13. Quist E. E., Hokin L. E. — Biochim. biophys. Acta, 1978, v. 511, p. 202—212.

Поступила 13/ХІ 1979 г

#### SENSITIVITY OF BRAIN Na,K-ATPASE TO ACETYLCHOLINE AFTER HEAT TREATMENT OF MEMBRANE PREPARATIONS

O. V. Esyrev, M. P. Danilenko

Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Kazakh SSR, Alma-Ata

Microsomal preparations of Na, K-ATPase, isolated from dog and bovine brains, were completely insensitive to acetylcholine ( $10^{-6}$ – $10^{-2}$  M) under standard experimental conditions. At the same time, heat pretreatment of membranes induced alterations of the enzymatic activity in presence of low concentrations ( $10^{-6}$ – $10^{-5}$  M) of the neurotransmitter. Acetylcholine stimulated the Na, K-ATPase activity after storage of the preparations at 22° within 30 or 60 min inhibited the activity at 37°. Addition of the transmitter during the preincubation increased its effect. The maximal value of Na, K-ATPase activation and inhibition constituted 30% and 24%, respectively. D-tubocurarine ( $10^{-6}$ – $10^{-5}$  M) and atropine ( $10^{-4}$  M) did not eliminate and eserine ( $10^{-4}$  M) did not alter the induced effect of acetylcholine. The effects of acetylcholine were changed to the opposite ones within 70–90 days of storage of the preparations. The phenomenon might be simulated by «ageing» of microsomes at 37° within 3–6 hrs.

## ВЛИЯНИЕ ПРОБЫ С 0,1 г L-ДОФА НА ДИНАМИКУ ЭКСКРЕЦИИ С МОЧОЙ КАТЕХОЛАМИНОВ И ДОФА У БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ

Клиническая больница № 8 им. Соловьева «Клиника неврозов», Москва

В этиологии и патогенезе шизофрении большое значение придается обмену дофамина [1—3]. Разными методическими подходами было показано нарушение обмена этого центрального медиатора при шизофрении, что может объясняться изменениями либо в самих рецепторных системах [4, 5], либо в ферментных системах синтеза и распада дофамина [6—9].

Ранее мы показали перспективность применения разработанной нами пробы с введением 0,1 г L-ДОФА для оценки синтетической способности симпатико-адреналовой системы (САС) у больных с нарушениями вегетативного регулирования (гипертоническая и язвенная болезни) [10, 11].

В настоящей работе мы попытались проанализировать динамические изменения обмена катехоламинов, в частности дофамина, определяя эти вещества в свободной и связанной форме в моче больных шизофренией после проведения пробы с 0,1 г L-ДОФА.

Мы исходили из предположения, что исследование экскреции катехоламинов с мочой является одним из адекватных методов оценки тонуса и реактивности САС [12, 13]. Определение экскреции связанных в виде сульфатов катехоламинов существенно дополняет сведения о метаболических процессах в САС.

### Методика

В клинических условиях были обследованы 2 группы больных шизофренией в возрасте 25—48 лет. В 1-ю группу входило 8 женщин и 1 мужчина, у 5 из них была шубообразная форма течения шизофрении, а у 4 — непрерывнотекущая (параноидная). У всех больных была стадия обострения (наличие аффективных расстройств, острого бреда и пр.), но у них в течение 3—4 нед были сняты все лекарственные вещества, включая нейролептики. Во 2-ю группу входило 10 женщин; у 9 из них была шубообразная форма течения шизофрении и только у одной — непрерывнотекущая (параноидная). У больных этой группы под воздействием нейролептиков (аминазин, стелазин и др.) достигнута ремиссия (отсутствие психотической симптоматики). Мочу для исследования катехоламинов и ДОФА собирали непрерывно в течение 2 сут в следующие интервалы: 9—13, 13—16, 16—20 и 20—9 ч. Показатели, полученные в 1-е сутки, были контрольными, а на 2-е сут в 9 ч всем больным давали *per os* 0,1 г L-ДОФА.

Содержание в моче свободных форм адреналина, норадrenalина, дофамина и ДОФА определяли флюориметрическим методом [14], а связанные их формы — по методу [15]. Все определения проводили на спектрофлюориметре «Атінко — Вагтап» (США). Полученные данные подвергали статистическому и корреляционному анализу. Для сравнения использовали результаты, полученные нами ранее при аналогичном методическом обследовании после введения 0,1 г L-ДОФА клинически здоровым людям среднего возраста (25—35 лет; 9 человек), а также пожилого и старческого возраста (60—85 лет; 8 человек) [10, 11]. Указанная доза является минимальной из приведенных в литературе, она обладает большей физиологичностью и не вызывает выраженных побочных клинических проявлений.

### Результаты и обсуждение

У больных шизофренией при обострении после приема L-ДОФА отмечалось бурное выделение неметаболизированного ДОФА (см. таблицу, рис. 1) в дневные часы, которое достигало 30-кратного увеличения сразу же после приема препарата. При ремиссии величина повышения экскреции ДОФА была уже сопоставима с уровнем его выведения у здоровых людей среднего возраста (в 9,3 раза по сравнению с контролем в перерасчете на суточную мочу). У больных в стадии ремиссии выведение ДОФА после приема препарата увеличивалось лишь в 1,6 раза (см. таблицу). Известно, что у здоровых людей сравнимого возраста такое же количество L-ДОФА вызывало увеличение содержания его в моче только в 1,2 раза, а у здоровых

стариков не было выявлено видимых изменений в экскреции этого предшественника [11]. Следует отметить, что увеличение дозы L-ДОФА до 0,5 г у больных реактивным психозом повышало его выведение в 4—6 раз [16], а в дозе 0,75 г препарат также вызывал увеличение в 6 раз экскреции неметаболизированного ДОФА у здоровых людей [17]. Таким образом, прямой зависимости между количеством введенного ДОФА и его выделением не выявлено. Количество выделенного ДОФА от введенной дозы у больных 1-й группы составило 0,2% от введенной дозы, а у больных 2-й группы — 0,03%, т. е. в 6,6 раза меньше. Большое выделение ДОФА сопровождалось и активным синтезом дофамина из экзогенного ДОФА (см. рис. 1). Выделение дофамина у больных 1-й группы составило 3,8% от введенного ДОФА, а у больных 2-й группы — 22,5%. Изменение коэффициента дофамин/ДОФА, отражающего способность дофамина синтезироваться из ДОФА, у больных 1-й группы составило 65,5, а у больных 2-й группы этот показатель увеличился в 5,3 раза и достигал 347, что может свидетельствовать о значительно более активном синтезе дофамина у больных шизофренией в период ремиссии. У этих же больных был значительно увеличен и синтез норадреналина, на что указывало резкое увеличение отношения дофамин/норадреналин, которое было равно 694 (в 4,7 раза выше, чем при обострении).

Интересна динамика выделения связанных в виде сульфатов катехоламинов, отражающая метаболизм адреналина, норадреналина и дофамина (рис. 2). Обращает на себя внимание тот факт, что экскреция связанного дофамина у больных 1-й группы максимальна в дневное время (9—16 ч), а у больных 2-й группы, наоборот, в вечернее и ночное время (16—9 ч), что в основном соответствует динамике выделения его свободных форм. Это может говорить о том, что синтез дофамина у больных шизофренией настолько активен, что даже интенсивная инактивация его сульфированием неэффективна и в моче выявляется большая концентрация свободного дофамина. Перерасчет экскреции этого медиатора на суточные величины показал практически 8-кратное ее увеличение у больных обеих групп. Выделение суммарной формы дофамина (свободной и связанной) имело такую же закономерность (рис. 3).

У больных 1-й группы синтез норадреналина был очень активным в дневное время, особенно в первые 4 ч после приема препарата, когда было отмечено 25-кратное увеличение экскреции его свободной формы и 4-кратное увеличение экскреции связанной формы

Суточная экскреция катехоламинов и ДОФА (в мкг) в контрольное время у больных шизофренией и здоровых людей разного возраста ( $M \pm m$ )

Группы обследованных	Свободная форма						Связанная форма				Свободная форма + связанная						
	адреналин		ДОФА		дофамин		адреналин		дофамин		норадреналин		дофамин				
	адреналин	норадреналин	ДОФА	дофамин	адреналин	норадреналин	адреналин	норадреналин	адреналин	норадреналин	адреналин	норадреналин	адреналин	норадреналин			
Больные шизофренией: в стадии обострения (9) в стадии ремиссии (10)	2,5 ± 1,1	2,9 ± 2,1	6,7 ± 4,0	197 ± 72	2,1 ± 1,6	5,9 ± 2,0	4,6 ± 2,7	326 ± 114	8,8 ± 4,1	523 ± 186	3,5 ± 1,8	2,5 ± 1,9	10,9 ± 3,2	414 ± 101	7,0 ± 2,6	5,9 ± 3,3	847 ± 326
	4,4 ± 0,9	7,8 ± 1,5	14,8 ± 2,8	241 ± 41	3,5 ± 0,8	3,4 ± 1,4	7,0 ± 2,6	433 ± 215	5,9 ± 2,1	950 ± 314	4,4 ± 0,9	5,4 ± 1,5	18,8 ± 4,5	176 ± 55	9,8 ± 2,0	9,4 ± 2,1	1191 ± 355
Здоровые лица: в возрасте 25—35 лет (9) в возрасте 60—85 лет (8)	5,2 ± 1,1	5,4 ± 1,5	18,8 ± 4,5	268 ± 59	5,4 ± 1,4	1,6 ± 0,6	9,8 ± 2,0	950 ± 314	9,4 ± 2,1	1191 ± 355	5,2 ± 1,1	5,4 ± 1,5	18,8 ± 4,5	176 ± 55	13,2 ± 2,0	8,3 ± 3,5	444 ± 112
					8,0 ± 0,9	2,9 ± 2,0											

(см. рис. 1 и 2). У больных 2-й группы синтез норадреналина после приема L-ДОФА был значительно менее активным и максимальное увеличение выделения этого медиатора было только 6-кратным, хотя выделение его связанной формы увеличивалось в 8 раз. Синтез норадреналина из



Рис. 1. Влияние введения 0,1 г L-ДОФА на экскрецию с мочой свободных катехоламинов и ДОФА у больных шизофренией.

А — с 9 до 13 ч; Б — с 13 до 16 ч; В — с 16 до 20 ч; Г — с 20 до 9 ч; 1 — больные шизофренией в возрасте 25—38 лет в стадии обострения; 2 — больные шизофренией в возрасте 25—38 лет в стадии ремиссии; 3 — контрольная группа здоровых людей в возрасте 25—35 лет; 4 — контрольная группа здоровых людей в возрасте 60—85 лет. Данные представлены в % к соответствующему периоду контрольных суток. Звездочка —  $P < 0,05$ .



Рис. 2. Влияние введения 0,1 г L-ДОФА на экскрецию с мочой связанных катехоламинов и ДОФА у больных шизофренией.

Обозначения те же, что на рис. 1.

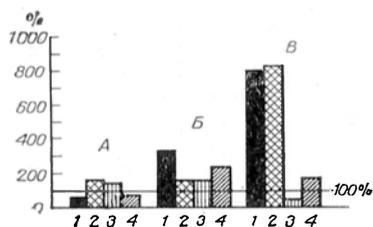


Рис. 3. Суточная экскреция суммарных катехоламинов (1 — А; 2 — НА; 3 — ДА) у больных шизофренией после проведения пробы с введением 0,1 г L-ДОФА. А — адреналин; Б — норадреналин; В — дофамин. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

дофамина происходит при участии дофамин- $\beta$ -гидроксилазы, активность которой, как показали данные, полученные у больных шизофренией, вероятно, может быть большой, особенно при обострении заболевания.

Синтез адреналина у больных 1-й группы был резко снижен, на что указывало увеличение коэффициента норадреналин/адреналин с 1,6 до 8, в то время как у больных 2-й группы он практически не изменялся. Следует отметить, что у здоровых людей сравнимого возраста не был выявлен увеличенный синтез адреналина, отношение норадреналин/адреналин оставалось без изменения после нагрузки L-ДОФА и составляло 0,9. Исходя из того

что синтез адреналина из норадреналина происходит в основном за счет фенилэтанол-амин-N-метилтрансферазы, можно предположить, что активность этого фермента у больных шизофренией в стадии обострения может снижаться. Однако клинические наблюдения показывают гиперактивность САС у больных шизофренией, что характеризуется сильной (неадекватной) реакцией этой системы на стрессовые ситуации, сопровождающейся экскрецией с мочой адреналина и норадреналина.

Корреляционный анализ степени экскреции свободных и связанных форм катехоламинов и ДОФА у больных шизофренией в стадии обострения

и ремиссии по сравнению со здоровыми людьми разного возраста показал относительно большую разницу между выделением этих веществ в контрольное время и после введения L-ДОФА, особенно в утренние и вечерние часы (рис. 4). Обращает на себя внимание значительно большее число корреляций ( $r > 0,75$ ) у больных шизофренией по сравнению со здоровыми людьми сравнимого возраста и в меньшей мере по сравнению со здоровыми людьми

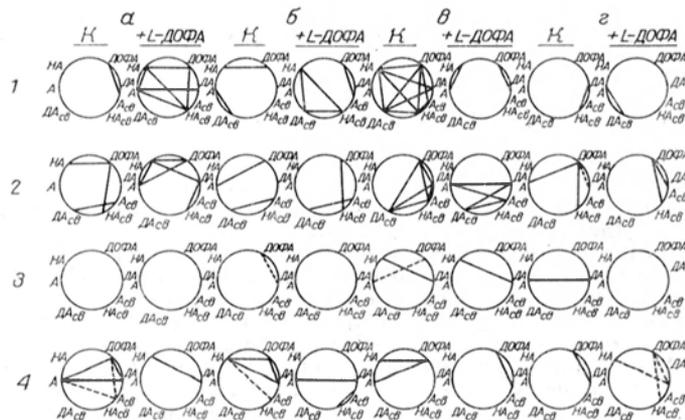


Рис. 4. Коррелятивные связи в экскреции свободных и связанных катехоламинов и ДОФА у больных шизофренией до и после проведения пробы с L-ДОФА (0,1 г).

К — контроль, А — адреналин, А<sub>св</sub> — адреналин связанный, НА — норадреналин, НА<sub>св</sub> — норадреналин связанный, ДА — дофамин, ДА<sub>св</sub> — дофамин связанный; а — исследования проводили в утреннее время с 9—13 ч, б — днем с 13—16 ч, в — вечером с 16—20 ч, г — ночью с 20—9 ч. L-ДОФА — введение 0,1 г L-ДОФА. 1 — больные шизофренией в стадии обострения, 2 — больные шизофренией в стадии ремиссии, 3 — здоровые люди в возрасте 25—35 лет, 4 — здоровые люди в возрасте 60—85 лет. Сплошная линия —  $r \geq +0,75$ ; пунктирная линия —  $r \geq -0,75$ .

пожилого и старческого возраста. У больных шизофренией в ночное время до пробы число корреляций увеличивается по сравнению с «дневным» показателем, а у здоровых — снижается.

Общее число корреляций у больных шизофренией в стадии обострения до пробы было 14, после пробы — 13, при ремиссии — соответственно 12 и 16, у здоровых людей пожилого и старческого возраста — 12 и 7, а у лиц среднего возраста — только 1 и 4, т. е. значительно меньше.

Таким образом, на основании полученных данных можно полагать, что у больных шизофренией под воздействием малых доз экзогенного ДОФА выявляются своеобразное нарушение метаболизма ДОФА, увеличенный синтез дофамина и норадреналина у больных в стадии обострения. Однако нельзя не учитывать того, что больные, находящиеся в стадии ремиссии, получали нейролептики, оказывающие сильное влияние на обмен дофамина [1, 2].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Praag H. M. — Brit. J. Psychiat., 1977, v. 130, p. 463.
2. Kety S. S. — In: Transmethylation and the Central Nervous System. Berlin, 1978, S. 4.
3. Understadt U. — Acta endocr. (Kbh.), 1978, Suppl. 216, p. 13.
4. Lee T., Seeman P. — Nature, 1978, v. 274, p. 897.
5. Owen F., Crow T. G. — Lancet, 1978, v. 2, p. 223.
6. Sullivan J., Stanfield C. W., Dackis C. — Am. J. Psychiat., 1977, v. 134, p. 1998.
7. Sildkraut J. J., Orsulak P. J., Schatzberg A. F. — Ibid., v. 135, p. 110.
8. Okaga T., Ohta T., Schinoda T. et al. — Neuropsychobiology, 1976, v. 2, p. 139.
9. White H. L., McLeod M. N., Davidson J. R. T. — Brit. J. Psychiat., 1976, v. 128, p. 184.
10. Васильев В. Н. — В кн.: Систолическая гипертония в возрастном аспекте. М., 1976, с. 98.
11. Васильев В. Н., Матлина Э. Ш. — Вопр. мед. химии, 1977, № 3, с. 332.
12. Euler U. S. — Clin. Chem., 1972, v. 18, p. 1445.
13. Crout J. R. — Anesthesiology, 1968, v. 29, p. 661.

14. Матлина Э. Ш., Киселева З. М., Софиева И. Э. — В кн.: Методы исследования некоторых гормонов и медиаторов. М., 1965, с. 25.
15. Матлина Э. Ш., Васильев В. Н. — В кн.: Психический стресс в спорте. Пермь, 1976, с. 18.
16. Анохина И. П. Нейрохимические механизмы психических заболеваний. М., 1975.
17. Матлина Э. Ш., Кандель И. Э., Васильев В. Н. и др. — Ж. невропатол. и психиатр., 1973, № 2, с. 205.

Поступила 16/ХII 1979 г.

## EFFECT OF SMALL DOSES OF L-DOPA ON EXCRETION WITH URINE OF CATECHOLAMINES AND L-DOPA IN PATIENTS WITH SCHIZOPHRENIA

V. N. Vasil'ev

Solov'ev Hospital N 8 «Clinic of Neuroses», Moscow

A 30-fold increase in excretion of L-DOPA, distinct elevation in synthesis of dopamine and noradrenaline as well as inhibition of adrenaline synthesis occurred in schizophrenic patients at an acute period after administration of 0.1 g of L-DOPA per os (L-DOPA test). As shown by the L-DOPA test, excretion of L-DOPA was distinctly decreased in the patients with the remittance step as compared with the acute period. At the same time, in the remission synthesis of dopamine occurred mainly in the night time, synthesis of noradrenaline was decreased as compared with the acute period. Synthesis of dopamine was increased 8-fold both in the patients at the acute period (mainly in the day-time) and within the remittance period (in the night-time) of the disease. The variations in excretion of L-DOPA, dopamine and noradrenaline, found in schizophrenic patients, were markedly distinct from dynamics of these patterns in healthy adult persons but were more similar to the parameters characteristic for persons in old and senile age. The L-DOPA test developed might be used for diagnosis of schizophrenia and of its periods (acute period and remission).

УДК 612.82.015.11-053

Р. И. Потапенко

## ВОЗРАСТНЫЕ И СЕЗОННЫЕ ОСОБЕННОСТИ АКТИВНОСТИ Na, K-И Mg-АТФ-аз В РАЗЛИЧНЫХ СТРУКТУРАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Лаборатория биохимии Института геронтологии АМН СССР, Киев

В механизмах старения важная роль отводится возрастным изменениям энергетического обмена. В связи с этим значительный интерес представляет исследование состояния АТФ-аз (КФ 3.6.1.3) — ферментных систем, непосредственно связанных с синтезом и расщеплением АТФ, генерацией мембранного потенциала. Однако в литературе имеются лишь единичные, к тому же весьма противоречивые сообщения о возрастных особенностях АТФ-азной активности головного мозга на поздних этапах онтогенеза. Так, по данным одних авторов [1—3], общая АТФ-азная активность ткани головного мозга в процессе старения повышается, а активность Na, K-АТФ-азы не изменяется, согласно данным других исследователей [4, 5], общая АТФ-азная активность и активность Na, K-АТФ-азы снижается. Нельзя не заметить, что эти данные получены в основном при исследовании целого мозга, без учета морфофункциональных и биохимических особенностей его разных отделов. Между тем изучение активности АТФ-аз и особенно транспортной АТФ-азы мозга, являющейся лимитирующим звеном натриевого насоса [6], представляется существенным в плане раскрытия механизмов изменения функциональной активности церебральной нервной системы в старости.

Целью настоящего исследования явилось изучение активности Na, K- и Mg-АТФ-аз в некоторых структурах головного мозга крыс разного возраста.

### Методика

Опыты проведены на 6—7-месячных (взрослых) и 24—26-месячных (старые) беспородных белых крысах-самцах. Животных декапитировали, быстро извлекали головной мозг, отделяли кору от белого вещества больших полушарий, выделяли гипоталамус. Из указанных структур в стеклянном гомогенизаторе с тefлоновым пе-

стиком готовили гомогенаты (1 : 60). Гомогенизацию проводили на холоду в 0,032 М сахарозе с 0,01 М трис-НСl-буфером (рН 7,5) в течение 30—40 с. Mg-Na, K-АТФ-азную активность определяли в среде (конечный объем 2 мл), содержащей (в мМ): NaCl — 100; KCl — 20; MgCl<sub>2</sub> — 2; АТФ — 2 и 0,2 мл гомогената, что соответствовало 280—320 мкг белка. Активность Mg-АТФ-азы измеряли в идентичном растворе в присутствии строгантина К (0,1 мМ). В ряде случаев для сравнения Mg-АТФ-азную активность определяли при добавлении в среду инкубации оубаина (0,1 мМ). Реакцию начинали внесением субстрата. Инкубация продолжалась 15 мин при 37 °С. Останавливали реакцию добавлением 2 мл 10% раствора холодной ТХУ. В надосадочной жидкости определяли неорганический фосфор Р<sub>н</sub> [7]. Белок определяли по Лоури [8]. Активность АТФ-аз выражали в микромолях Р<sub>н</sub> на 1 мг белка в 1 ч. Активность Na, K-АТФ-азы вычисляли как разницу между активностью суммарной и Mg-АТФ-аз. Результаты обрабатывали методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента. Вычисляли средние арифметические и ошибки средних на основании 7 определений и более.

## Результаты и их обсуждение

Из таблицы видно, что в зимний период (февраль) АТФ-азная активность гомогенатов исследованных структур головного мозга у взрослых и старых крыс неодинакова. Наиболее высока Na, K-Mg-АТФ-азная актив-

Активность АТФ-азы (в мкмоль Р<sub>н</sub> на 1 мг белка в 1 ч) гомогенатов некоторых структур головного мозга взрослых и старых крыс в зимний и весенний периоды

Возраст животных, мес	Большие полушария				Гипоталамус	
	кора		белое вещество		I	II
	I	II	I	II		
Зима						
6—7	10,67±0,46	1,90±0,28	7,57±0,41	1,32±0,16	13,21±0,35	1,73±0,18
24—26	10,23±1,05	1,29±0,22	5,87±0,27	1,19±0,21	11,84±0,73	2,01±0,32
<i>P</i>	>0,05	0,05< <i>P</i> <0,1	<0,01	>0,05	>0,05	>0,05
Весна						
6—7	10,47±0,45	3,02±0,16	8,94±0,48	3,20±0,22	15,18±0,50	3,00±0,32
24—26	11,17±1,00	2,03±0,14	9,30±0,51	3,15±0,35	12,68±0,96	2,41±0,15
<i>P</i>	>0,05	<0,001	>0,05	>0,05	<0,05	>0,05

Примечание. I — Mg-АТФ-аза; II — Na, K-АТФ-аза.

ность у животных обеих возрастных групп в коре и гипоталамусе, т. е. в структурах, богатых нейронами и дендритами. В белом веществе полушарий, состоящем в основном из проводниковых элементов, удельная активность транспортной АТФ-азы достоверно ниже. Здесь ниже и активность Mg-АТФ-азы.

При сравнении АТФ-азной активности головного мозга взрослых и старых животных обнаруживаются определенные возрастные различия. Так, в коре больших полушарий головного мозга старых крыс удельная активность Na, K-АТФ-азы на 22% ниже, чем у взрослых. Активность Mg-АТФ-азы в этом отделе мозга у них одинакова. Белое вещество больших полушарий головного мозга старых животных характеризуется более низкой Mg-АТФ-азной активностью и одинаковой со взрослыми особями удельной активностью транспортной АТФ-азы. В то же время АТФ-азная активность гипоталамуса крыс обеих возрастных групп практически одинакова.

Таким образом, характер возрастных изменений АТФ-азной активности в изучаемых отделах головного мозга при старении различен, что согласуется с концепцией [9] о гетеротопности и гетерохронности процесса старения.

Анализ данных, полученных весной (апрель) и сопоставление их с данными, полученными зимой, показали, что возрастные изменения активности АТФ-аз в весенний период имеют несколько иной характер. Из таблицы видно, что удельная активность транспортной АТФ-азы в коре больших полушарий головного мозга старых животных достоверно ниже (на 30%), чем у взрослых, а активность Mg-АТФ-азы у них одинакова. В белом веществе

больших полушарий мозга крыс обеих возрастных групп в отличие от холодного времени года активность АТФ-аз одинакова. В то же время в гипоталамусе старых животных в весенний период удельная активность Mg-АТФ-азы по сравнению со взрослыми особями ниже при одинаковой активности Na, K-АТФ-азы.

Таким образом, проведенные исследования позволили выявить неодинаковый характер возрастных изменений удельной активности АТФ-аз в разных структурах головного мозга при старении и зависимость установленных сдвигов от времени года. Сезонные колебания активности АТФ-аз обусловлены, по-видимому, неодинаковой функциональной активностью изучаемых структур головного мозга в зимний и весенний периоды. Как известно, существует тесная связь между функциональной активностью ткани и уровнем ее энергетического обеспечения. Высокому уровню функциональной активности ткани соответствует большая интенсивность энергетического обмена [10—12]. Мы обнаружили повышение активности АТФ-аз весной, однако не во всех отделах мозга и не в одинаковой степени у животных сравниваемых возрастных групп. Так, удельная активность транспортной АТФ-азы в коре головного мозга повышается весной как у взрослых, так и у старых крыс, причем примерно в одинаковой степени (на 57—59%). В то же время активность Mg-АТФ-азы у них не изменяется. В белом веществе головного мозга животных обеих возрастных групп возрастает удельная активность Na, K- и Mg-АТФ-аз. Однако у старых крыс прирост величин ферментативной активности больше: Na, K-АТФ-азы — на 58%, Mg-АТФ-азы — на 165%, в то время как у взрослых — соответственно на 18 и 142%. В гипоталамусе активность Na, K-АТФ-азы и Mg-АТФ-азы повышается только у взрослых крыс, а у старых особей сохраняется на уровне, характерном для зимы. Можно полагать, что повышение функциональной активности некоторых структур головного мозга весной обуславливает возрастание АТФ-азной активности. Имеются данные о повышении активности АТФ-аз головного мозга весной у зимнеявщих животных [13].

Обращает на себя внимание отсутствие повышения активности АТФ-аз весной в гипоталамусе старых крыс. Этот факт особенно интересен в свете современных представлений о роли возрастных изменений гипоталамуса в процессах старения организма [14—16].

Снижение активности транспортной АТФ-азы в старости может привести (и, надо полагать, приводит) к нарушению активного транспорта ионов. Действительно, в некоторых работах [17, 18] показано уменьшение содержания внутриклеточного калия и рост увеличения содержания натрия в ткани мозга старых животных. С последним обстоятельством может быть связано обнаруженное нами ранее [19] снижение интенсивности гликолиза, что в свою очередь может усугублять нарушение энергетического обеспечения специфической функции нервной ткани в старости.

Известно, что роль натриевого насоса в клетке не ограничивается поддержанием концентрационных градиентов. Он создает дополнительную разность потенциалов и тем самым генерирует электрогенную компоненту мембранного потенциала. Поэтому снижение активности Na, K-АТФ-азы в старости может изменять порог возбудимости нейронов, нарушать процессы реполяризации. Не исключено, что снижение активности транспортной АТФ-азы играет определенную роль в развивающемся с возрастом ослаблении тормозного процесса [20] и его активирующем влиянии на течение восстановительных процессов [21].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Никитин В. Н., Голубицкая Т. И. — Труды НИИ биологии. Харьков, 1954, т. 21, с. 143.
2. Узбеков Г. А. — В кн.: Современные проблемы биохимии дыхания и клиника. Иваново, 1970, т. 1, с. 12.
3. Hollander J., Barrows C. — J. Geront., 1968, v. 13, p. 181.
4. Саркисян А. А., Адамян Г. Г. — Ж. exper. и клин. мед., 1970, т. 10, № 2, с. 67.

5. Коробникова М. М. — В кн.: Всесоюзный биохимический съезд. 2-й. Тезисы секционных сообщений. Ташкент, 1969, т. 3, с. 121.
6. Болдырева А. А. Биохимические аспекты электромеханического сопряжения. М., 1977, с. 206.
7. Fiske C., Subbarow J. — Science, 1967, v. 65, p. 401.
8. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. R. et al. — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265—275.
9. Фролькис В. В. Регулирование, приспособление и старение. Л., 1970.
10. Мак-Ильвейн Г. Биохимия и центральная нервная система. М., 1962.
11. Гавская М. С. Биохимия мозга при умирании и оживлении организма. М., 1963.
12. Владимиров Г. Е., Пантелеева Н. С. Функциональная биохимия. Л., 1965.
13. Высочина Т. К. — Ж. эволюц. биохим., 1977, т. 13, № 4, с. 506.
14. Борисов И. Н. — Успехи совр. биол., 1966, т. 62, № 2 (5), с. 222.
15. Diltan V. M. — In: Hypothalamus, Pituitary and Aging. Springfield, 1976, v. 634.
16. Frolkis V. V. — Ibid., p. 614.
17. Bürger M. Altern und Krankheit. Leipzig, 1957.
18. Купраш Л. П. Возрастные особенности водно-электролитного обмена (Клинико-экспериментальное исследование). Дис. докт. Киев, 1974.
19. Потапенко Р. И. Возрастные особенности энергетического обмена различных отделов головного мозга. Дис. канд. Киев, 1973.
20. Павловские среды. М. — Л., 1949, т. 1, с. 68, 103, 116.
21. Танин С. А. Возрастные особенности уровней регуляции двигательных реакций. Дис. докт. Киев, 1970.

Поступила 21/ХI 1979 г.

## AGE AND SEASON CHARACTERISTICS OF NA, K- AND MG-ATPASES ACTIVITY IN VARIOUS BRAIN STRUCTURES

*R. I. Polapenko*

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

Activities of Na, K- and Mg-ATPases were studied in some brain structures of 6-7 months old and of 24-26 months old rats within winter and spring seasons. Age- and season-dependent variations in the enzymatic activity were found.

УДК 616.13-004.6-092.9:612.766

*П. С. Хомуло, Н. Н. Кадушкина, И. П. Жарова, И. Ю. Орлецкая*

## О ВЛИЯНИИ ФИЗИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НА СОСТОЯНИЕ КИНИНОВОЙ СИСТЕМЫ И АТЕРОГЕНЕЗ

Кафедра патологической физиологии Ленинградского санитарно-гигиенического  
медицинского института

Одной из причин атеросклероза является длительное перенапряжение аппарата эмоций. Показано, что после длительного эмоционального напряжения на фоне стойкой эмоционально обусловленной гиперлипемии переход к отдыху сопровождается повышением проницаемости сосудов и инфильтрацией липидов в сосудистую стенку. «Переходное состояние» рассматривается как одно из ведущих звеньев в патогенезе атеросклероза [1, 2]. Известно, что в регуляции проницаемости сосудистой стенки участвует кининовая система. Роль кининов в атерогенезе в настоящее время интенсивно изучается [3—6]. Внимание ученых привлекает также вопрос о влиянии физической активности на развитие атеросклероза. Клинические наблюдения о более позднем развитии атеросклероза у людей физического труда подтверждаются экспериментальными исследованиями [7—9]. Таким образом, для понимания механизмов развития атеросклероза немаловажно выяснить влияние физической активности на липидный обмен и состояние кининовой системы при эмоциональном напряжении и «переходном состоянии».

### М е т о д и к а

В данном исследовании эндокринные компоненты эмоционального стресса и «переходное состояние» моделировались введением животным гидрокортизона с последующей отменой гормона. I серия исследований выполнена на двух группах кроликов. Животных I-й группы (9 кроликов в возрасте 1½ мес) тренировали в беге на

Т а б л и ц а 1

Изменения показателей липидного обмена и кортикостероидов в крови при введении гидрокортизона физически тренированным и нетренированным кроликам

Группа животных	Условия опыта	Кортикостероиды, мкг %	Холестерин, мг %	Фосфолипиды, мг %	$\beta$ - и пре- $\beta$ -липопротеиды, мг %	Триглицериды, мг %
Тренированные кролики, $n=9$	1. Исходный уровень	6,14±0,14	30,2±0,96	98,4±1,93	146,6±3,33	54,7±1,13
	2. 10-й день введения гидрокортизона	8,14±0,14 $P<0,001$	48,4±1,1 $P<0,001$	238,3±4,3 $P<0,001$	496,5±11,1 $P<0,001$	200,1±3,3 $P<0,001$
	3. 10-й день отмены гидрокортизона	7,2±0,15 $P<0,001$ $P_2<0,01$	37,6±1,05 $P<0,001$ $P_2<0,001$	140,3±2,86 $P<0,001$ $P_2<0,001$	245,5±5,53 $P<0,001$ $P_2<0,001$	108,0±4,6 $P<0,001$ $P_2<0,001$
Нетренированные кролики, $n=10$	1. Исходный уровень	5,1±0,17	57,05±1,53	107,1±4,2	206,2±7,51	77,5±2,4
	2. 10-й день введения гидрокортизона	13,1±0,25 $P<0,001$	120,9±2,4 $P<0,001$	380,9±10,06 $P<0,001$	1168,7±22,92 $P<0,001$	377,2±11,7 $P<0,001$
	3. 10-й день отмены гидрокортизона	18,8±0,26 $P<0,001$ $P_2<0,001$	104,1±2,25 $P<0,001$ $P_2<0,001$	313,2±6,42 $P<0,001$ $P_2<0,001$	840±17,85 $P<0,001$ $P_2<0,001$	301,6±11,2 $P<0,001$ $P_2<0,001$

Пр и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2  $P$  — получено при сравнении средних величин с исходной;  $P_2$  — при сравнении показателей 2-й и 3-й групп.

Т а б л и ц а 2

Изменения показателей кининовой системы при введении гидрокортизона физически тренированным и нетренированным кроликам

Группа животных	Условия опыта	Кининоген, мкг/мл	Калликреин, мкг/мл	Прекалликреин, мкмоль на 100 мл плазмы в 1 мин	БИК, мкмоль на 100 мл плазмы в 1 мин
Тренированные кролики, $n=9$	1. Исходный уровень	5,43±0,43	0,97±0,08	13,2±0,14	2,73±0,04
	2. 10-й день введения гидрокортизона	7,46±0,73 $P<0,05$	0,59±0,05 $P<0,001$	13,57±0,15 $P>0,5$	2,86±0,05 $P<0,001$
	3. 10-й день отмены гидрокортизона	6,34±0,6 $P>0,5$ $P_2>0,5$	1,07±0,1 $P>0,5$ $P_2<0,05$	12,8±0,14 $P>0,5$ $P_2<0,01$	2,63±0,05 $P>0,5$ $P_2>0,5$
Нетренированные кролики, $n=10$	1. Исходный уровень	3,72±0,53	0,8±0,1	11,98±0,21	2,51±0,05
	2. 10-й день введения гидрокортизона	10,65±0,75 $P<0,001$	0,42±0,05 $P<0,001$	14,9±0,17 $P<0,001$	3,11±0,08 $P<0,001$
	3. 10-й день отмены гидрокортизона	7,99±1,25 $P<0,001$ $P_2<0,05$	1,01±0,18 $P>0,5$ $P_2<0,001$	10,08±0,26 $P<0,001$ $P_2<0,001$	2,25±0,04 $P<0,001$ $P_2<0,001$

специальном тротуаре со скоростью 3 км/ч. Время пробега увеличивали постепенно с 2 до 30 мин. Обученные бегу кролики подвергались ежедневной тренировке на тротуаре по 30 мин в течение 390 дней. Животные 2-й группы (10 кроликов такого же возраста) вели обычный для них малоподвижный образ жизни. Через 390 дней после начала тренировки (не прекращая ее) животным обеих групп вводили подкожно гидрокортизон фирмы «Рихтер» в дозе 5 мг на 1 кг массы тела в течение 10 дней. Перед введением гидрокортизона, на 10-й день введения и на 10-й день после отмены гормона определяли в плазме крови содержание 11-оксикортикостероидов [10] и показатели липидного обмена: холестерин [11], фосфолипиды [12],  $\beta$ - и пре- $\beta$ -липопротеиды [13], триглицериды [14]; оценивали состояние кининовой системы по содержанию кининогена [15], калликреина [16], прекаликреина и быстрореагирующего ингибитора калликреина (БИК) [17]. Для изучения компонентов калликреин-кининовой системы использовали цитратную плазму, полученную без контактов со стеклом. Все предварительные операции, связанные со взятием крови, осуществляли в силиконированной посуде на холоду. II серия исследований была выполнена на 10 беспородных собаках в возрасте 2 лет. I-ю группу (5 собак) тренировали с помощью физической нагрузки — бега на тротуаре в течение 3 мес со скоростью 7 км/час по 60 мин ежедневно. 2-я группа (5 собак) была контрольной. Через 3 мес после начала физической тренировки (не прекращая ее) у собак обеих групп моделировали мобилизационную (эмоциональную) гиперлипемию введением гидрокортизона подкожно в дозе 13 мг/кг в сутки в течение 5 дней, затем гормон отменяли. У животных обеих групп перед введением гидрокортизона, на 5-й день периода введения и на 10-й день после отмены гормона определяли в плазме крови количество кортикостероидов, показатели липидного обмена, содержание кининогена и калликреина.

### Результаты и обсуждение

Введение гидрокортизона кроликам сопровождалось увеличением уровня кортикостероидов в крови, развитием гиперлипемии как у нетренированных кроликов, так и на фоне физической нагрузки (табл. 1). Увеличение показателей липидного обмена было более выраженным у нетренированных кроликов. Отмена гормона («переходное состояние») сопровождалась снижением кортикостероидов в крови у животных обеих групп. После отмены гормона в группе нетренированных животных сохранялась выраженная гиперлипемия: холестерин был выше исходного уровня на 77 %, триглицериды — на 291 %, фосфолипиды — на 192 %,  $\beta$ - и пре- $\beta$ -липопротеиды — на 307 %. В то же время у физически активных животных показатели липидного обмена значительно меньше превышали исходный уровень (холестерин — на 25 %, триглицериды — на 96 %, фосфолипиды — на 50 %,  $\beta$ - и пре- $\beta$ -липопротеиды — на 68 %). При введении гидрокортизона у нетренированных и у физически активных кроликов наблюдалось снижение активности кининовой системы, которое характеризовалось увеличением количества кининогена и снижением содержания калликреина в крови (табл. 2). Более значительные изменения кининогена отмечались у нетренированных кроликов. У них же наблюдалось увеличение прекаликреина и БИК. На 10-й день после отмены гормона у активных кроликов отмечена нормализация показателей кининовой системы, у нетренированных наблюдались изменения количества кининогена, прекаликреина, БИК и калликреина, свидетельствующие о более медленной нормализации системы кининов. Результаты исследования показали тормозящее действие систематической физической тренировки на гидрокортизоновую (эмоциональную) гиперлипемию и стабилизацию кининовой системы при этом. Важно отметить, что при «переходном состоянии» (после отмены гормона) у нетренированных кроликов наблюдалась выраженная гиперлипемия на фоне значительной активности кининовой системы. Во II серии исследований у физически тренированных собак наблюдалось торможение развития гидрокортизоновой гиперлипемии [18]. Более выраженные сдвиги в состоянии кининовой системы отмечались у нетренированных животных. Так, у физически активных собак кининоген не увеличился ( $6,8 \pm 1,0$  мкг/мл против  $7,3 \pm 1,5$  мкг/мл)  $P > 0,5$ , а у нетренированных возрос на 284 % (с  $3,3 \pm 0,7$  до  $12,7 \pm 1,0$  мкг/мл)  $P < 0,001$ . При отмене гормона у активных собак количество кининогена не изменялось ( $10,9 \pm 1,2$  мкг/мл против  $7,3 \pm 1,5$  мкг/мл)  $P > 0,5$ ; у нетренированных резко снизилось на 515 % ( $1,9 \pm 0,3$  мкг/мл против  $12,7 \pm 1,0$  мкг/мл)  $P < 0,001$ . Активность калликреина при этом колебалась в незначительных пределах у собак обеих

групп. Таким образом, эксперимент на собаках подтвердил большую устойчивость кининовой системы к воздействию гидрокортизона (эмоционального стресса) у физически тренированных животных. Л. А. Ланцберг и соавт. наблюдали большую стабильность кининовой системы у спортсменов при физической нагрузке, чем у физически не тренированных людей [19].

Таким образом, показано, что систематическая физическая тренировка у кроликов и собак тормозила гидрокортизоновую (эмоциональную) гиперлипемию и активность кининовой системы, что можно рассценивать как антиатерогенное влияние физической нагрузки. Переход от эмоционального напряжения к отдыху у нетренированных животных характеризовался повышенным уровнем активности кининовой системы на фоне гиперлипемии, что рассматривается как атерогенный фактор. Физическая активность значительно уменьшила эти атерогенные сдвиги.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Хомуло П. С. — Пат. физиол., 1968, № 2, с. 3—10.
2. Хомуло П. С., Жарова И. П. — Бюлл. exper. биол., 1972, № 7, с. 17—19.
3. Дзизинский А. А., Гомазков О. А. Кинины в физиологии и патологии сердечно-сосудистой системы. Новосибирск, 1976, с. 97—127.
4. Гомазков О. А., Большакова Л. В., Шимкович М. В. и др. — Кардиология, 1972, № 4, с. 22—28.
5. Numano F. — Jap. J. med. Sci. Biol., 1966, v. 5, p. 307—321.
6. Shimamoto T. — Acta path. jap., 1969, v. 19, p. 15—43.
7. Барац С. С. — В кн.: Распространение гипертонической болезни и коронарного атеросклероза и условия жизни. Л., 1964, с. 70—80.
8. Keys A. — Med. a. Sport, 1970, v. 4, p. 1111—1120.
9. Froelicher V. F. — Am. Heart J., 1972, v. 84, p. 496—506.
10. Усватова И. Я., Панков Ю. А. — Лабор. дело, 1975, № 1, с. 6—9.
11. Предтеченский В. Е. Руководство по клиническим лабораторным исследованиям. М., 1964, с. 220—222.
12. Балаховский С. Д., Балаховский И. С. Методы химического анализа крови. М., 1953, с. 295.
13. Климов А. Н., Ловягина Т. Н., Баньковская Э. Б. — Лабор. дело, 1966, № 5, с. 276—280.
14. Stols F., Roat S., Honigmann S. — Z. med. Labortechn., 1968, Bd 9, S. 215—220.
15. Пасхина Т. С., Егорова Т. П. — Биохимия, 1966, т. 31, № 3, с. 468—470.
16. Суровикина М. С. — Лабор. дело, 1975, № 1, с. 6—9.
17. Веремеенко Н., Волохонская Л. И., Кизим А. И. и др. — Там же, с. 9—12.
18. Хомуло П. С., Кадушкина Н. Н. — Кардиология, 1978, № 6, с. 146—148.
19. Ланцберг Л. А., Некрасова А. А., Ценкова Н. К. — Cor et Vasa, 1973, v. 15, № 3, p. 188—196.

Поступила 21/XI 1979 г.

#### EFFECT OF PHYSICAL ACTIVITY ON THE STATE OF KININ SYSTEM AND ATHEROGENESIS

P. S. Khomulo, N. N. Kadushkina, I. P. Zharova,  
I. Yu. Orletskaya

Chair of Pathophysiology, Sanitary-Hygienic Medical School, Leningrad

Hydrocortisone-induced hyperlipemia was inhibited by physical loading in trained dogs and rabbits. Hyperlipemia simultaneously with activation of the kinin system was noted in physically untrained animals after the hormone treatment. At the same time, the patterns of lipid metabolism and of the kinin system components approached to the normal values in the trained animals. Importance of the phenomenon found for genesis of atherosclerosis is discussed.

## ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ НАСЫЩЕНИЯ КИСЛОРОДОМ ЭМУЛЬСИЙ ФТОРУГЛЕРОДОВ

Лаборатория биологически активных эмульсий Центрального научно-исследовательского института гематологии и переливания крови, Москва

В настоящее время среди большого числа кровезаменителей направленного действия отсутствуют препараты, которые могли бы выполнять газотранспортную функцию крови. Одним из перспективных направлений в разработке кровезаменителей — переносчиков кислорода является использование эмульсий полностью фторированных органических соединений (фторуглеродов), дисперсная фаза которых растворяет примерно такое же количество кислорода, которое присоединяется к гемоглобину равного объема эритроцитов [1]. Многочисленными экспериментами на обескровленных животных [1—9], а также на изолированных органах [10—12] доказана способность эмульсий фторуглеродов насыщаться кислородом и углекислым газом и отдавать их при снижении парциального давления, т. е. выполнять газотранспортную функцию. В последнее время проведена серия успешных переливаний людям кровезаменителя, разработанного на основе упомянутых эмульсий с положительными результатами [13]. Достижения в создании нового кровезаменителя — переносчика кислорода требуют точных знаний динамики насыщения и отдачи газов эмульсиями фторуглеродов в легких и крови. Принимая во внимание то обстоятельство, что для внутривенного введения обычно применяют 20% по объему эмульсии, изучение кинетики этих процессов становится необходимым и важным для совершенствования препарата, в первую очередь с целью достижения более высокого растворения в нем кислорода.

Увеличение количества растворяемого в эмульсиях кислорода может быть достигнуто путем повышения в них концентрации фторуглерода. Однако это связано с возрастанием общей вязкости кровезаменителя, что может вызвать нарушения в системе микроциркуляции и транспорте газов. Таким образом, установление факторов, влияющих на эффективность газообмена в эмульсии, необходимо для получения эмульсии с оптимальными свойствами.

В ранее опубликованных работах [1, 2] эффективность переноса кислорода оценивали по статической зависимости равновесной концентрации его в эмульсии от парциального давления кислорода в газовой среде, рассчитывая максимально возможное количество кислорода, которое может передать эмульсия при парциальном давлении, равном парциальному давлению в альвеолярном воздухе. Эта оценка может быть достоверной в случае достижения абсорбционного равновесия. В действительности равновесие может не достигаться ввиду малого времени контакта газа с эмульсией в альвеолах легкого.

Наиболее надежную оценку газотранспортной функции эмульсии фторуглерода можно получить путем исследования закономерностей процессов насыщения и отдачи кислорода в динамических условиях. Охианаги и Мицуно [3] исследовали кинетику насыщения и отдачи кислорода эмульсий перфтордекалина (ПФД) полярографическим методом. Использование безинерционного метода определения кислорода в водной фазе, каким является полярографический метод, давало возможность получать надежные результаты, однако узость пределов варьирования параметров, указанных в работе, не позволила авторам сделать обоснованные выводы о закономерностях этого процесса.

В данной работе проведено уточнение механизма процесса абсорбции кислорода эмульсиями фторуглеродов на примере эмульсий перфтортрибутиламина (ПФТБА), установлены функциональные зависимости кон-

станты абсорбции от различных параметров (вязкости, температуры, концентрации ПФТБА в эмульсии) и проведена сравнительная оценка эффективности газотранспортной функции эмульсии и цельной крови.

### Методика

*Теоретическая часть.* Для двухфазной системы, такой как эмульсия фторуглерода, в которой основным носителем является дисперсная фаза, естественно предположить стадийный механизм передачи кислорода: кислород газовой фазы сначала растворяется в дисперсионной среде (водной фазе), имеющей непосредственный контакт с газовой фазой, а затем перераспределяется между дисперсионной средой и дисперсной фазой.

В отсутствие макроdiffузионных осложнений количество кислорода, перешедшего из газовой фазы, может быть представлено уравнением абсорбции [14]:

$$\frac{dN_{O_2}}{dt} = k_{г/ж} \cdot S_{г/ж} (C_{O_2}^* - C_{O_2}), \quad (1)$$

где  $k_{г/ж}$  — коэффициент абсорбции кислорода водной фазой,  $S_{г/ж}$  — площадь поверхности раздела фаз газ/жидкость,  $C_{O_2}^*$  и  $C_{O_2}$  — соответственно равновесная и текущая объемные концентрации кислорода в водной фазе. Учитывая, что данное количество кислорода распределяется между водной фазой (в. ф.) и фазой фторуглерода (ф. ф.)

$$dN_{O_2} = d(N_{O_2})_{в. ф.} + d(N_{O_2})_{ф. ф.} \quad (2)$$

и выражая составляющие через концентрации и объемную долю каждой фазы

$$d(N_{O_2})_{в. ф.} = V(1 - \alpha) \cdot dC_{O_2}, \quad (3)$$

$$d(N_{O_2})_{ф. ф.} = V\alpha \cdot dX, \quad (4)$$

где  $V$  — объем эмульсии,  $\alpha$  — объемная доля фторуглерода,  $X$  — концентрация кислорода в фазе фторуглерода (в об. %), получаем уравнение распределения кислорода:

$$dN_{O_2} = V(1 - \alpha) dC_{O_2} + V\alpha dX. \quad (5)$$

Допустим, что между содержанием кислорода в водной фазе и фазе фторуглерода существует линейная зависимость:

$$C_{O_2} = KX, \quad (6)$$

где  $K$  — коэффициент распределения кислорода между жидкими фазами.

Решая совместно уравнения (1), (5) и (6), получаем уравнение изменения концентрации кислорода во времени:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = \frac{k_{г/ж} \cdot S_{г/ж}}{V \left[ 1 + \left( \frac{1}{K} - 1 \right) \alpha \right]} \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}) \quad (7)$$

или в интегральном виде:

$$C_{O_2} = C_{O_2}^* \left[ 1 - e^{-K_1 \frac{S_{г/ж}}{V} \cdot t} \right], \quad (8)$$

где  $K_1 = \frac{k_{г/ж}}{1 + \left( \frac{1}{K} - 1 \right) \alpha}$  — константа абсорбции кислорода (9) эмульсией, значение

которой не будет зависеть от того, определено ли оно по изменению концентрации кислорода в водной фазе эмульсии или в эмульсии в целом. Из уравнения (9) очевидно, что константа абсорбции кислорода эмульсией зависит от тех параметров, функциями которых являются константа абсорбции кислорода водной фазой ( $k_{г/ж}$ ) и коэффициент распределения кислорода ( $K$ ). Константа абсорбции кислорода водной фазой ( $k_{г/ж}$ ), как известно из исследований абсорбционных процессов [14], зависит от температуры, вязкости, состояния абсорбционного слоя на границе газ/жидкость и др.

Коэффициент распределения кислорода ( $K$ ) является мерой интенсивности передачи кислорода на границе раздела водная фаза/фторуглерод. В случае высокой скорости значение  $K$  стремится к величине отношения равновесных концентраций кислорода в водной фазе и во фторуглероде ( $C_{O_2}^*/X^*$ ), которое для чистых веществ составляет 0,0556 [1, 3]. При снижении скорости передачи кислорода следует ожидать уменьшения величины  $K$  ниже указанного соотношения. Значение  $K$  легко найти графоаналитическим методом из значений констант абсорбции кислорода эмульсией, линейаризуя уравнение (9) относительно  $\alpha$ .

*Методика эксперимента.* Эксперимент проводили в ячейке насыщения, которая представлена на рис. 1. Растворенный кислород из образца анализируемой жидкости

вытесняли азотом в течение  $1\frac{1}{2}$  ч. Для ускорения процесса выравнивания концентрации газа по объему жидкости последнюю перемешивали магнитной мешалкой, которую располагали так, чтобы воронка вращения была минимальной. После полного вытеснения кислорода из образца прекращали подачу азота в ячейку и начинали насыщение образца кислородом. Время насыщения замеряли секундомером с момента подачи кислорода в ячейку. Содержание кислорода в жидкости определяли на анализаторе кислорода марки «Lex-O<sub>2</sub>-Соп» фирмы «Лексингтон». Пробы отбирали шприцем, постоянно находящимся в атмосфере подаваемого газа. Цилиндрическая форма ячейки позволяла сохранять неизменной площадь поверхности раздела газ/жидкость. Учитывая значительное влияние изменения объема жидкости на скорость насыщения жидкости при постоянном отборе проб на анализ, вносили поправку в виде приведенного времени насыщения:

$$\Theta = \sum \frac{\Delta t_i}{V_i}, \quad (10)$$

где  $\Delta t_i$  — отрезок времени между двумя последовательными отборами проб,  $V_i$  — объем оставшейся в ячейке жидкости к моменту отбора  $i$ -ой пробы.

В этом случае уравнение (8) примет вид:

$$C_{O_2} = C_{O_2}^* [1 - e^{-K_1 \cdot S_{г/ж} \cdot \Theta}]. \quad (11)$$

Средний объем пробы анализируемой жидкости определяли по числу анализов и разности объема в начале и конце эксперимента. График изменения концентрации кислорода в жидкости представлен на рис. 2.

Расход газов выбирали таким образом, чтобы происходила быстрая смена состава атмосферы над жидкостью и чтобы давление в ячейке было равно атмосферному. Эмульсии ПФТБА готовили методом ультразвукового диспергирования на приборе марки J-32 фирмы «Бренсон», используя в качестве эмульгаторов сополимеры окиси этилена и окиси пропилена, проксанола П-168 и П-305. Дисперсность эмульсий варьировали путем изменения времени обработки в ультразвуковом поле и контролировали нефелометрическим методом [15]. В дальнейшем эмульсию, имевшую оптическую плотность  $D=0,02$ , будем называть «тонкой», а эмульсию с  $D=0,50$  — «грубой».

Выбор условий проведения эксперимента, исключающих макродиффузионные осложнения, проводили по инвариантности константы скорости абсорбции от скорости вращения магнитной мешалки.

В каждой серии опытов определяли среднее значение показателей по  $m$  повторным измерениям. Дисперсию воспроизводимости вычисляли по формуле:

$$S_j^2 = \frac{1}{m-1} \sum_{j=1}^m (y_j - \bar{y})^2,$$

где  $y_j$  и  $\bar{y}$  — соответственно результат единичного измерения и среднеарифметическое измерение. Однородность дисперсии проверяли по критерию Кохрена или Фишера при доверительной вероятности  $P=0,95$ . В тех случаях, когда дисперсия была неоднородной, увеличивали число повторных измерений и исключали грубые ошибки, используя критерий Стьюдента. Дисперсию воспроизводимости вычисляли по формуле:

$$S_{\text{воспр}}^2 = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N S_j^2,$$

где  $N$  — число серий опытов. Значение среднеквадратичного отклонения величины абсорбции кислорода эмульсией ПФС  $S=0,017$ .

## Результаты и обсуждение

Эксперимент был начат с исследования влияния скорости вращения магнитной мешалки на абсорбцию и десорбцию кислорода (табл. 1). Результаты, представленные в табл. 1, показывают, что интенсивность перемешивания не влияет на константу скорости насыщения воды, в то время как процесс выделения кислорода облегчается с увеличением скорости вращения мешалки. Этот результат согласуется с данными Охианаги и Мицу-

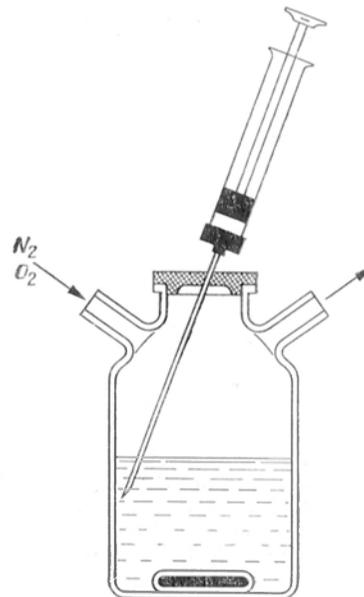


Рис. 1. Ячейка насыщения.

называть «тонкой», а эмульсию с

но [3], которые получили константу вытеснения кислорода, несколько большую, чем константа насыщения.

Некоторое увеличение константы абсорбции кислорода 20% водным раствором П-168 при высокой скорости вращения магнитной мешалки связано скорее со значительным искривлением поверхности вследствие большей вязкости и с меньшей стабильностью поверхности. В дальнейшем эксперимент проводили при постоянной скорости перемешивания, которая обеспечивала стабильность поверхности раздела газ/жидкость и отсутствие макродиффузионных осложнений.

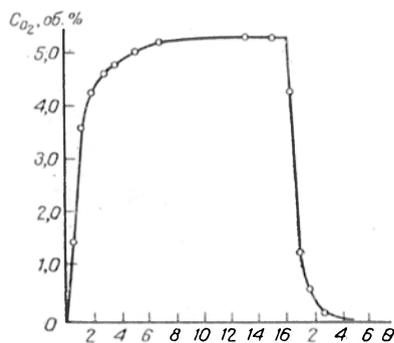


Рис. 2. Зависимость изменения концентрации кислорода от времени при замене атмосферы азота над жидкостью на кислород (насыщение) и кислорода на азот (вытеснение).

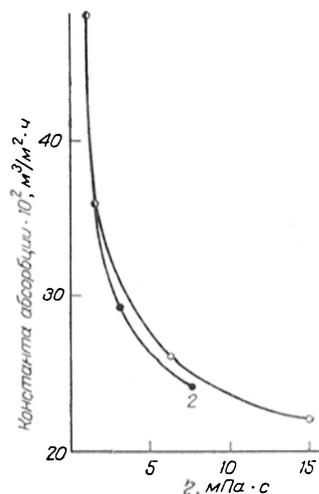


Рис. 3. Зависимость константы абсорбции кислорода от величины обратной вязкости.

1 — подлая фаза; 2 — эмульсия.

Одним из факторов, влияющих на абсорбционный процесс, является вязкость водной фазы, поэтому эксперимент был начат с исследования влияния вязкости растворов эмульгаторов.

Таблица 1

Зависимость констант абсорбции и десорбции кислорода от скорости вращения магнитной мешалки

Жидкость	Вязкость, мПа·с	Скорость вращения, об/мин			
		200		1400	
		константа абсорбции кислорода · 10 <sup>2</sup>	константа десорбции кислорода · 10 <sup>2</sup>	константа абсорбции кислорода · 10 <sup>2</sup>	константа десорбции кислорода · 10 <sup>2</sup>
Вода	1	4,78	4,78	4,78	7,97
20% водный раствор П-168	7,4	2,44	2,87	4,78*	7,00*

\* Константы определены в опытах, начавшихся со стадии вытеснения кислорода.

Таблица 2

Зависимость константы скорости абсорбции кислорода водной фазой от вязкости системы (t=25°)

№ п/п	Состав водной фазы	Вязкость, мПа·с	Константа абсорбции кислорода · 10 <sup>2</sup> , м <sup>3</sup> /м <sup>2</sup> ·ч	Равновесная концентрация кислорода да при P <sub>O<sub>2</sub></sub> = 0,16 мм Нг, об. %
1	Вода	0,9	4,78	2,1
2	10% водный раствор П-168	2,9	2,93	1,9
3	20% водный раствор П-168	7,4	2,36	1,8

Как видно из табл. 2, константа абсорбции уменьшается с увеличением вязкости. Наряду с уменьшением константы абсорбции несколько снижается значение равновесной концентрации кислорода в водной фазе.

Представив полученные данные в координатах  $k_{г/ж} = f\left(\frac{1}{\eta}\right)$  (рис. 3), получаем уравнение линейной зависимости константы абсорбции водной фазы от вязкости:

$$k_{г/ж} = 0,020 + 0,0279 \cdot \frac{1}{\eta} \quad (12)$$

Как было указано выше, основным параметром, влияющим на количество кислорода, растворенного в эмульсии, является концентрация перфторсоединения, поэтому была исследована зависимость констант абсорбции от объемной доли последнего (табл. 3).

Т а б л и ц а 3  
Влияние концентрации ПФТБА в эмульсии на константу абсорбции кислорода эмульсией ( $t=25^\circ$ )

№ п/п	Объемная доля ПФТБА в эмульсии, $\alpha$	Вязкость, мПа·с	Константа абсорбции кислорода $\cdot 10^2$ , $\text{м}^3/\text{м}^2 \cdot \text{ч}$	Равновесная концентрация кислорода в эмульсии при $P_{O_2} = 646$ мм Нг. об. %
1	0	0,90	4,78	2,1
2	0,06	1,30	3,70	3,9
3	0,12	2,65	3,20	6,3
4	0,18	7,0	2,56	7,8
5	0,24	15,0	2,19	10,7
6	Кровь крысы	5,0	1,12	23,0

Т а б л и ц а 4  
Влияние дисперсности эмульсии на константу абсорбции кислорода

Концентрация эмульсии, об. %	Константа абсорбции кислорода $\cdot 10^2$ , $\text{м}^3/\text{м}^2 \cdot \text{ч}$	
	«тонкая» эмульсия	«грубая» эмульсия
24	2,19	2,24
12	3,20	3,02

Полученные данные показывают, что константа абсорбции кислорода эмульсией ( $K_1$ ) уменьшается по мере возрастания концентрации ПФТБА. Одновременно увеличивается равновесная концентрация растворенного

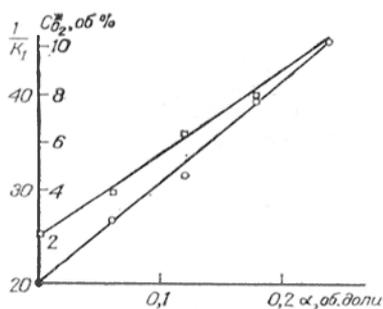


Рис. 4. Зависимость обратной величины константы абсорбции кислорода эмульсией от концентрации ПФТБА.

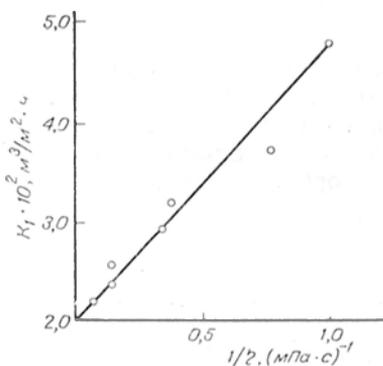


Рис. 5. Зависимость константы абсорбции кислорода эмульсией и водной фазой от вязкости.

кислорода. Значение константы распределения  $K$ , полученное из обработки данных варьирования объемной доли фторуглерода в эмульсии по методике, описанной выше, равно 0,172, что выше расчетного значения отношения  $C_{O_2}^*/X^*$ .

Экспериментальную оценку отношения  $C_{O_2}^*/X^*$  проводили по зависимости равновесной концентрации кислорода в эмульсии от  $\alpha$  (рис. 4), согласно уравнению

$$(C_{O_2}^*)_{эм} = C_{O_2}^* \left[ 1 + \left( \frac{X^*}{C_{O_2}^*} - 1 \right) \alpha \right], \quad (13)$$

где  $(C_{O_2}^*)_{эм}$  — равновесная концентрация кислорода в эмульсии. Экспериментально найденное значение отношения  $C_{O_2}^*/X^*$ , равное 0,0547, очень близко к расчетному значению (0,0556) и отличается от величины  $K$ , полученной из значений  $K_1$  в опытах по варьированию объемной доли фторуглерода в эмульсии.

Как видно из рис. 3 и 5, значения  $K_1$  близки к значениям  $k_{г/ж}$  при одних и тех же величинах вязкости системы, т. е. в пределах ошибки эксперимента уравнение (12) является аналитическим выражением зависимости

$K_1 = f(1/\eta)$ . Такие значения констант абсорбции кислорода водной фазой и эмульсией и, как следствие, высокое значение  $K$  могут свидетельствовать, с одной стороны, о чрезвычайно высокой скорости обмена кислорода между жидкими фазами, а с другой — о недостаточности представлений механизма последовательной передачи кислорода для описания полученных результатов.

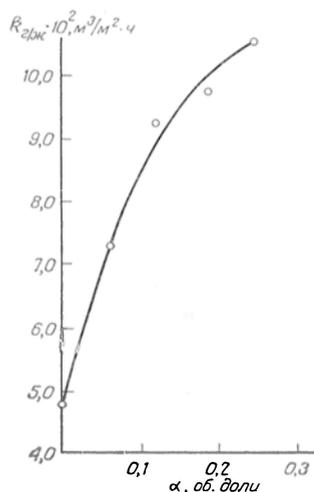


Рис. 6. Зависимость константы абсорбции кислорода водной фазой от концентрации ПФТБА в эмульсии.

Т а б л и ц а 5

Зависимость константы абсорбции кислорода эмульсией ПФТБА (12 об. %) от температуры

Температура, °С	Константа абсорбции кислорода · 10 <sup>2</sup> , м <sup>3</sup> /м <sup>2</sup> · с	Равновесная концентрация кислорода при P <sub>O<sub>2</sub></sub> = 646 мм Нг, об. %
20	3,0	6,4
25	3,2	6,0
30	3,4	5,4
37	3,6	5,0

Дополнительные сведения о возможном механизме процесса абсорбции кислорода эмульсией ПФТБА можно получить из зависимости константы абсорбции кислорода водной фазой  $k_{г/ж}$  от доли фторуглерода в эмульсии  $\alpha$ , полученной преобразованием экспериментально найденных значений констант абсорбции кислорода эмульсией по уравнению

$$k_{г/ж} = K_1 \left[ 1 + \left( \frac{1}{K} - 1 \right) \alpha \right], \quad (14)$$

являющемуся модификацией уравнения (9) относительно  $k_{г/ж}$ , предполагая быстрое установление равновесных значений концентрации кислорода в обеих жидких фазах, т. е. значение  $K = C_{O_2}^*/X^*$  (0,0547).

При строгом выполнении эстафетного механизма передачи кислорода значение  $k_{г/ж}$ , найденное таким образом, должно было бы уменьшаться с увеличением  $\alpha$  в соответствии с повышением вязкости системы или оставаться на постоянном уровне, если определяющим будет состояние адсорбционного слоя ПАВ на границе раздела водная фаза/газ.

Действительная зависимость  $k_{г/ж}$  от  $\alpha$ , представленная на рис. 6, показывает, что эффективное значение повышается с увеличением  $\alpha$ .

Данное явление можно объяснить с позиций последовательно-параллельного механизма передачи кислорода, т. е. участием частиц дисперсной фазы в транспорте кислорода. Отсутствие осложнений для транспорта газа на границе раздела двух жидких фаз может обуславливать также облегчение газообмена при выходе частицы к поверхности раздела газ/жидкость, когда ее будет отделять от газовой фазы лишь адсорбционный слой ПАВ.

Постоянно существующий обмен частиц, находящихся на поверхности, с частицами объема приведет к быстрому насыщению всего объема эмульсии. Увеличение вязкости системы, связанное с повышением концентрации

фторуглерода в эмульсии, и постоянство поверхности раздела газ/жидкость определяют нелинейность зависимости  $k_{г/ж}$  от  $\alpha$ .

Отсутствие влияния дисперсности эмульсии на величину константы абсорбции кислорода эмульсией, отмеченное Охианаги и Мицуно [3] и подтвержденное нашими данными (табл. 4), могут также свидетельствовать в пользу описанного механизма переноса кислорода.

Для сравнения эффективности газотранспортной функции эмульсии и крови было измерена константа скорости насыщения цельной крови крысы в тех же условиях, что и для эмульсии. Как видно из табл. 3, константа скорости абсорбции кислорода кровью в 2 раза меньше, чем концентрированной эмульсией. Это свидетельствует о том, что в кровяном русле эмульсия будет насыщаться до равновесия с альвеолярным воздухом и полнее отдавать кислород тканям.

В связи с тем что на абсорбционные процессы оказывает влияние температура, было проведено варьирование этого параметра (табл. 5).

Температурная зависимость константы абсорбции кислорода эмульсией ПФТБА после стандартной обработки полученных данных может быть выражена уравнением

$$K_1 = 0,82 \cdot e^{-\frac{2000}{RT}} \quad (15)$$

Таким образом, проведенные исследования позволили установить функциональную зависимость константы скорости абсорбции кислорода эмульсией фторуглеродов от вязкости, температуры эмульсии и предложить последовательно-параллельный механизм передачи кислорода от газовой фазы к фазе фторуглеродов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Sloviter H. A. — Fed. Proc., 1970, v. 29, p. 1484.
2. Watanabe R., Inahara H., Motoyama L. — in: International Congress of Nutrition. 10-th. Proceeding. Kyoto, 1976, p. 113—119.
3. Ohyanagi H., Mitsuno T. — Ibid., p. 21—54.
4. Geyer R. — Fed. Proc., 1970, v. 29, p. 1758.
5. Clark L. C., Wesseler E. P., Kaplan S. et al. — Ibid., 1975, v. 34, p. 1468.
6. Афонин Н. И., Иванова Н. Л., Козинер В. Б. и др. — В кн.: Парентеральное белковое питание и новые кровезаменители. М., 1979, с. 109.
7. Седова Л. А., Чаплыгина З. А., Домрачева В. С. — Там же, с. 110.
8. Иванова Н. Л., Коновалова Н. В., Афонин Н. И. и др. — Пробл. гематол., 1979, № 8, с. 24.
9. Чаплыгина З. А., Кузнецова И. Н., Гохман Н. Ш. и др. — Там же, с. 18.
10. Gollan F., Clark L. C., Malchesky P. S. — J. surg. Res., 1970, v. 10, p. 55.
11. Kylstra J. A., Natz R., Crowe J. et al. — Science, 1967, v. 157, p. 793.
12. Beisang A., Feemster J., Deetzmann R. H. — Fed. Proc., 1970, v. 29, p. 1782.
13. Takowski H., Tenscher P., Freg P. et al. — In: International Symposium on Perfluorochemical Blood Substitutes. 4-th. Proceedings. Amsterdam, 1979, p. 47—53.
14. Касаткин А. Г., Плановский А. Н., Чехов О. С. Расчет тарельчатых ректификационных и абсорбционных аппаратов. М., 1961.
15. Практикум по коллоидной химии и электронной микроскопии. М., 1974, с. 34.

Поступила 23/ХІ 1979 г.

#### KINETICS OF SATURATION BY OXYGEN OF PERFLUORINE-CONTAINING EMULSIONS

Yu. D. Aprosin, V. K. Alexeeva, N. I. Afonin

Central Institute of Hematology and Blood Transfusion, Moscow

As shown by kinetics of oxygen absorption in perfluorobutylamine emulsion, the in vitro rate of blood saturation with oxygen was twice-fold lower than the rate of saturation of concentrated emulsion. The patterns of oxygen absorption by emulsion of perfluorine-containing substances were shown to depend on viscosity and temperature and did not correlate with the size of the emulsion drops.

А. С. Логинов, М. Н. Приваленко, М. В. Белокопытова

## ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗОФЕРМЕНТОВ N-АЦЕТИЛ-β-D-ГЛЮКОЗАМИНИДАЗЫ ПЕЧЕНИ И СЫВОРОТКИ КРЫС В НОРМЕ И ПРИ ОСТРОМ ОТРАВЛЕНИИ ЧЕТЫРЕХХЛОРИСТЫМ УГЛЕРОДОМ

Центральный научно-исследовательский институт гастроэнтерологии, Москва

В тканях человека обнаружено по крайней мере 2 основных изофермента N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы — НАГ (β-2-ацетиамидо-2-дезоксиглюкозидацетиамидодезоксиглюкогидролаза, КФ 3.2.1.30) — А и В, а также минорные компоненты — I<sub>1</sub> и I<sub>2</sub>; количественное содержание молекулярных форм НАГ в биологических средах организма человека варьирует: в сыворотке преобладает изофермент А, в то время как в тканях различных органов (печень, почка, селезенка) содержится преимущественно В-форма НАГ [1—5]. Анализ изоферментного состава НАГ может быть использован при исследовании механизмов гиперферментемии, а также для выявления органных поражений и оценки их выраженности при различных заболеваниях. Так, появление в моче и степень увеличения экскреции В-формы НАГ, которая в норме присутствует только в ткани почек и не обнаружена в моче и плазме, отражает наличие и глубину ренальной патологии [4, 6]. Исследование активности НАГ проводится с диагностической целью у больных с хроническими активными болезнями печени; обнаружена зависимость уровня сывороточной НАГ от нозологической формы заболевания и его клинико-морфологических особенностей [7—9]. Биохимический механизм синдрома гиперферментемии остается неясным, что затрудняет его клиническую трактовку. Поведение изоэнзимов НАГ в экспериментальной и клинической гепатологии не изучалось. В настоящем, предварительном, сообщении приводятся результаты исследования изоферментов НАГ сыворотки и ткани печени крыс в норме и при остром токсическом отравлении СС<sub>1</sub>.

### М е т о д и к а

Опыты выполнены на крысах-самцах линии Вистар массой 180—200 г. Острое поражение печени вызывали однократным подкожным введением 1 мл 50% раствора СС<sub>1</sub> в оливковом масле. Через 24 ч после инъекции животных забивали путем вскрытия полости сердца под легким гексеналовым наркозом; печень *in situ* перфузировали охлажденным 0,25 М раствором сахарозы. Сыворотку и гомогенат ткани печени получали и обрабатывали при 4 °С. Сыворотку (смесь от 4—6 крыс в отношении 1 : 1) диализовали 18 ч против буфера (10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> рН 6,0); 1% гомогенат готовили на этом же буфере и центрифугировали при 2000 об/мин в течение 20 мин. На колонку (15×1 см) с ДЭАЭ-целлюлозой, уравновешенную указанным буфером, наносили 1 мл диализованной сыворотки или такой же объем супернатанта печени. Хроматографию НАГ проводили методом Иконне и Эллис [9], скорость элюции составляла 12—15 мл/ч. Элюционные диаграммы для каждого образца воспроизводили трижды. Активность НАГ определяли спектрофлуориметрически с 4-метилумбеллиферил-2-ацетиамидо-2-β-D-глюкопиранозидом (Koch Light, Англия) в качестве субстрата<sup>1</sup> по методам Яанг и соавт. [10] и О'Брайн и соавт. [11] в различных модификациях. Инкубационная смесь содержала 0,05 мл раствора фермента в буфере и 0,1 мл 1 мМ раствора субстрата в Na-фосфатно-цитратном буфере рН 4,5; инкубацию проводили при 37 °С в течение 1 ч, пробы охлаждали, реакцию останавливали 5 мл 0,17 М глицин-NaOH буфера рН 9,9. Флуоресценцию определяли на спектрофлуориметре «Хитачи» (длина волны возбуждающего света 365 нм, поглощаемого — 440 нм). Активность НАГ рассчитывали, сравнивая флуоресценцию опытных и стандартных проб, содержащих 0—2 нМ 4-метилумбеллиферона в 0,17 М глицин-NaOH буфере.

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

Элюционная диаграмма, полученная при хроматографии НАГ печени и сыворотки крыс на ДЭАЭ-целлюлозе, представлена на рисунке. В сыво-

<sup>1</sup> Приносим глубокую благодарность доктору мед. наук И. В. Цветковой (Институт биологической и медицинской химии АМН СССР) за любезно предоставленный субстрат.

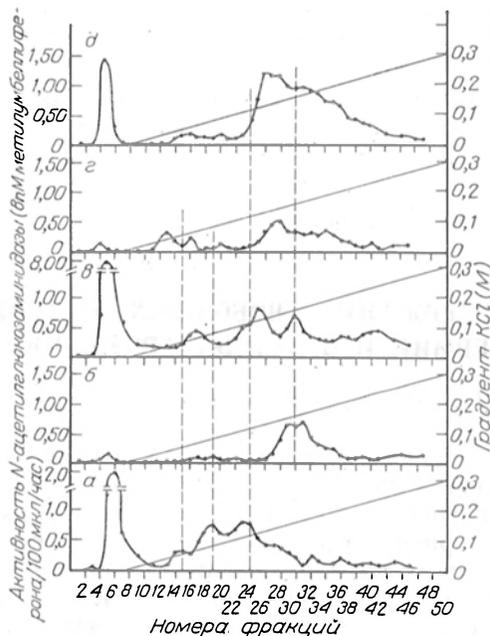
ротке интактных животных (см. рисунок, а) преобладает В-форма НАГ, которая элюируется исходным буфером. Сывороточный изофермент А выходит с градиентом КС1 в виде двойного пика. В небольшом количестве обнаружены также промежуточные I-формы фермента.

В печени интактных крыс (см. рисунок, б) в отличие от сыворотки доминирующей является А-форма НАГ, причем тканевой изофермент А элюируется при более высокой ионной силе, чем сывороточный. Подобное различие в хроматографических свойствах сывороточной и тканевой НАГ-А человека описано ранее [3, 10], однако в сыворотке человека преобладает сывороточный изофермент А, тогда как в ткани печени человека относительно содержание В-формы НАГ значительно выше, чем у крысы.

При остром отравлении  $CCl_4$  через 24 ч после его введения отмечены изменения в изоферментном составе НАГ сыворотки (см. рисунок, в). Наряду с изоэнзимом В, промежуточными формами I и сывороточным изоферментом А выходит пик активности НАГ, по своим хроматографическим свойствам подобный тканевому изоферменту А печени.

В отношении изоферментов НАГ печени крыс при остром отравлении  $CCl_4$  следует отметить большую гетерогенность и более широкую зону активности тканевого изофермента А (см. рисунок, г) по сравнению с тканью интактных животных (см. рисунок, б). Известным объяснением полученных данных может служить сопоставление их с результатами хроматографического разделения НАГ смеси диализованной сыворотки с супернатантом печени интактных крыс в отношении 1 : 1 (см. рисунок, д). По-видимому, присутствие белков крови препятствует разделению сывороточной и тканевой форм изофермента А и приводит к появлению более широкой и гетерогенной зоны активности НАГ. Эти особенности элюиционного профиля пика активности изофермента А пораженной ткани печени могут быть обусловлены изменением проницаемости клеточных мембран и белкового состава гепатоцитов.

Таким образом, появление в сыворотке крови крыс с острым отравлением  $CCl_4$  тканевой формы изофермента А, первоначально обнаруженной только в ткани печени интактных животных, может отражать патологические изменения в пораженном органе и предполагает тканевое происхождение синдрома гиперферментемии.



Хроматография НАГ печени и сыворотки интактных крыс через 24 ч после острого отравления  $CCl_4$ .

а — сыворотка крови [6]; б — ткань печени интактных крыс [5]; в — сыворотка крови [6]; г — ткань печени крыс после введения  $CCl_4$  [4]; д — смесь сыворотки и гомогената печени интактных крыс [3]. В скобках указано число опытов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Robinson D., Price R., Dance N. — *Biochem. J.*, 1967, v. 102, p. 533.
2. Robinson D., Stirling J. — *ibid.*, 1968, v. 107, p. 321.
3. Ellis B., Tucker S., Thompson A. et al. — *Clin. chim. Acta*, 1975, v. 64, p. 195.
4. Price R., Dance N. — *Biochim. biophys. Acta*, 1972, v. 271, p. 145.
5. Okada S., O'Brien J. — *Science*, 1969, v. 165, p. 698.
6. Price R., Dance N., Richards B. et al. — *Clin. chim. Acta*, 1970, v. 27, p. 65.
7. Platt D., Leinweber B. — *Acta hepato-splenol.* (Stuttg.), 1969, Bd 16, S. 324.
8. Nakamura N., Iwabori N., Koizumi T. — *Clin. chim. Acta*, 1970, v. 27, p. 47.

9. Ikonne J., Ellis R. — Biochem. J., 1973, v. 135, p. 457.  
10. Young E., Ellis R., Lake B. et al. — FEBS Letters, 1970, v. 9, p. 1.  
11. O'Brien J., Okada S., Chem A. et al. — New Engl. J. Med., 1970, v. 283, p. 15.

Поступила 12/ХІІ 1979 г.

## ISOENZYMES OF N-ACETYL- $\beta$ -D-GLUCOSAMINIDASE IN LIVER TISSUE AND BLOOD OF NORMAL RATS AND AFTER POISONING WITH $\text{CCl}_4$

A. S. Loginov, M. N. Privalenko, M. V. Belokopylova

Central Institute of Gastroenterology, Moscow

Isoenzyme B of N-acetyl- $\beta$ -D-glucoaminidase prevailed in rat blood serum, while the A form of the enzyme dominated in liver tissue as shown by DEAE cellulose chromatography. The serum isoenzyme A was distinct from the corresponding tissue type in chromatographic properties. In acute intoxication of liver tissue with  $\text{CCl}_4$  the tissue isoenzyme A, characteristic for the liver tissue of intact animals, was found in blood serum. Occurrence of the tissue isoenzyme A in blood serum might reflect the pathological state of the tissue; an increase in content of the enzyme in blood plasma appears to develop due to liberation of the enzyme from tissues.

УДК 612.822.1.015.1

P. A. Абдуллаев, Э. З. Эмирбеков

## СОДЕРЖАНИЕ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ В МОЗГЕ ПРИ ГИПОТЕРМИИ И В РАЗНЫЕ СРОКИ ПОСТГИПОТЕРМИЧЕСКОГО ПЕРИОДА

Проблемная лаборатория нейрохимии Дагестанского университета, Махачкала

Гипотермия нашла широкое применение в различных отраслях медицины и экспериментальной биологии [1—3]. Нарушенный гипотермией метаболизм организма, в том числе тканей мозга [2, 4—7], является одной из причин, ограничивающих широкое использование метода общего охлаждения. Учитывая важную роль аминокислот в функциональной деятельности нервной системы [8—10], их субстратную и регуляторную роль в биосинтезе белка [11], мы исследовали особенности количественных изменений свободных аминокислот в различных отделах головного мозга при гипотермии, пролонгировании этого состояния, а также в динамике постгипотермического периода.

### Методика

Опыты проведены на белых крысах-самцах массой 150—200 г. Гипотермию животных вызывали в холодových камерах, в которых циркулировала вода температуры 4—5 °С. Ректальную температуру снижали равномерно и медленно так, что за 50—60 мин она достигала 20—19 °С. В отдельных сериях опытов состояние гипотермии поддерживали в течение 1 и 2 ч. Исследование в постгипотермическом периоде проводили на 1, 3, 7, 15, 30, 45 и 60-е сутки после полного самосогревания (37 °С) животных. Крыс, перенесших гипотермию, содержали вместе с контрольными животными в условиях вивария. В нужный момент животных замораживали жидким азотом. Извлеченные большие полушария мозга, мозжечок, средний и продолговатый мозг растирали в порошок в жидком азоте. Безбелковый экстракт тканей мозга получали депротеинизацией 1% пикриновой кислотой с последующим удалением ее на колонке со смолой Дауэкс 2×8 (200/400 меш) [12]. Содержание свободных аминокислот в образце определяли с помощью автоматического анализатора аминокислот ААА-881 (ЧССР). Кислые и нейтральные компоненты анализировали по методу Бенсона [13], используя катионит OL-803, а основные компоненты — по методу Мура и Штейна [14], используя смолу OL-802. При анализе использовали реактивы фирмы «Lachema» (ЧССР).

### Результаты и обсуждение

Как видно из табл. 1, при охлаждении крыс до 20 °С в больших полушариях мозга и мозжечке содержание глутамина, аспарагиновой кислоты, аланина, цистина уменьшалось в одинаковой степени. При этом содержание триптофана, аргинина, глутаминовой кислоты и глицина в больших полу-

Содержание аминокислот (в мкмоль на 1 г ткани) в больших полушариях мозга и мозжечке при гипотермии ( $M \pm m$ ;  $n=6-7$ )

Аминокислота	Контроль		Гипотермия					
	большие полушария	мозжечок	5-10 мин		60 мин		120 мин	
			большие полушария	мозжечок	большие полушария	мозжечок	большие полушария	мозжечок
Лизин	0,25±0,02	0,32±0,02	0,29±0,03	0,31±0,03	0,19±0,01*	0,26±0,01	0,17±0,01*	0,25±0,02
Гистидин	0,19±0,02	0,28±0,01	0,20±0,01	0,29±0,02	0,20±0,01	0,45±0,02*	0,20±0,01	0,41±0,02*
Триптофан	0,09±0,01	0,09±0,01	0,12±0,01*	0,13±0,01*	0,12±0,01*	0,13±0,01	0,09±0,01	0,10±0,01
Аргинин	0,14±0,01	0,11±0,01	0,24±0,01*	0,19±0,01	0,22±0,01*	0,18±0,01	0,20±0,01*	0,18±0,01*
Аспаргат	3,21±0,25	2,97±0,18	2,23±0,35*	2,03±0,20*	2,17±0,20	2,13±0,16*	3,28±0,15	2,87±0,21
Треонин	0,43±0,03	0,56±0,03	0,45±0,02	0,49±0,02	0,61±0,04*	0,73±0,03*	0,52±0,02*	0,82±0,01*
Серин	0,94±0,09	0,87±0,06	0,98±0,04	1,16±0,06*	0,80±0,03	1,16±0,06*	0,75±0,10	0,96±0,07
Аспарагин	0,34±0,05	0,38±0,03	0,44±0,06	0,40±0,04	0,54±0,04*	0,53±0,03*	0,51±0,05*	0,57±0,04*
Глутамат	9,14±0,40	8,14±0,31	10,67±0,45*	9,41±0,41*	9,41±0,40	8,43±0,04	7,23±0,65*	6,73±0,32*
Глутамин	4,82±0,28	4,22±0,21	3,60±0,38*	3,2±0,25*	3,31±0,20*	3,41±0,16*	3,91±0,30	3,91±0,23
Глицин	0,80±0,05	1,03±0,07	1,13±0,08*	1,07±0,06	1,17±0,07	1,00±0,08	0,87±0,06	1,01±0,04
Аланин	0,68±0,04	0,70±0,04	0,34±0,05*	0,52±0,03*	0,34±0,04*	0,76±0,03	0,61±0,06	0,86±0,05
Валин	0,06±0,05	0,07±0,01	0,06±0,004	0,06±0,004	0,06±0,04	0,07±0,01	0,06±0,04	0,05±0,005
Цистин	0,61±0,08	0,78±0,04	0,38±0,006*	0,59±0,06*	0,41±0,03*	0,47±0,03*	0,72±0,04	0,67±0,04
Метионин	0,06±0,01	0,07±0,01	0,08±0,01	0,05±0,004	0,07±0,01	0,11±0,01*	0,08±0,01	0,11±0,01*
Изолейцин	0,06±0,004	0,07±0,01	0,06±0,005	0,07±0,01	0,09±0,01*	0,08±0,01	0,09±0,01*	0,10±0,01*
Лейцин	0,06±0,04	0,07±0,01	0,06±0,005	0,07±0,01	0,09±0,01*	0,10±0,01*	0,09±0,01*	0,10±0,01*
Тирозин	0,09±0,01	0,09±0,01	0,07±0,01	0,12±0,005*	0,06±0,01*	0,08±0,006	0,08±0,02	0,09±0,003
Фенилаланин	0,06±0,004	0,06±0,004	0,06±0,004	0,07±0,004	0,07±0,01	0,07±0,004	0,05±0,005	0,07±0,004

\* Здесь и в табл. 2 достоверные различия по отношению к контролю.

Содержание аминокислот (в мкмоль на 1 г ткани) в среднем и продолговатом мозге при гипотермии ( $M \pm m$ ;  $n=6-7$ )

Аминокислота	Контроль		Гипотермия					
			5—10 мин		60 мин		120 мин	
	средний мозг	продолговатый мозг						
Лизин	0,28±0,02	0,20±0,01	0,24±0,03	0,18±0,02	0,25±0,02	0,18±0,01	0,20±0,03*	0,12±0,01
Гистидин	0,26±0,02	0,31±0,02	0,28±0,03	0,28±0,02	0,30±0,02	0,26±0,01	0,38±0,03*	0,25±0,02
Триптофан	0,09±0,01	0,10±0,01	0,06±0,01*	0,06±0,006*	0,09±0,01	0,06±0,006*	0,09±0,01	0,10±0,01
Аргинин	0,16±0,01	0,19±0,02	0,15±0,01	0,16±0,01	0,17±0,02	0,21±0,02	0,25±0,01*	0,27±0,02*
Аспаргат	2,80±0,12	2,54±0,11	2,01±0,17*	2,04±0,06*	1,97±0,01*	1,86±0,08*	2,5±0,13	2,50±0,11
Треонин	0,42±0,03	0,62±0,04	0,50±0,03	0,56±0,04	0,47±0,02	0,52±0,04	0,62±0,02*	0,81±0,03*
Серин	0,80±0,08	0,69±0,02	0,75±0,07	0,72±0,03	0,70±0,08	0,61±0,04	0,61±0,05*	0,42±0,01*
Аспарагин	0,32±0,02	0,32±0,02	0,36±0,04	0,31±0,01	0,38±0,03	0,32±0,01	0,48±0,03*	0,55±0,02*
Глутамат	7,65±0,31	7,23±0,28	7,92±0,60	7,04±0,19	8,01±0,03	7,47±0,22	8,71±0,41*	8,29±0,33*
Глутамин	3,80±0,17	3,21±0,12	2,41±0,21*	2,57±0,14*	2,43±0,17*	2,41±0,14*	3,40±0,31	3,17±0,17
Глицин	1,12±0,10	1,27±0,08	1,07±0,13	1,14±0,10	1,15±0,10	1,07±0,10	1,61±0,11*	1,42±0,07*
Аланин	0,63±0,03	0,58±0,04	0,42±0,03*	0,46±0,03*	0,45±0,02*	0,46±0,02*	0,47±0,02*	0,40±0,04*
Валин	0,07±0,004	0,05±0,003	0,06±0,004	0,06±0,006	0,08±0,002	0,06±0,003	0,07±0,005	0,06±0,005
Цистин	0,51±0,03	0,62±0,03	0,41±0,03	0,58±0,02	0,31±0,01*	0,41±0,02*	0,61±0,04	0,48±0,02*
Метионин	0,08±0,006	0,08±0,01	0,11±0,005*	0,07±0,006	0,08±0,005	0,07±0,006	0,08±0,005	0,07±0,006
Изолейцин	0,07±0,006	0,07±0,004	0,07±0,006	0,06±0,003	0,08±0,005	0,07±0,004	0,10±0,006*	0,06±0,002
Лейцин	0,07±0,006	0,05±0,003	0,07±0,006	0,06±0,003	0,08±0,01	0,06±0,004	0,10±0,007*	0,09±0,003*
Тирозин	0,09±0,01	0,08±0,01	0,12±0,01*	0,08±0,01	0,12±0,01*	0,11±0,01	0,10±0,01	0,08±0,01
Фенилаланин	0,07±0,006	0,11±0,01	0,06±0,005	0,11±0,01	0,07±0,003	0,11±0,01	0,08±0,006	0,10±0,01

шариях мозга, триптофана, аргинина, глутаминовой кислоты, серина и тирозина в мозжечке увеличивалось. Наиболее стабильной к действию холода на организм оказалась концентрация аминокислот в среднем и продолговатом мозге, где лишь содержание триптофана, аспарагиновой кислоты, глутамин, аланина снижалось, а уровень тирозина и метионина в среднем мозге повышался.

Таким образом, динамика изменения концентрации свободных аминокислот при охлаждении крыс для различных отделов мозга различна. Общность заключается в снижении содержания аспарагиновой кислоты, глутамин и аланина, метаболизм которых тесно связан с энергетическим обменом мозга [8].

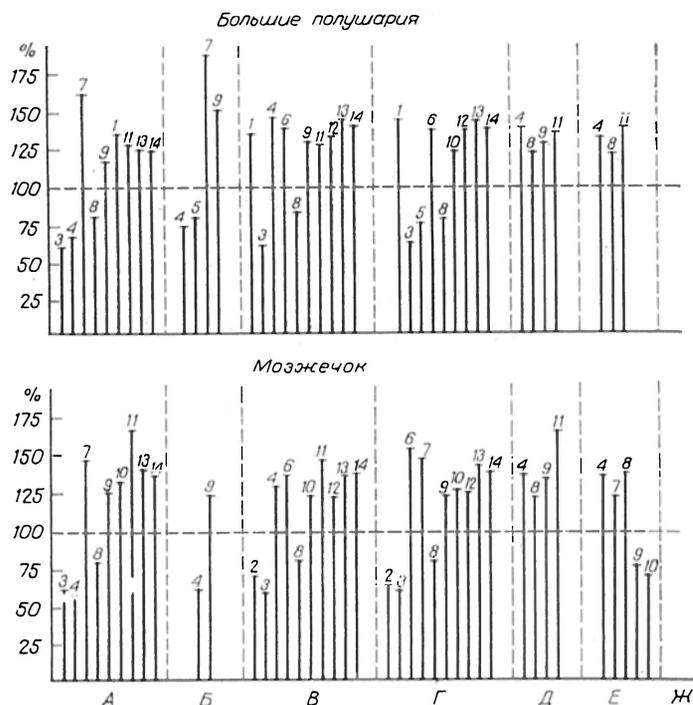


Рис. 1. Сравнительное содержание аминокислот (в % к контролю) в больших полушариях мозга и мозжечке крыс.

Здесь и на рис. 2: А — 1; Б — 3; В — 7; Г — 15; Д — 30; Е — 45; Ж — 60 — сутки после самосогревания. 1 — лизин; 2 — гистидин; 3 — аргинин; 4 — аспарагиновая кислота; 5 — треонин; 6 — серин; 7 — аспарагин; 8 — глутаминовая кислота; 9 — глутамин; 10 — глицин; 11 — лантин; 12 — цистин; 13 — изолейцин; 14 — лейцин.

В больших полушариях мозга крыс при пролонгировании гипотермии (в течение 1 ч) содержание лизина, глутаминовой кислоты снижалось; количество треонина, аспарагина, изолейцина, лейцина увеличивалось по сравнению с этими показателями у кратковременно охлажденных животных. При этом в мозжечке снижалось содержание лизина, глутаминовой кислоты, тирозина и увеличивалось содержание гистидина, треонина, аспарагина, аланина и лейцина. На данном этапе охлаждения в аминокислотном фонде среднего и продолговатого мозга дальнейших изменений не наблюдалось (табл. 2).

Двухчасовое пролонгирование гипотермии приводило к нормализации содержания триптофана, аспарагиновой кислоты, глутамин, аланина, цистина, тирозина в больших полушариях мозга и содержания триптофана, аспарагиновой кислоты, серина, глутамин, аланина, цистина в мозжечке (см. табл. 1), тогда как в аминокислотном фонде среднего и продолговатого мозга наступали значительные изменения (см. табл. 2).

Как показывают полученные нами данные, в больших полушариях мозга при 1- и 2-часовой, в мозжечке при 2-часовой пролонгированной гипотер-

мии, а в среднем и продолговатом мозге при кратковременной 1-часовой гипотермии наблюдалась тенденция к снижению суммы аминокислот по сравнению с таковой у контрольных животных. После 2-часовой гипотермии в исследуемых отделах мозга крыс изменялось соотношение суммы заменимых аминокислот к незаменимым, особенно это характерно для больших полушарий и мозжечка, где эта величина снижалась соответственно с 15 и 11,2 до 12,1 и 8,1. Изменение фонда свободных аминокислот мозга может явиться следствием изменения как их метаболизма, так и транспорта из крови [15]. В предыдущей работе [16] нами было установлено, что в опытах *in vivo* температурный эффект на транспорт аминокислот из крови в мозг отсутствует. В то же время при гипотермии (20 °С) происходит значительное повышение пептидгидролазной активности в тканях мозга [17], за счет которой, видимо, и увеличивается сумма незаменимых аминокислот.

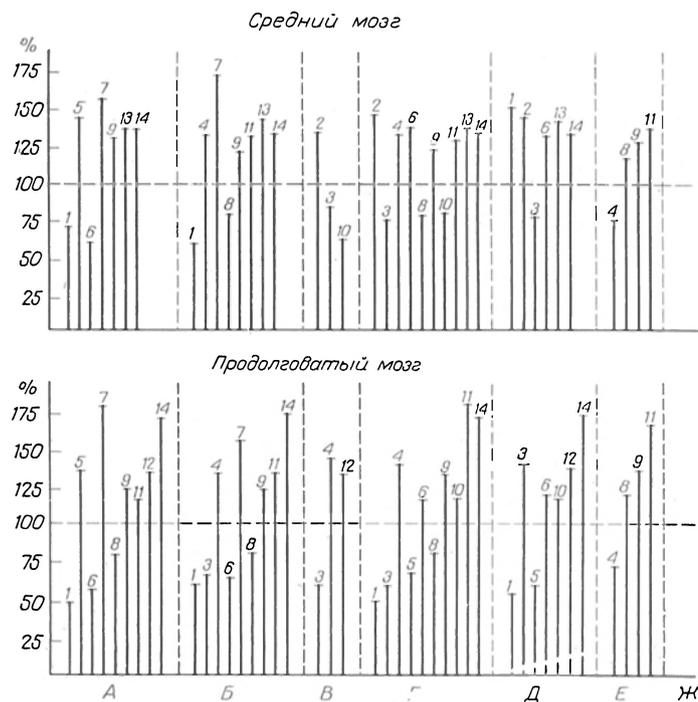


Рис. 2. Сравнительное содержание аминокислот (в % к контролю) в среднем и продолговатом мозге крыс.

Как видно из рис. 1 и 2, вызванные гипотермией изменения в метаболизме аминокислот в исследуемых отделах мозга подвергались дальнейшим колебаниям в динамике постгипотермического периода. После полного самоогревания в исследуемых отделах мозга наблюдалось повышение содержания глутамина, аспарагина, глицина, аланина, лейцина, изолейцина. В то же время содержание аргинина, аспарагиновой, глутаминовой кислот в больших полушариях и мозжечке, лизина, серина, глутаминовой кислоты в среднем и продолговатом мозге заметно снижалось. Спустя 3 сут после самоогревания животных концентрация многих аминокислот, за исключением аспарагиновой кислоты, треонина, аспарагина, глутамин в больших полушариях, аспарагиновой кислоты и глутамин в мозжечке, нормализовалась. В фонде аминокислот среднего и продолговатого мозга нормализация наступала в конце 1-й недели после самоогревания. Характерным для периода от 1 до 7 дней после самоогревания было снижение соотношения суммы дикарбоновых аминокислот к их амидам, что согласуется с данными по усилению процессов связывания аммиака, накопленного в мозге охлажденного животного [6].

В больших полушариях мозга и мозжечке на 7-е сутки постгипотермического периода, а в среднем и продолговатом мозге на 15-е сутки в метаболическом фонде аминокислот наступал новый период резких сдвигов: во всех отделах уменьшалось содержание глутаминовой кислоты, аргинина и увеличивался уровень лейцина, изолейцина, аспарагиновой кислоты, аланина и серина. При этом концентрация лизина, глутаминна, цистина в больших полушариях мозга, глицина, цистина в мозжечке, гистидина, глутаминна в среднем мозге и глутаминна, глицина в продолговатом мозге увеличивалась.

На 30-е сутки постгипотермического периода в больших полушариях мозга и мозжечке и на 45-е сутки в среднем и продолговатом мозге содержание всех незаменимых и заменимых аминокислот, за исключением глутаминовой и аспарагиновой кислот, аланина и глутаминна, нормализовалось. Известно, что этим аминокислотам приписывают медиаторную роль [18]. Накопление этих медиаторов в данный период постгипотермического состояния свидетельствует, видимо, об улучшении функциональной активности животных.

Анализ полученных результатов показывает, что при охлаждении животных, а также в начальные сроки после самосогревания аминокислоты глутаминовой системы активно используются для энергетических целей в качестве субстратов окисления [8] и, видимо, поэтому на последних этапах «холодовой болезни», когда нужда в энергетических затратах снижается, в тканях мозга происходит их накопление. Полная нормализация содержания всех исследуемых свободных аминокислот в отделах мозга происходит к 60-му дню постгипотермического периода.

Полученные нами данные об изменениях в аминокислотном фонде наряду с результатами предыдущего исследования [19], посвященного изучению аминокислотного состава белков тканей мозга в разные периоды постгипотермического состояния, отражают, видимо, закономерность периодичности развития адаптационных реакций после перенесения глубокого охлаждения.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Коростовцева Н. В. Повышение устойчивости к гипоксии. Л., 1976.
2. Неговский В. А. Оживление организма и искусственная гипотермия. М., 1960.
3. Майстрах Е. В. Гипотермия и анабиоз. М. — Л., 1964.
4. Владимиров Г. Е., Пантелеева И. С. Функциональная биохимия. Л., 1965, с. 213—217.
5. Гаевская М. С. Биохимия мозга при умирании и оживлении организма. М., 1963.
6. Эмирбеков Э. З. Азотистый метаболизм мозга при гипотермии и зимней спячке. Махачкала, 1969.
7. Векслер Я. И., Гершеневич З. С. — Укр. біохім. ж., 1962, т. 34, с. 406—415.
8. McIlwain H., Bachelard H. S. Biochemistry and the Central Nervous System. Baltimore, 1971.
9. Палладин А. В. Вопросы биохимии нервной системы. Киев, 1965.
10. Кометиани П. А. — В кн.: Обмен аминокислот. Тбилиси, 1967, с. 99—113.
11. Гулый М. Ф. — Укр. біохім. ж., 1978, т. 50, с. 243—260.
12. Алексеев Л. П. — В кн.: Современные методы в биохимии. М., 1964, т. 1, с. 129—161.
13. Benson I. V., Cordon I., Patterson I. A. — Analyt. Biochem., 1967, v. 18, p. 229—236.
14. Moore S., Spackman D. H., Stein W. H. — Analyt. Chem., 1958, v. 30, p. 1185—1189.
15. Lajtha A. — In: The Nervous System. Ed. D. Towers, R. Brady. New York, 1975, v. 1, p. 575—584.
16. Emirbekov E., Sershen H., Lajtha A. — Brain Res., 1977, v. 125, p. 187—191.
17. Эмирбеков Э. З., Пурмагомедова П. М. — Укр. біохім. ж., 1979, т. 51, с. 644—646.
18. Roberts E., Hammerschlag R. — In: Basic Neurochemistry. Boston, 1976, p. 218—245.
19. Эмирбеков Э. З., Абдуллаев Р. А. — В кн.: Метаболизм белков центральной нервной системы. Днепропетровск, 1978, с. 39—41.

## CONTENT OF FREE AMINO ACIDS IN BRAIN UNDER CONDITIONS OF HYPOTHERMIA AND WITHIN VARIOUS PERIODS AFTER THE LESION

*R. A. Abdullaev, E. Z. Emirbekov*

Problem Laboratory on Neurochemistry, Dagestan State University, Makhachkala

Content of 19 amino acids was estimated in rat brain hemispheres, cerebellum, mid-brain and medulla oblongata both under conditions of hypothermia (20°) and within 1, 3, 7, 15, 45 and 60 days after selfwarming. Hypothermia, depending on its length (5-10, 60 and 120 min), caused various alterations in the pool of amino acids, dissimilar in the brain regions studied. The phasic alterations in the amino acid content were observed in brain tissues during the posthypothermic period. Normalization of the amino acid pool occurred within the 60 day. Hypothermia and posthypothermic state were accompanied by similar alterations in the amino acid content either in brain hemispheres and cerebellum or in midbrain and medulla oblongata.

У ДК 616.12-005.4-06:616.153.963'915-008.61-07:616.153.1:577.152.311

*Н. Г. Никульчева, И. Б. Солитернова, И. В. Криворученко*

## АКТИВНОСТЬ ЛИПОПРОТЕИДЛИПАЗЫ У БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА С РАЗЛИЧНЫМИ ТИПАМИ ГИПЕРЛИПОПРОТЕИДЕМИИ НА ФОНЕ ЖИРОВОЙ НАГРУЗКИ

Отдел биохимии липидов и атеросклероза им. Аничкова Института экспериментальной медицины АМН СССР, лаборатория клинической и экспериментальной кардиологии Института физиологии им. Павлова АН СССР, Ленинград

В последние годы все больше внимания уделяется изучению катаболизма хиломикрон и липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП) в связи с установлением их роли в развитии гипертриглицеридемии и атеросклероза, с одной стороны [1—3], а также в образовании липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) — с другой [4—6]. Многочисленными исследованиями показано, что у больных ишемической болезнью сердца нередко отмечается нарушение обмена хиломикрон и особенно ЛПОНП, сопровождающееся накоплением их в крови. Одной из возможных причин повышения концентрации этих классов липопротеидов может быть нарушение их катаболизма, связанное с изменением активности липопротеидлипазы (ЛПЛ) — фермента, гидролизующего триглицериды, входящие в состав данных липопротеидных частиц.

Изучению активности ЛПЛ в плазме крови человека посвящено большое число публикаций, однако чаще всего в них идет речь об активности постгепариновой ЛПЛ [7—9]. Сравнительно мало работ по исследованию базальной липолитической активности плазмы крови в норме и при патологии. Возможно, это связано с распространенной точкой зрения о том, что ЛПЛ поступает в кровь из тканей (жировая, мышечная, легочная, мышца сердца) только после введения гепарина [10—12]. Однако некоторые авторы высказывают также мнение и о том, что повышение липолитической активности крови может происходить и в физиологических условиях, в частности под влиянием жировой нагрузки [13, 14], хотя это и не нашло подтверждения [15, 16].

В задачу настоящего исследования входило изучение активности липолитических ферментов крови при жировой нагрузке у больных ишемической болезнью сердца с различными типами гиперлипидемии (ГЛП) без введения им гепарина.

### Методика

Жировая нагрузка была проведена у 20 мужчин, страдающих ишемической болезнью сердца, в возрасте 35—50 лет, из них 10 человек перенесли инфаркт миокарда, 5 — повторный, остальные страдали хронической коронарной недостаточностью, проявлявшейся приступами стенокардии. ЭКГ регистрировали в покое и после дозированной нагрузки на велоэргометре. Диагностика ишемической болезни сердца основывалась на критериях ВОЗ (1970).

Больные находились на амбулаторном наблюдении, прием гиполипидемических препаратов был прекращен не менее чем за 1 мес до проведения пробы. Масса пациентов в период наблюдения была стабильной, и они соблюдали обычную диету.

Жировую нагрузку (пробный завтрак) проводили утром натощак через 12 ч после последнего приема пищи, которая состояла из 2 желтков и 250 г 20% сливок. Пробный завтрак имел следующий состав: белки — 14,6 г, жиры — 59,0 г, углеводы — 10,5 г, холестерин — 120 мг. Поскольку масса больных в обследуемой группе была в пределах 70—75 кг, то количество принимаемых холестерина и жира на 1 кг массы было близким у всех пациентов. Кровь брали из локтевой вены до завтрака, через 3 и 6 ч после него и сохраняли во льду. После центрифугирования плазму замораживали и анализировали на следующий день.

Субстратом служила 20% эмульсия интралипида (фирма «Vitrum», Швеция), которая является предпочтительным субстратом для ЛПЛ [17, 18]. Более подробно методика определения активности ЛПЛ в крови описана ранее [19]. Общую липолитическую активность оценивали по количеству освободившихся неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК) в микромолях и на 1 мл плазмы за 1 ч инкубации. Об активности ЛПЛ судили по разнице между общей липолитической активностью плазмы без NaCl и после его добавления. Концентрацию НЭЖК определяли колориметрическим методом [20].

Содержание холестерина и триглицеридов в плазме крови определяли на автоанализаторе АА-2 фирмы «Technicon» (США).

Фенотипирование ГЛП приведено в других публикациях [21, 22].

## Результаты и обсуждение

На рис. 1 приведены данные о липолитической активности плазмы крови у больных ишемической болезнью сердца до и после жирового завтрака. Исходная активность была небольшой и в среднем по группе составляла

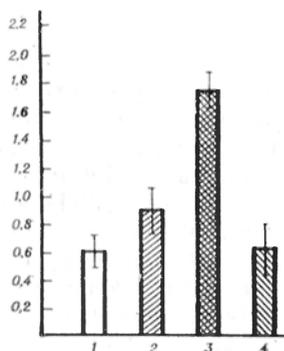


Рис. 1. Активность ЛПЛ (в мкмоль/мл/ч) у больных ишемической болезнью сердца на фоне жировой нагрузки.

1 — исходная липолитическая активность плазмы крови до нагрузки; 2 — липолитическая активность через 3 ч после жировой нагрузки; 3 — то же через 6 ч ( $P < 0,001$ ); 4 — то же через 6 ч после нагрузки + 1 М NaCl ( $P < 0,001$ ).

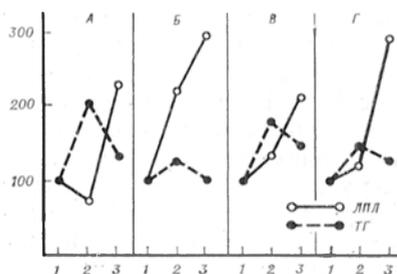


Рис. 2. Изменение концентрации триглицеридов (ТГ) и активности ЛПЛ у больных ишемической болезнью сердца с различными типами ГЛП на фоне жировой нагрузки (в % к исходным величинам).

А — нормолипидемия; Б — IIa тип ГЛП; В — IIb тип ГЛП; Г — IV тип ГЛП. 1 — до нагрузки; 2 — через 3 ч после жировой нагрузки; 3 — через 6 ч после жировой нагрузки.

ла  $0,63 \pm 0,13$  мкмоль НЭЖК на 1 мл плазмы за 1 ч. Через 3 ч после нагрузки выявилась тенденция к повышению этой активности, хотя оно было недостаточным. Более четкое повышение липолитической активности (на 180% по отношению к исходной;  $P < 0,001$ ) наблюдалось через 6 ч после приема жира. Этот эффект отмечался у всех больных.

Для выяснения вопроса о том, в какой мере повышение липолитической активности обусловлено ЛПЛ, была проведена серия опытов с добавлением NaCl в инкубационную среду в конечной концентрации 1 М. Результаты показали, что в этом случае липолитическая активность становится практически равной базальной. Иными словами, добавление NaCl полностью устраняло прирост активности, свидетельствуя о том, что через 6 ч после

жирового завтрака общая липолитическая активность плазмы крови повышалась за счет ЛПЛ.

Содержание триглицеридов (см. таблицу) у этих больных достоверно повышалось через 3 ч после жирового завтрака и через 6 ч значительно снижалось, не достигая, однако, исходного уровня. Концентрация холестерина в эти сроки оставалась без изменений. Уровень НЭЖК достоверно увеличивался уже через 3 ч и продолжал возрастать к 6-му часу. Содержание  $\alpha$ -холестерина имело тенденцию к снижению через 3 ч при максимальном повышении уровня триглицеридов.

Содержание НЭЖК, триглицеридов и холестерина в плазме больных ишемической болезнью сердца до и после жировой нагрузки

Условия опыта	НЭЖК, мкмоль на 1 мл плазмы	Триглицериды	Холестерин	
			мг на 100 мл	
До жировой нагрузки	$0,371 \pm 0,035$ (19)	$202 \pm 24,4$ (20)	$288 \pm 12,0$ (20)	$45,2 \pm 2,1$ (20)
Через 3 ч после нагрузки	$0,533 \pm 0,040$ (19)	$328 \pm 36,5$ (20)	$290 \pm 12,0$ (20)	$41,8 \pm 2,07$ (20)
<i>p</i>	$< 0,001$	$< 0,01$		
Через 6 ч после нагрузки	$0,718 \pm 0,057$ (19)	$242 \pm 32,9$ (20)	$281 \pm 13,0$ (20)	$42,5 \pm 1,9$ (20)
<i>p</i>	$< 0,01$			

Примечание. В скобках — число опытов.

Для сопоставления активности ЛПЛ и уровня триглицеридов группа обследованных была разделена на две подгруппы в зависимости от содержания триглицеридов: в 1-ю подгруппу вошли больные с содержанием триглицеридов 190 мг на 100 мл и ниже (пациенты с нормолипидемией и IIa типом ГЛП), во 2-ю — с содержанием триглицеридов выше 190 мг на 100 мл (больные с IIb и IV типом ГЛП). Оказалось, что активность ЛПЛ в среднем по этим подгруппам почти не отличалась. Это отчетливо видно из данных об изменении липолитической активности в процессе жировой нагрузки: в 1-й подгруппе через 3 ч она составляла 128 % от исходной, через 6 ч — 254 %, во 2-й подгруппе — 137 и 267 % соответственно. Нужно отметить, что и средние абсолютные величины в обеих подгруппах были близки между собой.

Таким образом, использованный нами подход не выявил зависимости между концентрацией триглицеридов и активностью ЛПЛ. Отсутствие корреляции между содержанием триглицеридов и активностью постгепариновой ЛПЛ плазмы крови у больных с гипертриглицеридемией наблюдали другие авторы [9, 23]. Вместе с тем в литературе имеются сведения о различных величинах активности постгепариновой ЛПЛ у больных с разными типами ГЛП [7, 8, 24—26]. В связи с этим представляло интерес сопоставить измеряемую в наших опытах липолитическую активность с уровнем триглицеридов у больных с разными типами ГЛП после жировой нагрузки.

На рис. 2 приведены данные об изменении этих показателей в процентах к исходному уровню. Интересная динамика в активности ЛПЛ отмечена у больных с нормолипидемией (см. рис. 2, А); через 3 ч на фоне резкого повышения содержания триглицеридов (в 2 раза) активность ЛПЛ снижалась на 30 % от исходной, а через 6 ч при снижении концентрации триглицеридов в плазме крови активность ЛПЛ возрастала на 130 % по сравнению с первоначальным уровнем.

У пациентов со IIa типом ГЛП (см. рис. 2, Б) прежде всего отмечается очень небольшое повышение уровня триглицеридов — всего на 28 % — через 3 ч с полной нормализацией через 6 ч. Обращает на себя внимание также тот факт, что уже через 3 ч у этих больных активность ЛПЛ резко возрастает (на 123 %) и продолжает увеличиваться, превышая на 200 % исходную через 6 ч.

Динамика изменений и уровня триглицеридов и активности ЛПЛ при IIб и IV типе ГЛП весьма близка (см. рис. 2, В, Г). При умеренном повышении уровня триглицеридов через 3 ч (на 80 и 50 % соответственно) активность ЛПЛ возросла незначительно, к 6-му часу продолжала повышаться, причем у больных с IV типом ГЛП повышение было более выраженным. Необходимо отметить, что в двух последних группах исходный уровень триглицеридов был значительно выше, чем в двух первых (225 и 250 мг % на 100 мл против 126 и 116 мг на 100 мл соответственно).

Таким образом, при анализе данных, относящихся к различным типам ГЛП, выявились некоторые особенности в изменении активности ЛПЛ в ответ на жировую нагрузку. Она резко увеличивалась уже через 3 ч только при IIа типе ГЛП, а у больных с другими типами ГЛП и нормолипидемией выраженное повышение ее проявлялось только через 6 ч. При определении содержания НЭЖК в плазме крови обнаружены постепенное повышение их уровня через 3 и 6 ч у больных с нормолипидемией и IIа типом ГЛП и более выраженные изменения при IV и IIб типе ГЛП, особенно при последнем. Полученные результаты свидетельствуют, что однократная жировая нагрузка вызывает достоверное повышение активности ЛПЛ у больных ишемической болезнью сердца вне зависимости от исходного уровня липидов.

В литературе приводятся противоречивые сведения о влиянии жировых нагрузок на активность липолитических ферментов плазмы крови. Если одни авторы не обнаруживали изменений ферментативной активности [15, 16], то другие находили ее повышение [13, 14]. К результатам наших исследований близки данные, полученные при изучении активности ЛПЛ жировой ткани, являющейся основным источником этого фермента в плазме крови [27, 28]. Последними авторами было показано, что у здоровых лиц активность ЛПЛ в жировой ткани, взятой через 6—8 ч после приема пищи, была выше, чем натощак. При этом было отмечено отсутствие корреляции между уровнем триглицеридов и активностью ЛПЛ в жировой ткани.

Обращает на себя внимание, что у больных ишемической болезнью сердца наблюдалось различное изменение активности ЛПЛ в ответ на жировую нагрузку в зависимости от типа ГЛП. У пациентов со IIа типом ГЛП обнаруживалась реакция на этот раздражитель уже через 3 ч, тогда как у других больных выраженные изменения ферментативной активности проявлялись только через 6 ч. При этом уровень триглицеридов при IIа типе ГЛП возрастал через 3 ч всего на 28 % с полной нормализацией через 6 ч, тогда как у больных со IIб и IV типом ГЛП повышение их содержания было более значительным через 3 ч (80 и 50 % соответственно) при очень высоком исходном уровне, близком к 250 мг на 100 мл. Через 6 ч содержание триглицеридов в крови у таких больных еще превышало первоначальный уровень на 50 и 30 % соответственно.

Интересно, что из всех типов ГЛП только при IIа типе не отмечается наличия гипертриглицеридемии и плазма крови всегда прозрачна. Очевидно, при данном типе трансформация ЛПОНП в ЛПНП протекает наиболее быстро, возможно, быстрее, чем в норме. В пользу такого предположения свидетельствует и тот факт, что у пациентов с нормолипидемией в ответ на жировую нагрузку повышение уровня триглицеридов выражено в значительно большей степени, чем у больных со IIа типом ГЛП.

Результаты наших исследований представляют интерес, поскольку они касаются изменения базальной (не связанной с введением гепарина) активности ЛПЛ в ответ на такой физиологический раздражитель, как однократный прием жира, тем более что распространенный подход к измерению липолитической активности в плазме крови натощак, по мнению Bogensztein [29], не отражает долю участия фермента, освобождаемого из жировой ткани и скелетных мышц, в общей внепеченочной липолитической активности плазмы.

Кроме того, определение активности ЛПЛ в ответ на жировую нагрузку позволило выявить различную реакцию у больных со IIа и IIб типом ГЛП, что еще раз подтверждает справедливость выделения этих двух подгрупп в пределах II типа ГЛП. При объединении таких больных не проявилось

бы четких изменений изучаемых параметров. Фактически больные со IIb типом ГЛП по изменению концентрации триглицеридов и активности ЛПЛ стоят ближе к пациентам с IV типом ГЛП, чем со IIa. Наконец, полученные данные показывают, что анализ липолитической активности у больных ишемической болезнью сердца при делении их на группы по уровню триглицеридов не раскрывает специфики изменения ферментативной активности, которая четко прослеживается при учете типов ГЛП.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Zilvermit D. B.* — *Circulat. Res.*, 1973, v. 33, p. 633—638.
2. *Hülsmann W. C., Jansen H.* — In: *Energy, Regulation and Biosynthesis in Molecular Biology*. Ed. D. Richter. Berlin, 1974, p. 322—335.
3. *Brunzell J. D., Chait A., Bierman E. L.* — *Metabolism*, 1978, v. 27, p. 1109—1127.
4. *Nikkilä E. A.* — *Europ. J. clin. invest.*, 1978, v. 8, p. 111—113.
5. *Schaefer E. J., Anderson D. W., Brever H. B. et al.* — *Lancet*, 1978, v. 2, p. 391—393.
6. *Tall A. R., M. B., Small D. M.* — *New Engl. J. Med.*, 1978, v. 299, p. 1232—1236.
7. *Ganesan D., Bradford R. H., Ganesan G. et al.* — *J. appl. Physiol.*, 1975, v. 39, p. 1022—1033.
8. *Greten H., De Grella R., Klose G. et al.* — *J. Lipid. Res.*, 1976, v. 17, p. 203—211.
9. *Huttunen J. K., Ehnholm C., Kekki M. et al.* — *Clin. Sci.*, 1976, v. 50, p. 249—260.
10. *Brown W. V., Shaw W., Baginsky M.* — In: *Lipoprotein Metabolism*. Ed. H. Greten. Berlin, 1976, p. 2—6.
11. *La Rosa J. C., Levy R. I., Windmueller H. G. et al.* — *J. Lipid. Res.*, 1972, v. 13, p. 356—363.
12. *Olivecrona T., Egelrud T.* — In: *Lipid Metabolism, Obesity and Diabetes Mellitus. Impact Upon Atherosclerosis*. Stuttgart, 1974, p. 23—28.
13. *Sailer S., Sandhofer F., Braunsteiner H.* — *Germ. med. Monthly*, 1966, Bd 11, p. 41—43.
14. *Wieland H.* — In: *Hungarian Arteriosclerosis Conference*. 4th. Budapest, 1976, p. 50.
15. *Nilsson-Ehle P., Carlström S., Belfrage P.* — *Scand. J. clin. Lab. Invest.*, 1975, v. 36, p. 373—378.
16. *Rogers M. P., Barnett D., Robinson D. S.* — *Atherosclerosis*, 1976, v. 24, p. 551—564.
17. *Fielding Ch. J., Havel R. J.* — *Arch. Path. Lab. Med.*, 1977, v. 101, p. 225—229.
18. *Vessby B., Boberg J., Lithell H.* — *Clin. Sci.*, 1978, v. 54, p. 201—203.
19. *Солитернова И. Б., Никульчева Н. Г.* — *Вопр. мед. химии*, 1979, № 2, с. 204—209.
20. *Falholt K., Lund B., Falholt W.* — *Clin. chim. Acta*, 1973, v. 46, p. 105—111.
21. *Никульчева Н. Г., Криворученко И. В., Трюфанов В. Ф.* *Кардиология*, 1976, № 2, с. 55—60.
22. Фенотипирование гиперлиппротеидемий. Метод. рекомендации. Под ред. А. Н. Климова, И. Е. Ганелиной. М., 1975.
23. *Boberg J.* — *Acta med. scand.*, 1972, v. 191, p. 97—102.
24. *Augustin J., Wieland H., Puhl W.* — et al. — *Circulation*, 1976, v. 54, p. 11—25.
25. *Левитова Е. Н., Лобова Н. М., Тумов В. Н.* — В кн.: *Структура, биосинтез и превращение липидов в организме животного и человека*. М., 1975, с. 66.
26. *Тумов В. Н., Творогова М. Г., Крылова Э. А.* — *Лабор. дело*, 1978, № 11, с. 657—661.
27. *Brunzell J. D., Goldberg A. P.* — In: *Atherosclerosis 4*. Ed. G. Schettler et al. Berlin, 1977, p. 336—341.
28. *Lithell H., Boberg J., Hellsing K. et al.* — *Atherosclerosis*, 1978, v. 30, p. 89—94.
29. *Borensztajn J.* — *Artery*, 1979, v. 5, p. 346—353.

Поступила 16/II 1980 г.

#### ACTIVITY OF LIPOPROTEIN LIPASE IN PATIENTS WITH ISCHEMIC HEART IMPAIRMENT AND WITH VARIOUS TYPES OF HYPERLIPOPROTEINEMIA AFTER LOADING WITH LIPIDS

*N. G. Nikul'cheva, I. B. Soliternova, I. V. Krivoruchenko*

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

Lipolytic activity was distinctly increased in blood plasma of patients with ischemic heart impairment and various types of hyperlipoproteinemia after a test breakfast. The

increase in lipolysis was due to elevation in the lipoprotein lipase activity in response to loading with lipids. Attempts to distinguish among the ischemic patients some subgroups on the basis only of the initial level of triglycerides in their blood plasma did not exhibit any differences in the enzymatic activity after the loading with lipids. This relationship was clearly noted in classification of the patients on the basis of the types of hyperlipoproteinemia. The earliest and the most pronounced increase in lipolytic activity in response to the loading with lipids was observed in the 11a type of hyperlipoproteinemia.

УДК 616.74-008.944.52-02:576.851.553.097.29

*Н. П. Чеснокова, И. В. Алаева*

## **ВЛИЯНИЕ БОТУЛИНИЧЕСКОГО ТОКСИНА НА СОДЕРЖАНИЕ КАТЕХОЛАМИНОВ В РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ**

Кафедра патологической физиологии Саратовского медицинского института

В единичных экспериментальных исследованиях имеются сведения о том, что ботулиническая интоксикация характеризуется развитием не только прогрессирующей гипоксической гипоксии, но и тканевой гипоксии, связанной с подавлением активности ряда дегидрогеназ и угнетением экстракции кислорода тканями [1—3].

Как показали наши предыдущие исследования [3, 4], подавление процессов экстракции и утилизации кислорода мышцами наступает не в период максимальной сорбции токсина различными тканями, в частности мышечной, а спустя некоторое время. Необходимость определенного латентного периода в подавлении процессов утилизации кислорода мышечной тканью на фоне введения ботулинического токсина дает возможность предположить, что в основе развития тканевой гипоксии при ботулизме лежит не непосредственный ингибирующий эффект токсина на процессы тканевого дыхания, а опосредованное действие за счет нарушения метаболизма биологически активных соединений, в частности катехоламинов. Последние, как известно, накапливаясь в избыточных концентрациях в тканях, могут угнетать процессы утилизации кислорода [5, 6].

В связи с изложенным представлялось целесообразным изучение содержания катехоламинов в различных типах скелетных мышц в динамике ботулинической интоксикации.

### **М е т о д и к а**

Опыты поставлены на контрольных и затравленных ботулиническим токсином крысах массой около 250 г. Ботулинический токсин типа С (1 ДЛМ для мыши составляет 0,00005 мг сухого токсина) вводили в мышцы спины с целью воспроизведения генерализованной формы ботулинической интоксикации. Последняя проявлялась спустя сутки в развитии парезов скелетной мускулатуры, переходящих в параличи через 2 сут. Местную форму интоксикации достигали введением токсина в мышцы голени в дозе 0,0025 мг на 100 г массы. Исследование проводили через 16—18 ч при отсутствии клинических проявлений интоксикации, через 1½ сут при развитии локальных парезов скелетной мускулатуры и через 2—2½ сут на фоне выраженных параличей. У животных определяли содержание адреналина и норадреналина триоксинидоловым флюорометрическим методом [7] в модификации В. В. Меньшикова [8] в различных типах скелетных мышц: наружных межреберных, в быстрой белой (*m. tibialis anterior*), медленной красной (*m. soleus*) и смешанной (*m. gastrocnemius*).

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

Развитие парезов скелетной мускулатуры при общей форме ботулинической интоксикации сочеталось с выраженными изменениями содержания катехоламинов в различных типах скелетных мышц независимо от их морфофункциональных особенностей (табл. 1). Так, в наружных межреберных мышцах повышалось содержание адреналина, в то время как уровень норадреналина не отличался от контроля. В быстрой белой и медленной красной мышцах имело место одновременное увеличение содержания адреналина и норадреналина, в то время как в смешанной икроножной мышце

Т а б л и ц а 1

Содержание катехоламинов (в мкг на 1 г ткани) в различных типах скелетных мышц при общей форме ботулинической интоксикации ( $M \pm m$ )

Серия опытов	Камбаловидная мышца		Икроножная мышца		Передняя большеберцовая мышца		Межреберная мышца	
	адреналин	норадреналин	адреналин	норадреналин	адреналин	норадреналин	адреналин	норадреналин
I. Контроль	0,08±0,008	0,27±0,003	0,074±0,005	0,19±0,003	0,067±0,007	0,22±0,006	0,09±0,008	0,26±0,02
II. Парезы скелетной мускулатуры	0,27±0,034	0,45±0,02	0,18±0,02	0,23±0,02	0,14±0,015	0,30±0,028	0,15±0,013	0,30±0,017
<i>P</i>	<0,001	<0,001	<0,001	>0,1	<0,001	<0,01	<0,001	>0,05
III. Паралич скелетной мускулатуры	0,20±0,003	0,61±0,03	0,15±0,001	0,35±0,02	0,12±0,007	0,28±0,018	0,18±0,025	0,35±0,03
<i>P</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,05

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3: *P* — рассчитано по отношению к контролю; в каждой серии по 10—13 опытов.

Т а б л и ц а 2

Содержание катехоламинов (в мкг на 1 г ткани) в различных типах скелетных мышц на ранних стадиях местной формы ботулинической интоксикации

Серия опытов	Вид мышцы	Исследованный показатель	Доклинический период		Парезы скелетной мускулатуры	
			интактная конечность	пораженная конечность	интактная конечность	пораженная конечность
I	Камбаловидная	Адреналин	0,16±0,01	0,20±0,001	0,13±0,007	0,27±0,023
		<i>P/P<sub>1</sub></i>	<0,001	<0,001/<0,01	<0,001	<0,001/<0,001
II	Икроножная	Норадреналин	0,34±0,08	0,48±0,02	0,32±0,018	0,62±0,04
		<i>P/P<sub>1</sub></i>	>0,5	<0,001/>0,05	<0,01	<0,001/<0,001
III	Передняя большеберцовая	Адреналин	0,07±0,006	0,09±0,006	0,06±0,005	0,13±0,006
		<i>P/P<sub>1</sub></i>	>0,5	>0,05/>0,05	>0,05	<0,001/<0,001
III	Передняя большеберцовая	Норадреналин	0,18±0,013	0,21±0,01	0,14±0,007	0,30±0,02
		<i>P/P<sub>1</sub></i>	>0,5	>0,5/>0,5	>0,2	>0,05/<0,001
III	Передняя большеберцовая	Адреналин	0,05±0,005	0,10±0,009	0,07±0,005	0,15±0,01
		<i>P/P<sub>1</sub></i>	>0,1	<0,02/<0,001	>0,5	<0,001/<0,001
III	Передняя большеберцовая	Норадреналин	0,15±0,009	0,25±0,009	0,13±0,012	0,31±0,01
		<i>P/P<sub>1</sub></i>	<0,001	>0,5/<0,001	<0,001	<0,001/<0,001

Примечание. Здесь и в табл. 3 *P<sub>1</sub>* — рассчитано по отношению к интактной стороне.

повышался лишь уровень адреналина. По мере развития паралитического синдрома изменения метаболизма катехоламинов в мышцах еще более усиливались. Так, в икроножной и межреберной мышцах уровень адреналина оставался высоким, как и на ранней стадии интоксикации, однако параллельно увеличивалась и концентрация норадреналина. В быстрой белой и красной медленной мышцах сохранялась закономерность, свойственная более ранней стадии интоксикации, — высокий уровень адреналина и норадреналина. Между тем количество норадреналина в красной медленной мышце значительно превышало таковое на стадии развития парезов скелетной мускулатуры.

Резкое возрастание уровня катехоламинов на паралитической стадии интоксикации в различных типах скелетных мышц сочеталось, как показано нами в предыдущей работе, с угнетением интенсивности экстракции и утилизации кислорода.

Поскольку в динамике общей формы ботулинической интоксикации возникает прогрессирующая гипоксическая гипоксия, которая, безусловно, не может не отразиться на структуре и функции митохондрий различных органов и тканей, в частности мышечной, представлялось целесообразным проведение экспериментов на модели местной формы ботулинической интоксикации. Последняя длительное время носит локальный характер. Как оказалось (табл. 2), в доклинический период местной формы ботулинической интоксикации не было сколько-нибудь выраженных изменений содержания катехоламинов в наружной межреберной мышце ( $P > 0,05$ ), т. е. вдали от места введения токсина. В то же время на стороне введения токсина отмечались определенные изменения содержания катехоламинов в различных типах скелетных мышц. Так, в медленной мышце (*m. soleus*) увеличивалось содержание адреналина и норадреналина, в быстрой мышце (*m. tibialis anterior*) — только адреналина, а в смешанной мышце содержание биогенных аминов не изменялось. В то же время на интактной конечности отмечалось возрастание уровня адреналина в медленной мышце (*m. soleus*) и снижение содержания норадреналина в быстрой мышце (*m. tibialis anterior*). По мере развития парезов скелетной мускулатуры на стороне введения токсина возникало еще большее, чем в предыдущий период интоксикации, повышение уровня адреналина и норадреналина в различных типах скелетных мышц — быстрых и медленных, независимо от их морфологических, биохимических и функциональных особенностей. В икроножной смешанной мышце отмечалось отчетливое увеличение количества адреналина. Содержание адреналина повышалось и в наружных межреберных мышцах ( $P < 0,001$ ), т. е. за пределами местного локального поражения. В этот же период интоксикации на интактной стороне также отмечалось возрастание уровня адреналина и норадреналина в медленной мышце, в икроножной мышце содержание аминов не изменялось, а в быстрой передней большеберцовой оставалось сниженным количество норадреналина.

При развитии выраженных местных параличей скелетной мускулатуры на стороне введения токсина еще более повышалось содержание катехоламинов в медленной мышце и оставалось выше контроля в быстрой мышце (табл. 3). В смешанной икроножной мышце увеличивалось содержание адреналина. На интактной стороне, несмотря на отсутствие внешних проявлений генерализации интоксикации, имело место возрастание уровня адреналина и норадреналина в медленной мышце (*m. soleus*), увеличивалось содержание адреналина в быстрой мышце (*m. tibialis anterior*). Одновременно значительно превышал норму уровень адреналина и в наружных межреберных мышцах ( $P < 0,001$ ).

Таким образом, изменения содержания катехоламинов возникают в различных типах скелетных мышц, предшествуют развитию блока холинергической передачи возбуждения и усиливаются по мере появления клинических признаков интоксикации.

В последующих экспериментах целесообразно было установить взаимосвязь развивающегося под влиянием ботулинического токсина блока холинергической передачи возбуждения и изменений метаболизма биоген-

ных аминов. С этой целью проведены опыты с использованием хлорида гуанидина, усиливающего квантовое освобождение ацетилхолина и несколько замедляющего развитие ботулинической интоксикации [9, 10]. Гуанидина хлорид вводили внутривенно в суточной дозе 5 мг на 100 г массы животного на протяжении 2 сут развития интоксикации. Животных брали в эксперимент в сроки, соответствующие развитию паралитического локального поражения конечности без фармакологической коррекции. В этой модификации экспериментов также было установлено повышение уровня ад-

Т а б л и ц а 3

Содержание катехоламинов (в мкг на 1 г ткани) в различных типах скелетных мышц на паралитической стадии местной ботулинической интоксикации ( $M \pm m$ )

Серия опытов	Вид мышцы	Исследованный показатель	Интоксикация (параличи)			
			без фармакологических воздействий		на фоне введения гуанидина	
			интактная конечность	пораженная конечность	интактная конечность	пораженная конечность
I	Камбаловидная	Адреналин $P/P_1$ $P_2$	$0,40 \pm 0,006$ <0,001	$0,74 \pm 0,07$ <0,001/<0,001	$0,31 \pm 0,03$ <0,001	$0,40 \pm 0,02$ <0,001/>0,05 <0,001
		Норадреналин $P/P_1$ $P_2$	$0,56 \pm 0,08$ <0,001	$1,50 \pm 0,21$ <0,001/<0,001	$0,63 \pm 0,04$ <0,001	$0,67 \pm 0,046$ <0,001/>0,5 <0,001
II	Икроножная	Адреналин $P/P_1$ $P_2$	$0,09 \pm 0,006$ <0,05	$0,16 \pm 0,008$ <0,001/<0,001	$0,08 \pm 0,006$ >0,2	$0,11 \pm 0,005$ <0,001/<0,01
		Норадреналин $P/P_1$ $P_2$	$0,15 \pm 0,01$ >0,5	$0,24 \pm 0,02$ >0,2/<0,01	$0,14 \pm 0,004$ >0,2	$0,15 \pm 0,02$ >0,5/>0,5 <0,001
III	Передняя большеберцовая	Адреналин $P/P_1$ $P_2$	$0,1 \pm 0,009$ <0,01	$0,14 \pm 0,01$ <0,001/<0,01	$0,09 \pm 0,007$ <0,05	$0,11 \pm 0,005$ <0,001/<0,05 <0,01
		Норадреналин $P/P_1$ $P_2$	$0,21 \pm 0,02$ >0,5	$0,28 \pm 0,017$ <0,01/<0,05	$0,15 \pm 0,01$ <0,001	$0,18 \pm 0,02$ >0,05/>0,1 <0,001

Примечание.  $P_2$  — рассчитано по отношению к соответствующей стадии интоксикации без коррекции.

реналина и норадреналина в медленных мышцах, увеличение содержания адреналина в быстрых мышцах, отсутствие изменений уровня катехоламинов в смешанной мышце на стороне введения токсина. В то же время на стороне, противоположной введению токсина, имело место возрастание уровня адреналина и норадреналина в камбаловидной мышце и увеличение количества адреналина в передней большеберцовой мышце.

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Аносов И. Я., Булатова Т. И. — Ж. микробиол., 1975, № 5, с. 111—116.
2. Аносов И. Я., Булатова Т. И. — Там же, 1976, № 7, с. 33—37.
3. Чеснокова Н. П., Астафьева О. Г. — Вопр. мед. химии, 1980, № 1, с. 32—36.
4. Астафьева О. Г., Чеснокова Н. П. — В кн.: Патологическая физиология инфекционного процесса и аллергии. Саратов, 1978, с. 9—13.
5. Манухин Б. Н. — Докл. АН СССР, 1956, т. 106, № 4, с. 747—748.
6. Кулинский В. И. — Пробл. эндокринологии, 1970, № 5, с. 67—72.
7. Euler U. S., Lishajko F. — Acta physiol. scand., 1961, v. 51, p. 348—356.
8. Матлина Э. Ш., Меньшиков В. В. Клиническая биохимия катехоламинов. М., 1967.
9. Cherington M., Sover A., Greenberg H. — Curr. Ther. Res., 1972, v. 14, p. 91—94.
10. Cherington M., Greenberg H., Sover A. — Clin. Toxicol., 1973, v. 6, p. 83—89.

Поступила 23/1 1980 г.

К ст. И. А. Морозова и соавт.

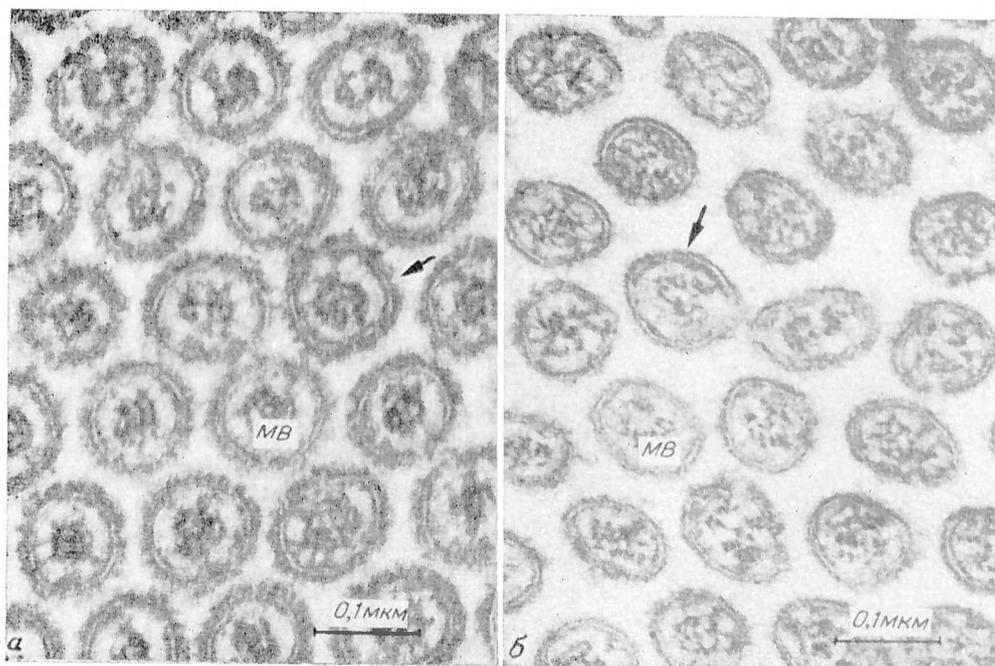


Рис. 1. Поперечный срез микроворсинок энтероцита и состояние гликокаликса (указан стрелкой).  
а — контроль; б — экспериментальный D-авитаминоз. Здесь и на рис. 2 и 3: MB — микроворсинки.

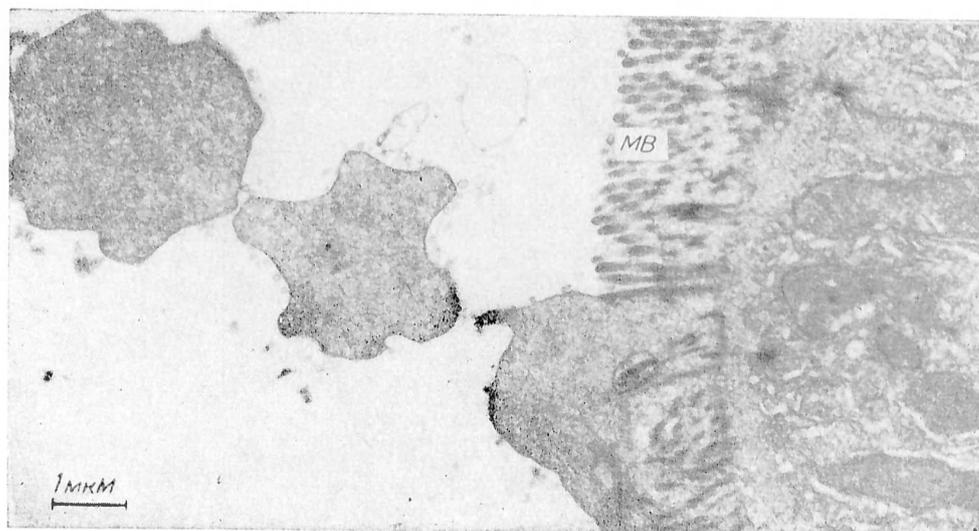


Рис. 3. Выбухание и отрыв части цитоплазмы энтероцита с незначительными изменениями ультраструктуры внутриклеточных оргanelл.

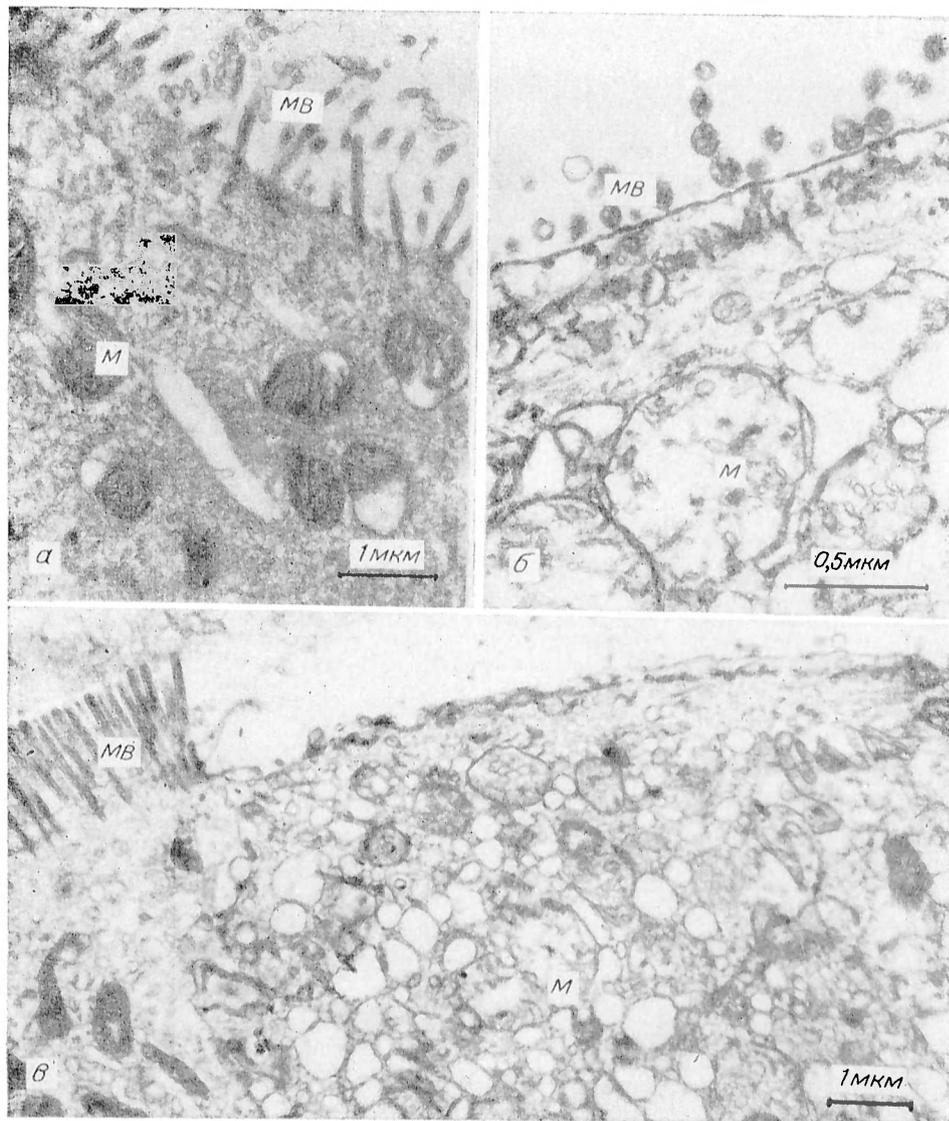


Рис. 2. Ультраструктура энтероцитов у животных с экспериментальным D-авитаминозом.

*а* — неупорядоченное, разреженное расположение микроворсинок и локальное набухание митохондрий (М); *б* — фрагментация микроворсинок на отдельные везикулярные образования; *в* — исчезновение микроворсинок с апикальной поверхности энтероцита средней части ворсинки тонкой кишки.

## EFFECT OF BOTULINIC TOXIN ON CONTENT OF CATECHOLAMINES IN VARIOUS SKELETAL MUSCLES

*N. P. Chesnokova, I. V. Alaeva*

Medical School, Saratov

Local and general forms of botulinic intoxication of the C type were characterized by an increase in content of catecholamines in various skeletal muscles — fast, slow and mixed. The increase in content of adrenaline and noradrenaline was observed in the muscles, treated with the toxin, at the preclinical period of intoxication with the subsequent elevation as pareses and paralyzes developed in local intoxication. Administration of guanidine chloride, which partially prevents the block of cholinergic stimulation, was accompanied by a decrease in the content of catecholamines in various muscles especially in the slow *musculus soleus*.

УДК 616.833-039.14-056.43-092.9-07:616.153.915-074

*В. М. Плесков, Н. Г. Никульчева, Г. В. Коновалов*

## ЛИПИДЫ И ЛИПОПРОТЕИДЫ КРОВИ У КРОЛИКОВ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ АЛЛЕРГИЧЕСКИМ ПОЛИНЕВРИТОМ

Отдел биохимии липидов и атеросклероза им. акад. Н. Н. Аничкова, лаборатория нормальной и патологической морфологии нервной системы отдела патологической анатомии Научно-исследовательского института экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

Распространенность аутоаллергических, демиелинизирующих заболеваний нервной системы, тяжесть и продолжительность течения, отсутствие радикальных средств профилактики и лечения объясняют повышенный интерес исследователей к изучению их этиологии и патогенеза. В настоящее время накопилось достаточное количество фактов, касающихся иммунопатологических и морфологических аспектов указанных болезней [1—3]. Однако изучению нарушений липидного обмена при этих заболеваниях уделяется гораздо меньше внимания, хотя хорошо известно, что аутоиммунная гиперлипидемия играет важную роль в развитии иммунопатологического процесса в организме, в частности при прогрессировании атеросклероза [4]. Этот факт подтверждается опытами, в которых иммунизация животных нередко приводит к выработке антител, сходных с антилипопротеиновыми антителами, обнаруженными в плазме крови кроликов с гиперхолестеринемией [5]. Последние могут взаимодействовать с  $\beta$ - и пре- $\beta$ -липопротеидами (ЛП), образуя иммунные комплексы, вызывающие нарушение проницаемости эндотелия и повреждение сосудистой стенки по известному механизму действия иммунных комплексов на ткани [6]. Нарушение проницаемости приводит к проникновению в сосудистую стенку макромолекул, в том числе атерогенных  $\beta$ - и пре- $\beta$ -ЛП [4, 7, 8]. Отложение в интима артерий атерогенных ЛП в виде аутоиммунных комплексов или в свободном состоянии сопровождается повреждением окружающих тканей и высвобождением структурных антигенов, которые могут явиться причиной вторичного иммунного ответа с образованием аутоантител против эластина и коллагена артерий [9]. Таким образом, иммунные реакции могут оказывать существенное влияние на развитие и течение атеросклеротического процесса, что нашло отражение в аутоиммунной теории патогенеза атеросклероза, сформулированной Климовым и соавт. [4].

Гиперлипидемия, развивающаяся при иммунизации животных основным белком миелина центральной и периферической нервной системы (ПНС), представляет интерес в двух отношениях: во-первых, с точки зрения изучения особенностей нарушений липидного обмена, возникающих при данном патологическом состоянии, и, во-вторых, с точки зрения дальнейшего анализа некоторых сторон патогенеза аутоиммунных демиелинизирующих заболеваний нервной системы, таких, как экспериментальный

аллергический полиневрит (ЭАП) и экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЭАЭ).

Известно, что ЭАП развивается после инокуляции животным основного белка миелина из ПНС в смеси с полным стимулятором Фрейнда [10, 11]. Эта экспериментальная модель по своим неврологическим проявлениям, иммунологическим и морфологическим показателям имеет значительное сходство с рядом широко распространенных заболеваний нервной системы человека [12].

Как уже указывалось выше, характер нарушений липидного обмена при данных аллергических заболеваниях изучен явно недостаточно. В литературе имеются лишь единичные публикации на эту тему, касающиеся только ЭАЭ. Так, у морских свинок с ЭАЭ еще до появления неврологических симптомов заболевания значительно увеличивается содержание общих липидов и свободных жирных кислот в сыворотке крови [13].

Задачей настоящего исследования явилось изучение изменений уровня липидов и ЛП в крови, а также проницаемости стенки аорты кроликов с ЭАП; в отношении этих показателей какие-либо сведения в литературе отсутствуют.

### М е т о д и к а

Опыты проведены на 69 кроликах-самцах породы шиншилла массой тела 2,5—3,0 кг. Поставлены 3 серии опытов: I — контрольная серия — интактные животные; II — кролики, инокулированные адьювантом Фрейнда; III — кролики, получившие основной белок миелина в смеси с полным адьювантом Фрейнда.

Основной белок миелина был выделен из седалищных нервов быка [11]. Анализ сыворотки крови проводили до инокуляции животных, а также спустя 1 ч, 12, 20, 25 и 30 дней после введения невритогенной смеси. Кровь брали из краевой вены уха животного утром до приема пищи и в сыворотке крови определяли содержание холестерина (ХС) в хлороформном экстракте по реакции Либерманна — Бурхардта, триглицеридов (ТГ) [14], суммарной фракции  $\beta$ - и пре- $\beta$ -ЛП турбидиметрическим методом [15]. Спектр ЛП в сыворотке крови анализировали методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) [16]. Белки сыворотки крови разделяли в 7,5% ПААГ в аппарате фирмы «Реанал» с последующей их окраской 1% раствором амидо черного. Для определения тяжести развития периаксонального демиелинизирующего процесса морфологически были изучены с помощью метода Марки наиболее часто и тяжело поражаемые отделы ПНС (специальные ганглии пояснично-крестцового отдела и их корешки). Необходимо отметить, что именно развивающаяся демиелинизация, согласно ранее проведенным исследованиям, определяет неврологическую симптоматику ЭАП [17].

Изучение степени проницаемости аорты проводили с помощью 1% раствора синего Эванса, вводимого внутривенно в дозе 10 мл на 1 кг массы тела за 5—15 мин до забоя кролика. На срезы толщиной 5—10 мкм, приготовленные на замораживающем микротоме или криостате, наносили вазелиновое масло и покрывали тонким стеклом, которое окантовывали парафином. Локализацию красителя, а также его количество, по которому оценивали сосудистую проницаемость, проводили в люминесцентном микроскопе МЛ-2 с выходными фильтрами СЗС-7-2, ФС-1-2 и запирающим ЖС-18, фотографировали при увеличении окуляра в 1,7 и 3 раза и объектива в 40 раз (водная иммерсия) и в 100 раз на цветную фотопленку «Orvo-Colog». С целью исключения артефактов, связанных с аутофлюоресценцией, препараты, кроме того, микроскопировали с выходным фильтром УФС-3-3 и бесцветным запирающим. Помимо визуального исследования, интенсивность специфического свечения препаратов измеряли количественно на том же микроскопе МЛ-2 с приставкой МФЭУ-1 при напряжении 1000 В со шкалой чувствительности 0,3 при зонде 0,5. Окуляр — гамаль  $\times 1,7$ , объектив —  $\times 40$ . Интенсивность свечения, выражаемую в милливольтгах, измеряли в 50 точках аорты со специфическим свечением и не менее чем в 3 полях зрения при измерении фона в контрольных срезах и оценивали в условных единицах по методике, описанной ранее [18].

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

Динамика содержания в сыворотке крови кроликов с ЭАП суммарной фракции  $\beta$ - и пре- $\beta$ -ЛП, ХС и ТГ представлена на рис. 1. Из рис. 1 видно, что уже через 1 ч после введения кроликам невритогенной смеси у них отмечалось резкое нарастание всех изучаемых показателей. Так, содержание ХС увеличивалось более чем в 2 раза, так же как и содержание ТГ, концентрация суммарной фракции  $\beta$ - и пре- $\beta$ -ЛП возрастала в 3 раза. Однако следует отметить, что через 48 ч от начала эксперимента содержание всех липидных фракций в сыворотке крови кроликов, инокулированных неврито-

генной смесью, практически возвращалось к норме. Отмеченное выше резкое повышение уровня ХС, ТГ и  $\beta$ - и пре- $\beta$ -ЛП вскоре после иммунизации животных, по-видимому, можно объяснить влиянием стресса, вызванного инокуляцией невритогенной смеси в богатые рецепторными образованиями подушечки лап кроликов. Известно, что стрессовое состояние сопровождается развитием гиперлипидемии, в основе которой лежит повышенный выход из жировых депо неэстерифицированных жирных кислот, используемых печенью для синтеза ТГ, что в свою очередь приводит к стимуляции образования ЛП очень низкой плотности (пре- $\beta$ -ЛП) и секреции их в кровь в больших количествах, чем в норме. Таков, вероятно, основной механизм первой фазы развития гиперлипидемии.

Спустя 12 дней после инокуляции кроликов основным белком миелина отмечалось новое стойкое возрастание указанных выше показателей, достигающее максимального подъема к 30-му дню от начала эксперимента. Содержание ХС и ТГ к этому сроку увеличивалось в 3 раза, а  $\beta$ - и пре- $\beta$ -ЛП — более чем в 4 раза. При этом обращало на себя внимание то, что у кроликов с более тяжелыми клиническими проявлениями ЭАП гиперлипидемия была выражена в большей степени. У животных, инокулированных только адьювантом Фрейнда без основного белка, также отмечалось повышение концентрации ХС, ТГ и  $\beta$ - и пре- $\beta$ -ЛП, однако оно было значительно менее выраженным.

Интересно отметить, что отношение ХС:ТГ в сыворотке крови интактных и заболевших кроликов было сходным и составляло 0,4. Это до некоторой степени свидетельствует о том, что в патологический процесс вовлечен в одинаковой степени обмен как ХС, так и ТГ. Отмеченный факт существенным образом отличает характер гиперлипидемии при ЭАП от таковой, развивающейся у животных после скармливания им ХС. В последнем случае отношение ХС:ТГ может достигать высоких значений (5:1 и выше) за счет значительно более резкого увеличения концентрации ХС.

При сопоставлении тяжести течения заболевания с характером биохимических изменений было обнаружено, что второй подъем в содержании липидных фракций в сыворотке крови наблюдался главным образом спустя 12 дней от начала эксперимента, тогда как проявление первых неврологических симптомов у большинства животных отмечалось к 15-му дню, т. е. происходило на фоне начавшегося нарастания уровня липидов. При этом, как уже указывалось выше, наблюдалась определенная корреляция между повышением содержания липидов, тяжестью неврологических проявлений заболевания и поражениями спинальных ганглиев (распад миелиновых оболочек).

На рис. 2 представлен липопротеидный спектр сыворотки крови подопытных и контрольных животных. Видно, что в зависимости от тяжести заболевания наряду с увеличением уровня липидных фракций в сыворотке крови кроликов с ЭАП отмечалось заметное повышение интенсивности полос  $\beta$ - и пре- $\beta$ -ЛП. Кроме того, в области между  $\beta$ - и пре- $\beta$ -ЛП появлялось затемнение, являющееся, вероятнее всего, следствием неполной трансформации ЛП очень низкой плотности в ЛП низкой плотности. Одновременно с увеличением интенсивности фракций  $\beta$ - и пре- $\beta$ -ЛП выявлялось ослабление полосы  $\alpha$ -ЛП. У кроликов, которым вводили адьювант Фрейнда, изменения на липидограммах были значительно менее выраженными. Таким образом, на основании полученных данных можно прийти к выводу о

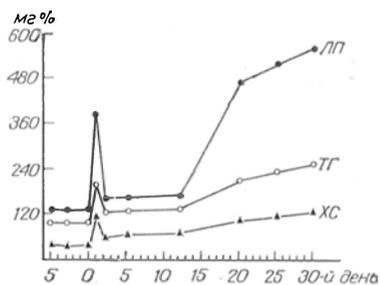


Рис. 1. Концентрация ХС, ТГ и ЛП (суммарной фракции  $\beta$ - и пре- $\beta$ -ЛП) в сыворотке крови кроликов с экспериментальным аллергическим полиневритом (средние данные из 25 опытов).

На оси абсцисс нулевой день соответствует времени введения кроликам основного невритогенного белка в смеси со стимулятором Фрейнда.

том, что у кроликов с ЭАП в патологический процесс вовлекаются все фракции ЛП и преимущественно атерогенные  $\beta$ - и пре- $\beta$ -ЛП.

Хорошо известно, что развитие иммунопатологического процесса, как правило, сопровождается нарастанием уровня  $\gamma$ -глобулинов в крови [19]. Этот факт послужил основанием для исследования белкового состава сыворотки крови животных с ЭАП. Было установлено, что содержание  $\gamma$ -глобулинов в сыворотке крови у заболевших кроликов коррелировало с тяжестью неврологических и морфологических проявлений ЭАП (рис. 3). Кроме того, чем тяжелее протекало заболевание, тем в большей степени происходило также нарастание уровня  $\beta$ - и  $\alpha_2$ -глобулинов, являющихся основными белковыми компонентами соответственно  $\beta$ - и пре- $\beta$ -ЛП.

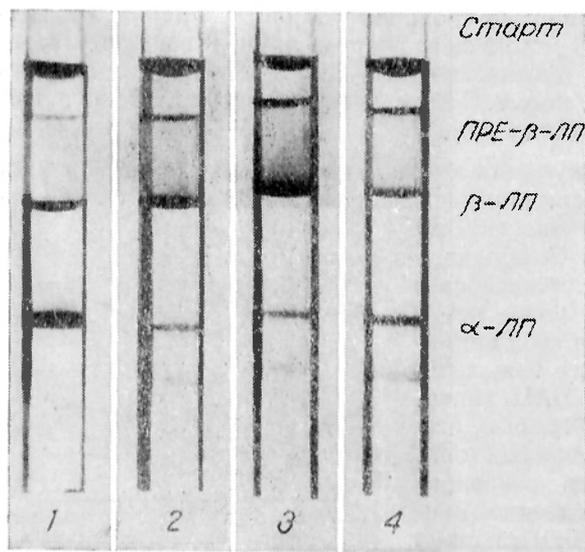


Рис. 2. Спектр липопротеидов сыворотки крови контрольного и подопытных кроликов.

1 — норма; 2 — кролик с легкой формой ЭАП; 3 — кролик с тяжелой формой ЭАП; 4 — кролик, инокулированный одним стимулятором Фрейнда.

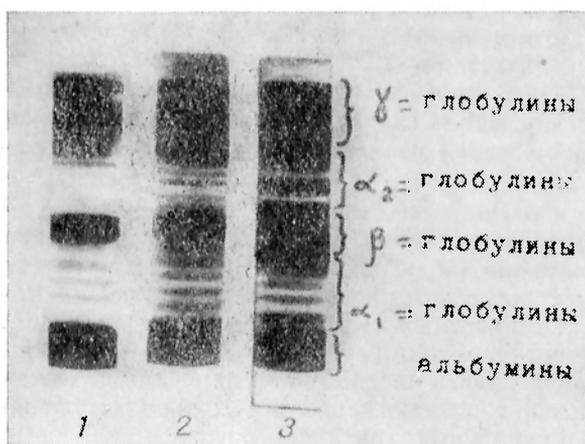


Рис. 3. Спектр белков сыворотки крови контрольного и подопытных кроликов с ЭАП.

1 — норма; 2 — кролик с легкой формой ЭАП; 3 — кролик с тяжелой формой ЭАП.

обмене липидов у них не отмечалось. Эти данные свидетельствуют о наличии определенной коррелятивной зависимости между неврологическими проявлениями ЭАП и выраженностью изменений в обмене липидов.

Как было установлено ранее [20], повышение проницаемости сосудов при ЭАП является наиболее ранним признаком развития заболевания, предшествующим наступлению периаксональной демиелинизации. Исходя из этого, была изучена проницаемость аорты у кроликов данной серии опытов. В экспериментах с введением синего Эванса на 25—30-й день от момента

ЭАП. Было установлено, что содержание  $\gamma$ -глобулинов в сыворотке крови у заболевших кроликов коррелировало с тяжестью неврологических и морфологических проявлений ЭАП (рис. 3). Кроме того, чем тяжелее протекало заболевание, тем в большей степени происходило также нарастание уровня  $\beta$ - и  $\alpha_2$ -глобулинов, являющихся основными белковыми компонентами соответственно  $\beta$ - и пре- $\beta$ -ЛП. Последние данные полностью совпадают с результатами разделения фракций ЛП сыворотки крови животных методом диск-электрофореза в ПААГ.

Интересно отметить, что у 6 из 69 кроликов, инокулированных невритогенной смесью, развития ЭАП не наблюдалось. При этом содержание ХС, ТГ и суммарной фракции  $\beta$ - и пре- $\beta$ -ЛП у них не отличалось от таких же показателей у контрольных животных. Так, содержание ХС в конце эксперимента у первых составило в среднем 38 мг %, а у вторых — 36 мг %; содержание ТГ было равно 96 и 90 мг %,  $\beta$ - и пре- $\beta$ -ЛП — соответственно 158 и 121 мг %. По-видимому, указанные животные оказались нечувствительными к невритогенной смеси, поэтому ни клинических проявлений, ни сдвигов в

инокуляции животных невритогенной смесью выявлено проникновение использованного флюоресцирующего препарата во внутреннюю и среднюю оболочки аорты кроликов, тогда как у контрольных животных отмечалось характерное ярко-красное свечение красителя в основном в эндотелиальном слое, распространяющееся до внутренней эластической мембраны. Для количественной оценки содержания красителя была проведена фотометрия аорт кроликов с ЭАП, которая показала, что содержание краски Эванса в эндотелии животных с ЭАП равнялось  $120 \pm 2,3$  ед., а в аналогичной ткани интактных животных —  $18 \pm 2,1$  ед.; содержание красителя в средней оболочке аорты подопытных кроликов составило  $38 \pm 2,8$  ед., а у интактных животных —  $12 \pm 0,9$  ед.

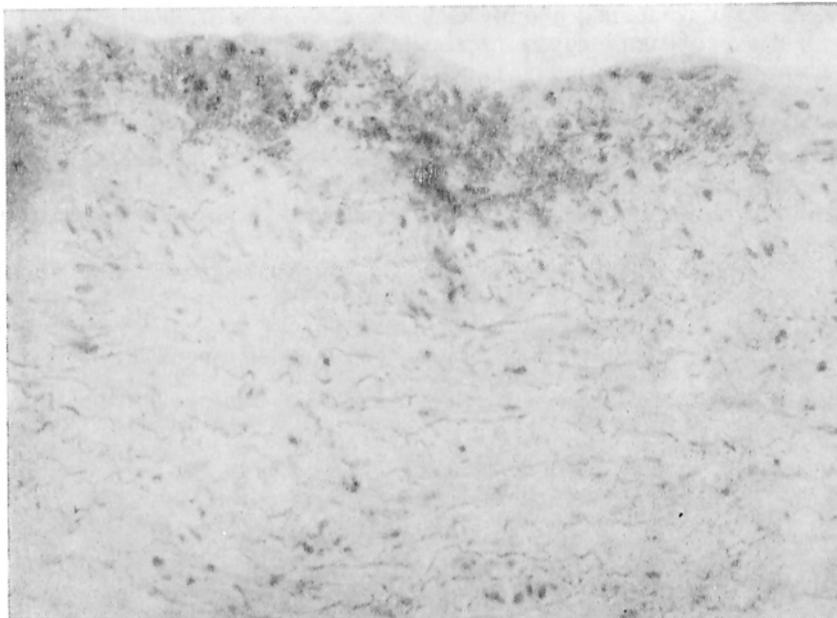


Рис. 4. Умеренно выраженное отложение диффузно расположенных и внутриклеточных липидов в стенке аорты кролика (30 дней от начала эксперимента).

Окраска суданом III-гематоксилином. Ув. 240.

При тотальном окрашивании суданом аорты кроликов с ЭАП спустя 25—30 дней после инокуляции им невритогенной смеси выявили небольшие липидные полоски и пятна, имеющие локализацию, типичную для аорты животных с экспериментальным атеросклерозом. В результате микроскопического исследования в интиме аорты обнаружили отложение вне- и внутриклеточных липидов, окрашиваемых суданом в ярко-красный цвет (рис. 4). У некоторых кроликов незначительное отложение липидов было обнаружено также и в средней оболочке. Таким образом, установленные нами морфологические изменения в стенке аорты кроликов с ЭАП были сходны с таковыми, наблюдаемыми в начальных стадиях экспериментального холестеринового атеросклероза. Полученные результаты совпадают с данными других авторов о том, что введение чужеродного белка кроликам усиливает развитие у них атеросклеротических поражений сосудов [2, 21].

Подводя итог полученных в настоящей работе данных, можно отметить, что развитие ЭАП у кроликов сочетается с определенными нарушениями липидного обмена, которые не только коррелируют с неврологической симптоматикой, характерной для данного заболевания, но наряду с изменением сосудистой проницаемости обнаруживаются даже раньше клинических проявлений болезни. Кроме того, было показано, что у животных с ЭАП проявлялся целый ряд признаков (повышение уровня ХС, ТГ, суммарной фракции  $\beta$ - и пре- $\beta$ -ЛП, увеличение проницаемости стенки аорты и ее ли-

идная инфильтрация), характерных для начальной стадии экспериментального холестерина атеросклероза, хотя не было абсолютно полной аналогии между этими заболеваниями. Так, если при последнем гиперлипидемия обусловлена преимущественно увеличением содержания в крови ХС и в значительно меньшей степени повышением концентрации ТГ, то при ЭАП изменения указанных липидов протекали равномерно, о чем свидетельствует сохранение более или менее постоянной величины отношения ХС/ТГ в сыворотке крови больных животных по сравнению с таковой у контрольных.

Таким образом, участие иммунологических механизмов в развитии атеросклероза у животных и человека [4, 9], с одной стороны, а также появление гиперлипидемии при развитии иммунных заболеваний — с другой, свидетельствуют о наличии определенной взаимосвязи между этими процессами. Однако если первая проблема изучается весьма успешно, то в отношении изучения иммунной гиперлипидемии этого сказать пока нельзя. Раскрытие некоторых биохимических механизмов, лежащих в основе нарушения липидного обмена при таких заболеваниях, как ЭАП и ЭАЭ, явится предметом наших дальнейших исследований, что позволит выяснить также особенности нарушения липидного обмена при демиелинизирующих заболеваниях и значение установленных изменений в патогенезе этих болезней.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Baily Y. M. — Rev. Atheroscler., 1967, n. 9, Suppl. 1, p. 204.
2. Minick C. R., Murphy G. E., Campbell W. G. — J. exp. Med., 1966, v. 124, p. 635.
3. Iris L., Groult N., Lenegre J. — Rev. Atheroscler., 1967, v. 9, Suppl. 1, p. 242.
4. Klimov A. N., Zubzhitsky Yu. N., Nagornev V. A. — Atheroscler. Rev., 1979, v. 4, p. 119.
5. Antonucci M. — C. R. Acad. Sci. (Paris), 1969, v. 268, p. 183.
6. Henson P. M., Cochrane C. G. — J. exp. Med., 1971, v. 133, p. 554—571.
7. Cochrane C. G. — Ibid., 1963, v. 118, p. 490.
8. Cochrane C. G. — Progr. Allergy, 1963, v. 11, p. 1.
9. Gero S., Szekely J., Bihari-Varga M. et al. — In: Atherosclerosis III. Ed. G. Schettler, Z. Weizel. Berlin, 1974, p. 591.
10. Dunkley P. R., Carnege P. R. — In: Research Methods in Neurochemistry. Ed. N. Marks, R. Rodnighy. New York, 1974, v. 2, p. 219.
11. Плесков В. М., Коновалов Г. В. — Вопр. мед. химии, 1975, № 4, с. 371.
12. Жаботинский Ю. М., Иоффе В. И. — Экспериментальные аллергические демиелинизирующие заболевания нервной системы. Л., 1975.
13. Mueller P., Kies M. W., Alvord E. C. et al. — Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1964, v. 115, p. 1095.
14. Carlson L. A. — J. atheroscler. Res., 1963, v. 3, p. 334.
15. Климов А. Н., Ловягина Т. П., Баньковская Э. Б. — Лабор. дело, 1966, № 5, с. 276.
16. Маграчева Е. Я. — Вопр. мед. химии, 1973, № 6, с. 652.
17. Zhabotinski Y. M., Konovalov N. V., Fedorova L. A. et al. — Neuropat. pol., 1978, v. 16, p. 219.
18. Нагорнев В. А., Зубжицкий Ю. Н. — Арх. пат., 1972, № 4, с. 41.
19. Коновалов Г. В., Тульчинский Л. А., Зубжицкий Ю. Н. — Там же, 1976, № 11, с. 22.
20. Коновалов Г. В. — В кн.: Жаботинский Ю. М., Иоффе В. И. Экспериментальные аллергические демиелинизирующие заболевания нервной системы. Л., 1975, с. 116.
21. Roberts J. R. — Circulation, 1960, v. 22, p. 657.

Поступила 19/II 1980 г.

#### LIPIDS AND LIPOPROTEINS FROM BLOOD OF RABBITS WITH EXPERIMENTAL ALLERGIC POLYNEURITIS

V. M. Pleskov, N. G. Nikul'cheva, G. V. Konovalov

N. N. Anichkov Department of Lipid Biochemistry and Atherosclerosis, Laboratory of Normal and Pathological Morphology of Nervous System, Department of Pathoanatomy, Institute of Experimental Medicine, Academy of Medical Sciences of the USSR, Leningrad

Experiments were carried out using 69 rabbit males with a body mass of 2.5-3.0 kg. Experimental allergic polyneuritis developed in the animals after administration into foot pads of the base neuritogenic proteins together with complete Freund's adjuvant. Content

of cholesterol (CS) and triglycerides (TG) was increased more than 2-fold, concentration of the total fraction of  $\beta$ - and pre- $\beta$ -lipoproteins was elevated 3-fold in blood plasma of rabbits within 1 hr after the treatment. Within 12 days after administration of the mixture another increase in the fractions studied was observed, reaching the maximal value within the 30 days of the experiment: content of cholesterol and triglycerides was increased 3-fold, total fraction  $\beta$ - and pre- $\beta$ -lipoproteins — more than 4-fold. The ratio CS/TG was similar in blood sera of both normal and injured rabbits and was approximately equal to 0.4. The increase in permeability of aortal wall and its lipid infiltration were found at the same period.

УДК 611.342-018.1:577.161.2

*И. А. Морозов, В. Б. Спиричев, Р. Р. Фернандес, Н. В. Блажевич*

## **УЛЬТРАСТРУКТУРА ЭНТЕРОЦИТОВ ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ КРЫС ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ ВИТАМИНОМ D**

Институт питания АМН СССР, Москва

Нарушение всасывания кальция в кишечнике является основным проявлением недостаточности витамина D, лежащим в основе гипокальциемии и нарушения минерализации костной ткани при рахите. Несмотря на это, конкретные механизмы указанного нарушения, как и многие аспекты витамин-D-зависимого механизма всасывания кальция, остаются неясны [1—3]. Существенная информация по этим вопросам могла бы быть получена в результате электронно-микроскопических исследований ультраструктуры всасывающих эпителиоцитов кишечника при различной обеспеченности витамином D. Мы не обнаружили в доступной литературе сведений по указанному вопросу, и настоящая работа предпринята для восполнения этого пробела.

### **М е т о д и к а**

В опытах использовали молодых растущих крыс линии Вистар, находившихся в течение 4 нед на рационе, лишенном витамина D, или получавших в дополнение к этому рациону физиологические дозы этого витамина — по 10 МЕ витамина D<sub>2</sub> в день. О недостаточности витамина D судили по концентрации кальция в сыворотке крови, которую определяли методом комплексонометрического титрования [4], а также по концентрации в сыворотке крови основного циркулирующего метаболита витамина D — 25-оксивитамина D, которую определяли методом радиоконкурентного связывания [5], используя препарат 25-[26(27)-метил-<sup>3</sup>H]-оксихолекальциферола в дозе 12 Ки/ммоль, The Radiochemical Centre, Amersham, Великобритания. В качестве нерадиоактивного стандарта использовали препарат кристаллического оксихолекальциферола, любезно предоставленный нам доктором М. Перриану (Institut ROUSSEL UCLAF, Paris, France), которой выражаем искреннюю благодарность. Способность тонкой кишки крыс к всасыванию <sup>45</sup>Ca *in situ* исследовали по убыли <sup>45</sup>Ca из просвета кишки и скорости его поступления в кровотоки. С этой целью животным, лишенным за 1 сут пищи, под эфирным наркозом в изолированный лигатурами 5-сантиметровый проксимальный участок тонкой кишки вводили 0,5 мл среды, содержащей 50 мМ NaCl, 10 мМ фруктозу, 145 мМ маннит и 2,5 мМ <sup>45</sup>Ca Cl<sub>2</sub> на 30 мМ трис-HCl-буфере pH 7,4. Через 15 мин животных декапитуировали, собирали кровь. Содержимое изолированного лигатурами отрезка кишки переносили в пробирку, промывая кишку 0,9% NaCl, и доводили объем водой до 10 мл. Одновременно доводили до 10 мл 0,5 мл исходной среды, вносимой в просвет кишечника. Убыль <sup>45</sup>Ca из просвета рассчитывали по разнице радиоактивности исходной среды и содержимого изолированного участка кишки после 15 мин всасывания. Радиоактивность среды и сыворотки крови определяли на сцинтилляционном счетчике «Mark 2» («Nuclear Chicago»), используя жидкость Брея. Способность вывернутого отрезка тонкой кишки к активному транспорту <sup>45</sup>Ca против концентрационного градиента исследовали *in vitro* описанным методом [6, 7] и выражали отношением  $S_{вн} : S_{ст}$ , характеризующим градиент, создаваемый стенкой кишки, между концентрацией <sup>45</sup>Ca внутри вывернутого отрезка кишки ( $S_{вн}$ ) и в паружной среде, омывающей слизистую оболочку ( $S_{ст}$ ).

Микроворсинки энтероцитов тонкой кишки крыс выделяли методом [8] с незначительной модификацией (замена трис-буфера, мешающего последующему определению сахаразы, на NaOH-малатный буфер). Активность сахаразы как специфического маркерного фермента микроворсинок определяли глюкозооксидазным методом [9, 10]. Липиды микроворсинок извлекали смесью хлороформ — метанол по [11]. Содержимое липидного фосфора определяли по [10], содержание белка — по Лоури [12]. Для проведения электронно-микроскопических исследований кусочки ткани двенадца-

типерстной кишки фиксировали в 4% растворе параформальдегида на буфере Хэнкса (рН 7,3) при 4 °С в течение 3—12 ч. После отмывания в буфере в течение ночи вырезали образцы ткани величиной 1×3—4 мм. Дофиксацию проводили в 1% растворе четырехоксида осмия в течение 3 ч. Ткань обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и ацетоне, пропитывали в смеси эпоксидных смол с ацетоном (1 : 1) и заключали в смесь эпоксидных смол эпон — аралдит методом плоской заливки. После полимеризации готовили ультратонкие срезы на ультрамикроскопе LKB—4800, контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали в электронном микроскопе JEM—7A/120.

## Результаты и обсуждение

Пребывание крыс в течение 4 нед на рационе, лишенном витамина D, приводило к резкому снижению концентрации 25-оксивитамина и кальция в сыворотке крови и к нарушению всасывания этого иона в кишечнике, что выражалось как в почти полной утрате способности кишечника к активному транспорту  $^{45}\text{Ca}$  против концентрационного градиента *in vitro*, так и в уменьшении всасывания  $^{45}\text{Ca}$  в условиях *in situ* (табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Влияние недостаточности витамина D на концентрацию кальция в крови и его всасывание в тонкой кишке у крыс

Показатель	Контроль	Дефицит витамина D	P
25-Оксивитамин D в сыворотке, нг/мл	18,8±3,2 (6)	4,8±1,1 (4)	<0,01
Кальций крови, мг на 100 мл	8,8±0,2 (5)	5,1±0,3 (5)	<0,001
Активный транспорт $^{45}\text{Ca}$ ( $\text{Ca}_{\text{вн}}:\text{Ca}_{\text{и}}$ )	2,83±0,53 (6)	1,30±0,05 (6)	<0,05
Всасывание $^{45}\text{Ca}$ :			
убыль $^{45}\text{Ca}$ из просвета кишки, нмоль за 15 мин	874±24 (6)	760±28 (6)	<0,05
выход $^{45}\text{Ca}$ в кровоток, имп/мин на 0,1 мл сыворотки	3030±110 (6)	2440±140 (6)	<0,01

Пр и м е ч а н и е. В скобках — число животных.

Недостаточность витамина D не влияла на удельную активность сахаразы, являющейся специфическим маркерным ферментом микроворсинок, ни в цельном гомогенате кишечного эпителия, ни во фракции выделенных из него микроворсинок. Равным образом недостаток витамина D не изменял общего содержания этого фермента в гомогенате и микроворсинках при расчете на 5-сантиметровый отрезок тонкой кишки, взятый у одного животного (табл. 2). В то же время микроворсинки, выделенные от животных, лишенных витамина D, отличались более низким содержанием липидного фосфора по сравнению с микроворсинками крыс, обеспеченных этим витамином (см. табл. 2), что согласуется с аналогичными опытами на цыплятах [13, 14].

Электронно-микроскопические исследования выявили серьезные изменения ультраструктуры энтероцитов крыс, лишенных витамина D, в первую очередь затрагивающие микроворсинки. На рис. 1 представлен поперечный срез через слой микроворсинок энтероцита контрольных и D-авитаминозных животных. Видно, что даже при сохранении правильного строения и нормального расположения микроворсинок энтероцита крыс, лишенных витамина D, слой гликокаликса на мембранах резко уменьшен, а иногда и вовсе отсутствует. Одновременно видно более резкое расположение микроворсинок, что свидетельствует об уменьшении их количества на единицу площади (рис. 1, а, б, см. на вклейке). В клетках, где имеются подобные изменения, наблюдается локальное набухание части митохондрий (рис. 2, а, см. на вклейке).

Следующей стадией изменений можно считать распад микроворсинок на отдельные везикулярные фрагменты (рис. 2, б). В подобных клетках про-

исходит резкое набухание митохондрий с просветлением матрикса и редукцией крист и расширение цистерн шероховатой эндоплазматической сети.

В дальнейшем фрагменты микроворсинок отходят от клетки и апикальная поверхность энтероцитов полностью оголяется (рис. 2, в). У некоторых энтероцитов оголение апикальной поверхности происходит без значительных изменений внутриклеточных органелл. В таких клетках можно отметить лишь фрагментацию и расширение цистерн эргастоплазмы. Иногда наблюдается клазматоз части цитоплазмы вместе с отграничивающей мембраной и выход подобных фрагментов клетки в просвет кишки (рис. 3, см. на вклейке). Этот процесс можно сравнить с микроапокриновым типом секреции, не свойственным клеткам кишечного эпителия.

Т а б л и ц а 2

Активность сахаразы и биохимическая характеристика микроворсинок кишечного эпителия крыс при различной обеспеченности витамином D (данные 3 опытов)

Показатель	Контроль	Дефицит витамина D
Удельная активность сахаразы, мкмоль глюкозы за 1 мин на 1 мг белка:		
в гомогенате эпителия	0,142±0,043	0,138±0,036
во фракции микроворсинок	1,84±0,40	2,05±0,53
Общая активность сахаразы в 5-сантиметровом отрезке тонкой кишки, мкмоль/мин:		
в гомогенате слизистой оболочки	3,80±0,9	3,50±1,12
во фракции микроворсинок	1,13±0,25	1,22±0,49
Содержание липидного фосфора в микроворсинках, мкг на 1 мг белка	3,60±1,63	2,63±1,79*

\* Достоверность различий ( $P < 0,05$ ) рассчитана разностным методом путем сравнения парных величин, полученных в каждом из 3 опытов.

Описанные изменения затрагивают около 10—15% клеток слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки. Клетки, имеющие описанные изменения, располагаются произвольно по всей длине ворсинки от крипт до вершины. Это свидетельствует о том, что обнаруживаемые нарушения ультраструктуры обусловлены внутренними причинами (отсутствием витамина D), а не являются следствием естественной дегенерации в процессе физиологического обновления эпителия. В последнем случае изменения ультраструктуры наблюдаются в энтероцитах, расположенных на вершинах ворсин слизистой оболочки кишечника.

Представленные электронно-микроскопические данные являются, насколько нам известно, первой демонстрацией серьезных нарушений ультраструктуры микроворсинок энтероцита при недостаточности витамина D.

Акцептирование ионов  $Ca^{2+}$  мембранами микроворсинок является первым этапом в механизме всасывания кальция [2, 15, 16]. Существенная роль в этом акцептировании может принадлежать локализованному в гликокаликсе кальцийсвязывающему белку и мукополисахаридам гликокаликса [2, 3]. В связи с этим обнаруженные нами изменения ультраструктуры микроворсинок и исчезновение гликокаликса могут иметь непосредственное отношение к механизму развивающихся при дефиците витамина D нарушений всасывания кальция в кишечнике. Полученные электронно-микроскопические данные об исчезновении гликокаликса с поверхности микроворсинок при D-авитаминозе согласуются со сведениями о нарушении в этих условиях синтеза кальцийсвязывающего белка, располагающегося на микроворсинках [2, 3]. Выявленные изменения ультраструктуры микроворсинок, свидетельствующие об их дестабилизации, могут быть обусловлены изменениями химического состава мембран микроворсинок, в частности отмеченным нами и другими авторами [13—15] уменьшением содержания в них фосфолипидов. Обнаруженное в наших исследованиях набухание митохондрий энтероцитов крыс, лишенных витамина D, согласуется с получен-

ными ранее данными о существенном нарушении биохимической активности этих органелл в указанных условиях [17]. В связи с важной ролью митохондрий в энергообеспечении процессов всасывания этой патологии также может принадлежать важная роль в общем механизме нарушений всасывания кальция при недостаточности витамина D. Данные о нарушении структуры шероховатого эндоплазматического ретикулула, ответственного за биосинтез белка, по-видимому, согласуются с результатами биохимических исследований, выявивших значительное угнетение синтеза РНК и белка в слизистой оболочке тонкой кишки крыс, лишенных витамина D [17, 18].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Спиричев В. Б. — Казан. мед. ж., 1976, № 5, с. 406—419.
2. Бауман В. К. — В кн.: Физиология всасывания. Л., 1977, с. 152—222.
3. Wasserman R. H., Taylor A. N. — In: Handbook of Physiology Sec. 7. Endocrinology. Washington, 1976, v. 7, p. 137—155.
4. Вичев Е. П., Каракашев А. В. — Вопр. мед. химии, 1960, № 4, с. 435—438.
5. De Nayer Ph., Thalasso M., Beckers C. — In: Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine. Vienna, 1978, p. 199.
6. Спиричев В. Б., Петрова Э. А. — В кн.: Экспериментальная витаминология. Минск, 1979, с. 80—130.
7. Martin D. L., DeLuca H. F. — Am. J. Physiol., 1969, v. 216, p. 1351.
8. Kessler M., Acuto O., Storelli C. et al. — Biochim. biophys. Acta, 1978, v. 506, p. 136—154.
9. Лукомская И. С., Городецкий В. К. — Биохимия, 1961, т. 26, с. 477—479.
10. Kelly J. J., Alpers D. H. — Biochim. biophys. Acta, 1973, v. 315, p. 113—120.
11. Allen R. J. L. — Biochem. J., 1940, v. 34, p. 858—865.
12. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al. — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265—275.
13. Goodman D. B. P., Haussler M. R., Rasmussen H. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1972, v. 46, p. 80—86.
14. Мах Е. Е., Goodman D. B. P., Rasmussen H. — Biochim. biophys. Acta, 1978, v. 511, p. 224—239.
15. Фарнандес Р. Р. Изучение действия  $\alpha$ -оксихолекальциферола на обмен кальция и фосфора при различных условиях питания. Автореф. дис. канд. М., 1979.
16. Wong R. G., Norman A. W. — J. biol. Chem., 1975, v. 250, p. 2411—2419.
17. Андрианов Н. В., Шунне Н. Г., Блажевич Н. В. и др. — Вопр. мед. химии, 1977, № 4, с. 537—545.
18. Wasserman R. H., Corradino R. A. — Vitam. a. Horm., 1973, v. 31, p. 43—103.

Поступила 20/III 1980 г.

#### EFFECT OF VITAMIN D ON ULTRASTRUCTURE OF RAT DUODENAL ENTEROCYTES

I. A. Morosov, V. B. Spirichev, R. R. Fernandes,  
N. V. Blazheevich

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

Deficiency of vitamin D, responsible for impaired absorption of calcium in rat small intestine, did not affect the activity of saccharase (marker enzyme of microvilli) in homogenate of intestinal epithelium and in an isolated fraction of microvilli. Content of lipid phosphorus per mg of protein in the microvilli of rats, deficient in vitamin D, was decreased by 30% as compared with the control animals. Deficiency of vitamin D was accompanied by alterations in ultrastructure of 10-15% of enterocytes from small intestine. These alterations consisted in more widely spaced arrangement of microvilli, their fragmentation into separate vesicles with liberation of apical cellular surface, swelling of mitochondria with reduction of their crysts, enlargement of rough endoplasmic reticulum cisterns. The layer of glycocalix on the microvilli was decreased or completely disappeared in most enterocytes. The impairments found in submicroscopic organization of enterocytes might constitute the morphologic basis for the disturbed calcium absorption in the intestine under conditions of vitamin D deficiency.

Ф. З. Меерсон, В. И. Павлова, Э. Н. Коробейникова

## ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ СТРЕССОРНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ОРГАНИЗМА АНТИОКСИДАНТАМИ И $\beta$ -БЛОКАТОРОМ ИНДЕРАЛОМ

Институт общей патологии и патологической физиологии АМН СССР, Челябинский педагогический институт, Челябинский медицинский институт

Вскоре после создания теории цепных свободнорадикальных реакций перекисного окисления [1] было выдвинуто положение о целесообразности использования ингибиторов цепных свободнорадикальных реакций для лечения болезней, развитие которых связано с активизацией перекисного окисления липидов — ПОЛ [2]. Недавно было показано, что решающим звеном патогенетической цепи стрессорного повреждения внутренних органов являются активизация ПОЛ и накопление гидроперекисей, которые повреждают клеточные мембраны [3, 4]. В соответствии с этим стрессорное повреждение сердца удалось полностью предотвратить предварительным введением ингибитора ПОЛ — жирорастворимого антиоксиданта дибунола (ионола) — 2,6-ди(трет-бутил)метилфенола [5]. Известно, что при стрессе наряду с повреждением сердца закономерно возникают язвенные поражения слизистой оболочки желудка и выраженная ферментемия [6], являющаяся результатом генерализованного повреждения клеточных мембран.

Цель настоящей работы — выяснить возможность предупреждения этих стрессорных повреждений с помощью дибунола, водорастворимого антиоксиданта эсдема-6/2<sup>1</sup> и других антиоксидантов. При решении этой задачи стрессорные повреждения оценивали по степени ферментемии и выраженности язвенных поражений слизистой оболочки желудка, а эффект антиоксидантов сопоставляли с эффектом  $\beta$ -блокатора индерала, который, как известно, блокирует развивающееся при стрессе повреждающее действие катехоламинов на органы и ткани.

### М е т о д и к а

Эмоционально-болевого стресс (ЭБС) воспроизводили в форме так называемого невроза тревоги по методике [7]. Крыс, 2 сут не получавших пищи, помещали в специальную камеру, через пол которой подавался ток (4 мА). Крысы могли избежать электроболевого раздражения, только уйдя на платформу, расположенную в центре камеры. После выработки у крыс условного оборонительного рефлекса избегания (животные постоянно находились на платформе) через пол платформы в течение 6 ч наносили короткие сильные удары (6 мА в течение 2 с) через произвольные промежутки времени. Основными чертами этой модели ЭБС являются, во-первых, конфликт между выработанным условным рефлексом избегания тока путем ухода на платформу и безусловным болевым раздражением на этой платформе, во-вторых, напряженное ожидание электроболевого воздействия, обусловленное тем, что удары на платформе наносятся через случайные промежутки времени.

Эксперименты проводили на 140 крысах-самцах линии Вистар массой 180—200 г. Было проведено 6 серий опытов. Животным ежедневно в течение 5 сут вводили: в I серии (контроль 2) по 0,5 мл физиологического раствора внутривнутрибрюшинно, во II серии по 0,1 мг/кг индерала внутривнутрибрюшинно, в III серии по 80 мг/кг дибунола внутривнутрибрюшинно, в IV серии по 100 мг/кг эсдема-6/2 внутривнутрибрюшинно, в V серии по 50 мг/кг  $\alpha$ -токоферол-ацетата внутримышечно, в VI серии по 30 мг/кг селенита натрия подкожно. На 5-е сутки сразу после заключительного введения препаратов всех животных подвергали стрессу. Степень язвенного поражения слизистой оболочки желудка (число язв, размер каждой из них) определяли через 2 ч после завершения стрессорного воздействия. Контролем 1 служили животные без ЭБС, которым вводили физиологический раствор.

Для определения активности ферментов в плазме крови животных декапитировали в разные сроки (от 2 до 240 ч) после стрессорного воздействия. В цитоплазме и митохондриях определяли активность аспартат-аминотрансферазы (АСТ) и аланин-аминотрансферазы (АЛТ) по унифицированному методу с использованием набора реактивов фирмы «Лаксма», креатинфосфокиназы (КФК) методом Эннора и Розенберга в

<sup>1</sup> Авторы выражают признательность акад. Н. М. Эмануэлю и доктору хим. наук Л. Д. Смирнову за любезное предоставление ими антиоксиданта эсдема-6/2.

модификации Гринио и Консигорум [8], малатдегидрогеназы (МДГ) методом [9], лактатдегидрогеназы (ЛДГ) методом [10], а также 3 лизосомальных фермента — катепсина D по расщеплению гемоглобина [13], кислой фосфатазы методом [11] и лейцил-аминопептидазы по расщеплению L-лейцинамидогидрохлорида по методу Спэкмана [12]. Изоферменты ЛДГ выявляли тетразолиевым методом после электрофореза в ПАА-геле в аппарате фирмы «Реанал». Белок определяли по Лоури [14].

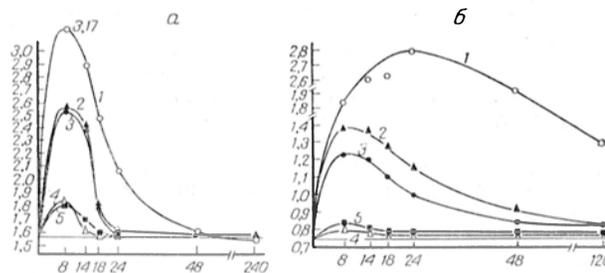
## Результаты и обсуждение

Из табл. 1 следует, что у животных без ЭБС (контроль I) язвенных поражений желудка обычно не наблюдалось, а у животных, перенесших ЭБС, более чем в 90 % случаев возникали тяжелые язвенные поражения слизистой оболочки желудка при средней длине язв на один желудок 12,7 мм. У животных, получавших перед ЭБС индерал, язвы возникали менее чем в половине случаев и средняя длина их была в 4 раза меньше; у животных, получавших дибунол, этот предупреждающий эффект был выражен в еще большей степени: язвы возникли у 1/3 животных и средняя длина их на один желудок составляла около 2,4 мм, т. е. была в 5 раз меньше, чем у животных без ЭБС. Антиоксидант ОП-6, относящийся к классу оксипиридинов, уменьшал среднюю длину язв почти в 10 раз, т. е. по этому параметру оказался эффективнее дибунола. Два других антиоксиданта —  $\alpha$ -токоферол и селенит натрия — также уменьшали величину стрессорных язвенных повреждений. Однако про-

Таблица 1  
Влияние предварительного введения антиоксидантов и индерала на образование язвенных поражений желудка крыс, подвергнутых ЭБС (n=32)

Серия опытов	Число животных, у которых возникли язвы желудка	Средняя длина язвенных поражений на один желудок, мм
Контроль I	0	0
I	30	12,7
II	14	2,9
III	12	2,47
IV	12	1,1
V	18	3,7
VI	24	6,7

филактический эффект их был слабее: язвенные поражения развивались у 2/3 животных, получавших эти препараты, и длина язв составляла 3—7 мм, т. е. была в 2—3 раза меньше, чем у животных, получавших



Изменение активности АЛТ (а) и катепсина D (б) после ЭБС.

По оси абсцисс — время от начала ЭБС (в ч); по оси ординат — активность ферментов: а — в мкмоль/мл·ч; б — в мкг тирозина на 1 мг белка за 1 ч. 1 — физиологический раствор + ЭБС; 2 — селенит натрия + ЭБС; 3 —  $\alpha$ -токоферол + ЭБС; 4 — дибунол + ЭБС; 5 — индерал + ЭБС.

физиологический раствор, но в 2—6 раза больше, чем у животных, получавших дибунол или эсдем-6/2.

Влияние индерала и использованных антиоксидантов на возникавшую после стресса ферментемию было в принципе таким же значительным, как и влияние на язвенные поражения слизистой оболочки желудка. Постстрессорная ферментемия выражалась в повышении в 2—3 раза активности всех исследуемых ферментов в плазме крови, ее динамика для цитоплазматических ферментов и ферментов, локализованных в лизосомах, была различной. Активность изученных цитоплазматических ферментов — АСТ, АЛТ, КФК, МДГ и ЛДГ — оказывалась максимальной уже через 8 ч после начала стрессорного воздействия и постепенно возвращалась к исходному уровню к 48 ч. Активность изученных лизосомальных ферментов, напротив, достигала максимума лишь через 1 сут после перенесенной стрессорной

Таблица 2

Влияние предварительного введения антиоксидантов и индерала на активность АСТ (в мкмоль/мл·ч) в плазме крови после ЭБС

Серия опытов	Время от начала ЭБС, ч	Физиологический раствор	<i>P</i>	Индерал	Дибунол	Антиоксидант эсдем-6/2	Токоферол	<i>P</i>	Селенит натрия	<i>P</i>
Контроль I (13)	—	2,39±0,29		2,35±0,3	2,29±0,47	2,40±0,1	2,36±0,4		2,40±0,4	
I (10)	8	6,1±0,1 (255%)	<0,001	3,17±0,12	2,9±0,36	2,60±0,3	4,13±0,46	<0,01	3,73±0,11	<0,05
II (10)	14	5,1±0,2 (213%)		3,00±0,6	3,06±0,47	—	3,30±0,5		3,50±0,4	
III (10)	18	4,36±0,1 (182%)	<0,001	2,60±0,5	2,65±0,5	2,48±0,2	2,55±0,4		3,0±0,5	
IV (10)	24	4,00±0,2 (167%)	<0,001	2,45±0,6	2,49±0,14	2,46±0,3	2,38±0,5		2,56±0,3	
V (8)	48	3,9±0,2 (163%)	<0,01	2,36±0,3	2,40±0,3	—	2,36±0,6		2,40±0,3	
VI (8)	120	2,42±0,35		2,36±0,3	2,40±0,6	—	2,39±0,5		2,39±0,4	

Примечание. Здесь и в табл. 3 в скобках — число животных, *P* дано в сравнении с контролем I.

Таблица 3

Влияние предварительного введения антиоксидантов и индерала на активность кислого катепсина в плазме крови (в мкг тирозина на 1 мг белка за 1 ч) после ЭБС

Серия опытов	Время от начала ЭБС, ч	Физиологический раствор	<i>P</i>	Индерал	Дибунол	Антиоксидант эсдем-6/2	α-Токоферол	<i>P</i>	Селенит натрия	<i>P</i>
Контроль I (13)	—	0,74±0,05		0,755±0,03	0,755±0,03	0,75±0,03	0,74±0,03		0,74±0,03	
I (10)	8	1,82±0,06 (245%)	<0,01	0,80±0,06	0,80±0,01	0,81±0,01	1,22±0,12	<0,05	1,38±0,1	<0,05
II (10)	14	2,50±0,11	<0,001	0,80±0,03	0,78±0,02	—	1,20±0,1	<0,05	1,36±0,13	<0,05
III (10)	18	2,61±0,2 (352%)	<0,001	0,78±0,02	0,76±0,04	0,77±0,02	1,10±0,14	<0,05	1,28±0,1	<0,05
IV (10)	24	2,78±0,3 (375%)	<0,001	0,76±0,04	0,77±0,01	0,75±0,04	1,00±0,13		1,15±0,3	<0,05
V (10)	48	1,88±0,03 (254%)	<0,001	0,76±0,01	0,76±0,02	—	0,82±0,03		0,9±0,02	
VI (10)	120	1,28±0,09	<0,05	0,75±0,02	0,75±0,04	—	0,8±0,02		0,83±0,02	

Влияние предварительного введения антиоксидантов и индерала на активность ЛДГ и ее изоэнзимные спектры в плазме крови крыс через 2 ч после окончания ЭБС

Серия опытов	Общая активность ЛДГ, мкм НАД·Н <sub>2</sub> /мл	P	Изоферменты ЛДГ, %						P
			ЛДГ <sub>1</sub>	P	ЛДГ <sub>2</sub>	ЛДГ <sub>3</sub>	ЛДГ <sub>4</sub>	ЛДГ <sub>5</sub>	
Контроль I (8)	0,67 ± 0,02	<0,01	9,34 ± 1,2	<0,01	29,8 ± 2,4	22,5 ± 2,2	19,8 ± 1,4	18,5 ± 1,3	<0,05
I (8)	1,9 ± 0,4		27 ± 1,5		17 ± 1,9	19 ± 1,9	11 ± 1,1	16 ± 2,1	
II (8)	0,75 ± 0,05 (283%)		9,6 ± 1,4		28 ± 2,1	19,8 ± 1,7	24,6 ± 2,4	18,0 ± 1,8	
III (18)	0,77 ± 0,06		10,0 ± 1,3		26,59 ± 1,4	22,2 ± 2,0	21,6 ± 2,1	19,6 ± 1,7	
IV (8)	0,42 ± 0,01		9,91 ± 2,1		25,7 ± 1,7	21,6 ± 0,9	22,4 ± 2,1	18,7 ± 1,9	
V (8)	0,93 ± 0,7		12,0 ± 1,8		26,6 ± 2,2	22,0 ± 1,9	19,79 ± 2,3	19,6 ± 2,1	
VI (8)	0,95 ± 0,6	15,1 ± 1,6	22,9 ± 2,1	26,2 ± 2,3	17,4 ± 2,6	18,4 ± 2,1			

ситуации и через 5 сут оставалась значительно повышенной.

Представленные в табл. 2 и 3 данные позволяют сопоставить активность цитоплазматического фермента АСТ и лизосомального фермента катепсина D в плазме крови после ЭБС.

Из табл. 2 видно, что у контрольных животных I серии активность АСТ уже через 8 ч от начала стрессорного воздействия оказалась повышенной в 2,5 раза и постепенно приближалась к исходному уровню на протяжении 5 сут. У животных, получавших индерал, активность АСТ в плазме крови возросла на  $\frac{1}{3}$ , причем этот сдвиг был на границе достоверности и полностью отсутствовал через 18 ч от начала ЭБС. У животных, получавших дибунол и эсдем-6/2, постстрессорное повышение активности фермента было еще меньшим и недостоверным.

Профилактическое действие  $\alpha$ -токоферола и селенита натрия оказалось значительно меньшим. Несмотря на их введение, активность ферментов в плазме крови достоверно возросла соответственно на 72 и 56 % и вернулась к контрольному уровню лишь через 1 сут.

Из табл. 3 следует, что активность катепсина D в плазме крови достигла максимума, т. е. возросла в 3,7 раза, лишь через 1 сут после ЭБС и спустя 2 и 5 сут оставалась повышенной соответственно на 150 и 70 %. Предварительное введение индерала, дибунола и эсдема-6/2 полностью снимало этот эффект. Защитный эффект  $\alpha$ -токоферола и селенита натрия был значительно меньше: активность фермента возросла на 90 % и оставалась достоверно повышенной в течение 2 сут. На рисунке показаны обе эти закономерности: отставленное во времени и более длительное повышение активности лизосомальных ферментов по сравнению с цитоплазматическими и больший защитный эффект дибунола по сравнению с другими антиоксидантами.

В основе ферментемии при стрессорных, ишемических, токсических воздействиях, как известно, лежат повреждение плазматических и других клеточных мембран и выход ферментов в кровь. В связи с этим представляют интерес данные о влиянии ЭБС на активность и изоэнзимный

спектр ЛДГ, в дальнейшем они могут быть использованы при обсуждении вопроса о локализации стрессорных повреждений клеточных мембран.

Из табл. 4 следует, что через 8 ч от начала ЭБС одновременно с трехкратным повышением общей активности ЛДГ наблюдается значительный сдвиг ее изоэнзимного спектра — увеличение в 3 раза процентного содержания ЛДГ<sub>1</sub>, который преобладает в сердце и других органах с аэробным обменом, и меньше, но достоверное увеличение содержания ЛДГ<sub>5</sub>, что характерно для скелетной мускулатуры и печени. Эти данные соответствуют тому, что наибольшая активизация ПОЛ и наибольшие альтернативные изменения наблюдаются при ЭБС в сердце и скелетных мышцах [15]. Существенно, что стрессорное повышение активности ЛДГ и изменения ее изоэнзимного спектра полностью устраняются индералом, дибунолом и эсдемом-6/2 и не полностью — другими антиоксидантами.

Эти факты, а также аналогичные данные, полученные при изучении влияния ЭБС, индерала и антиоксидантов на активность в плазме крови других ферментов, позволяют высказать следующие положения.

Во-первых, тяжелый стресс вызывает ферментемию, которая для цитоплазматических ферментов быстро достигает максимума и сравнительно быстро исчезает, а для лизосомальных ферментов достигает максимума значительно позже и долго сохраняется. Возможно, этот последний сдвиг свидетельствует о длительной лабилизации лизосом при стрессе и такая значительная «утечка» протеолитических лизосомальных ферментов играет роль в развитии стрессорных повреждений.

Во-вторых,  $\beta$ -блокатор периферического действия индерал в значительной мере, а нередко полностью предотвращает стрессорные язвенные повреждения слизистой оболочки желудка и стрессорную ферментемию. Это согласуется с другими данными о решающей роли избытка катехоламинов в развитии стрессорных повреждений [5].

В-третьих, антиоксиданты дибунол и эсдем-6/2 предотвращают стрессорные повреждения желудка, стрессорную ферментемию, а следовательно, и повреждение клеточных мембран при стрессе более радикально, чем индерал. Другие исследованные антиоксиданты —  $\alpha$ -токоферол-ацетат и селенит натрия — вызывают значительно меньший защитный эффект.

Эти данные позволяют утверждать, что рациональная комбинация  $\beta$ -блокаторов с антиоксидантами создает перспективу эффективной химической профилактики повреждений, возникающих при тяжелом эмоциональном стрессе.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Семенов Н. Н. Цепные реакции. Л., 1934.
2. Эмануэль Н. М., Липчина Л. П. — Докл. АН СССР, 1958, т. 121, с. 141.
3. Меерсон Ф. З., Гибер Л. М., Коган А. Х. и др. — Там же, 1977, т. 237, с. 977.
4. Меерсон Ф. З., Гибер Л. М., Марковская Г. И., и др. — Там же, с. 1230.
5. Меерсон Ф. З., Каган В. Е., Голубева Л. Ю. и др. — Кардиология, 1979, № 8, с. 108.
6. Меерсон Ф. З., Павлова В. И., Якушев В. С. и др. — Там же, 1978, № 3, с. 52.
7. Desiderato O., Mac Kinnon J. R., Hisson H. — J. comp. physiol. Psychol., 1974, v. 87, p. 208.
8. Гринио Л. П., Консисторум А. В. — Вopr. мед. химии, 1964, № 1, с. 70.
9. Amellung D. — Klin. Wschr., 1958, Bd 36, S. 963.
10. Hill B., Levi C. — Cancer Res., 1954, v. 14, p. 513.
11. Bessey O., Lowry O., Brock M. (1946) Цит. Methoden der enzymatischen Analyse Hrsg. H. Bergmeyer. Weinheim, 1965.
12. Wprackman L. (1955) — Там же.
13. Anson M. L. — J. gen. Physiol., 1939, v. 22, p. 79.
14. Lowry O. H. et al. — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265.
15. Меерсон Ф. З., Каган В. Е., Прилипко Л. Л. и др. — Бюлл. exper. биол., 1979, № 10, с. 404.

Поступила 20/III 1980 г.

## PREVENTION BY ANTIOXIDANTS AND A $\beta$ -ADRENOBLOCKING AGENT INDEROL OF THE IMPAIRMENTS CAUSED BY STRESS

*F. Z. Meerson, V. I. Pavlova, E. N. Korobeynikova*

Institute of General Pathology and Pathophysiology, Academy of Medical Sciences of the  
WSSR, Moscow, Pedagogical Institute and Medical School, Chelyabinsk

Ulcerous impairments of gastric mucosa and an increase in activity of some enzymes in blood plasma were observed in rats after severe emotional-pain stress (EPS). The activity of cytoplasmic enzymes in blood plasma reached maximal values immediately after EPS and then returned to the initial level within the first day. At the same time, activity of lysosomal enzymes reached the highest values only at the end of the first day after EPS and their increased activity was maintained within 5 days. Ulcerous impairments of stomach as well as destruction of cellular membranes, responsible for an increase in the enzymatic activity in blood plasma, might be prevented by  $\beta$ -adrenoblocking agent inderal. These data suggested that the impairments were due to the effect of excessive amount of catecholamines. Antioxidants dibunol and OP-6, administered prior to EPS, prevented the impairments caused by stress more effectively as compared with inderal; other antioxidants —  $\alpha$ -tocopherol acetate and sodium selenite were less effective. The data obtained support the assumption on the leading role of lipid peroxidation in pathogenesis of the stress impairments; these data established that the impairments caused by stress might be prevented using the combination of antioxidants and  $\beta$ -adrenoblocking agents.

УДК 577.152.344.042.2

*Г. А. Яровая, В. Л. Доценко, Э. И. Агапова, Е. П. Степанян*

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ КОММЕРЧЕСКИХ ПОЛИВАЛЕНТНЫХ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕИНАЗ. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДЕЙСТВИЯ НА КАЛЛИКРЕИНЫ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ И ТРИПСИН

Центральный институт усовершенствования врачей, Институт сердечно-сосудистой  
хирургии им. А. Н. Бакулева АМН СССР, Москва

В настоящее время в клинической практике все шире используются препараты поливалентных ингибиторов протеиназ типа трасилола. Эти ингибиторы белково-пептидной природы, выделенные из поджелудочной железы и других органов крупного рогатого скота, способны в растворе при реакции среды, близкой к нейтральной, обратимо и очень быстро взаимодействовать с рядом ферментов, принадлежащих к группе сериновых протеиназ, а именно с трипсином, химотрипсином, калликреинами, плазмином и другими, подавляя их активность. На этом свойстве основывается терапевтическое действие ингибиторов протеиназ [1, 2]. Большой интерес клиницистов к данным ингибиторам обусловлен прежде всего тем, что ферментные системы, блокируемые этими ингибиторами, играют ключевую роль в важнейших биологических процессах, таких, как кининогенез, свертывание крови, фибринолиз, регуляция сосудистого тонуса, воспалительные и иммунологические реакции и др. [3].

Однако несмотря на имеющийся в настоящее время большой клинический опыт использования антипротеиназ при различных патологических состояниях, остается много нерешенных вопросов. Клиническая практика показывает, что один и тот же коммерческий препарат ингибитора, применяемый при различных патологических состояниях, характеризующихся избыточным протеолизом, оказывает различный эффект. С другой стороны, при одном и том же заболевании клиническое применение различных ингибиторов типа трасилола, обладающих, как принято считать, одинаковым действием [2], нередко оказывается неодинаково эффективным. Это, по-видимому, может быть обусловлено различным средством используемых в клинике ингибиторов к отдельным протеиназам, степень активирования которых при различных патологических состояниях может существенно различаться. Трудность выбора препарата ингибитора усугубляется неопределенностью маркировки активности коммерческих препаратов, затрудняющей оценку их относительной эффективности. Эти обстоятельства послужили основанием для сравнительного изучения действия ряда препаратов анти-

протениаз в отношении калликреина плазмы крови, тканевого калликреина и трипсина.

В данной работе представлены результаты исследования эффективности действия 4 препаратов ингибиторов протеиназ: пантрипина (отечественный препарат), трасилола (фирма «Байер», ФРГ), гордокса («Гидеон Рихтер», Венгрия), и контрикала (УЕВ, ГДР), на активность калликреина плазмы человеческой крови, очищенного от других протеиназ плазмы, калликреина из панкреатической железы свиньи (коммерческий препарат фирмы «Дильминал», ГДР) и трипсина («Спофа», Чехословакия).

### М е т о д и к а

Эффективность действия ингибиторов определяли по степени торможения способности калликреинов различного происхождения и трипсина гидролизовать известный субстрат этих ферментов N-бензоил-L-аргининэтиловый эфир (БАЭЭ). Скорость расщепления БАЭЭ оценивали по приросту оптической плотности пробы при 253 нм и температуре 25 °С в течение 9 мин [4].

Для измерения активности фермента в присутствии различных доз ингибитора в пробу брали 0,03—0,5 мл фермента и 0,005—0,1 мл ингибитора, инкубировали 15 мин при 25 °С, довели объем пробы до 2 мл 0,05 М трис-НСl буфером рН 8,0 и непосредственно перед измерением добавляли 1,0 мл  $1,5 \cdot 10^{-3}$  М раствора БАЭЭ. Контролем служили пробы без добавления ингибитора. Результаты выражали в единицах (Е) активности фермента, подавляемых 1 мл препарата ингибитора (Е — международная единица активности ферментов, соответствующая количеству фермента, катализирующего расщепление 1 мкмоль субстрата в 1 мин в стандартных условиях). Препарат частично очищенного калликреина из сыворотки крови человека получали методом ионообменной хроматографии на QAE-сефадексе А-50 и молселекте СМ-50 [5]. Препарат калликреина, используемый для исследования действия ингибиторов, имел удельную БАЭЭ-эстеразную активность 0,28 Е. Киининогеназную активность препарата оценивали по количеству брадикинина, освобождающегося при 1-, 2- и 5-минутной инкубации калликреина с киинином плазмы крови человека, прогретой при 60 °С в течение 1 ч. Реакцию проводили при 37 °С в 0,1 М трис-НСl буфере рН 7,5 с  $1 \cdot 10^{-3}$  М 8-оксигинолином (ингибитор киинина разрушающих ферментов — киининаз) и останавливали добавлением 12,5% ТХУ. Содержание брадикинина в фильтрате определяли биологическим методом по сокращению изолированного рога матки крысы, используя в качестве стандарта синтетический брадикинин (фирма «Reanal», Венгрия) [6].

Препарат калликреина из поджелудочной железы свиньи (фирма «Дильминал», ГДР) перед использованием растворяли в 2 мл 0,05 М трис-НСl буфера рН 8,0. Тестирование действия ингибиторов проводили в пробах, содержащих 0,03 мл фермента и различные количества ингибитора. Условия инкубации и измерения остаточной активности фермента описаны выше. Раствор трипсина готовили в 0,02 н. НСl в концентрации 670 мкг в 10 мл. К пробам по 0,2 мл раствора трипсина добавляли 0,3 мл 0,05 М трис-НСl буфера с 0,002%  $\text{CaCl}_2$  и различные количества ингибитора. Условия инкубации и измерения активности описаны выше. Содержание белка в препаратах ингибиторов определяли методом Лоури [7]. Для построения калибровочной кривой использовали стандартную смесь альбумина (5%) и глобулина (3%) фирмы «Sigma» (США). Точную концентрацию активного ингибитора в исследуемых препаратах устанавливали титрованием определенного количества ингибитора возрастающими количествами трипсина. Инкубацию фермента с ингибитором проводили в течение 15 мин, затем измеряли остаточную БАЭЭ-эстеразную активность фермента и строили кривую [8].

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

Результаты изучения эффективности действия ингибиторов показали различную чувствительность к ним калликреина плазмы крови человека, панкреатического калликреина и трипсина. Чувствительность ферментов к исследуемым ингибиторам определяли титрованием фиксированного количества ферментов различными количествами каждого ингибитора до полного подавления активности фермента, после чего графически рассчитывали  $I_{50}$ , т. е. концентрацию ингибитора, снижающую активность фермента вдвое.

По величине  $I_{50}$  судили об эффективности действия 4 различных ингибиторов на исследуемые протеиназы. На рис. 1 приведены кривые титрования калликреинов и трипсина трасилолом, контрикалом, гордоксом и пантрипином в условиях, описанных выше. Степень ингибирования ферментов выражали в процентах от максимального торможения активности, принятого за 100.

На рис. 2 показана относительная эффективность действия исследуемых 4 ингибиторов на эстеразную активность калликреинов различного происхождения и трипсина в пропорциях, отражающих величины  $I_{50}$ . Из рис. 2 видно, что калликреин плазмы крови подавляется всеми исследуемыми ингибиторами хуже, чем тканевый калликреин и трипсин. Контрикал, трасилол и гордокс тормозят действие плазменного калликреина практически в одинаковой степени; этим ингибиторам уступает пантрипин, эффективность которого в 2—3 раза ниже в пересчете на активный ингибитор препарата. Самым сильным ингибиторным действием в отношении тка-

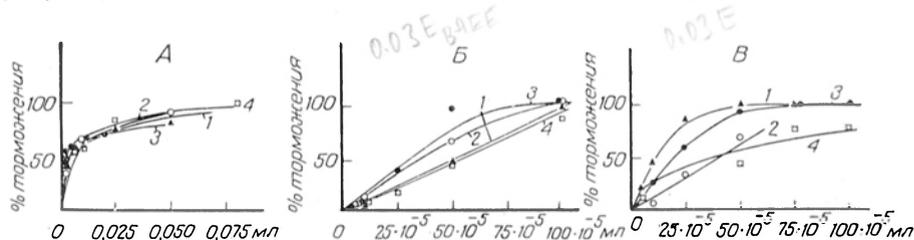


Рис. 1. Кривые титрования калликреинов и трипсина трасилолом (1), гордоксом (2), контрикалом (3), пантрипином (4).

А — торможение БАЭЭ-эстеразной активности калликреина сыворотки крови человека (для титрования каждым ингибитором брали 30 мЕ калликреина). Б — торможение БАЭЭ-эстеразной активности панкреатического калликреина (препарат, «Дильминал»; для титрования каждым ингибитором брали 30 мЕ калликреина); В — торможение БАЭЭ-эстеразной активности трипсина (для титрования каждым ингибитором брали 100 мЕ трипсина). Указанные количества ферментов преинкубировали 15 мин при 25 °С в 0,05 М трис-НСl буфере рН 8,0 (количества ингибиторов приведены по осям абсцисс). Общий объем пробы доводили 0,05 М трис-НСl буфером рН 8,0 до 2 мл и добавляли БАЭЭ до конечной концентрации  $0,5 \cdot 10^{-3}$  М. Скорость гидролиза БАЭЭ измеряли, как описано в разделе «Методика».

невого калликреина обладает контрикал, за ним по мере уменьшения эффективности следуют гордокс и трасилол, имеющие близкие величины  $I_{50}$ , и, наконец, пантрипин. При взаимодействии с трипсином максимальную и очень высокую активность ( $I_{50} = 0,56 \cdot 10^{-8}$  М) проявляет трасилол, затем контрикал, меньшей ингибиторной способностью в отношении трипсина обладают гордокс и особенно пантрипин.

В связи с изложенным представляется обоснованной возможность дифференцированного подхода к использованию различных препаратов ингибиторов протеиназ. Так, можно предположить, что применение контрикала, трасилола и гордокса предпочтительно при патологиях, сопровождающихся активированием кининогеназной системы плазмы крови, при активировании органических кининогеназ предпочтительным в терапии должен быть контрикал, в случае необходимости подавления активности трипсина следует применять трасилол.

Для удобства выбора подходящего препарата и расчета необходимой дозы приведены 2 таблицы, содержащие основную информацию об активности исследуемых ингибиторов. В табл. 1 перечислены параметры, характеризующие каждый из 4 ингибиторов по их весовому содержанию в препаратах и активности в ингибиторных единицах, предлагаемых фирмами, производящими эти препараты.

Из табл. 1 видно, что содержание белка в трасилоле, гордоксе и контрикале, определенное по Лоури, и количество ингибитора в них, оцененное по титрованию трипсином, характеризуются близкими величинами; это является свидетельством того, что весь белок этих препаратов принадлежит ингибитору. Препарат пантрипина содержит только 30 % активного ингибитора.

Согласно рекомендациям специального комитета [9], установлена размерность единиц для выражения активности ингибитора калликреина и трипсина, выделенных из тканей млекопитающих. Вначале была предложена калликреиновая ингибиторная единица (КИЕ), соответствующая количеству ингибитора, которое в стандартных условиях (кри инкубации в течение 15 мин при 37 °С и рН 8,0) на 50 % подавляет 2 КЕ (калликреиновые единицы) активности панкреатического калликреина свиньи при определе-

нии активности фермента биологическим методом. Затем наряду с этой единицей стали пользоваться так называемой международной ингибиторной единицей (МЕ), соответствующей количеству ингибитора, угнетающему (при инкубации в течение 15 мин при 25 °С и рН 8,0) на 50 % 2 Е активности трипсина или калликрейна, оцененной по гидролизу синтетических эфиров [3, 9]. Использование субстратов различной природы исключает возможность сравнения активности ингибиторов, поскольку кинетика реакции ферментов с ингибиторами в присутствии природных или различных синтетических субстратов заметно различается [9]. Таким образом, унифицированный принцип выражения активности ингибитора не соблюдается, что затрудняет сравнительную оценку действия

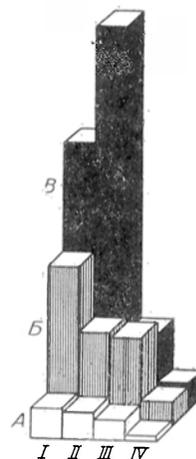


Рис. 2. Трехмерная диаграмма эффективности действия контрикала (I), трасилола (II), гордокса (III) и пантрипина (IV) на активность плазменного и тканевого калликреина и трипсина.

A — калликреин плазмы; B — калликреин поджелудочной железы; B — трипсин. Величины  $10^4$  для данных ингибиторов по отношению к каждому ферменту: IB=0,85; IIB=0,57; IIIB=3,0; IVB=10,8; IB=1,4; IIB=2,6; IIIB=2,7; IVB=11,2; IA=8,5; IIA=9,1; IIIA=12,0; IVA=75,1.

различных препаратов. Кроме того, обнаруженные нами различия в эффективности действия препаратов на некоторые протеиназы обуславливают целесообразность дополнительной характеристики активности ингибиторов.

Таблица 1

Ингибитор	Антипротеолитическая активность препарата, в ингибиторных единицах, используемых фирмами, на 1 мл	Содержание белков, мг/мл (по Лоурри)	Содержание ингибитора в препарате, мг/мл (по титрованию трипсином)	Содержание препарата, мкг на 1 ингибиторную единицу	Концентрация ингибитора, Моль**
Трасилол	5000 КИЕ (единица калликреин-ингибитора)	1,00	1,08	0,20	$1,66 \cdot 10^{-4}$
Гордокс	10 000 Е (единица инактиватора калликрейна)	1,125	1,24	0,12	$1,91 \cdot 10^{-4}$
Контрикал	5000 АТЕ (антитрипсиновая единица = 15 000 КИЕ (единица инактиватора калликрейна))	0,750	0,76	0,15	$1,16 \cdot 10^{-4}$
Пантрипин*	7,5 ЕД	3,2	1,03	137,33	$1,58 \cdot 10^{-1}$

\* Здесь и в табл. 2 содержимое флакона с пероксидом пантрипина (15 КД) раствора в 2 мл физиологического раствора;

\*\* Молекулярная масса каждого препарата принята равной 6500 [9].

В табл. 2 приведены результаты расчетов эффективности действия ингибиторов на активность каждого исследуемого фермента. Действие ингибитора выражено в условных ингибиторных единицах (ИЕ), что дает возможность сравнивать эффективность препаратов ингибитора по отношению к различным сериновым протеиназам. 1 ИЕ соответствует такому количеству ингибитора, которое на 50 % тормозит 2 ед. БАЭЭ-эстеразной активности фермента, т. е. вдвое уменьшает скорость гидролиза БАЭЭ при инкубации в течение 15 мин и при 25 °С и рН 8,0.

В табл. 2 нашло отражение соотношение между количествами ингибитора в единицах, указанных на коммерческих препаратах (см. табл. 1), и предлагаемой условной ингибиторной единицей. Последняя графа табл. 2 содержит сведения о количестве (в миллилитрах) препарата ингибитора, которое способно подавить 100 БАЭЭ-эстеразных единиц активности фермента из изученных сериновых протеиназ.

Анализируя данные, приведенные на рисунках и в таблицах, при унификации маркировки ингибирующей активности препаратов можно прийти к выводу, что наименьшей чувствительностью к действию изученных ингибиторов обладает калликреин плазмы крови, большей чувствительностью — панкреатический калликреин и трипсин. Если сравнивать активность пре-

Т а б л и ц а 2

Сравнение коммерческих препаратов ингибиторов протеиназ по действию на активность калликреина плазмы крови, панкреатического калликреина и трипсина

Ингибитор	Активность ингибитора, ИЕ на 1 мл препарата			Количество ингибитора (в единицах активности**), соответствующее 1 ИЕ***			Количество ингибитора (в мл), необходимое для подавления 100 Е**** активности фермента		
	калликреин плазмы крови	панкреатический калликреин	трипсин	калликреин плазмы крови	панкреатический калликреин	трипсин	калликреин плазмы крови	панкреатический калликреин	трипсин
Трасилол	7,5	58,0	455,0	670 КИЕ	85 КИЕ	10 КИЕ	13,0	1,7	0,2
Гордокс	10,0	93,0	115,0	1000 Е	110 Е	90 Е	10,0	1,1	0,9
Контрикал	7,5	101,5	205,0	670 АТЕ	50 АТЕ	25 АТЕ	13,0	1,0	0,5
Пантрипин*	3,6	54,5	163,0	2 ЕД	0,15 ЕД	0,045 ЕД	27,0	2,0	0,6

\*\* Имеются в виду единицы активности ингибиторов, предложенные фирмой-производителем.

\*\*\* ИЕ — условная ингибиторная единица, 1 ИЕ соответствует количеству ингибитора, которое тормозит 2 ед. БАЭЭ-эстеразной активности фермента.

\*\*\*\* Е-БАЭЭ-эстеразная единица активности ферментов.

паратов ингибиторов между собой, то можно отметить, что наибольшей активностью в отношении калликреинов обладают контрикал, трасилол и гордокс, наименьшей активностью по отношению к калликреинам и трипсину — пантрипин.

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Werle E. — In: International Research Conference on Proteinase Inhibitors. 1-st. Proceedings. Ed. H. Fritz, H. Tsheshe. Berlin, 1970, v. 25, p. 550—578.
2. Vogel R., Zichgraf-Rüdel G. — In: Handbuch der experimentellen Pharmakologie. Berlin, 1970, Bd 25, S. 550—578.
3. Trautshold J., Werle E., Zichgraf-Rüdel G. — Biochem. Pharmacol., 1967, v. 16, p. 59—72.
4. Trautshold J., Werle E. — Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 1961, Bd 325, S. 49.
5. Доценко В. Л., Яровая Г. А., Голосова Н. А. и др. — Биохимия, 1977, т. 42, № 2, с. 283—286.
6. Пасхина Т. С., Егорова Т. П., Зыкова В. П. и др. — В кн.: Современные методы в биохимии. М., 1968, т. 2, с. 205—232.
7. Lowry O. H., Rozenbrough N. J., Farr A. L. et al. — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265.
8. Ларионова Н. И., Казанская Н. Ф., Якубовская Р. И. — Биохимия, 1979, т. 44, № 1, с. 3—17.
9. Vogel R., Werle E. — In: Handbuch der experimentellen Pharmakologie. Berlin, 1970, Bd 25, S. 213—249.

Поступила 26/II 1980 г.

EFFICIENCY OF THE TRADE GRADE POLYVALENT INHIBITORS OF PROTEINASES. COMPARISON OF THEIR ACTION ON KALLIKREINS OF VARIOUS ORIGIN AND ON TRYPSIN

*G. A. Yarovaya, V. L. Dolzenko, E. I. Agapova,  
E. P. Stepanyan*

Central Institute for Postgraduate Training of Physicians, A. N. Bakulev Institute of Cardiovascular Surgery, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Polyvalent peptide-protein inhibitors of proteinases trasilol, contrical, hordox and pantrypine were studied using purified preparations of kallikreins from human blood plasma and hog pancreas as well as of trypsin. All the trade grade preparations of the inhibitors studied exhibited more distinct affinity to trypsin and tissue kallikrein as compared with blood plasma kallikrein. Trasilol inhibited most effectively the activity of trypsin, contrical — of pancreatic kallikrein. Contrical, trasilol and hordox inactivated blood plasma kallikrein at similar rates, pantrypine was several times less effective.

УДК 616.13/.14-089:577.152.344.042.2

*Г. А. Яровая, В. Л. Доценко, Э. И. Агапова,  
А. Я. Нежлудко, Е. П. Степанян*

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ КОММЕРЧЕСКИХ ПОЛИВАЛЕНТНЫХ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕИНАЗ. ПРИМЕНЕНИЕ ГОРДОКСА ПРИ ХИРУРГИЧЕСКОМ ВМЕШАТЕЛЬСТВЕ ПО ПОВОДУ ПАТОЛОГИЙ СОСУДОВ**

Центральный институт усовершенствования врачей, Институт сердечно-сосудистой хирургии им. А. Н. Бакулева АМН СССР, Москва

Как известно, ферменты системы, блокируемые ингибиторами типа ингибитора трипсина Кунитца, играют важную роль в таких процессах, как кининогенез, гемостаз, фибринолиз, воспаление [1, 2]. Тончайшие механизмы регуляции этих процессов при некоторых патологических состояниях могут нарушаться, что сопровождается, как правило, избыточным протеолизом. Усиление активности протеолитических процессов наблюдаются при воспалениях и шоках различной этиологии, феохромоцитоме, демининг-синдроме, некоторых сердечно-сосудистых, наследственных и других заболеваниях. Наиболее обоснованным является применение ингибиторов протеиназ в терапии острых панкреатитов, шоков различной этиологии, фибринолитических кровотечениях и др. [1—3].

Популярность ингибиторов пептидно-белковой природы обусловлена их незначительной токсичностью и низкой молекулярной массой, что уменьшает опасность аллергической реакции и позволяет ингибитору быстро проникать из кровотока в ткани. Последнее обстоятельство, однако, требует длительных внутривенных вливаний, так как при одноразовом введении, например трасилола (в количестве 1000—2000 КИЕ на 1 кг массы тела), в крови через 10 мин остается лишь половина введенной дозы ингибитора [1]. Полученные ранее результаты показали, что пережатие брюшной аорты при реконструктивных операциях на сосудах приводит к усилению процессов кининообразования в плазме крови [4].

В настоящей работе приведены данные, демонстрирующие влияние гордокса («Гидеон Рихтер», Венгрия) на активность калликреина в плазме крови больных, подвергнутых реконструктивной операции по поводу стеноза брюшной аорты атеросклеротического происхождения, а также больных с септическими осложнениями после операций на открытом сердце по поводу врожденных пороков. На основании результатов исследований, опубликованных в предыдущей работе, можно заключить, что для торможения этих процессов в плазме крови оправдано применение такого ингибитора, как гордокс.

## Методика

Исследование влияния гордокса на состояние кининогеназной системы проводили на двух группах больных со стенозом брюшной аорты атеросклеротического происхождения. В 1-й группе (14 больных) изучали состояние кининогеназной системы в период пережатия аорты и реваскуляризации при реконструктивной операции без лечебных мероприятий, во 2-й (10 больных) во время операции проводили специфическую терапию гордоксом. За 5 мин до снятия зажима внутривенно вводили первую дозу препарата 400 000 Е, затем 100 000 Е капельно в составе 200 мл физиологического раствора в течение 40—60 мин. Определение содержания калликрейна и прекаликрейна у той и другой групп больных проводили в 4 этапа: I — до пережатия брюшной аорты; II — в конце пережатия аорты, III — через 5 мин после реваскуляризации нижних конечностей и IV — через 30 мин после восстановления кровотока. Изучение эффективности действия гордокса на кининогеназную систему больных с септическими осложнениями после операций на открытом сердце проводили на группе из 18 человек. Всем больным вводили гордокс ежедневно в течение 3 дней по следующей схеме: одномоментно медленно 500 000 Е, а последующие 2 ч еще 500 000 Е внутривенно капельно в составе «гемодеза». Показатели состояния кининогеназной системы исследовали непосредственно перед введением гордокса и через 30 мин после прекращения введения препарата. Активность калликрейна и содержание прекаликрейна в плазме крови определяли упрощенным хроматографическим методом [5], используя в качестве субстрата для активного фермента N-бензоил-L-аргининэтиловый эфир (БЛЭЭ). Результаты выражали в миллиединицах (мЕ) на 1 мл плазмы крови. Кровь для анализа брали из локтевой вены через силиконовую иглу в полиэтиленовую пробирку.

## Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены результаты определения активности калликрейна и содержания прекаликрейна у двух групп больных, не получавших и получавших ингибитор во время операции по поводу стеноза брюшной аорты. Для сравнения в табл. 1 приведены величины содержания калликрейна и его предшественника, полученные у доноров.

Как видно из табл. 1, в группе больных, не получавших ингибитор, активность калликрейна в плазме крови характеризуется высокими величинами и прогрессивно повышается на I, II и III этапах операции в среднем в 3,  $4\frac{1}{2}$  и  $5\frac{1}{2}$  раз соответственно. При этом уровень прекаликрейна снижается соответственно в 2,  $4\frac{1}{2}$  и 14 раз по сравнению с нормой. Повышение активности калликрейна при одновременном уменьшении содержания предшественника свидетельствует об активировании процесса кининогеназа, достигающего максимума на III этапе операции, т. е. после пуска кровотока, когда отмечается особенно резкое падение уровня прекаликрейна. Найдено также, что через 30 мин после реваскуляризации активность калликрейна продолжает оставаться очень высокой. Сопоставление лабораторных и клинических наблюдений показало, что в это время активирование кининогеназной системы сопровождается сильным падением артериального давления.

Есть основания полагать, что основной причиной активирования кининогеназы в этих условиях является освобождение клеточных протеиназ при нарушении мембранной проницаемости [6]. Сдвиг кислотно-щелочного равновесия и увеличение содержания в крови кислых метаболитов [7] могут, вероятно, резко снизить активность ингибиторов и активность ферментов, разрушающих кинины [8].

При септических осложнениях одновременно с ухудшением клинического состояния больного еще более заметно активируется кининовая система, что, по-видимому, обусловлено наличием патогенной флоры и дальнейшим активированием протеолитических систем плазмы крови [9].

Во 2-й группе больных, которым за 5 мин до пуска кровотока вводили гордокс, активность калликрейна в плазме крови резко снижалась на III этапе. Эта величина была в 2—3 раза ниже по сравнению с активностью фермента на предыдущем этапе операции у этих же больных и в 4 раза ниже, чем у больных, не получавших гордокса; содержание прекаликрейна при этом продолжало оставаться пониженным по сравнению с нормой на 25 %, но было в 10 раз выше, чем у больных 1-й группы после восстановления кровотока. В этот же период у больных, получавших ингибитор, не наблюдалось снижения артериального давления. Эти данные указывают на

Т а б л и ц а 1

Активность калликреина и содержание прекалликреина в плазме крови больных стенозом брюшной аорты, получавших и не получавших гордокс на различных этапах оперативного вмешательства

Показатель	Норма	Больные, получавшие гордокс			Больные, не получавшие гордокс		
		I	II	III	I	II	III
Калликреин, мЕ	53,1±8,3	170,0±37,9 $P^* < 0,05$	229,2±23,4 $P < 0,05$	75,0±14,4 $P < 0,05$	167,2±23,8 $P < 0,05$	245,0±62,29 $P < 0,05$	290,0±28,3 $P < 0,05$
Прекалликреин, мЕ	411,9±37,7	170,0±36,43 $P^* < 0,05$	176,0±52,2 $P < 0,05$	301,0±23,0 $P < 0,05$	172,0±26,7 $P < 0,05$	91,1±21,4 $P < 0,05$	29,0±31,3 $P < 0,05$

П р и м е ч а н и е. I — до пережатия аорты, II — в конце пережатия аорты, III — через 5 мин после снятия зажима с аорты.

\* По отношению к норме.

Т а б л и ц а 2

Активность калликреина и содержание прекалликреина в плазме крови больных врожденными пороками сердца «синего» типа с септическими осложнениями в послеоперационном периоде на фоне лечения гордоксом

Показатель	Норма	Лечение гордоксом					
		1-й день		2-й день		3-й день	
		до введения	после введения	до введения	после введения	до введения	после введения
Активность калликреина, Е	53,1±8,3	304,2±50,4 $P^* < 0,05$	179,5±37,4 $P^* < 0,05$	111,9±39,4 $P^* > 0,05$	103,7±23,2 $P^* > 0,05$	32,4±9,7 $P^* > 0,05$	27,4±3,6 $P^* > 0,05$
Содержание прекалликреина, мЕ	411,9±37,7	97,7±44,2 $P^* < 0,05$	90,0±27,1 $P^* < 0,05$	232,0±28,2 $P^* < 0,05$	251,4±20,3 $P^* < 0,05$	344,8±25,6 $P^* > 0,05$	365,1±30,5 $P^* > 0,05$

П р и м е ч а н и е. Одной звездочкой отмечены значения  $P$  по отношению к норме, двумя — по отношению к исходной активности до введения ингибитора.

быстрое торможение ингибитором активности калликреина после введения гордокса и свидетельствуют также об угнетении процесса активирования прекалликреина.

Для удобства оценки степени активирования кининовой системы можно пользоваться в данном случае величиной отношения активности калликреина к содержанию его предшественника. Коэффициент активирования, вычисленный таким способом, будет расти пропорционально степени активирования кининовой системы и будет тем выше, чем меньше остаточное содержание прекалликреина.

На рис. 1 представлены изменения величины коэффициента активирования системы прекалликреин — калликреин в плазме крови у рассмот-

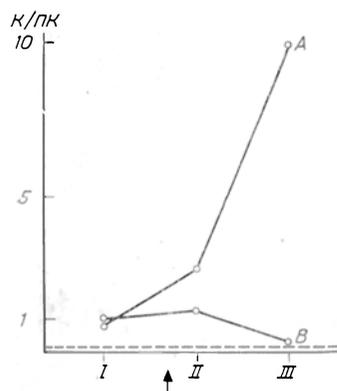


Рис. 1. Сравнительные изменения относительного содержания калликреина (К) и прекалликреина (ПК) в плазме крови больных, оперированных по поводу стеноза брюшной аорты, не получавших (А) и получавших (В) гордокс.

Стрелкой указан момент введения первой дозы препарата (400 000 Е). Далее введение гордокса проводили капельно (100 000 Е) до конца операции. I — до пережатия аорты; II — конец пережатия аорты; III — через 5 мин после пуска кровотока. Здесь и на рис. 2 пунктирная линия — значение К/ПК в норме.

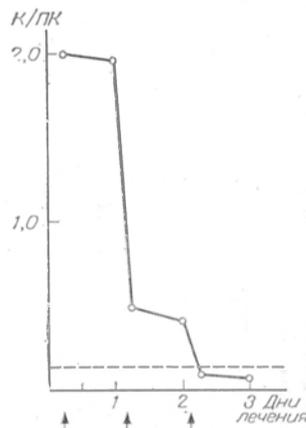


Рис. 2. Влияние гордокса на изменение относительного содержания калликреина (К) и прекалликреина (ПК) в плазме крови больных с септическими осложнениями после операции по поводу врожденного порока сердца.

Стрелками указаны моменты введения ингибитора по схеме: 500 000 Е — одномоментно, затем 500 000 Е — капельно в течение 2 ч.

ренных выше двух групп больных. Сопоставление кривых А и В убеждает в том, что ингибитор оказывает выраженный эффект на характер изменения коэффициента активирования, который резко уменьшается после введения гордокса, что свидетельствует об относительном снижении уровня активного фермента под действием ингибитора.

Влияние гордокса на содержание калликреина и его предшественника в плазме крови в процессе трехдневного лечения изучено у больных с септическими осложнениями после операции на открытом сердце по поводу врожденного порока. Определение указанных компонентов кининовой системы проводили ежедневно до и после введения ингибитора по схеме, описанной выше. Активность калликреина в плазме крови таких больных повышена в среднем в 5 раз при одновременном снижении уровня предшественника на 76% по сравнению с нормой.

Из представленных в табл. 2 данных следует, что эффект ингибитора наиболее существенно отражается на уровне калликреина, активность которого уже в 1-й день после применения ингибитора снижается почти в 2 раза. После 3 дней введения гордокса содержание калликреина достигает нормальных величин, что происходит на фоне улучшения состояния, уменьшения интоксикации и снижения температуры тела больных. При этом происходит постепенное нарастание уровня прекалликреина, характеризующегося к 3-му дню лечения величинами, близкими к норме. В период между вливаниями гордокса исследуемые показатели активности кининовой системы сохраняли тенденцию к нормализации, о чем свидетельст-

вуют данные, полученные на следующий день после введения ингибитора. Однако точно установить продолжительность действия ингибитора не удалось, поскольку кровь для анализа брали через 20 мин после окончания вливания ингибитора и затем только на следующий день перед новым введением гордокса.

На рис. 2 графически показано влияние гордокса на коэффициент активирования калликреина в плазме крови данной группы больных. Как видно из рис. 2, эффект ингибитора существенно проявляется уже через 5 мин после введения. В этот период происходит резкое снижение коэффициента активирования, который в последующие 2 дня лечения постепенно достигает нормы.

Т а б л и ц а 3

Эффективность действия гордокса на активность калликреина плазмы крови у двух групп больных и теоретически рассчитанная доза ингибитора

Группа обследованных больных	Первая терапевтическая доза ингибитора		Общая БАЭЭ-эстеразная активность калликреина в кровотоке (в Е) до введения ингибитора	Количество (в Е) калликреина, подавленного ингибитором через 20 мин после окончания введения	Эффективность торможения, % от максимально возможного	Расчетная минимальная доза ингибитора в единицах, приведенных фирмой	
	в единицах, указанных фирмой	в единицах ингибирования калликреина на плазме крови (ИЕ)				без учета эффективности торможения	с учетом эффективности торможения
Больные стенозом брюшной аорты, получавшие ингибитор во время операции	500 000	500	510	285	57	510 000	895 000
Больные с септическими осложнениями после операции на открытом сердце	1 000 000	1000	304	125	12,5	304 000	24 300 000

П р и м е ч а н и е. Общее количество плазмы в кровотоке рассчитывали из объема циркулирующей крови и величины гематокрита.

Приведенные результаты свидетельствуют о целесообразности включения поливалентных ингибиторов протеиназ типа трасилола в комплекс терапии при хирургическом вмешательстве, сопровождающемся резко выраженной гипоксией, по-видимому, способствующей активированию кининогеназной системы в плазме крови. Введение ингибиторов столь же важно и при лечении постоперационных септических осложнений, которые также характеризуются активированием этой системы.

Наблюдаемое нами постепенное нарастание уровня прекалликреина при лечении ингибитором свидетельствует также о тормозящем действии последнего на процесс активирования профермента, что согласуется с данными других авторов [10, 11].

Обращает на себя внимание тот факт, что торможение активности калликреина и процесса активирования прекалликреина, вызванные введением ингибитора, проявляются достаточно длительное время (около суток), в то же время известно, что пептидно-белковые ингибиторы протеиназ типа трасилола чрезвычайно быстро выводятся из кровяного русла [1—3]. Объяснить этот факт трудно, поскольку многое в механизме действия этих ингибиторов в условиях организма остается неясным. Однако можно предполагать, что ингибитор усиливает собственные защитные силы организма. Так, по данным Пасхиной с соавт. [11], у леченных трасилолом или ингитрилом

ожоговых больных наблюдалось повышение концентрации  $\alpha_1$ -антитрипсина, являющегося ингибитором ряда протеолитических ферментов.

Полученные нами ранее данные по эффективности действия ингибиторов в отношении препаратов отдельных протениаз дают возможность в случае доступности информации об относительной активности соответствующих протениаз рассчитать количество ингибитора, достаточное для подавления избыточной активности фермента. Для примера такой расчет был нами выполнен с использованием данных, характеризующих способность гордокса подавлять активность калликреина плазмы крови, и учетом активности фермента у больных обеих групп до и после введения ингибитора. Результаты расчета представлены в табл. 3, где приведены величины первой терапевтической дозы ингибитора, введенной в два приема (одномоментно и капельно); активность калликреина до введения гордокса, рассчитанная на общее содержание плазмы крови, активность калликреина, подавленная ингибитором через 20 мин после окончания введения, эффективность действия ингибитора *in vitro* в отношении калликреина плазмы крови и расчетные величины необходимой дозы ингибитора. Из табл. 3 видно, что реализуется часть потенциальной возможности ингибитора, причем степень эффективности действия гордокса у различных групп больных различна. Введенная доза ингибитора при реконструктивной операции была несколько ниже рассчитанной нами для подавления избыточной активности плазменного калликреина для этих больных. Однако этого количества оказалось достаточно для приведения активного калликреина к нормальным величинам через 20 мин после введения ингибитора. Для группы больных с септическими послеоперационными осложнениями введенная доза ингибитора была недостаточной для угнетения избыточной активности калликреина. С учетом эффективности действия ингибитора *in vivo* эта доза должна быть увеличена в  $2^{1/2}$  раза.

Из приведенных в работе данных следует, что в случае содержания в плазме крови повышенного количества активного калликреина требуется введение больших доз ингибиторов протениаз, поскольку эффективность последних в отношении калликреинов плазмы крови мала. Таким образом, полученные нами данные подтверждают необходимость введения больным больших доз ингибитора (это отмечают и другие авторы [2, 3],) и могут быть использованы для рационального расчета терапевтических доз ингибитора.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Werle E.* — In: International Research Conference on Proteinase Inhibitors. 1-st. Proceedings. Ed. H. Fritz, H. Tshesche. Berlin, 1970, p. 23—27.
2. *Vogel R., Zickgraf-Rüdel G.* — In: Handbuch der experimentellen Pharmakologie. Berlin, 1970, Bd 25, S. 550—578.
3. *Trautshold J., Werle E., Zickgraf-Rüdel G.* — Biochem. Pharmacol., 1967, v. 16, p. 59—72.
4. *Сеидов В. Д., Агапова Э. И., Поспелова Е. П.* — Кардиология, 1978, № 8, с. 78—83.
5. *Пасхина Т. Е., Кринская А. В.* — В кн.: Современные методы в биохимии. Под ред. В. Н. Ореховича. М., 1977, с. 157—163.
6. *Bach H. P., Wilkens H.* — In: The Effect of Trasilol on Mikrocirculatory Phenomen. New Aspects of Trasilol Therapy. Stuttgart, 1970, p. 64—76.
7. *Lewis G. P.* — Physiol. Rev., 1960, v. 40, p. 647—676.
8. *Edey H., Lewis G. P.* — Brit. J. Pharmacol., 1962, v. 19, p. 299—305.
9. *Савельев В. С., Гологорский В. А., Гельфант Б. Р.* — Хирургия, 1976, № 6, с. 45—52.
10. *Пасхина Т. С., Кринская А. В., Зыкова В. П.* — Биохимия, 1975, т. 40, № 1, с. 302—309.
11. *Пасхина Т. С., Долгина М. И., Нартикова В. Ф. и др.* — Вопр. мед. химии, 1977, № 5, с. 689—700.

Поступила 26/II 1980 г.

# EFFICIENCY OF THE TRADE GRADE POLYVALENT INHIBITORS OF PROTEINASES. THE USE OF HORDOX IN SURGICAL TREATMENT OF VESSEL PATHOLOGIES

*G. A. Yarovaya, V. L. Dotsenko, E. I. Agapova,  
A. Ya. Nezhudko, E. P. Stepanyan*

Central Institute for Postgraduate Training of Physicians, A. N. Bakulev Institute of Cardiovascular Surgery, Academy of Medical Sciences of the USSR,  
Moscow

Effect of hordox on activity of the kallikrein-prekallikrein system was studied in blood plasma of patients with stenosis of abdominal aorta during the reconstructive operation and in patients with septic complications after the open-heart operation. These impairments were accompanied by a distinct increase in kallikrein activity with simultaneous decrease in prekallikrein content, suggesting activation of the kininogenase system; the kallikrein activity was normalized in patients treated with the inhibitor. The highest efficiency of the inhibitor was observed in patients with stenosis of abdominal aorta; in patients with septic complications it was 4-fold less effective. The data obtained suggest that inhibition of the blood plasma kininogenase system correlates with restoration in these patients. The results, obtained in study of the inhibitor efficiency in vitro and in vivo, may be used for calculation of therapeutic doses of the proteinase inhibitors.

## МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

---

УДК 616-008.839.22-074:543.544

*И. В. Березин, Ю. М. Лопухин, И. П. Андрианова,  
Я. И. Лапук, Л. Б. Алексеева, В. И. Сергиенко,  
Е. А. Бородин, Э. М. Халилов, А. И. Арчаков*

### АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ДЛЯ УДАЛЕНИЯ ХОЛЕСТЕРИНА

И Московский медицинский институт им. Н. И. Пирогова, Московский университет им. М. В. Ломоносова

В терапии атеросклероза основное место занимают гипохолестеринемические средства и диетотерапия. В последние годы разрабатываются более форсированные способы снижения содержания липидов в крови. К ним относятся операции выключения части тонкой кишки, замена больших объемов плазмы большого донорской плазмой [1], липоэкстракция [2]. Нами разрабатывается метод сорбционного извлечения холестерина и липидов из крови. Для успешного решения поставленной задачи прежде всего необходимо создание селективного по отношению к холестерину сорбента.

В настоящей работе изучена возможность применения для этой цели аффинной хроматографии с использованием в качестве аффината дигитонина, который, как известно, образует малорастворимые комплексы со стероидами и ввиду своей специфичности является наиболее приемлемым сапонинном для осаждения холестерина [3].

#### Методика

В качестве твердого носителя мы выбрали силихром, химически модифицированный введением в его состав аминокрупп. Ранее было показано, что аминоксилхром может быть с успехом использован для иммобилизации аффинатов, поскольку этот носитель обладает рядом достоинств, отличающих его от других сорбентов: он механи-

чески прочен, его структура не подвержена биологической атаке, он легко регенерируется [4].

Модификацию (аминирование) силохрома производили следующим образом. В круглодонную колбу вместимостью 2000 мл помещали 100 г силохрома, 500 мл толуола, 20 мл  $\gamma$ -аминопропилтриэтоксисилана и нагревали при температуре кипения толуола в течение 12 ч с обратным холодильником. Затем смесь охлаждали и фильтровали. Осадок на фильтре промывали 1 л толуола, затем сушили в сушильном шкафу 12 ч при температуре 45—50 °С и 12 ч в вакуум-эксикаторе. Получали 98 г аминированного силохрома с удельной активностью по титруемым аминок группам 0,56 мг-экв/г.

При исследовании способов иммобилизации дигитонина была предварительно

Т а б л и ц а 1

Активность носителя, модифицированного дигитонином и окисленным дигитонином (количество сорбированного холестерина в мг/г)

Носитель	Активность сорбента	
	после приготовления	после промывания 100-кратным объемом воды
Силохром+дигитонин	4,0	0
Аминосилохром+дигитонин	8,0	0
Силохром+окисленный дигитонин	4,0	4,0
Аминосилохром+окисленный дигитонин	11,4	11,4

Т а б л и ц а 2

Зависимость активности модифицированного носителя от соотношения реагентов и времени окисления (количество сорбированного холестерина в мг/г)

Соотношение массы дигитонин: периодат натрия	Время окисления, ч	Активность носителя, мг/г
1:1/2	4	4,0
1:1/4	8	0
1:1/8	12	0
1:2	0,5	11
1:2	1	11
1:2	1,5	11
1:2	2	10
1:2	3	7,8

изучена возможность его физической сорбции на силохроме и аминосилохроме. Для этого к 1 г твердого носителя добавляли растворы дигитонина в воде (полученные при нагревании до 37 °С и последующем охлаждении) или в 50% водном диоксане, перемешивали качанием при комнатной температуре в течение 6 ч и оставляли на ночь. Осадок отделяли фильтрованием и сушили на воздухе. Контроль активности полученных сорбентов во всех случаях осуществляли по количеству холестерина, удаленного из плазмы крови. Холестерин определяли по методу Вебстера [5]. Удельную активность сорбента выражали в миллиграммах сорбированного холестерина на 1 г сорбента.

В целях получения носителя, прочно удерживающего дигитонин на поверхности, необходимо было разработать метод ковалентного связывания аффината с матрицей. В связи с этим мы изучили окисление дигитонина периодатом натрия в водно-диоксановой среде и последующее взаимодействие полученных продуктов с аминосилохромом. К 0,1 г дигитонина добавляли различные количества периодата натрия и 10 мл 50% водного диоксана. Реакционную смесь выдерживали в темноте при комнатной температуре. Затем добавляли 2 г твердого носителя (силохром или аминосилохром). Реакционную смесь перемешивали качанием в течение 6 ч. Осадок отделяли фильтрованием, промывали водой и сушили на воздухе.

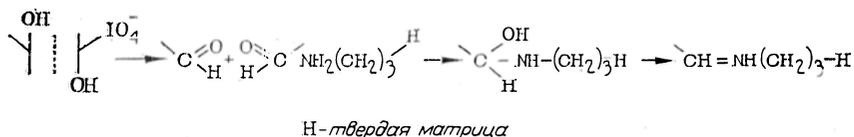
Стеновые испытания полученных образцов сорбентов проводили по следующей схеме. К 1 г сорбента добавляли 10, 20 и 40 мл сыворотки с содержанием холестерина 200—300 мг% и перемешивали качанием при комнатной температуре в течение 30 мин. В контрольных колбах находилась сыворотка без сорбента. Исследование сорбции в динамическом режиме проводили на колонках объемом 20 и 50 мл в условиях рециркуляции с перемешиванием со скоростью потока через колонку 50 мл/мин. Пробы сыворотки для измерения концентрации холестерина брали через 5, 15 и 30 мин до и после колонки. Динамическую обменную емкость колонки (ДООЕК) и удельную емкость сорбента (УЕС) рассчитывали по описанным ранее формулам [6].

## Результаты и обсуждение

Результаты изучения физической сорбции дигитонина на силохроме и аминосилохроме представлены в табл. 1 и на рис. 1. Как видно, дигитонин активнее сорбируется из водно-диоксановых растворов и лучше на аминосилохроме, чем на силохроме. Однако в обоих случаях сорбированный дигитонин легко вымывался водой. При разработке метода ковалентного связывания аффината с матрицей учитывалось, что в состав дигитонина входит 5 моносахаридных звеньев. Поэтому целесообразно осуществлять

козалентное связывание этого сапониина с носителем, используя методы химии углеводов.

Периодатное окисление сахаров приводит к возникновению альдегидных групп, которые могут легко реагировать с аминогруппами аминсилохрома, образуя азометиновые соединения:



Зависимость удельной активности полученных сорбентов от типа носителя, соотношения реагентов, времени окисления и количества промывных вод приведена в табл. 2 и на рис. 2 и 3. Было показано, что оптимальными

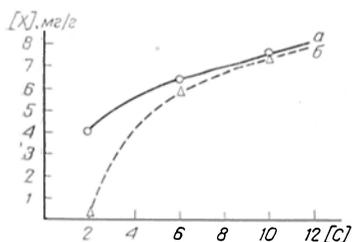


Рис. 1. Физическая сорбция дигитонина на силохроме. а и б — соответственно из водного и водно-диоксанового растворов.

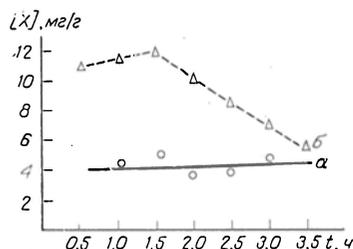


Рис. 2. Активность модифицированного носителя при обработке дигитонина периодатом натрия в соотношении массы 1 : 2.

а и б — носители на основе силохрома и аминсилохрома соответственно.

ными условиями являются использование соотношения реагентов дигитонин/периодат натрия 1:2 и проведение окисления в 50% водном диоксане в течение 1 1/2 ч. Модифицированный носитель не терял заметно своей удельной активности при промывании его 100-кратным объемом (см. табл. 1).

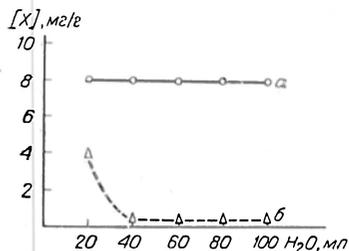


Рис. 3. Активность модифицированного носителя (1 г) в зависимости от объема промывных вод.

а и б — носители на основе аминсилохрома и силохрома соответственно.

Таблица 3

Динамика содержания холестерина при пропускании плазмы крови через колонку с сорбентом дигитонин — аминсилохром

Исходная концентрация холестерина (мг%)	Время циркуляции, мин					
	5		15		30	
	Д	П	Д	П	Д	П
300	274	266	248	214	204	194

Примечание. Условия опыта: объем колонки 50 мл, объем циркулирующей плазмы 200 мл, объемная скорость потока через колонку 50 мл/мин, масса сорбента в колонке 20 г. Д и П — соответственно концентрация холестерина на входе в колонку и на выходе из нее.

Соотношение дигитонин/аминсилохром во всех случаях соответствовало 1:20, так как было показано, что это соотношение является оптимальным. При увеличении количества аминсилохрома в 2 раза, активность полученного сорбента уменьшалась в 2 раза, а при уменьшении аминсилохрома оставалась без изменений.

Была проверена также возможность повторного использования окислительной реакционной смеси для модификации аминсилохрома. Однако полученный таким образом сорбент не связывал холестерин.

Изучение возможности повышения активности сорбента дигитонин — аминсилохром путем удаления аффината с поверхности носителя и использования более длинной «ножки», связывающей эти 2 компонента, не дало положительных результатов. При обработке аминсилохрома глутаровым альдегидом и последующей конденсацией полученного продукта с 1,4-тетраметиленадиамином расстояние активной аминогруппы от поверхности носителя увеличивается на 8 звеньев, однако приготовленный таким образом и введенный во взаимодействие с окислительной смесью носитель оказался неактивным по отношению к холестерину.

Полученный модифицированный носитель для аффинной хроматографии был испытан в качестве селективного сорбента на холестерин. Результаты статических испытаний показали, что данный образец обладает способностью связывать из сыворотки 10 мг холестерина на 1 г сорбента. Полученные показатели динамических испытаний представлены в табл. 3. Из табл. 3 видно, что сорбционная способность образца наиболее высока в первые 15 мин работы колонки и практически исчезает к 30-й минуте. Это может свидетельствовать, с одной стороны, о высокой специфичности сорбента, с другой — о его быстрой насыщаемости. Расчеты ДООК и УЭС (равные соответственно 270 мг и 13,5 мг/г) свидетельствуют в пользу первого предположения.

Поскольку угольные сорбенты позволяют извлекать из плазмы крови не более 3 мг холестерина на 1 г носителя, можно считать, что создан достаточно селективный по холестерину сорбент. Перспективность его применения в экспериментальной и клинической практике для дехолестеринизации биологических жидкостей будет зависеть от дальнейших испытаний сорбента на цельной крови и лабораторных животных.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Thompson G. R., Lowenthal R., Myant N.* — *Lancet*, 1975, v. 1, p. 1208.
2. *Климов А. Н., Петрова-Маслакова Л. Г., Хечинашвили Г. Г. и др.* — *Кардиология*, 1978, № 6, с. 23—29.
3. *Физер Л., Физер М.* *Стероиды*. М., 1964, с. 42.
4. *Березин И. В., Антонов В. К., Мартинек К.* — В кн.: *Иммобилизованные ферменты*. М., 1976, т. 1, с. 106.
5. *Webster D.* — *Clin. chem. Acta*, 1962, v. 7, p. 277.
6. *Лопухин Ю. М., Молоденков М. Н.* *Гемосорбция*. М., 1978.

Поступила 7/II 1980 г.

#### AFFINITY CHROMATOGRAPHY IN ELIMINATION OF CHOLESTEROL

*I. V. Beresin, Yu. M. Lopukhin, I. P. Andrianova, Ya. I. Lapuk, L. B. Alexeeva, V. I. Sergienko, E. A. Borodin, E. M. Khalilov, A. I. Archakov*

*N. I. Pirogov* II Medical School, *M. V. Lomonosov State University*, Moscow

Elimination of cholesterol from physiological fluids was carried out by means of affinity chromatography using digitonine as an affinity agent. For this purpose a method of covalent binding of digitonine with aminosylochrome was developed. The most suitable conditions for production of the stable sorbent specific for cholesterol are described. The ratio of concentrations of digitonine to sodium periodate was 1 : 2; oxidation was performed in a medium containing 50% aqueous dioxane within 1.5 hrs. The modified sorbent, used for affinity chromatography of cholesterol, possessed a specific capacity of 10 mg/g.

## ВЛИЯНИЕ РЯДА ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ТЕЧЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПАРОТИТА

Кафедра хирургической стоматологии Одесского медицинского института им. Н. И. Пирогова, лаборатория биохимии Одесского научно-исследовательского института стоматологии

При гнойно-травматическом паротите у белых крыс благоприятное влияние оказывают местное введение ингибитора протеаз и внутримышечное введение трипсина. При этом снижается отек околоушной железы, увеличивается содержание в ней белка и  $\alpha$ -амилазы. Механизм лечебного действия этих препаратов заключается, по-видимому, в торможении эндогенного протеолиза, уровень которого при паротите возрастает. Введение комплекса антимикробных ферментов (лизоцим, РНК-аза, ДНК-аза) не оказывает существенного влияния на изученные показатели околоушной железы.

Ферменты нашли широкое применение в медицине в качестве лекарственных средств [1—6]. Однако при заболеваниях слюнных желез их применение крайне ограничено. Имеются единичные сообщения об использовании протеолитических ферментов для промывания выводных протоков слюнных желез при их воспалении [7] и ингибиторов протеаз при лечении больных с тяжелыми формами неэпидемического паротита [8].

Целью настоящего исследования явилось определение характера влияния ряда ферментных препаратов, применяемых в медицине, на состояние и некоторые биохимические показатели околоушной железы при экспериментальном гнойно-травматическом паротите.

### М е т о д ы

Опыты проведены на 119 белых крысах в возрасте 3—4 мес. 34 из них составили контрольную группу. У остальных животных воспроизводили гнойно-травматический паротит. Под эфирным наркозом производили разрез кожи и подкожной клетчатки по линии, соединяющей нижний край ушной раковины с углом рта, длиной 1—1,5 см. Околоушную железу выделяли из фасции и захватывали специальным пинцетом (зазор между браншами 0,5—0,8 мм), с помощью которого производили 3 сдавливания, каждое продолжительностью 10—12 с. После этого в ткани железы вводили 0,05 мл профильтрованной каловой взвеси, которую готовили ex tempore путем растирания 1 г свежевыделенного кала крысы с 9 мл физиологического раствора; суспензию фильтровали через 4 слоя марли. Рану наглухо зашивали.

Было изучено лечебное действие следующих ферментных препаратов: трипсина кристаллического (фирма «Srofa», ЧССР), лизоцима, перекристаллизованного три раза (фирма «Реахим» Олайна), рибонуклеазы кристаллической из поджелудочной железы крупного рогатого скота (фирма «Reanal», Венгрия), ДНК-азы панкреатической (Ленинградский завод ферментных препаратов), ингибитора трипсина (препарат контрикал, ГДР). Все эти препараты растворяли в растворе антибиотиков следующего состава: бензилпенициллин — 500 000 ЕД, стрептомицина сульфат — 0,5 г, мономицин — 0,5 г в 250 мл дистиллированной воды. Трипсин растворяли в растворе антибиотиков в количестве 0,5 мг/мл и вводили 2 раза в сутки внутримышечно по 0,5 мл. В другой группе крысам с экспериментальным паротитом вводили ингибитор протеаз, растворенный в растворе антибиотиков концентрации 2000 ЕД/мл, по 0,5 мл 2 раза в сутки в область околоушной железы методом чрескожной пункции. Лизоцим, РНК-азу и ДНК-азу вводили вместе в растворе антибиотиков в следующей концентрации (в мг/мл): лизоцим — 5, РНК-аза — 1, ДНК-аза — 1. Раствор этих ферментов вводили внутримышечно 2 раза в день по 0,5 мл. В одной опытной группе крысам вводили раствор ингибитора внутримышечно в тех же дозах, что и при местном введении. Часть подопытных крыс получали внутримышечные инъекции раствора антибиотиков (0,5 мл 2 раза в сутки).

Лечение животных начинали сразу после воспроизведения заболевания и забивали спустя 12 ч после заключительной инъекции. Животных умерщвляли под легким эфирным наркозом путем тотального кровопускания из сердца через 24 ч, 3 и 7 сут после воспроизведения заболевания; околоушные железы извлекали и взвешивали на торзионных весах. Гомогенат околоушных желез готовили путем растирания навесок железы с толченым стеклом и последующего суспендирования в дистиллированной воде из расчета 20 мг ткани на 1 мл. Гомогенаты центрифугировали в рефрижераторной центрифуге при 2500 г в течение 15 мин при 4 °С. Для исследования использовали на-

досадочную жидкость, в которой определяли концентрацию белка методом Лоури, активность  $\alpha$ -амилазы йодокрахмальным микрометодом Смита и Роя в модификации А. П. Левицкого и др. [9]. Активность кислой РНК-азы определяли спектрофотометрически [10], казеинолитическую активность — по расщеплению казеина при pH 7,6 методом Кунитца в модификации А. П. Левицкого [11], активность катепсинов pH 3,5 — несколько модифицированным гемоглобиновым методом Ансона [11], активность кислой фосфатазы — спектрофотометрическим микрометодом Бессея в модификации А. П. Левицкого и соавт. [12]. Статистическую обработку результатов проводили по Стьюденту [13].

## Результаты и обсуждение

Через 1 сут после воспроизведения гнойно-травматического паротита масса околоушной железы возрастала почти в 2 раза (рис. 1). Как показало гистологическое исследование, увеличение околоушной железы проис-

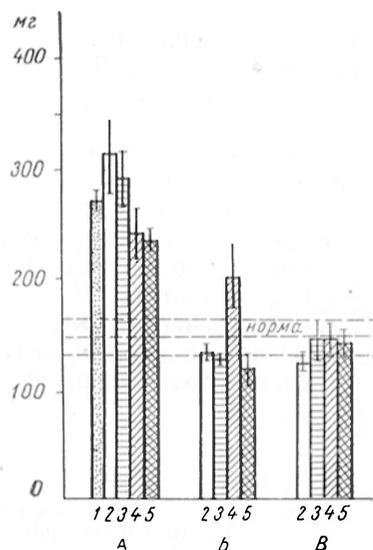


Рис. 1. Влияние ферментов на массу околоушной железы крыс при гнойно-травматическом паротите.

Здесь и на рис. 2—4: 1 — без лечения; 2 — введение антибиотиков; 3 — введение антимикробных ферментов с антибиотиками; 4 — введение трипсина с антибиотиками; 5 — введение ингибитора протеаз с антибиотиками. А — 1-е сутки; Б — 3-и сутки; В — 7-е сутки.

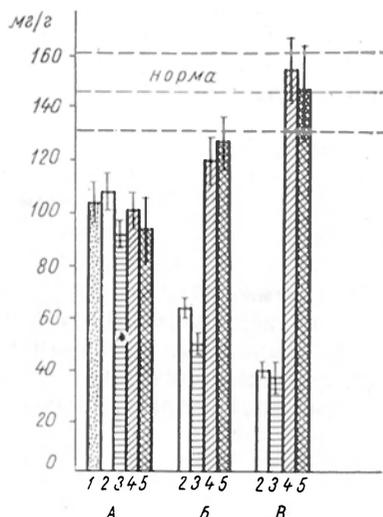


Рис. 2. Влияние ферментов на содержание белка в околоушной железе крыс при гнойно-травматическом паротите.

ходило главным образом за счет отека и кровоизлияний. Введение антибиотиков или антимикробных ферментов существенно не влияло на массу пораженной железы.

Напротив, введение трипсина вызвало четкую тенденцию к снижению массы железы ( $P > 0,05$ ), а ингибитор протеаз обуславливал статистически достоверное уменьшение размеров околоушной железы, вызванное, по-видимому, ослаблением отечной реакции. Через 3 сут масса околоушной железы возвращалась к норме и на 7-е сутки оставалась на этом уровне.

Через 1 сут после воспроизведения паротита концентрация белка в железе резко снижалась (рис. 2) и оставалась сниженной при введении антибиотиков или ферментных препаратов и их ингибиторов. Лишь внутримышечные инъекции трипсина и местное введение ингибитора протеаз нормализовали данный показатель. Можно предполагать, что ингибиторы протеаз либо усиливают биосинтез белка, либо, что более вероятно, уменьшают скорость его распада под действием эндогенных внутриклеточных протеаз. Что же касается аналогичного действия дистантно вводимого трипсина, то, как мы показали ранее [14], организм реагирует на него повышением уровня эндогенных ингибиторов.

Сходным с изменениями концентрации белка был характер изменения активности  $\alpha$ -амилазы (рис. 3). Правда, через 1 сут после воспроизведения

заболевания она лишь проявляла тенденцию к снижению, но на 3-и и 7-е сутки достоверно и резко снижалась. Введение ферментных препаратов в 1-е сутки заболевания достоверно снижало амиллитическую активность околушной железы. С 3-х суток наблюдались значительные различия в действии ферментных препаратов: антимикробные ферменты мало влияли на сниженную активность  $\alpha$ -амилазы околушной железы, тогда как трипсин и ингибиторы протеаз достоверно повышали ее. На 7-е сутки различия в действии ферментов проявлялись еще резче.

Развитие гнойно-травматического паротита сопровождалось значительным повышением активности протеолитических ферментов околушной железы. Казеиолитическая активность через 1 сут от начала заболе-

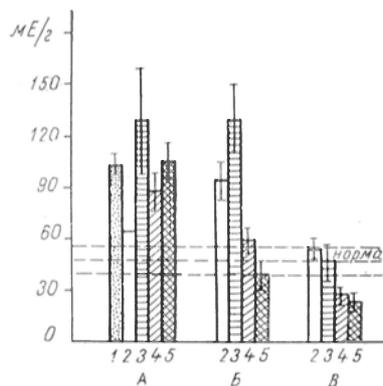


Рис. 3. Активность  $\alpha$ -амилазы в околушной слюной железе при гнойно-травматическом паротите

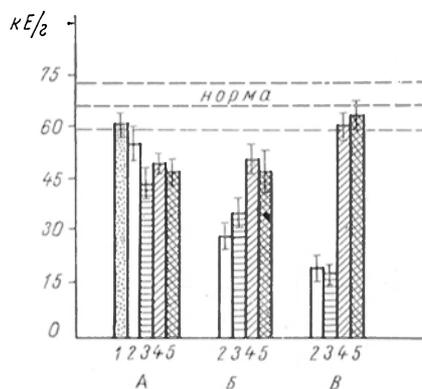


Рис. 4. Влияние ферментов на казеиолитическую активность в околушной слюной железе при гнойно-травматическом паротите.

вания повысилась более чем вдвое (рис. 4). Антибиотики достоверно снижали ее, тогда как ферментные препараты не оказывали на нее существенного влияния. На 3-и сутки казеиолитическая активность не снижалась при введении антибиотиков либо комплекса антимикробных ферментов и полностью нормализовалась после введения трипсина или его ингибитора. На 7-е сутки протеолитическая активность железы возвращалась к норме у крыс, леченных антибиотиками или антимикробными ферментами, и резко (почти вдвое по сравнению с нормой) снижалась при введении трипсина или ингибитора. Эти данные подтверждают нашу точку зрения о влиянии ингибиторов протеаз на уровень белка в ткани путем торможения эндогенного протеолиза.

Развитие гнойно-травматического паротита сопровождалось активацией катепсинов рН 3,5 (см. таблицу), тогда как другие лизосомальные ферменты (кислая фосфатаза, кислая РНК-аза) существенно не изменялись. Проводимое лечение во всех случаях существенно снижало активность катепсинов рН 3,5, хотя и не до нормы. Интересно отметить, что активность кислой фосфатазы достоверно повышалась при введении трипсина и так же достоверно снижалась при введении ингибитора. Активность кислой РНК-азы при паротите мало изменялась, однако повышалась при введении антибиотиков и (особенно) трипсина. Напротив, введение антимикробных ферментов и ингибитора протеаз достоверно снижало активность кислой РНК-азы в ткани околушной железы крыс, что обусловлено, по всей видимости, уменьшением концентрации белка.

Заслуживающие внимания данные получены нами при различных способах введения ингибитора протеаз. Внутримышечное или местное введение ингибитора в одинаковой степени снижает массу околушной железы, концентрацию белка и катептическую активность. В то же время активность  $\alpha$ -амилазы в меньшей степени снижается при местном введении, чем при дистантном, а казеиолитическая активность больше повышается при по-

## Влияние энзимотерапии на активность лизосомальных ферментов в ткани околушной железы крыс при гнойно-травматическом паротите (через 1 сут)

Условия эксперимента	Катепсины рН 3,5		Кислая фосфатаза		Кислая РНК-аза	
	мЕ/г	мЕ на 1 мг белка	мЕ/г	мЕ на 1 мг белка	Е/г	Е на 1 мг белка
Интактные животные	156±9,3	1,28±0,09	1211±102	9,33±0,75	27,7±1,5	0,15±0,01
Гнойно-травматический паротит:						
без лечения	342±25,0	3,40±0,26	1325±85,2	12,8±1,40	20,4±1,8	0,20±0,03
<i>P</i>	<0,001	<0,001	>0,5	>0,05	>0,6	>0,1
антибиотики	228±19,3	2,18±0,27	1350±198	12,5±1,00	22,3±1,7	0,21±0,02
<i>P</i>	<0,001	<0,001	>0,5	<0,05	>0,7	<0,01
<i>P</i> <sub>1</sub>	<0,001	<0,001	>0,9	>0,9	>0,4	>0,8
антимикробные ферменты и антибиотики	257±76,7	3,02±0,98	1400±80,0	15,5±1,30	15,8±1,6	0,17±0,01
<i>P</i>	>0,2	>0,05	>0,1	<0,001	<0,05	>0,05
<i>P</i> <sub>1</sub>	>0,3	>0,7	>0,5	<0,001	>0,05	>0,2
трипсин и антибиотики	270±17,6	2,75±0,25	1650±112	16,5±0,94	24,3±2,8	0,25±0,03
<i>P</i>	<0,001	<0,001	<0,01	<0,001	>0,5	<0,01
<i>P</i> <sub>1</sub>	<0,05	>0,05	<0,05	<0,01	>0,1	>0,2
ингибитор протеаз и антибиотики	221±39,5	2,36±0,33	800±116	9,00±1,00	13,6±1,6	0,16±0,02
<i>P</i>	>0,2	<0,05	<0,05	>0,7	<0,001	>0,5
<i>P</i> <sub>1</sub>	<0,05	<0,05	<0,001	<0,05	<0,02	>0,3

Примечание. Достоверность различий: *P* — с интактными животными, *P*<sub>1</sub> — с крысами «без лечения».

следнем способе. Это свидетельствует о том, что в оценке лечебного действия препарата немаловажное значение имеет не только его доза, но и способ введения.

Таким образом, проведенные исследования показали, что наиболее благоприятное действие на ткань околоушной железы (уменьшение отека, увеличение накопления белка и  $\alpha$ -амилазы) оказывает ингибитор протеаз, вводимый местно, или трипсин, вводимый дистантно. Механизм лечебного действия этих препаратов, по-видимому, заключается в торможении эндогенного протеолиза, играющего важную роль в патогенезе воспаления [15] и регуляции ряда биологических функций клетки [16]. Антимикробные ферменты (лизоцим, РНК-аза, ДНК-аза) при гнойно-травматическом паротите неэффективны.

Полученные данные можно использовать в клинике при назначении ферментов с лечебной целью у больных с воспалительными заболеваниями околоушных желез.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Биохимические методы исследования в клинике. Под ред. А. А. Покровского. М., 1969.
2. Протеолитические ферменты в гнойной хирургии. /Стручков В. И., Григорян А. В., Гостищев В. К. и др. М., 1970.
3. *Веремеенко К. Н.* Ферменты протеолиза и их ингибиторы в медицинской практике. Киев, 1971.
4. *Веремеенко К. И.* Кининовая система. Киев, 1977.
5. *Вольф М., Рансбергер К.* Лечение ферментами. М., 1976.
6. *Мосс Д. У., Баттервоорт П. Д.* Энзимология и медицина. М., 1978.
7. *Клментов А. В.* Болезни слюнных желез. Л., 1975.
8. *Сакович А. А.* Материалы к лечению неэпидемических паротитов. (Экспериментальное и клиническое исследование). Автореф. дис. канд. Л., 1976.
9. *Левицкий А. П., Коновец В. М., Марченко А. И.* — Физиол. ж., 1973, № 6, с. 819—823.
10. *Коновец В. М., Левицкий А. П.* — Укр. біохім. ж., 1973, № 4, с. 453—456.
11. *Левицкий А. П.* Пищеварительные ферменты слюнных желез. Дис. докт. Одесса, 1973.
12. *Левицкий А. П., Марченко А. И., Рыбак Т. Л.* — Лабор. дело, 1973, № 10, с. 624—625.
13. *Монцевицоте-Эрингене Е. В.* — Пат. физиол., 1964, № 4, с. 71—78.
14. *Левицкий А. П., Варава Г. Н., Коваленко А. Ф.* и др. — В кн.: Украинский биохимический съезд. 3-й. Тезисы симпозиальных докладов. Донецк, 1977, с. 116—117.
15. *Arrigoni-Martelli E., Restelli A.* — Europ. J. Pharmacol., 1972, v. 18, p. 191—198.
16. *Локишина Л. А.* — Успехи биол. химии, 1977, т. 18, с. 162—184.

Поступила 16/IV 1979 г.

#### EFFECT OF SEVERAL ENZYMATIC PREPARATIONS ON EXPERIMENTAL PAROTIDITIS

*A. P. Levitsky, A. F. Kovalenko*

N. I. Pirogov Medical School, Research Institute of Stomatology, Odessa

Increase in the weight of rat parotid glands, decrease in the protein concentration and the activity of  $\alpha$ -amylase with simultaneous activation of the proteolytic enzymes (caseinolytic activity at pH 7.6, activity of cathepsins at pH 5.5) were observed in pyotraumatic parotiditis. Local administration of the protease inhibitor (contrical) or intramuscular treatment with trypsin showed the positive medical effect — decrease of the gland weight, increase in the protein concentration and in the  $\alpha$ -amylase activity together with lowering in the activity of proteinases. Intramuscular administration of antimicrobial enzymes (lysozyme, RNase, DNAase) did not affect the pyotraumatic parotiditis. Application of proteolytic enzymes or their inhibitors is recommended for clinical treatment of parotidites.

УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ, ПОМЕЩЕННЫХ В 1980 ГОДУ В ЖУРНАЛЕ  
«ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ»

- Абдуллаев Р. А., Эмирбеков Э. З. Содержание свободных аминокислот в мозге при гипотермии и в разные сроки постгипотермического периода. 6, 802—808.
- Абиев Г. А., Поталенко А. Я., Бабаев А. З. Механизм фотохимического взаимодействия 8-метоксиборалена с ДНК: образование флюоресцирующих циклоаддуктов. 3, 328—331.
- Авхутская Г. С., Мотавкина Н. С. Изменение состава неэстерифицированных жирных кислот Шигелл Флекснера № 15172 тип 3а в процессе пассирования на развивающихся куриных эмбрионах. 1, 23—30.
- Альшанский А. М., Иванов В. В., Промыслов М. Ш. Влияние акрилонитрила на уровень  $\gamma$ -аминомасляной кислоты, активность глутаматдекарбоксилазы и перекисное окисление липидов в головном мозге крыс. 4, 507—509.
- Анненков Г. А., Сафронова Е. Е., Губерничева Л. М., Волкова Н. М. Обнаружение фенилаланингидроксилазной активности в лейкоцитах и фибробластах человека. 6, 723—726.
- Апросин Ю. Д., Алексеева В. К., Афонин П. И. Исследование кинетики насыщения кислородом эмульсий фторуглеродов. 6, 793—799.
- Арбузов В. А., Кречетова Г. Д. Ядерноцитоплазматический транспорт мРНК в клетках печени и гепатомы крыс при подавлении белкового синтеза циклогексимидом. 3, 354—361.
- Арбузов В. А., Кречетова Г. Д. Смена механизмов, контролирующих стабильность мРНК, в процессе регенерации печени крыс. 4, 517—525.
- Афонин Н. И., Доронина Н. Н., Смелова О. С., Иванова Н. Л., Путяткина Т. К. Изменение активности лактатдегидрогеназы и содержания молочной и пировиноградной кислот в крови и тканях животных после внутривенного введения эмульсий перфтортрибутиламина. 2, 185—187.
- Бадрутдинов М. Г., Мартынов А. П. Энергетический обмен при непеченочном холестазах. 3, 385—387.
- Базанов Е. А., Герасимова Е. Н., Озерова И. Н., Бежанян М. В., Сучкова С. Н., Бодрова Е. А., Шальнов А. И. Показатели обмена коллагена, содержание липидов, циклического 3',5'-АМФ и некоторых гормонов в плазме крови мужчин 40—59 лет. 4, 464—470.
- Барышевская Г. Д., Михнева Л. М., Усова Ю. И. Диск-электрофорез белков плазмы крови и растворимых белков мозга при синдроме Дауна. 4, 480—484.
- Бейер Е. М., Видершайн Г. Я. Индивидуальные различия изоферментного спектра  $\alpha$ -L-фукозидазы человека. 4, 538—539.
- Белоченко Д. И., Капустин А. В., Калинин М. Н., Кайкова В. М. Влияние алкоголя на липидный состав различных отделов миокарда и плазмы крови человека. 1, 66—71.
- Бельченко Д. И., Голованов С. А., Доманский В. Ю., Ханина Н. Я., Антонова Л. А. Липидный состав, активность и изоферментный спектр некоторых ферментов лимфоидных клеток и влияние на них гидрокортизона. 2, 236—239.
- Бенюл Е. А., Матвеев Ю. А., Кулакова С. Н. Об усвояемости различных жирных кислот в пищеварительном тракте больных с синдромом нарушенной абсорбции вследствие обширных резекций тонкой кишки. 3, 381—384.
- Бем М., Гос Х., Краузе Е.-Г., Волленбергер Б., Цирцинский Г., Рабици Г., Пфайфер К., Волленбергер А. Активность гликогенфосфорилазы в пораженных и не пораженных инфарктом участках миокарда человека после смерти. 1, 37—41.
- Блажевич П. В., Фернандес Р., Исаева В. А., Переверзева О. Г., Алексеева И. А., Поздняков А. Л., Спиричев В. Б. Влияние  $1\alpha$ -оксихолекальциферола и различного потребления фосфора на минеральный обмен при хронической почечной недостаточности. 1, 13—23.
- Блинова Т. В., Косых А. А., Солопаева И. М. Влияние катепсина D и кислотной фосфатазы лизосом на катаболизм коллагеновых белков в цирротически измененной печени в условиях стимуляции регенерации хориогонином. 3, 410—415.
- Брайловская И. В., Александрова А. Е., Слепнева Л. В. Влияние острой гипоксической гипоксии на дыхание митохондрий печени крыс. 4, 435—438.
- Быстрова И. М., Манойлов Ю. С. Хроматографический анализ гемина, выделенного из эритроцитов крови гематологических больных. 1, 97—99.
- Бышевский А. Ш., Галян С. Л. Влияние ингибиторов синтеза белка на вызываемое викасомом изменение содержания термостабильного антифактора Ха в сыворотке крови. 1, 85—88.
- Васильев В. Н. Влияние пробы с 0,1 г L-ДОФА на динамику экскреции с мочой катехоламинов и ДОФА у больных шизофренией. 6, 782—786.
- Векслер Я. И., Магомедова К. М. Активность аспарат-аминотрансферазы в головном и спинном мозге при острой и хронической алкогольной интоксикации. 4, 438—442.
- Векслер Я. И., Магомедова К. М., Луговой В. М. Особенности азотистого обмена в головном и спинном мозге при тяжелой физической работе у животных в состоянии хронической алкогольной интоксикации. 6, 746—750.
- Виноградов В. В., Струмило С. А. Регуляция активности дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата в печени крыс инсулином и гидрокортизоном. 2, 169—174.
- Воронков Г. С. Содержание креатина, креатинфосфата и активность креатинфосфокиназы в сердце собак с ограничением коронарного кровотока. 2, 203—206.

- Воскобов А. И., Лучко В. С.* Выделение и радиометрический метод определения активности АТР: тиаминдифосфатфосфотрансферазы из печени крыс. 4, 564—568.
- Габитов М. М., Карагезян К. Г.* Влияние экзогенной супероксиддисмутазы на перекисное окисление липидов в гомогенатах тканей при гипероксии. 5, 646—650.
- Габриэлян П. И., Арапова О. И., Башикина Л. В., Емец В. И., Деревянко В. П., Могирева И. А., Шкурко В. И., Шальнев Б. И., Гальперин Э. И.* Особенности биологической активности ишемизированной ткани печени. 3, 302—305.
- Геворкян Э. С.* Связывание гидрокортизон-рецепторного комплекса с разными группами негистоновых белков. 5, 656—659.
- Герасимова Е. П., Торховская Т. И., Озерова И. П., Халтаев Н. Г., Метельская В. А.* Жирнокислотный состав липопротеинов высокой плотности при гиперальфалипотеидемии. 5, 650—656.
- Голицгорский М. С., Даценко З. М., Волков Г. Л.* Влияние эстрогенов и андрогенов на кишечный транспорт кальция при экспериментальной хронической почечной недостаточности. 4, 449—451.
- Голиков П. П., Бобков А. И., Бобкова А. С., Енелеев Р. Х.* Специфический рецептор глюкокортикоидов в цитозоле печени человека. 2, 248—252.
- Головенко Н. Я., Метешкин Ю. В., Якубовская Л. П.* Исследование каталитических свойств монооксигеназ, окисляющих <sup>14</sup>C-феназепам. 5, 637—640.
- Горбач З. В., Островский Ю. М., Магальш С. С., Бородинский А. Н.* Метаболитные эффекты, связанные с ингибированием транскетолазы. 5, 608—612.
- Голубев В. П., Козельцев В. Л., Силаева С. А.* Структура и биосинтетические функции митохондриальных фракций печени крыс. 3, 312—318.
- Григорьева О. С., Корукова А. А., Гурвич А. Е.* Изменение проницаемости мембран при быстром увеличении плотности суспензии лимфоидных клеток. 2, 179—185.
- Гриценко Э. А., Воскобов А. И.* Проницаемость и депонирование тиамин и его пирофосфорного эфира в животном организме. 4, 534—538.
- Гроздова М. Д., Григорович Ю. А., Зубовская А. М., Мирошниченко В. П., Шарлова И. Л.* Аденилатциклазная система и транспорт кальция в сердечной мышце кроликов в норме и при аллергическом повреждении. 3, 415—421.
- Гроздова М. Д., Панасюк А. Ф., Шарлова И. Л.* Влияние 17 $\beta$ -эстрадиола на потребление кальция культурой фибробластов кожи человека. 4, 452—454.
- Грозина А. А., Уласевич И. И.* Активность ферментов эритроцитов при D-гипервитаминозе. 3, 345—347.
- Гроховский Л. П., Гайворонский Г. И., Кижель Т. П.* Изменение состава костной ткани позвоночника при экспериментальном сколиозе. 1, 92—97.
- Груздва К. П., Антифьева Б. А., Елисеева В. П., Мухихина С. В.* Фосфолипидный состав, перекисное окисление и активность некоторых ферментов органоидов гепатоцитов при алкогольной интоксикации. 2, 165—169.
- Гудошников В. И., Комолов И. С., Федотов В. П.* Изучение роли кальция и калия в регуляции освобождения пролактина и соматотропного гормона в культуре клеток аденогипофиза крысы. 4, 525—528.
- Гукасян И. А., Кованов Вал. В., Хилькин А. М., Шмелев И. А.* Исследование белков системы комплемента у больных в остром периоде инфаркта миокарда. 3, 362—365.
- Гусев В. А., Брусов О. С., Панченко Л. Ф.* Супероксиддисмутаза — радиобиологическое значение и возможности (обзор). 3, 291—301.
- Данилов В. Б., Винокурова Т. И., Тарасов В. В., Завгородняя С. В.* Влияние фурановых соединений на перекисное окисление липидов печени крыс. 4, 470—472.
- Денисов В. М.* Активность некоторых ферментов гликолитического и пентозомонофосфатного путей превращения углеводов в сердце при его гипертрофии. 1, 51—55.
- Джея П. П., Толейкис А. И., Прашкявичюс А. К.* Влияние экспериментального инфаркта миокарда на скорость окисления сукцината и активность сукцинатдегидрогеназы в митохондриях сердца. 5, 591—594.
- Джея П. П., Толейкис А. И., Прашкявичюс А. К.* Влияние экспериментального инфаркта миокарда на скорость окисления НАД $\cdot$ Н и 3-оксибутирата в митохондриях сердца. 6, 731—735.
- Есырев О. В., Даниленко М. П.* Появление чувствительности Na, K-АТФ-азы мозга к ацетилхолину после тепловой обработки мембранных препаратов. 6, 778—781.
- Зайденберг М. А., Короткина Р. П., Носова И. М., Дудникова Г. П., Писаржевский С. А., Карелин А. А.* Влияние введения цГМФ на некоторые метаболические процессы в тканях раны крыс. 6, 770—774.
- Збарский И. Б., Перевощикова К. А., Филатова Л. С., Попова В. С.* Белковый состав и электронная микрострукция фракции остаточного белка клеточных ядер некоторых нормальных органов и опухолей крыс. 3, 406—410.
- Иванова А. С., Архипова О. Г., Купина Л. М., Павловская Л. В.* Роль свободнорадикальных окислительных реакций в патогенезе силикоза. 5, 595—598.
- Иващенко А. Т., Бушнев И. А., Утеулин К. Р.* Изменения активности и аденозинтрифосфатаз печени и миокарда голодающих крыс. 3, 306—308.
- Иващенко А. Т.* Некоторые свойства аниончувствительной АТФ-азы эритроцитов. 5, 668—671.
- Казакова О. В., Локишина Л. А., Тарханова И. О., Орехович В. Н.* Иммунохимические исследования катепсинов D человека. 1, 114—117.
- Калашников В. В., Васильев М. Ю., Тартинов Ю. С.* Иммунохимическая идентификация антигенных детерминант эмбрионального преальбумина (ЗПА-1). 3, 421—425.

- Кальнев В. Р., Рачкус Ю. А., Канопкайте С. И. Метилкобаламинзависимое метилирование белков при малигнизации. 5, 660—663.
- Карапетян Л. А., Григорян Л. А., Геворкян Г. А., Александян С. С., Галоян А. А. Влияние нейроромона С и гексапептида на включение меченых аминокислот в белков различных органов. 2, 201—203.
- Карелин А. А. Связь стимулируемого инсулином исчезновения неорганического фосфата *in vitro* с действием инсулина на накопление креатина в плазматических мембранах из скелетных мышц крысы. 2, 220—227.
- Киреев М. М., Конвай В. Д., Корпачев В. Г. Нуклеотидный фонд головного мозга крыс в восстановительном периоде после реанимации. 2, 158—162.
- Киселева И. П., Лапин И. П., Прахье И. Б., Самсонова М. Л. Различное влияние кинуренинов на триптофанпирролазную активность печени крыс. 4, 458—461.
- Коваленко А. Ф., Левицкий А. П. Влияние калликреиноподобного фермента саливаина на течение остроо экспериментального паротита. 6, 750—752.
- Кожанова С. В., Басенова А. Т., Бузурбаев Г. Г. Влияние некоторых нитрофурановых производных на потребление кислорода митохондриями печени крыс. 5, 605—608.
- Козельцев В. Л., Голубев В. П., Володина Т. В. Защитная роль фосфолипидов при энзиматической деградации белков митохондриальных мембран. 5, 680—685.
- Коляда А. Ю., Кобляков В. А., Паньшин О. А., Карамышева А. Ф., Сенницкая Л. В. Состояние монооксигеназной ферментной системы при хроническом введении диэтилнитрозамина. 1, 47—51.
- Кондрашин А. А., Березов Т. Т. Особенности реконструкции цитохромоксидазы липидами митохондрий печени и гепатомы 27. 3, 334—339.
- Конопля А. И., Конопля Е. Н., Гилев В. А. О влиянии тиаминна на формирование иммунного ответа, индуцированного однократной или трехкратной инъекцией антигена. 4, 489—492.
- Константинов Ю. М., Филиппова С. И., Вавилин В. А., Панов А. В., Ляховиц В. В. Изменения окислительного фосфорилирования в митохондриях печени крыс при развитии холестаза. 4, 498—502.
- Конь И. Я., Натансон А. О. Механизм транспорта витамина А: клеточная рецепция ретинола и внутриклеточные белки, связывающие витамин А (обзор). 1, 3—12.
- Конь И. Я., Темиркулова Р. С., Ширна Л. И. Исследование стабильности мембран митохондрий и лизосом при введении избыточных доз витамина А *in vivo*. 4, 528—534.
- Конь И. Я., Валакина Т. И., Темиркулова Р. С., Лаурова Н. В. Активность некоторых ферментов катаболизма гликопротеидов в органах крыс при гипергиповитаминозе А. 5, 704—711.
- Коровакин Б. Ф., Государский В. И., Зайцева К. К., Иван Б. А., Ипатова Л. П., Кожмякин Л. А., Мамоданова Г. И., Финогенов Ю. С., Филов В. А. Лигосомы и цАМФ в стабилизации мембран лизосом. 3, 403—406.
- Кочерга В. И., Опентанова И. Л. Одновременная экстракция и флюориметрическое определение порадrenalина, дофамина, серотонина и 5-оксииндолуксусной кислоты в отдельных небольших участках мозга. 1, 81—85.
- Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А., Григорова Е. А. Взаимодействие гепарина с фибринмономером и комплексом фибринмономер — фибриноген. 3, 318—321.
- Лазымова З. А., Лилицкая Г. Л., Леонтьева Н. А., Галегов Г. А. Действие ремантадина на синтез вирусспецифических полипептидов в культуре клеток, инфицированных вирусом Синдбис. 5, 677—679.
- Левин Г. С., Каменецкая Ц. Л., Дрегерис Я. Я., Фрейманис Я. Ф. Влияние некоторых 1,4-нафтохинонов на липолиз при геморрагическом шоке. 5, 616—620.
- Левицкая Ю. В., Некрасова А. А., Рабен Н. А. Метод определения простагландинов в моче. 4, 557—561.
- Левицкий Е. Л. Возрастные особенности репликации ДНК в селезенке белых крыс. 4, 509—512.
- Лемонджава Н. И., Труфанов А. В. Активность креатинфосфокиназы, АСТ и АЛТ в сыворотке крови при некоторых видах инфекционной патологии обезьян. 6, 727—730.
- Лемшико В. В., Калиман П. А. Возрастные особенности действия тироксина на содержание цитохромов в митохондриях печени и массу тела крыс. 5, 632—636.
- Лифшиц Р. И., Рябинин В. Е., Чарная Л. Ф., Вальдман Б. М., Ефименко Г. П. Влияние низкомолекулярных пептидов из крови обожженных собак на функциональное состояние нитактных митохондрий печени мышей. 1, 63—66.
- Логинов А. С., Приваленко М. И., Белокопытова М. В. Исследование изофермента N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы печени и сыворотки крыс в норме и при остром отравлении четыреххлористым углеродом. 6, 800—802.
- Лосева Л. А., Дегтярь В. Г., Исаченков В. А. Роль 5α-андростан-3β,17β-диола в осуществлении обратной связи между гонадами и гипоталамо-гипофизарной системой орхидэктомированных взрослых крыс. 3, 398—402.
- Луговой В. И., Кравченко Л. П. Влияние стероидных гормонов на стабильность изолированных лизосом в условиях замораживания. 5, 620—623.
- Лялков Б. Г., Гаппаров М. М. Транспорт фосфолипидов между субклеточными мембранами (Обзор). 5, 579—587.
- Мальцев А. В., Волкова И. П. Сравнительное гель-электрофоретическое исследование растворимых белков эндотелия и децидуальной ткани человека. 4, 442—446.
- Маргявичене Л. Э., Толейкис А. И., Жюжнис В. Я. Колебания концентрации холестерина и глюкозы в сыворот-

- ке крови человека в течение года. 2, 195—198.
- Марценюк О. В., Перова Н. В., Герасимова Е. Н., Твердислов В. А., Эль-Кардаги С.* Влияние липопротендов плазмы крови человека на ионную проводимость биологических липидных мембран. 4, 484—489.
- Матвеев В. П.* Биосинтез пиримидиновых нуклеотидов в нормальной и регенерирующей костной ткани. 2, 162—165.
- Меерсон Ф. З., Явич М. П.* Активность креатинфосфокиназы и соотношение ее изоформ в миокарде при адаптации сердца к длительной нагрузке. 5, 599—605.
- Меерсон Ф. З., Павлова В. И., Коробейникова Э. П.* Предупреждение стрессорных повреждений организма антиоксидантами и  $\beta$ -блокатором индералом. 6, 827—832.
- Мирзоян Р. А., Промыслов М. Ш.* Путресцин и полиамины в глиомах мозга человека и крысы. 3, 379—381.
- Михайлов В. В., Русанова А. Г.* К механизму изменения электролитного и углеводного обмена в подчелюстной слюнной железе при экспериментальном ботулизме у крыс. 1, 99—104.
- Михайлов В. В., Чикина Н. А., Белопольский А. А.* К механизму нарушения обмена гистамина в слюнной железе при экспериментальном ботулизме. 3, 347—350.
- Михайлов В. В., Яковлев В. Ф.* К механизму изменения содержания гликогена и активности лактатдегидрогеназы в дыхательных мышцах при экспериментальном ботулизме у крыс. 4, 473—475.
- Мищенко В. П., Гольденберг Ю. М., Новосельцева Т. В.* Изменения свертываемости крови и фибринолиза под влиянием антиоксиданта ионола. 6, 763—767.
- Морозов И. А., Спиричев В. Б., Фернандес Р. Р., Блажевич Н. В.* Ультраструктура энтероцитов двенадцатиперстной кишки крыс при различной обеспеченности витамином D. 6, 823—826.
- Наточин Ю. В., Маслова М. П., Казеннов А. М., Резник Л. В., Савина Г. В., Шахматова Е. И., Школьник Л. А.* Влияние адреналектомии на активность ферментов в тонких срезах и гомогенатах почки. 5, 627—632.
- Никитин Ю. П., Шакалис Д. А.* Карбоновые эстеразы и их изоэнзимы при экспериментальной гиперхолестеринемии. 5, 587—590.
- Никифорова А. А., Терюкова П. П., Чистякова А. М., Климов А. Н.* Об участии лецитин-холестерин-ацилтрансферазы в перераспределении подфракций липопротеидов высокой плотности в крови новорожденных. 1, 111—114.
- Никифоровская Л. Ф., Кононова А. Л., Иванова Л. Н.* Влияние солевой нагрузки и гидрокортизона на гликозаминогликаны почек белых крыс. 1, 58—62.
- Никульчева Н. Г., Солитернова И. Б., Криворученко И. В.* Активность липопротеидлипазы у больных ишемической болезнью сердца с различными типами гиперлипидемии на фоне жировой нагрузки. 6, 808—813.
- Обухлоа Г. Г.* Компоненты кининовой системы и ингибиторы протениназ сыноротки крови при геморрагическом лихорадке с почечным синдромом. 1, 118—120.
- Оглоблина О. Г., Платонова Л. В., Мясникова Л. В., Лившиц М. Б., Пасхина Т. С.* Активность протениназ гранулоцитов и уровень кислотостабильных ингибиторов протениназ в бронхиальном секрете детей с бронхонатиями различной этиологии. 3, 387—392.
- Озерова И. Н., Торховская Т. И., Пощеский В. А., Герасимова Е. Н.* Активность лецитин-холестерин-ацилтрансферазы и липидный состав подфракций липопротендов высокой плотности при гиперальфа-липопротеидемии. 3, 365—370.
- Оргель М. Я., Бондаренко Б. Н., Сокол А. С., Пленов Н. П., Шалимов С. А., Парпалей И. А., Радзиховский А. П., Земсков В. С., Полищук Л. В., Степченко С. П.* Сочетанная газовая и тонкослойная хроматография липидов в диагностике функциональной недостаточности печени. 4, 548—552.
- Орликов Г. А., Думеш Ф. Ю.* Методика диск-электрофореза белков желудочного сока человека в полиакриламидном геле. 4, 555—557.
- Орлов А. С.* Избирательная активация биосинтеза ДНК в почках крыс под влиянием этиленмина. 2, 232—236.
- Орлов Е. П.* Сравнительное содержание S-аденозил-L-метионина и S-аденозил-L-гомоцистеина в тканях некоторых экспериментальных опухолей в процессе их роста. 5, 699—704.
- Островский С. Ю., Садовник М. П.* Изменение фонда свободных аминокислот у крыс, предпочитающих воду или этанол, при нагрузке этанолом. 3, 502—506.
- Парфентьева Е. П., Василенко Ю. К., Лисвицкая Л. И., Оганесян Э. Т.* Влияние урсоловой кислоты на некоторые показатели липидного обмена при экспериментальном атеросклерозе. 2, 174—179.
- Пасечник В. И., Перова Н. В., Гианик Т., Гаджалова С. И., Солдатова Е. А., Щербакова И. А.* Изменение упругих свойств бислоиных липидных мембран при встраивании липопротендов плазмы крови. 4, 493—497.
- Перова Н. В., Метельская В. А., Озерова И. Н., Гаджалова С. И., Чернышева Н. П., Полесский В. А., Жуковский Г. С., Герасимова Е. Н.* Апопротеин А-I в подфракциях липопротендов высокой плотности и активность лецитин-холестерин-ацилтрансферазы при гиперальфа-холестеринемии. 5, 688—694.
- Петренко С. В., Балаклеевский А. И.* О некоторых механизмах регуляции активности моноаминоксидаз в различных отделах мозга. 2, 264—270.
- Петрова Э. А., Лазарева П. П., Худяков Г. Д.* Содержание свободного и этерифицированного холекальциферола в тканях крыс при D-витаминной интоксикации. 3, 325—328.
- Пикунев А. Т., Щербань А. И.* Исследование механизма активирующего действия норадреналина на Na, K-ATФ-азу коры мозга крыс. 5, 671—673.
- Плесков В. М., Никульчева Н. Г., Коно-*

- валов Г. В. Липиды и липопротеиды крови у кроликов с экспериментальным аллергическим полиневритом. 6, 817—823.
- Плещитый К. Д., Блажевич Н. В., Перверзева О. Г., Спиричев В. Б. Активность некоторых механизмов естественного иммунитета при различной обеспеченности организма белых крыс витамином D. 4, 512—516.
- Погосбекова С. Д., Карагезян К. Г. Изучение изменений фосфолипидного обмена в субклеточных образованиях сердечной мышцы при экспериментальном инфаркте миокарда у кроликов. 2, 214—220.
- Попов А. В., Орбецова В. П., Брэдварова И. Т., Винарова М. Р. Метаболизм липопротеидов низкой плотности в культуре ткани фибробластов человека. 3, 374—379.
- Потапенко Р. И. Возрастные и сезонные особенности активности Na, K- и Mg-АТФ-аз в различных структурах головного мозга. 6, 786—789.
- Прянишникова Е. Н., Жуланова З. И., Романцев Е. Ф. Изменение активности простагландинсинтазы в тканях мышей под влиянием S-[N-(3-аминопропил)-2-аминоэтил] тиофосфорной кислоты. 5, 685—688.
- Пчелкина З. М., Матвеев Б. П., Рыкунов Э. И., Терентьев А. А. Сравнительное иммунохимическое и физико-химическое изучение двух  $\alpha$ -гликопротеидов опухоли почки человека. 1, 78—81.
- Рабинович П. Д., Герасимович А. И. Гликозаминогликаны в моче больных язвенной болезнью, хроническим гастритом и здоровых людей. 4, 545—548.
- Рисин С. А., Пенкратова Н. Н. Влияние нефракционированных гистонов на изолированные лизосомы печени мышей. 6, 752—755.
- Розанов В. А. Влияние пиридоксальфосфата и производных пантотената на  $\gamma$ -аминобутиратный шунт в головном мозге мышей. 1, 42—46.
- Романова Л. А. Влияние острого и хронического потребления этанола на активность муноаминоксидазы мозга и печени крыс. 2, 252—255.
- Русинова Г. Г. Биосинтез ДНК селезенки крыс после стимуляции кроветворения фенилгидразином. 4, 446—449.
- Рыженков В. Е., Свергун В. Т. Действие аналога синэстрола сингетина на уровень липидов и на липидный состав липопротеидов сыворотки крови кроликов. 3, 370—374.
- Рыскулова С. Т., Иващенко А. Т. Влияние адреналина на активность АТФ-аз плазматических мембран печени крыс. 3, 308—312.
- Савов В. М., Каган В. Е., Прилипко Л. Л. Участие перекисных радикалов и активных форм кислорода в перекисном окислении липидов микросомальных мембран, индуцируемом органическими гидроперекисями. 5, 623—627.
- Сафразбекян Р. Р., Сукасян Р. С. Значение исходной активности моноаминоксидазы для развития активирующего или ингибирующего действия N-метил- и N-этилтагидрофтазазепинов. 2, 240—243.
- Сергеев С. А., Грибанов Г. А. Аутолитические изменения липидов сыворотки крови крыс в норме и при остром кислородном голодании. 2, 260—264.
- Сидоренков И. В., Днепровская О. А. Влияние общей вибрации на содержание глюкозы и активность ферментов глюконеогенеза в крови и тканях кроликов при экспериментальной гиперхолестеринемии, 6, 774—776.
- Силаева Т. Ю., Докшина Г. А. Изучение действия таурина на инкреторную активность поджелудочной железы в опытах in vitro, 1, 75—78.
- Силаева С. А., Хацернова Б. Я., Данилова Н. И., Шереметевская Т. Н., Юликова Е. П., Буланова А. Н. Влияние стуриннов А и В на синтез ДНК и активность рибонуклеотидредуктазы и тимидинкиназы в регенерирующей печени крыс. 2, 255—259.
- Слободская В. В., Титов А. В., Терещин И. М. Гипохолестеринемическое действие холестериноксидазы в эксперименте. 6, 735—738.
- Соколов Н. Н., Вотрин И. И., Фицнер А. Б., Кирсанова И. Д., Дебов С. С. Новый способ выделения очищенных препаратов рестрикционных эндонуклеаз с использованием органических растворителей. 4, 568—572.
- Соловьева Н. И., Балаевская Т. О., Макеева О. С., Орехович В. И. Выделение и свойства трех коллагеназ Clostridium histolyticum. 5, 674—677.
- Стан Е. Я., Смирнова Л. И., Черникова М. П. Особенности переваривания белков, не способных к створаживанию, в ранний постнатальный период развития. 3, 339—345.
- Степанова Л. Н., Розанов А. Я. Распределение и секреция меченого  $^{35}\text{S}$ -тиамина в пищеварительной системе крыс разного возраста. 5, 663—668.
- Суджян Ц. М. Частичная очистка и свойства форм D и I гликогенсинтазы мозга крыс. 2, 243—248.
- Сяткин С. П., Березов Т. Т. Активность орнитиндекарбоксидазы в злокачественных опухолях. 1, 121—124.
- Сяткин С. П. Синтез хлоргидратов полиаминов и их окислительное дезаминирование диаминоксидазой из быстроразрушающихся тканей. 3, 322—325.
- Сяткин С. П., Березов Т. Т. Быстрый спектрофотометрический метод определения орнитиндекарбоксилазы с помощью 2,4-динитрофторбензола. 4, 561—564.
- Таганович А. Д. Изменение активности АТФ-азы и содержания неэстерифицированных жирных кислот в митохондриях сердца и печени при экспериментальной недостаточности митрального клапана. 6, 739—742.
- Тананова Г. В., Северцева В. В. Влияние электростимуляции скелетных мышц на уровень неэстерифицированных жирных кислот, триглицеридов и глюкозы крови в эксперименте. 1, 30—32.
- Толстых Л. П. Показатели компонентов калликреин-кининовой системы крови у здоровых доношенных и недоношенных детей первых 3 мес жизни. 6, 776—778.
- Тоцкий В. И. Проницаемость биомембран и перекисное окисление липидов при

- действии на организм поперечной перегрузки. 2, 187—194.
- Требенко З. А., Коцеевко И. И., Романцев Е. Ф.* Фонд аденозинтрифосфорной кислоты в тканях крыс после введения β-меркаптоэтиламина. 1, 124—126.
- Ураков А. Л.* Изменение окислительного фосфорилирования при действии кофеин-бензоата натрия. 2, 198—200.
- Усачева Н. Т., Николаевская В. Р., Черников М. П.* К характеристике гидролитического расщепления белка в раннем возрасте. 2, 206—210.
- Федорова Т. М., Ашмарин И. П.* Действие некоторых ДНК-тропных противораковых и противопаразитарных агентов на активность ДНК-азы I. 3, 393—397.
- Федуров В. В.* Активация включения <sup>14</sup>C-п-оксibenзоата и 2-<sup>14</sup>C-мевалоната в убихинон в регенерирующей печени крыс. 6, 759—763.
- Филиппов С. П.* ГАМК — глутамат-аспартат и трансаминазы мозга при инсулиновом первом синдроме. 4, 455—457.
- Филиппова Л. Б., Розанов А. Я.* Сравнительные исследования распределения и связывания <sup>35</sup>S-геминейрина и <sup>35</sup>S-тиамина белками в нейроструктурах мозга крыс. 5, 643—646.
- Формазиук В. Е., Добрецов Г. Е., Полеский В. А., Торховская Т. И., Герасимова Е. Н., Владимиров Ю. А.* Изменение структуры атерогенных липопротеидов при экспериментальном атеросклерозе. 4, 540—545.
- Хаджиев К. Х., Чирке Ю. Г.* Окислительное фосфорилирование некоторых субстратов цикла Кребса при экспериментальной терапии энтероколита цитохромом с. 2, 154—157.
- Ходакова А. А., Менджерецкая Л. Г., Коробова Л. П.* Влияние гипероксии на концентрацию гистамина в тканях белых крыс. 3, 331—334.
- Хомуло П. С., Кадушкина И. Н., Жарова И. П., Орлецкая И. Ю.* О влиянии физической активности на состояние кининовой системы и атерогенез. 6, 789—792.
- Хохлов А. П., Малаховский В. К.* Изменение некоторых компонентов системы циклических нуклеотидов у больных неврогенными миопатиями. 5, 640—643.
- Храмов В. А., Спасов А. А.* Определение диаминоуксиклот и гуанидиновых производных в сыворотке крови человека. 2, 147—149.
- Цветкова И. В., Бахарев В. А., Казы З., Осипова Г. И., Розенфельд Е. Л., Розовский И. С.* Выявление недостаточности арилсульфатазы А при метахроматической лейкодистрофии и пренатальный диагноз заболевания. 4, 461—464.
- Цветкова И. В., Розенфельд Е. Л., Новикова И. М., Барашнев Ю. И., Пригожина И. Г.* Биохимическая диагностика маннозидоза в двух семьях. 4, 552—555.
- Цушко В. С.* Метаболизм фибриногена <sup>131</sup>I при внутривенном и внутрибрюшинном путях введения в условиях тромбиновой нагрузки и кровопотери. 2, 227—232.
- Чеснокова И. П., Астафьева О. Г.* К механизму нарушения энергетического обеспечения мышц при ботулинической интоксикации. 1, 32—36.
- Чеснокова И. П., Алаева И. В., Астафьева О. Г.* О влиянии ботулинического токсина на утилизацию кислорода в различных типах скелетных мышц. 5, 612—616.
- Чеснокова И. П., Алаева И. В.* Влияние ботулинического токсина на содержание катехоламинов в различных типах скелетных мышц. 6, 813—817.
- Шаркова Е. В.* Ферменты превращения цитрата и изоцитрата в митохондриях сердечной и скелетной мышцы эмбрионов и взрослых кроликов. 5, 694—698.
- Швец В. И., Сенников Г. А., Гольбец И. И., Краснопольский Ю. М.* Изучение иммунохимической структуры сифилитических реактивов. 1, 55—58.
- Шелепов В. П., Давыдова С. Я., Шапот В. С.* Некоторые эндокринные нарушения, вызываемые опухолью в организме. 1, 105—110.
- Шенкман Б. З.* О влиянии дизентерийного эндотоксина на содержание гистамина и серотонина в слизистой оболочке толстого кишечника. 3, 351—354.
- Шилина Н. К., Чернавина Г. В.* Соотношение показателей перекисного окисления липидов печени, плазмы и эритроцитов у больных при недостаточности функции печени. 2, 150—154.
- Шишкин С. С., Китавцев Б. А., Дебов С. С.* Влияние посмертного аутолиза на белки 40S рибосомных субъединиц скелетных мышц крыс. 4, 476—480.
- Шостак И. П., Рожко О. Т., Мартыненко Ф. П.* Определение соматотропина и пролактина додецилсульфат-электрофорезом в полиакриламидном геле. 1, 71—75.
- Юсипова Н. А.* Изучение гликозаминогликанов тканей и сыворотки крови крыс с адьювантным артритом. 2, 201—214.
- Юсипова Н. А., Гончарик Л. А., Балакеевский А. И., Суриков П. М., Безкровная В. Г., Лавничук О. А.* Циклический 3',5'-аденозинмонофосфат в печени крыс с экспериментальным ревматоидным артритом. 6, 767—770.
- Яровая Г. А., Доценко В. Л., Агапова Э. И., Степанян Е. П.* Эффективность действия коммерческих поливалентных ингибиторов протеиназ. Сравнительный анализ действия на калликреины различного происхождения и трипсин. 6, 832—837.
- Яровая Г. А., Доценко В. Л., Агапова Э. И., Нежлудко А. Я., Степанян Е. П.* Эффективность действия коммерческих поливалентных ингибиторов протеиназ. Применение гордокса при хирургическом вмешательстве по поводу патологии сосудов. 6, 837—843.
- Яхнина Д. И.* Возможный механизм защитного действия α-токоферола при экспериментальной гипоксии. 1, 88—92.

#### Методы биохимических исследований

- Ажицкий Г. Ю., Ахмед Мухтар, Троицкий Г. В.* Об использовании полиакриламидного геля для целей изофокусирования в борат-полиольных системах. 1, 133—136.
- Березин И. В., Лопухин Ю. М., Андрия*

нова И. П., Лапук Я. И., Алексеева Л. Б., Сергиенко В. И., Бородин Е. А., Халилов Э. М., Арчаков А. И. Алфифинная хроматография для удаления холестерина. 6, 843—846.

Величко Л. П., Тимофеев В. П., Шефер И. А. Микрометод денситометрического определения фракций фосфолипидов крови тонкослойной хроматографией на пластинах «Silufol UV-245». 2, 275—278.

Гудим В. И., Сигала П., Иванова В. С., Олдаг К. Уровень молекул средней массы в крови детей с хронической почечной недостаточностью в условиях лечения краткосрочным гемодиализом. 6, 742—745.

Ефимова Л. В., Малахова Э. А. Определение активности липопротеидлипазы, триацилглицеролипазы, моноацилглицеролипазы и трибутириназы в плазме крови, миокарда и жировой ткани сердца кроликов. 2, 270—275.

Козлов П. Б., Забросова Л. И., Лейтман М. Б. Усовершенствованный метод количественного определения гидроперекисей липидов, изменение их содержа-

ния в тканях при воздействии на организм высокой внешней температуры. 1, 130—133.

Петрунин Д. Д., Козляева Г. А., Татаринцов Ю. С., Шевченко О. П. Препаративное выделение хорионического альфа<sub>2</sub>-микроглобулина человека. 5, 711—713.

Черкащенко Л. П. Спектрофлуориметрический метод определения АТФ в миокарде при его биопсии. 1, 127—130.

#### Рецензии

Северин С. Е., Глушанков Е. П. Рецензия на книгу Т. Ш. Шарманова. «Витамины А и белковое питание». М., Медицина, 1979. 5, 713—714.

#### Юбилей

Акад. АМН СССР проф. В. Н. Орехович, к 75-летию со дня рождения/2, 278—279

#### Хроника

Филиппович И. В. IV Всесоюзный биохимический съезд. 3, 425—428.

### СОДЕРЖАНИЕ

Анненков Г. А., Сафронова Е. Е., Губерниева Л. М., Волкова Н. М. Обнаружение фенилаланингидроксилазной активности в лейкоцитах и фибробластах человека . . . . .	723
Лемонджавя Н. И., Труфанов А. В. Активность креатинфосфокиназы, АСТ и АЛТ в сыворотке крови при некоторых видах инфекционной патологии обезьян . . . . .	727
Джея П. П., Толейкис А. И., Прашкявичюс А. К. Влияние экспериментального инфаркта миокарда на скорость окисления НАДН и 3-оксибутирата в митохондриях сердца . . . . .	731
Слободская В. В., Титов А. В., Терешин И. М. Гипохолестеринемическое действие холестериноксидазы в эксперименте . . . . .	735
Таганович А. Д. Изменение активности АТФ-азы и содержания неэстерифицированных жирных кислот в митохондриях сердца и печени при экспериментальной недостаточности митрального клапана . . . . .	739
Гудим В. И., Сигала П., Иванова В. С., Олдаг К. Содержание молекул средней массы в крови детей с хронической почечной недостаточностью в условиях лечения краткосрочным гемодиализом . . . . .	742
Векслер Я. И., Магомедова К. М., Луговец В. М. Особенности азотистого обмена в головном и спинном мозге при тяжелой физической работе у животных в состоянии хронической алкогольной интоксикации . . . . .	746
Коваленко А. Ф., Левицкий А. П. Влияние калликреиноподобного фермента саливана на течение острого экспериментального паротита . . . . .	750

### CONTENTS

Annenkov G. A., Safronova, E. E., Gubernieva, L. M., Volkova, N. M. Detection of phenylalanine hydroxylase activity in human leukocytes and fibroblasts . . . . .	723
Lemondzhava, N. I., Trufanov, A. V. Activities of creatine phosphokinase, aspartate- and alanine aminotransferases in monkey blood serum in some infections . . . . .	727
Dzheya, P. P., Toleykis, A. I., Prashkyavichus, A. K. Effect of experimental myocardial infarction on the rate of NADH and 3-hydroxybutyrate oxidation in heart mitochondria . . . . .	731
Slobodskaya, V. V., Titov, A. V., Tereshin, I. M. Hypocholesterolemic effect of cholesterol oxidase in vitro . . . . .	735
Taganovich, A. D. Alterations in ATPase activity and in content of unesterified fatty acids in heart and liver mitochondria under conditions of experimental mitral valve insufficiency . . . . .	739
Gudim, V. I., Sigalla, P., Ivanova, V. S., Oldag, K. Content of middle mass molecules in blood of children with chronic kidney insufficiency under conditions of short-term treatment with hemodialysis . . . . .	742
Vexler, Ya, I., Magomedova, K. M., Lugovets, V. M. The characteristic of nitrogenous metabolism in brain and spinal cord under conditions of heavy physical loading of animals, subjected to chronical alcohol intoxication . . . . .	746
Kovalenko, A. F., Levitsky, A. P. Role of kallikrein in pathogenesis of parotiditis . . . . .	750

- Рисин С. А., Пенкратова Н. Н.* Влияние нефракционированных гистонов на изолированные лизосомы печени мышей . . . . . 752
- Малюк В. И., Скульбашевский Л. З., Максимова А. В.* Динамика жирно-кислотного состава липидов митохондрий печени и легких морских свинок при экспериментальном туберкулезе . . . . . 755
- Федуров В. В.* Активация включения  $^{14}\text{C}$ -*p*-оксибензоата и  $2\text{-}^{14}\text{C}$ -мевалоната в убихинон в регенерирующей печени крыс . . . . . 759
- Мищенко В. П., Гольденберг Ю. М., Новосельцева Т. В.* Изменения свертываемости крови и фибринолиза под влиянием антиоксиданта ионола . . . . . 763
- Юсипова Н. А., Гончарик Л. А., Балаклеевский А. И., Суриков П. М., Безкровная В. Г., Лавничук О. А.* Циклический 3', 5'-аденозинмонофосфат в печени крыс с экспериментальным ревматоидным артритом . . . . . 767
- Зайденберг М. А., Короткина Р. Н., Носова И. М., Дудникова Г. Н., Писаржевский С. А., Карелин А. А.* Влияние введения цГМФ на некоторые метаболические процессы в тканях раны крыс . . . . . 770
- Сидоренков И. В., Днепровская О. А.* Влияние общей вибрации на содержание глюкозы и активность ферментов глюконеогенеза в крови и тканях кроликов при экспериментальной гиперхолестеринемии . . . . . 774
- Толстых Л. П.* Показатели компонентов калликреин-кининовой системы крови у здоровых доношенных и недоношенных детей первых 3 мес жизни . . . . . 776
- Есирев О. В., Даниленко М. П.* Появление чувствительности Na, K-АТФ-азы мозга к ацетилхолину после тепловой обработки мембранных препаратов . . . . . 778
- Васильев В. Н.* Влияние пробы с  $0,1$  г L-ДОФА на динамику экскреции с мочой катехоламинов и ДОФА у больных шизофренией . . . . . 782
- Потапенко Р. И.* Возрастные и сезонные особенности активности Na, K- и Mg-АТФ-аз в различных структурах головного мозга . . . . . 786
- Хомуло П. С., Кадушкина Н. Н., Жарова И. П., Орлецкая И. Ю.* О влиянии физической активности на состоянии кининовой системы и атерогенез . . . . . 789
- Апросин Ю. Д., Алексеева В. К., Афонин Н. И.* Исследование кинетики насыщения кислородом эмульсий фторуглеродов . . . . . 793
- Логинов А. С., Приваленко М. Н., Белокопытова М. В.* Исследование изоферментов N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминидазы печени и сыворотки крыс в норме и при остром отравлении четыреххлористым углеродом . . . . . 800
- Risin, S. A., Penkratova, N. N.* Effect of unfractionated histones on lysosomes, isolated from mouse liver tissue . . . . . 752
- Malyuk, V. I., Skul'bashevsky, L. Z., Maximova, A. V.* Dynamics of fatty acid composition of lipids in mitochondria of guinea pig liver and lung tissues under conditions of experimental tuberculosis . . . . . 755
- Fedurov, V. V.* Stimulation of incorporation of  $^{14}\text{C}$ -*p*-hydroxybenzoate and  $2\text{-}^{14}\text{C}$ -mevalonate into ubiquinone in regenerating rat liver tissue . . . . . 759
- Mischenko, V. P., Gol'denberg, Yu. M., Novosel'tseva, T. V.* Effect of antioxidant ionole on blood coagulation and fibrinolysis . . . . . 763
- Yusipova, N. A., Goncharik, L. A., Balakleevsky, A. I., Surikov, P. M., Bezkravnaya, V. G., Lavnichuk, O. A.* Cyclic adenosine-3', 5'-monophosphate in liver tissue of rats with experimental rheumatoid arthritis . . . . . 767
- Zaydenberg, M. A., Korotkina, R. N., Nosova, I. M., Dudnikova, G. N., Piszarshevsky, S. A., Karelin, A. A.* Effect of cGMP administration on some metabolic processes in tissues of rat wound . . . . . 770
- Sidorenkov, I. V., Dneprovskaya, O. A.* Effect of vibration on content of glucose and on the activity of enzymes involved in gluconeogenesis in rabbit blood and tissues under conditions of experimental hypercholesterolemia . . . . . 774
- Tolstykh, L. P.* The patterns of the kallikrein-kinin system in blood of healthy and premature children within the first three months of postnatal period . . . . . 776
- Esyrev, O. V., Danilenko, M. P.* Sensitivity of brain Na, K-ATP-ase to acetylcholine after heat treatment of membrane preparations . . . . . 778
- Vasil'ev, V. N.* Effect of small doses of L-DOPA on excretion with urine of catecholamines and L-DOPA in patients with schizophrenia . . . . . 782
- Polapenko, R. I.* Age and season characteristics of Na, K- and Mg-ATP-ases activity in various brain structures . . . . . 786
- Khomulo, P. S., Kadushkina, N. N., Zharova, I. P., Orletskaia, I. Yu.* Effect of physical activity on the state of kinin system and atherogenesis . . . . . 789
- Aprosin, Yu. D., Alexeeva, V. K., Afonin, N. I.* Kinetics of saturation by oxygen of perfluorine-containing emulsions . . . . . 793
- Loginov, A. S., Privalenko, M. N., Belokopytova, M. V.* Isoenzymes of N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase in liver tissue and blood of normal rats and after poisoning with  $\text{CCl}_4$  . . . . . 800
- Abdullaev, R. A., Emirbekov, E. Z.*

- Содержание свободных аминокислот в мозге при гипотермии и в разные сроки постгипотермического периода
- 802 *Никольчева Н. Г., Солитернова И. Б., Криворученко И. В.* Активность липопротеидлипазы у больных ишемической болезнью сердца с различными типами гиперлипотеидемии на фоне жировой нагрузки
- 808 *Чеснокова Н. П., Алаева И. В.* Влияние ботулинического токсина на содержание катехоламинов в различных типах скелетных мышц
- 813 *Плесков В. М., Никольчева Н. Г., Коновалов Г. В.* Липиды и липопротеиды крови у кроликов с экспериментальным аллергическим полиневритом
- 817 *Морозов И. А., Спиричев В. Б., Фернандес Р. Р., Блажевич Н. В.* Ультраструктура энтероцитов двенадцатиперстной кишки крыс при различной обеспеченности витамином D
- 823 *Меерсон Ф. З., Павлова В. И., Коробейникова Э. Н.* Предупреждение стрессорных повреждений организма антиоксидантами и  $\beta$ -блокатором индералом
- 827 *Яровая Г. А., Доценко В. Л., Агапова Э. И., Степанян Е. П.* Эффективность действия коммерческих поливалентных ингибиторов протеиназ. Сравнительный анализ действия на калликреины различного происхождения и трипсин
- 832 *Яровая Г. А., Доценко В. Л., Агапова Э. И., Нежлудко А. Я., Степанян Е. П.* Эффективность действия коммерческих поливалентных ингибиторов протеиназ. Применение гордокса при хирургическом вмешательстве по поводу патологий сосудов
- 837
- Методы биохимических исследований**
- Березин И. В., Лопухин Ю. М., Андрианова И. П., Лапук Я. И., Алексеева Л. Б., Сергиенко В. И., Бородин Е. А., Халилов Э. М., Арчаков А. И.* Аффинная хроматография для удаления холестерина
- 843 *Левицкий А. П., Коваленко А. Ф.* Влияние ряда ферментных препаратов на течение экспериментального паротита
- 847 *Указатель статей, помещенных в 1980 году в журнале «Вопросы медицинской химии»*
- 852
- Content of free amino acids in brain under conditions of hypothermia and within various periods after the lesion
- Nikul'cheva, N. G., Soliternova, I. B., Krivoruchenko, I. V.* Activity of lipoprotein lipase in patients with ischemic heart impairment and with various types of hyperlipoproteinemia after loading with lipids
- Chesnokova, N. P., Alaeva, I. V.* Effect of botulinic toxin on content of catecholamines in various skeletal muscles
- Pleskov, V. M., Nikul'cheva, N. G., Kononov, G. V.* Lipids and lipoproteins from blood of rabbits with experimental allergic polyneuritis
- Morosov, I. A., Spirichev, V. B., Fernandes, R. R., Blazhevich, N. V.* Effect of vitamin D on ultrastructure of rat duodenal enterocytes
- Meerson, F. Z., Pavlova, V. I., Korobeynikova, E. N.* Prevention by antioxidants and a  $\beta$ -adrenoblocking agent inderol of the impairments caused by stress
- Yarovaya, G. A., Dotsenko, V. L., Agapova, E. I., Stepanyan, E. P.* Efficiency of the trade grade polyvalent inhibitors of proteinases. Comparison of their action on kallikreins of various origin and on trypsin
- Yarovaya, G. A., Dotsenko, V. L., Agapova, E. I., Nezhudko, A. Ya., Stepanyan, E. P.* Efficiency of the trade grade polyvalent inhibitors of proteinases. The use of hordox in surgical treatment of vessel pathologies
- Methods of Biochemical Investigations**
- Beresin, I. V., Lopukhin, Yu. M., Andrianova, I. P., Lapuk, Ya. I., Alexeeva, L. B., Sergienko, V. I., Borodin, E. A., Khalilov, E. M., Archakov, A. I.* Affinity chromatography in elimination of cholesterol
- Levitsky A. P., Kovalenko A. F.* Effect of some enzymatic preparations on the course of experimental parotitis