

И. Н. Кендыш (Москва)

ЗНАЧЕНИЕ ГЛЮКАГОНА В ПАТОГЕНЕЗЕ ДИАБЕТА (ОБЗОР)

В последнее десятилетие в связи с активной разработкой физиологических и патологических аспектов функционирования α -клеток поджелудочной железы пристальное внимание исследователей привлекает вопрос о значении глюкагона в возникновении и развитии диабета, который и до настоящего времени остается дискуссионным. В литературе высказываются противоположные мнения — от утверждения об эссенциальной роли глюкагона [1—3] до полного отрицания значения его в патогенезе сахарного диабета [4—6]. Практическая важность проблемы определяется экспериментальными предпосылками терапии диабета средствами, подавляющими секрецию глюкагона [7—8].

Анализируя вопрос о роли глюкагона в патогенезе диабета, необходимо прежде всего рассмотреть взаимодействие инсулина и глюкагона в регуляции обмена веществ. Оба гормона контролируют обменные процессы в одних и тех же тканях-мишенях: печени, жировой ткани и мышцах, хотя тканевый спектр действия инсулина гораздо шире, чем глюкагона. Глюкагон усиливает протеолиз и липолиз во всех указанных тканях, а также гликогенолиз и глюконеогенез в печени и, возможно, глюконеогенез в почках. Результатом согласованного влияния глюкагона на различные ткани является освобождение жирных кислот и аминокислот, которые в данной ситуации служат в конечном счете пущам энергетики благодаря активации глюконеогенеза в печени и превращению их в глюкозу. Глюкагон, опосредуя свойственные ему метаболические эффекты путем срочной активации аденилатциклазы и продукции цАМФ, осуществляет модификацию метаболизма уже через несколько секунд или минут и, таким образом, является гормоном экстренной мобилизации субстратов для обеспечения биоэнергетики [9—13].

В противоположность глюкагону инсулин ингибирует протеолиз, липолиз, гликогенолиз и глюконеогенез, усиливает синтез белков, липидов и гликогена и, следовательно, выступает в качестве гормона утилизации субстратов. При одновременной экспозиции инсулина и глюкагона инсулин по биологическому действию превосходит глюкагон: действие инсулина проявляется позднее, но сохраняется более длительное время. Инсулин предупреждает или обращает все метаболические эффекты глюкагона. Это означает, что в смысле направленности биохимического действия глюкагон и инсулин можно считать антагонистами, за исключением утилизации глюкозы, на которую глюкагон не оказывает прямого влияния [12—16].

В условиях нормальной жизнедеятельности секреция глюкагона и инсулина регулируется теми субстратами, содержание которых в крови контролируется этими гормонами. Глюкоза и жирные кислоты стимулируют секрецию инсулина, но тормозят секрецию глюкагона, в то время как аминокислоты, в особенности аргинин, усиливают секрецию обоих гормонов. Глюкагон активизирует секрецию инсулина, а инсулин ингибирует выделение глюкагона, повышая проницаемость и окисление глюкозы в α -клетках. Следовательно, антагонизм наблюдается и в регуляции секреции глюкагона и инсулина [10, 11, 13, 17].

Однако в физиологическом отношении инсулин и глюкагон вряд ли можно рассматривать в качестве гормонов-антагонистов. При оценке взаи-

действия этих гормонов на уровне организма становится очевидной их кооперативная роль в рациональной утилизации алиментарных и эндогенных субстратов. Действительно, при углеводном и жировом рационе повышение секреции инсулина при понижении секреции глюкагона обуславливает максимальную ретенцию пищевых субстратов в виде гликогена и липидов. В условиях белкового питания, когда увеличена секреция обоих гормонов, инсулин способствует синтезу белка из алиментарных аминокислот, а глюкагон вовлекает аминокислоты в глюконеогенез. Так как в этой ситуации исходный уровень глюкозы понижен, индуцируемые глюкагоном глюконеогенез и, возможно, липолиз являются процессами, обеспечивающими биоэнергетику. В этом плане роль глюкагона заключается в предупреждении гипогликемии, возможность которой возрастает в связи с вызываемой аминокислотами гиперинсулинемией. При нормальном питании, включающем все основные ингредиенты, секреция инсулина увеличивается преимущественно за счет воздействия глюкозы и аминокислот, а секреция глюкагона подавляется глюкозой и жирными кислотами, в результате чего уровень инсулина в крови и его метаболические эффекты преобладают над таковыми глюкагона [9—11, 16, 17].

При голодании, естественно, секреция инсулина и глюкагона изменяется иначе. Индекс молярного соотношения инсулин/глюкагон в крови резко понижается. Так, у человека при 48-часовом голодании данный индекс составляет 0,4, при низкоуглеводном рационе — 1,8, при сбалансированном рационе — 3,8, а при инфузии глюкозы возрастает до 16. Состояние голодания характеризуется преобладанием активности глюкагона с увеличением в организме количества цАМФ и активацией процессов мобилизации липидов, белков и углеводов. Как это показано на крысах, в цикле голодание — питание соответствующие изменения индекса инсулин/глюкагон, количества цАМФ и направленности метаболизма (анаболизм — катаболизм) регистрируются в течение 5—20 мин после откармливания животных. Таким образом, результатом взаимодействия инсулина и глюкагона является срочная адаптивная система регуляции метаболического гомеостаза [11, 18, 19].

В свете изложенных материалов концепция Унгера о бигормональной регуляции утилизации и мобилизации субстратов в обмене веществ на уровне организма единым органом Лангерганса [11] не вызывает принципиальных возражений, но нуждается в определенной коррекции. Уязвимым звеном этой концепции является безоговорочное допущение, что глюкагон служит главным липолитическим гормоном. Хотя такое допущение на основании большого числа преимущественно косвенных данных возможно [9, 13], не следует игнорировать липолитический эффект катехоламинов, СТГ, АКТГ и, вероятно, глюкокортикоидов, особенно в свете экспериментальных данных о том, что липолиз в жировой ткани животных и человека более чувствителен к катехоламинам, чем к глюкагону [20, 21]. Поскольку липолитические гормоны одновременно усиливают продукцию глюкозы, можно высказать сомнения и об их соотносительной роли в регуляции глюконеогенеза в условиях метаболической адаптации. Нам кажется более правильным представление о моногормональной регуляции фазы утилизации инсулином и полигормональной регуляции фазы мобилизации субстратов в цикле голодание — питание комплексом указанных катаболических гормонов, секреция которых при изменении алиментарных условий качественно подобна секреции глюкагона.

При диабете и ожирении секреция и уровень глюкагона в плазме крови изменяются односторонне. Ряд данных свидетельствует о том, что при экспериментальном диабете у различных животных существенно стимулируется секреция панкреатического и внепанкреатического глюкагона, вследствие чего уровень гормона в крови увеличивается. Эти изменения, наблюдающиеся в условиях медикаментозного инсулинодефицитного диабета, характерны и для мышей с гипергликемическим ожирением, у которых отмечается почти 20-кратное повышение уровня иммунореактивного инсулина в крови [22—28].

У людей в состоянии ожирения или предиабета базальный уровень глюкагона в крови может быть нормальным или более высоким в зависимости от тяжести обменных сдвигов [29—33], тогда как при клинически выраженном диабете он почти всегда значительно превышает нормальные величины [26, 34—36].

Особенно демонстративны изменения секреции глюкагона при нагрузочных тестах. У животных с экспериментальным или генетически обусловленным диабетом глюкоза в меньшей мере, чем в норме, тормозит секрецию глюкагона или вообще не влияет на уровень циркулирующего глюкагона. В ряде случаев отмечается парадоксальный эффект — активирование секреции глюкагона в ответ на нагрузку глюкозой. Эти регуляторные особенности секреции глюкагона связаны с продолжительностью и тяжестью диабета и обусловлены, по-видимому, степенью дефицита инсулина и инсулинорезистентностью, так как инсулин *in vivo* и *in vitro* восстанавливает чувствительность α -клеток к глюкозе и, следовательно, обращает парадоксальный эффект глюкозы на секрецию глюкагона [25, 27, 37—39].

Чувствительность секреторного аппарата α -клеток к аминокислотам при диабете, напротив, увеличивается [27, 28, 39].

Эти экспериментальные материалы хорошо согласуются с результатами клинических исследований. У здоровых людей глюкоза независимо от способа ее введения подавляет секрецию глюкагона и уменьшает содержание гормона в крови. При ожирении и наследственном предиабете реакция α -клеток на глюкозу развивается в пределах нормальных параметров [33, 36, 40], а при диабете может быть резко пониженной, парадоксальной или отсутствовать вообще. Парадоксальное увеличение секреции глюкагона при нагрузке глюкозой происходит при диабете средней или тяжелой формы и является результатом, а возможно, и функциональным показателем степени утилизации глюкозы, дефицита инсулина и инсулинорезистентности. Введение инсулина нормализует повышенный базальный уровень глюкагона в крови и его секрецию в ответ на нагрузку глюкозой [22, 33, 35—37, 41—43].

При генетическом предиабете или ожирении аргинин сильнее, чем в норме, стимулирует секрецию глюкагона.

Следует подчеркнуть, что в условиях предиабета аргининовый тест информативнее нагрузки глюкозой, так как он выявляет усиление секреции глюкагона и инсулина при нормальных значениях теста толерантности к глюкозе и соответствующих гормональных показателей [30, 36, 40, 44]. После введения аргинина содержание глюкагона в крови возрастает в большей мере у пожилых людей, чем у молодых, причем такая же закономерность сохраняется и у больных диабетом. В связи с повышенной реактивностью α -клеток при диабете аргинин провоцирует более высокий подъем и медленный спад содержания глюкагона в периферической крови, при этом наблюдается обратная корреляция между увеличением циркулирующего глюкагона и инсулина. Введение инсулина нормализует чувствительность секреторного аппарата α -клеток к аминокислотам [36, 45—47].

Реактивность α -клеток по отношению к жирным кислотам у больных диабетом, по-видимому, не изменяется [41].

Таким образом, при диабете происходит перестройка сбалансированной субстратной регуляции секреции глюкагона в сторону ее усиления, вследствие чего увеличивается уровень глюкагона в крови. Существует мнение, что повышенная реакция α -клеток на аргинин и парадоксальная реакция их на глюкозу обусловлены секрецией внепанкреатического глюкагона, скорее всего, желудочно-кишечного происхождения [28, 42, 44, 48, 49]. Однако наличие подобной реактивности α -клеток у больных диабетом людей, у которых внепанкреатический глюкагон практически отсутствует (см. ниже), делает это предположение сомнительным. Указанные нарушения секреции глюкагона при диабете являются следствием дефицита инсулина либо снижения его эффективности в отношении транспорта и метаболизма глюкозы и, возможно, аминокислот в клетках поджелудочной железы.

Впервые мнение о ведущей роли глюкагона в этиологии диабета было высказано в 1953 г. при экспериментальном изучении синдрома гипергликемического ожирения мышей, принципиально соответствующего диабету тучных людей [50]. В дальнейшем благодаря открывшимся возможностям после разработки радиоиммунологического метода определения глюкагона Унгер и соавт. предложили концепцию об эссенциальной роли глюкагона в патогенезе диабета. В первоначальной интерпретации эта концепция детерминировала первичную зависимость гипергликемии от повышенной секреции глюкагона при диабете и других состояниях на основании трех категорий фактов.

1. При спонтанном или экспериментальном диабете у животных или человека всегда наблюдается повышение содержания глюкагона в крови. Эндогенная гипергликемия не развивается в отсутствие глюкагона, а наличие ее у собак с удаленной поджелудочной железой объясняется сверхнормальной секрецией глюкагона α -клетками желудка и тонкого кишечника. Этот глюкагон по биологическим, физико-химическим и иммунологическим свойствам идентичен панкреатическому, но отличается от глюкагоноподобной иммуореактивности подстуденального отдела кишечника.

2. Соматостатин, ингибируя секрецию инсулина и глюкагона, снижает гипергликемию до тех пор, пока уровень глюкагона в крови не восстанавливается с помощью инфузии глюкагона. Вызванная глюкагоном гипергликемия не предупреждается инсулином, так как глюкагон эффективнее инсулина в регуляции продукции глюкозы.

3. Введение соматостатина больным диабетом собакам и людям уменьшает содержание глюкагона в крови и предупреждает или понижает гипергликемию посредством торможения глюконеогенеза. Дефицит инсулина без глюкагона не может вызвать эндогенную гипергликемию [1,3].

Несколько позднее авторы, исходя из представления о бигормональной регуляции метаболизма глюкозы и антагонизме инсулина и глюкагона в обмене липидов и белков, постулировали важную роль глюкагона в диабетическом кетоацидозе и сделали заключение, что подавление секреции глюкагона может быть перспективным средством терапии диабета [51].

Известно, что гипергликемия при диабете обусловлена снижением периферической утилизации глюкозы и усилением глюконеогенеза, причем значение глюконеогенеза в этом отношении является более важным [52]. Как уже отмечалось, глюкагон стимулирует глюконеогенез, но не оказывает прямого влияния на утилизацию глюкозы в тканях. Кроме того, повышение секреции глюкагона первично определяется метаболическими последствиями дефицита инсулина, а инсулин предупреждает или обращает все обменные эффекты глюкагона, в том числе и гипергликемию, вопреки представлениям Унгера [13]. Уже эти основные положения противоречат гипотезе о главной роли глюкагона в развитии диабетической гипергликемии.

При выраженном диабете ни исходный уровень, ни скорость снижения содержания глюкагона в крови после введения инсулина не коррелируют с величиной гипергликемии [7, 35, 53]. В экспериментах на крысах с удаленной поджелудочной железой и введением ингибиторов секреции глюкагона (соматостатин, антиглюкагоновой сыворотки, инсулина) показано, что снижение секреции глюкагона не обязательно связано с уменьшением концентрации глюкозы в крови и что, хотя гиперглюкагонемия может участвовать в развитии гипергликемии при панкреатэктомии, избыточная секреция глюкагона в данной ситуации является вторичной по отношению к дефициту инсулина, а гипогликемическое действие инсулина практически не зависит от его способности тормозить секрецию глюкагона [48, 49].

У здоровых людей инфузия соматостатина подавляет секрецию не только глюкагона, но и инсулина, что приводит к некоторому снижению утилизации глюкозы в периферических тканях и ингибированию продукции глюкозы в печени. Развивающаяся при этом гипогликемия обусловлена подавлением глюконеогенеза и может быть предупреждена нормализацией уровня инсулина. Эти и другие данные свидетельствуют о том, что гипергликемическое действие эндогенного глюкагона реализуется только при недос-

татке инсулина [4—6]. При диабете, когда существенно усиливается глюконеогенез, соматостатин понижает гипергликемию путем торможения секреции глюкагона в α -клетках и, следовательно, продукции глюкозы в печени. Гипогликемический эффект соматостатина, опосредуемый через глюкагон, не связан с улучшением утилизации глюкозы вследствие одновременного ингибирования базальной или стимулированной глюкозой и аминокислотами секреции инсулина. Интересно отметить, что восстановление гипергликемии и появление других симптомов диабета происходят в течение 30 мин после отмены инфузии соматостатина. Превентивное действие соматостатина в отношении диабетической гипергликемии, несомненно, опосредуется через глюкагон, так как введение соматостатина больным после панкреатэктомии не изменяет уровень гипергликемии [54—57].

Необходимо подчеркнуть, что механизм гипогликемического действия соматостатина не исчерпывается медиацией через секрецию глюкагона. У больных юношеским диабетом инфузия соматостатина при внутривенном тесте толерантности к глюкозе не влияет на параметры гликемической кривой и утилизацию глюкозы, тогда как при пероральной нагрузке глюкозой соматостатин практически полностью предупреждает гипергликемию, подавляя резорбцию глюкозы. Поскольку основные эффекты соматостатина выявляются при его длительном введении, авторы считают торможение всасывания глюкозы в кишечнике главной причиной гипогликемического действия соматостатина при диабете [4].

В качестве серьезного возражения против первичной роли глюкагона в возникновении гипергликемии при диабете следует рассматривать исследования, проведенные у людей с удаленной поджелудочной железой. Дело в том, что у людей в отличие от лабораторных животных внепанкреатический глюкагон практически отсутствует, составляя всего лишь около 1 % глюкагона, секретируемого поджелудочной железой. Несмотря на следовые количества глюкагона в крови и отсутствие секреции гормона в ответ на аргинин, в результате панкреатэктомии и, следовательно, независимо от глюкагона развивается экстенсивная гипергликемия, для коррекции которой необходимо постоянное введение инсулина [54, 57—60].

При оценке зависимости нарушений липидного обмена при диабете от секреции глюкагона прежде всего следует указать на отсутствие корреляции между содержанием в крови свободных жирных кислот, глицерина и кетоновых тел, с одной стороны, и глюкагона — с другой [35, 53, 61]. Вместе с тем введение глюкагона больным диабетом активирует липолиз и увеличивает концентрацию в крови свободных жирных кислот и кетоновых тел, причем эти эффекты гормона находятся в прямой связи с дефицитом инсулина и тяжестью болезни, так как при диабете не проявляется контррегуляторное действие инсулина, секрецию которого глюкагон усиливает в нормальных условиях [43, 62—64]. Однако при нормализации уровня эндогенного глюкагона или даже полного подавления его секреции с помощью инфузии соматостатина у больных юношеским диабетом, несмотря на существенное снижение гипергликемии, содержание глицерина, свободных жирных кислот и кетоновых тел не уменьшается [55, 65]. В экспериментах других авторов длительная (в течение 18 ч) инфузия соматостатина больным после отмены инсулина препятствует восстановлению кетоацидоза, гипергликемии и гиперглюкагонемии [8].

Особенно информативными в рассматриваемом аспекте являются наблюдения, проведенные у больных с удаленной поджелудочной железой. Хотя у таких больных практически полностью отсутствует базальная или стимулированная секреция глюкагона, содержание глицерина, свободных жирных кислот и кетоновых тел в крови увеличивается в такой же степени, как и у больных диабетом с высоким уровнем циркулирующего глюкагона. Это, по мнению авторов, свидетельствует против представления о первичной роли глюкагона в механизме возникновения диабетического кетоацидоза [57—60].

В вопросе о роли глюкагона в усилении катаболизма белка при диабете нет достаточной ясности. Аутофагия печени вследствие увеличения числа

и объема лизосом при экспериментальном диабете у крыс может быть результатом как избытка глюкагона, так и недостатка инсулина [66]. Непрерывная трехдневная инфузия глюкагона больным диабетом юношеского и взрослого типа, обеспечивающая 7-кратное повышение уровня глюкагона в крови, не увеличивает гипергликемию, глюкозурию и выведение азота с мочой, т. е. не влияет на распад белка и использование его в глюконеогенезе [67].

В экспериментальном плане для выяснения вопроса о роли глюкагона в патогенезе диабета весьма полезными были бы исследования, направленные на избирательную модификацию функции α -клеток, но, к сожалению, такие эксперименты до настоящего времени единичны. Опыты на мышах с синдромом гипергликемического ожирения, для которых характерны усиление глюконеогенеза, гипергликемия, гиперинсулинемия, глюкозурия, снижение толерантности к глюкозе и инсулину и другие признаки, свойственные диабету тучных людей [52], показали, что введение диэтилдитиокарбамата, разрушающего α -клетки поджелудочной железы, существенно изменяет патологию обмена веществ. При воздействии этого агента наблюдается снижение гипергликемии, предупреждение прибавки в массе тела и устранение инсулинорезистентности, а также гипергликемии, вызываемой введением гормона роста. Эти эффекты сохраняются около 2 нед после введения диэтилдитиокарбамата. Введение хлористого кобальта вызывает подобные, но менее выраженные изменения. У нормальных мышей при воздействии обоих препаратов отмечается преходящая гипогликемия. Однако в связи с отсутствием данных о секреции глюкагона и инсулина и корреляции между морфологией островкового аппарата и указанными биохимическими сдвигами однозначная интерпретация этих экспериментов затруднительна [50]. Тем более что, по современным воззрениям, в этиологии наследственного синдрома гипергликемического ожирения у мышей некоторых линий каузальное значение имеет дефицит панкреатического полипептида [68].

Введение хлористого кобальта кроликам с аллоксановым диабетом не понижает гипергликемию, а вызывает гиперплазию α -клеток в поджелудочной железе. По заключению авторов, это говорит о том, что глюкагон не играет значительной роли в патогенезе диабета. При скрытом аллоксановом диабете у собак введение хлористого кобальта сопровождается гиперплазией α -клеток и последующим замещением ими функционально поврежденных β -клеток, что обуславливает манифестацию диабета [69].

Таким образом, анализ данных литературы свидетельствует о том, что глюкагон не играет эссенциальной роли ни в этиологии, ни в патогенезе диабета. Увеличение секреции глюкагона при диабете является вторичным по отношению к недостатку секреции и метаболической эффективности инсулина. Селективное действие глюкагона в происхождении обменных нарушений при диабете трудно вычленить, так как присущие глюкагону метаболические эффекты перекрываются биохимическими последствиями дефицита инсулина. Вместе с тем нельзя отрицать аддитивного влияния глюкагона на развитие диабетических изменений метаболизма. При диабете у людей и крыс наряду с уменьшением секреции инсулина и увеличением секреции глюкагона в поджелудочной железе резко возрастает содержание соматостатина, что свидетельствует о возможности локальной контрглюкагоновой регуляции [8, 26]. Увеличение тканевого и циркулирующего пула цАМФ при экспериментальном и клиническом диабете устраняется соматостатином и, по всей видимости, обусловлено глюкагоном [55, 65, 70]. Глюкагон вносит определенный вклад в развитие гипергликемии, активируя гликогенолиз и глюконеогенез, хотя основное значение в усилении этих процессов имеет дефицит инсулина либо ослабление его действия на печень. Дополнительный эффект глюкагона в других нарушениях обмена веществ возможен при некоторых формах диабета, но не может считаться патогенетически существенным.

В связи с вышеизложенным возникает вопрос о применении соматостатина при лечении диабета. Терапевтические возможности соматостатина определяют ролью глюкагона в патогенезе обменных сдвигов и поэтому

ограничиваются преимущественно коррекцией глюконеогенеза и гипергликемии, но, поскольку глюкагон обуславливает только часть сверхпродукции глюкозы при диабете и не влияет на ее утилизацию, соматостатин не может полностью ликвидировать эндогенную гипергликемию. Особенно следует отметить, что соматостатин не приводит к компенсации диабетических изменений липидного обмена и устранению кетоацидоза. Учитывая также то обстоятельство, что соматостатин тормозит секрецию инсулина и, следовательно, понижает утилизацию глюкозы, использование соматостатина при инсулинодефицитном диабете нельзя считать целесообразным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Unger R. H., Orci L. — *Lancet*, 1975, v. 1, p. 14—16.
2. Joffe B. I., Goldberg R. B., Krut L. H. et al. — *Ibid.*, 1975, v. 1, p. 1069—1071.
3. Dobbs R., Sakurai H., Sasaki H. et al. — *Science*, 1975, v. 187, p. 544—547.
4. Felig P., Wahren J. — *Metabolism*, 1976, v. 25, Suppl. 1, p. 1509—1511.
5. Felig P., Wahren J., Sherwin R. et al. — *Diabetes*, 1976, v. 25, p. 1091—1099.
6. Sherwin R. S., Hendler R., DeFronzo R. et al. — *Proc. nat. Acad. Sci., USA*, 1977, v. 74, p. 348—352.
7. Warne G. L., Alford F. P., Chisholm D. J. et al. — *Clin. Endocr.*, 1977, v. 6, p. 277—284.
8. Gerich J. E. — *Arch. intern. Med.*, 1977, v. 137, p. 659—666.
9. Lefebvre P. — In: *Glucagon. Molecular Physiology, Clinical and Therapeutic Implication*. Oxford, 1972, p. 109—121.
10. Marliss E. B., Aoki T. T., Cahill G. F. — *Ibid.*, p. 123—150.
11. Unger R. H., Lefebvre P. J. — *Ibid.*, p. 213—244.
12. Park C. R., Exton J. H. — *Ibid.*, p. 77—108.
13. Кендыш И. И. — *Успехи совр. биологии*, 1979, т. 87, 1. 3, с. 359.
14. Lefebvre P. J., Luyckx A. S. — *Diabetologia*, 1969, v. 5, № 3, p. 195—197.
15. Park C. R., Lewis S. B., Claus T. et al. — In: *Regulation of Hepatic Metabolism*. Copenhagen, 1974, p. 677—679.
16. Пьюсхолм Э., Старт К., Регуляция метаболизма. М., 1977.
17. Samols E., Tyler J. M., Markx V. — In: *Glucagon. Molecular Physiology, Clinical and Therapeutic Implications*. Oxford, 1972, p. 151—173.
18. Seitz H. J., Müller M. J., Krone W. et al. — *Arch. Biochem.*, 1977, v. 183, p. 647—663.
19. Seitz H. J., Müller M. J., Mordmeyer P. et al. — *Endocrinology*, 1976, v. 99, p. 1313—1318.
20. Mosinger B., Kuhn E., Kujlova V. — *J. Lab. clin. Med.*, 1965, v. 66, p. 380—389.
21. Muller W. A., Aoki T. T., Eghahl R. H. et al. — *Diabetologia*, 1977, v. 13, p. 55—58.
22. Unger R. H. — In: *Glucagon. Molecular Physiology, Clinical and Therapeutic Implications*. Oxford, 1972, p. 245—257.
23. Grodsky G. M., Frankel B. J., Gerich J. E. et al. — *Diabetologia*, 1974, v. 10, Suppl., p. 521—528.
24. Lavine R. L., Voyles N., Perrino P. L. et al. — *Endocrinology*, 1975, v. 97, p. 615—620.
25. Matschinsky F. M., Pagliara A. S. — *Metabolism*, 1976, v. 25, N 11, Suppl. 1, p. 1517—1518.
26. Orci L., Baelens D., Rufener C. et al. — *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, 1976, v. 73, p. 1338—1432.
27. Weir G. C., Atkins R., Martin D. B. — *Metabolism*, 1976, v. 25, No. 11, Suppl. 1, p. 1519—1521.
28. Blazquez E., Munoz-Barragan L., Patton G. S. et al. — *J. Lab. clin. Med.*, 1977, v. 89, p. 971—977.
29. Lawrence A. M. — In: *Glucagon. Molecular Physiology, Clinical and Therapeutic Implications*. Oxford, 1972, p. 259—274.
30. Gerich J. E., Langlois M., Noacco C. — *Lancet*, 1973, v. 1, p. 1233.
31. Felig P., Wahren J., Hendler R. et al. — *J. clin. Invest.*, 1974, v. 53, p. 582—590.
32. Bibergeil H., Schulz H., Michaelis D. et al. — In: *Current Topics in Diabetes Research*. Amsterdam, 1976, p. 21—22.
33. Hatfield H. H., Banasiak M. F., Drisco U. T. et al. — *J. clin. Endocr.*, 1977, v. 44, p. 1080—1087.
34. Lindsey C. A., Faloona G. R., Unger R. H. — *J. A. M. A.*, 1974, v. 229, p. 1771—1773.
35. Alford F., Perry-Keene D., Chisholm D. et al. — In: *Current Topics in Diabetes Research*. Amsterdam, 1976, p. 33.
36. Ohneda A., Watanabe K., Ishii S. et al. — *Ibid.*, p. 39—40.
37. Blaaten J. T., Faloona G. R., Unger R. H. — *J. clin. Invest.*, 1974, v. 53, p. 1017—1021.
38. Frankel B. J., Gerich J. E., Nagura R. et al. — *Ibid.*, p. 1637—1646.
39. Hahn H. J., Ziegler M. — *Europ. J. clin. Invest.*, 1977, v. 7, p. 237.

40. Fallucca F., Menzinger G., Iavicoli M. et al. — In: Current Topics in Diabetes Research. Amsterdam, 1976, p. 36.
41. Gerich J. E., Langlois M., Noacco C. et al. — J. clin. Invest., 1976, v. 58, p. 320—325.
42. Sanke T., Kondo M., Nanjo K. et al. — Wakayama med. Rep., 1976, v. 19, p. 161—168.
43. Tiengo A., Nosadini R., Fedele D. et al. — In: Current Topics in Diabetes Research. Amsterdam, 1976, p. 66.
44. Nonaka K., Toyoshima H., Yoshida T. et al. — Ibid., p. 39.
45. Nakashima Y., Oyama H., Tenku A. et al. — Radioisotopes, 1976, v. 25, p. 723—727.
46. Seino Y., Ikeda M., Nakane K. et al. — Metabolism, 1977, v. 26, p. 911—919.
47. Ferrero E., Casale G., Tassi G. et al. — Minerva med., 1978, v. 69, p. 1233—1239.
48. Dunbar J. C., Micossi P., Pontiroli A. E. et al. — In: Current Topics in Diabetes Research. Amsterdam, 1976, p. 36.
49. Dunbar J. C., Walsh M. F., Foa P. P. — Diabetologia, 1978, v. 14, p. 53—58.
50. Mayer J., Andrus S. B., Silides D. J. — Endocrinology, 1953, v. 53, p. 572—581.
51. Unger R. H., Orci L. — Arch. intern. Med., 1977, v. 137, p. 482—491.
52. Кендыш И. И. — Пробл. эндокринол., 1976, № 5, с. 94—100.
53. Barnes A. J., Crowley M. F., Bloom A. et al. — Lancet, 1975, v. 2, p. 734—737.
54. Gerich J. E., Karam J. H., Lorenzi M. — Ibid., 1976, v. 1, p. 855.
55. Lundbaek K., Hansen A. P., Orskov H. et al. — Ibid., p. 215—218.
56. Waldbausl W., Bratusch-Marrain P., Dudezak R. et al. — J. clin. Endocr., 1977, p. 876—883.
57. Barnes A. J., Bloom S. R., Alford F. P. et al. — Lancet, 1976, v. 1, p. 967.
58. Barnes A. J., Bloom S. R. — Ibid., p. 219—221.
59. Barnes A. J., Bloom S. R., Mashiter K. et al. — Diabetologia, 1977, v. 13, p. 71—75.
60. Bloom S. R., Barnes A. J., Bryant M. G. et al. — Metabolism, 1976, v. 25, № 11, Suppl. 1, p. 1481—1482.
61. Ginsberg H. N. — Ibid., 1977, v. 26, p. 1135—1146.
62. Liljenquist J. E., Bomboy J. D., Lewis S. B. et al. — J. clin. Invest., 1974, v. 53, p. 190—197.
63. Srivastava M. C., Seth H. N., Valecha I. D. et al. — In: Current Topics in Diabetes Research. Amsterdam, 1976, p. 42.
64. Harano Y., Ohgaku S., Shimizu Y. et al. — Endocr. jap., 1977, v. 24, p. 121—128.
65. Hansen A. P., Christensen S. E., Iversen J. et al. — In: Current Topics in Diabetes Research. Amsterdam, 1976, p. 44.
66. Amherdt M., Harris V., Renold A. E. et al. — J. clin. Invest., 1974, v. 54, p. 188—193.
67. Sherwin R. S., Hendler R., Felig P. — Metabolism, 1977, v. 26, p. 53—58.
68. Gates R. J., Lazarus N. R. — Horm. Res., 1977, v. 8, p. 189—202.
69. Лейтес С. М., Лантвеа И. И. Очерки по патофизиологии обмена веществ и эндокринной системы. М., 1967.
70. Hertelendy F., Calabria D., Todd H. et al. — Endocrinology, 1977, v. 101, p. 1095—1098.

Поступила 15/IV 1979 г.

УДК 612.351.11:577.152.261

Н. П. Мертвецов

МНОЖЕСТВЕННЫЕ ФОРМЫ ТИРОЗИНАМИНОТРАНСФЕРАЗЫ В КЛЕТКАХ ПЕЧЕНИ КРЫС И ИХ РОЛЬ В ГОМЕОСТАЗЕ КЛЕТКИ

Специальное конструкторско-технологическое бюро биологически активных веществ
Главмикробиопрома, Новосибирск

В последние годы установлено, что многие гормоны осуществляют свое регуляторное действие в организме животных, выступая в роли индукторов определенных ферментов в клетках-мишенях [1—4]. При этом одним из основных механизмов действия гормонов является стимуляция ДНК-зависимого синтеза РНК в чувствительных к гормону клетках [5—8].

Известно, что в организме животных может существовать несколько ферментных белков (изоферментов), катализирующих одну и ту же биохимическую реакцию [9, 10]. В ряде случаев гормональная генетическая индукция может осуществляться на уровне изоферментов, т. е. воздействие гормона-индуктора может приводить к увеличению скорости синтеза не всех множественных форм данного фермента, а только определенных индуцибельных его форм [4, 11—13].

Удобной и перспективной моделью для исследования биохимических особенностей индуцибельных изоферментов и закономерностей их индукции является тирозинаминотрансфераза (ТАТ, L-тирозин: 2-оксоглутаратами-

потрансфераза, КФ 2. 6. 1. 5) печени крыс. Показано, что через 5 ч после введения крысам кортизола активность ТАТ возрастает в 5—10 раз; гормон индуцирует ДНК-зависимый синтез молекул РНК, которые в свою очередь обеспечивают усиление синтеза этого фермента [7, 14—17]. Когда избыточная концентрация введенного извне гормона понижается [18], активность ТАТ также возвращается к исходному уровню [19].

Молекулярная гетерогенность ТАТ печени. Чувствительность множественных форм (изоферментов ТАТ) к гормональным индукторам. Интерконверсия форм ТАТ

Молекулярная гетерогенность ТАТ печени установлена в ряде работ [13, 20—29]. Ф. Б. Левину впервые удалось продемонстрировать, что введение кортизола крысам вызывает увеличение только одной из двух фракций ТАТ, которые обнаруживаются после электрофореза экстракта печени крыс в агаровом геле, а именно анодной фракции [20]. В дальнейшем с помощью осадочной гистохимической реакции было показано, что в пределах каждой такой фракции выявляются еще по две полосы — анодные и катодные изоферменты ТАТ [21] (рис. 1).

Под действием кортизола в печени крыс резко возрастает активность только анодных изоферментов ТАТ, в то время как активность катодных изоферментов при этом не изменяется. Через 12—20 ч активность анодных изоферментов возвращается к исходному уровню [20, 30, 31], а активность катодных изоферментов остается неизменной (рис. 2).

Используя в качестве модели для изучения механизмов гормональной индукции печень крысят 2-дневного возраста, у которых базальный уровень активности ТАТ весьма низок, удалось установить, что выявляемые путем электрофореза в полиакриламидном геле три пика указанной активности находятся под контролем различных гормонов. Так, инъекция адреналина приводит к появлению одного быстро мигрирующего пика ТАТ (С), в то время как при комбинированном введении адреналина и кортизола появляются быстро мигрирующий пик (С), а также пик ТАТ с промежуточной электрофоретической подвижностью (В) [22]. В печени взрослых крыс были обнаружены три электрофоретически различные формы ТАТ [22, 38], одна из которых индуцируется инсулином (форма А), две другие формы (В и С) — кортизолом и глюкагоном; адреналин индуцирует только форму С [23].

Другая группа исследователей, используя метод хроматографии на колонке с гидроксилантатитом, выявила в экстрактах печени крыс четыре формы ТАТ [12, 24, 25], обозначенные номерами I, II, III и IV в соответст-

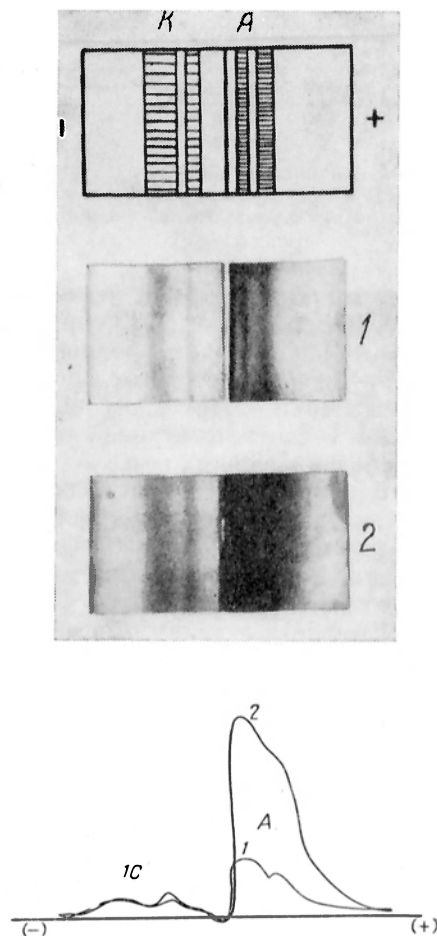


Рис. 1. Электрофореграммы и денситограммы изоферментов ТАТ печени. 1 — норма; 2 — кортизол, 5 ч. А1, А2 — анодные изоферменты; К1, К2 — катодные изоферменты [31].

вии с порядком элюции с колонки. Изучение влияния гормонов на хроматографически различные формы ТАТ показало, что активность форм II и III повышается при введении кортизона или глюкагона; под действием адреналина возрастает ферментативная активность формы II, тогда как при введении инсулина крысам с аллоксановым диабетом повышается активность

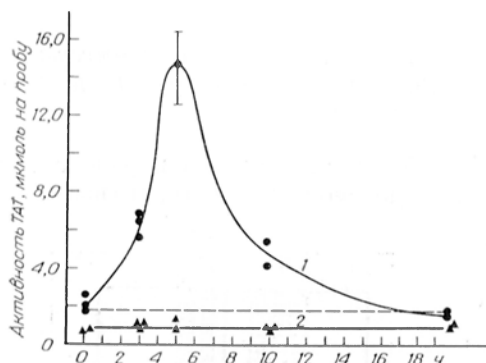


Рис. 2. Активность анодных (1) и катодных (2) изоферментов ТАТ печени крыс через разное время после введения кортизола [31].

формы IV [12, 24]. Следует отметить, что тот же характер индукции различных форм ТАТ наблюдается при перфузии изолированной печени крыс гормонами [25]. Этот факт может служить доводом в пользу непосредственного воздействия гормонов на молекулярные формы ТАТ в печени крыс. К сожалению, авторы работ по выявлению молекулярной гетерогенности ТАТ не сопоставляли собственных результатов с данными других исследователей, поэтому неизвестно, существует ли соответствие между «электрофоретическими» [22, 23] и «хроматографическими» формами ТАТ [24], обнару-

женными цитируемыми исследователями в печени крыс. Однако сопоставление результатов по индукции различных форм ТАТ гормонами (табл. 1) позволяет предположить, что электрофоретическая форма ТАТ — А — соответствует хроматографической форме IV (классификация Ивасаки — Пито), форма В — форме II; для хроматографической формы I соответствующей электрофоретической формы в анализируемых исследованиях нет.

В серии работ Кенни и соавт. при хроматографии на КМ-сефадексе сырого экстракта печени крыс или препарата фермента, очищенного по методу Валерио и соавт. [32], наблюдали появление трех фракций активности ТАТ (формы I, II и III, обозначенные в порядке элюции с хроматографической колонки) [26, 28, 33].

Выявленные таким путем молекулярные формы ТАТ, отличаясь по поведению при КМ-хроматографии, оказались иммунохимически идентичными. Соотношение этих форм ТАТ в печени зависело от возраста животных, гормонального статуса организма и изменялось в процессе выделения и очистки фермента.

В определенных случаях наблюдалось взаимопревращение форм фермента, которое зависело от наличия в составе ТАТ сульфгидрильных групп и ингибировалось цианистыми соединениями. Авторы высказали предположение о том, что анализируемые формы ТАТ представляют собой отдельные модификации молекулы фермента, возникающие в процессе фосфорилирования, метилирования или лимитированного протеолиза [26, 28, 33]. Несколько позже было высказано предположение о существовании в печени крыс определенного фактора, регулирующего взаимопревращение (интерконверсию) этих форм ТАТ («фактор конверсии», FC) [34, 35].

При дифференциальном ультрацентрифугировании клеточек печени крыс такой фактор (FC) белковой природы был обнаружен в составе определенных внутриклеточных компонентов [34—36]. Оказалось, что такой «фактор конверсии» стимулирует *in vitro* превращение формы III ТАТ, выявляемой по методу Кенни и соавт. [26], в формы II ТАТ и I ТАТ; обратных превращений не наблюдалось. «Превращающая активность» внутриклеточных седиментируемых факторов существенно зависела от pH и температуры; оптимум pH составлял 6,5 [36].

В работах группы Пито и соавт. также была сделана попытка обнаружить в тканях крыс «факторы конверсии» множественных форм ТАТ и изу-

чить их влияние на формы ТАТ, выявляемые по методу этих авторов, т. е. хроматографией на гидроксиланатите [13, 35, 37]. Установлено, что при дифференциальном центрифугировании клеток печени удается зарегистрировать «фактор конверсии» множественных форм ТАТ в составе определенных субклеточных фракций — митохондриальной фракции и лизосом.

«Фактор конверсии» (FC) стимулировал превращение *in vitro* форм ТАТ (II→III→IV), выявляемых при хроматографии на гидроксиланатите [37]. «Превращающая» активность оказалась в основном связанной с фракцией лизосом; превращение форм ТАТ *in vitro* ингибировалось цианистыми соединениями, п-хлормеркурийбензоатом и йодоацетатом и сильно зависело от содержания сульфгидрильных групп в составе молекулярных форм ТАТ. Пито и соавт. высказали предположение о том, что «фактор конверсии» (FC) идентичен определенным протеолитическим ферментам лизосом; с другой стороны, они отождествляли FC с одним из микросомальных ферментов — глутатионинсулинтрансдегидрогеназой [37]. Исследования по идентификации «фактора конверсии» ТАТ продолжаются.

Т а б л и ц а 1

Индукция множественных форм ТАТ в печени крыс гормонами

Способ разделения множественных форм ТАТ	Гормон-индуктор	Индукцируемая форма	Источник литературы
Электрофорез в полиакриламидном геле — формы А, В и С	Адреналин	Форма С	[23]
	Кортизол	Форма С	
	Глюкагон	Форма В Форма С Форма В	
	Инсулин	Форма А	
Хроматография на гидроксиланатите — формы I, II, III и IV	Адреналин	Форма II	[24]
	Кортизол	Форма II Форма III	[25]
	Глюкагон	Форма II Форма III	
	Инсулин	Форма IV	
Электрофорез в агаровом геле — формы А1, А2, К1 и К2	Кортизол	Форма А1 Форма А2	[20] [31]
Хроматография на КМ-сефадексе		Форма I	[26]
		Форма II	[33]
		Форма III	

Анализируя приведенные факты, можно думать, что формы ТАТ (III—II—I), описанные Кенни и соавт. [26], в какой-то мере соответствуют молекулярным формам ТАТ (II—III—IV), выявленным Пито и соавт. с помощью хроматографии на гидроксиланатите [25, 37]: эти формы подвергались взаимному превращению (интерконверсии) в присутствии специальных факторов, выделенных из клеток печени. В определенных условиях эти превращения носят направленный характер: возможен только переход форм III→II→I (классификация Джонсона — Кенни) и форм II→III→IV (классификация Ивасаки — Пито). Основываясь на связи FC с фракцией лизосом, можно предположить, что эти формы ТАТ представляют собой модификации молекулы ТАТ, возникающие в процессе ее лимитированного внутриклеточного протеолиза, катализируемого ферментами лизосом (например, FC). Об этом свидетельствует и иммунохимическая идентичность данных молекулярных форм ТАТ [26]. Интенсивность такого мягкого про-

теолиза, обуславливающего процессинг данных форм ТАТ, зависит, по-видимому, от ряда физиологических факторов, в частности от гормонального статуса организма. По-видимому, гормоны могут играть регулирующую роль в процессинге таких форм ТАТ, влияя каким-то образом на активность «факторов конверсии» (FC).

Следует отметить, что одна из множественных форм ТАТ, выявляемых при хроматографии на гидроксиланатите (форма I ТАТ), не включается в цикл интерконверсии и, по-видимому, не подлежит гормональному контролю [25, 37]. Эта молекулярная форма ТАТ, отличающаяся термолабильностью [25, 38], отсутствует в препаратах фермента, полученных с помощью тепловой обработки; вместе с тем она может играть определенную роль в ферментном гомеостазе клетки. Существование неиндуцируемых форм ТАТ было обнаружено и с помощью электрофореза экстрактов печени крыс в агаровом геле [20, 21].

Выделение и исследование свойств индуцируемых кортизолом и конститутивных изоферментов ТАТ

Как следует из наших экспериментов, путем хроматографии на ДЭА-целлюлозе удастся разделить ТАТ из печени крыс на две фракции, одна из которых содержит индуцируемые анодные изоферменты, а другая — неиндуцируемые катодные изоферменты ТАТ [39, 40]. Такое разделение является еще одним свидетельством молекулярной гетерогенности данного фермента. Разделяемые хроматографически фракции ТАТ соответствуют определенным зонам активности фермента, выявляемым при электрофорезе в агаровом геле (рис. 3).

Изоферменты ТАТ печени крыс в процессе очистки обнаруживают достоверные отличия в термостабильности, что может служить их важной характеристикой. Тепловая обработка (5 мин, 68 °C) фракции белков печени, осаждаемых сульфатом аммония в пределах 35—85 % насыщения, приводит к полной инактивации катодных изоферментов ТАТ, в то время как активность анодных изоферментов при этом существенно не изменяется [39, 40]. Некоторыми авторами также отмечена повышенная термочувствительность определенных молекулярных форм ТАТ. Пито и соавт. наблюдали инактивацию на стадии тепловой обработки определенной части ТАТ печени крыс, а именно одной из четырех фракций, выявляемых при хроматографии на гидроксиланатите, — формы I [12, 25]. Инактивация части активности ТАТ на стадии тепловой обработки отмечена также Сэдлером [38].

Поскольку лишь одна из четырех форм ТАТ, описанных Пито и соавт. [24, 25], а именно форма I, инактивируется при тепловой обработке, можно думать, что эта форма идентична катодному изоферменту ТАТ, выделенному нами [40].

Обнаруженные нами различия в термостабильности анодного и катодного изоферментов ТАТ дают основания взглянуть по-новому на классические методы выделения ее из печени крыс, в которых в качестве одной из стадий используется процедура тепловой обработки [32, 41—43]. Можно думать, что ТАТ, выделяемая методами, включающими стадию тепловой обработки, представляет собой лишь часть изоферментного спектра ТАТ печени, а именно анодную ТАТ. Именно такой фермент подробно исследован в работах Кенни [16, 17, 41], Томкинса и соавт. [32, 42]. Возможность «потери» катодных изоферментов ТАТ в процессе выделения на стадии тепловой обработки обусловлена еще и тем, что при гормональной индукции кортизолом резко изменяется соотношение изоферментов в печени крыс в сторону преобладания индуцируемых анодных форм.

Используя ряд последовательных процедур фракционирования белков печени, удастся выделить и очистить анодный и катодный изоферменты ТАТ, идентифицированные электрофоретически [40, 44]. Разработанное нами препаративное выделение и очистка анодного (индуцируемого) изофермента ТАТ включали четыре стадии. Этот способ обеспечивает очистку фермента примерно в 4000 раз. По данным энзимэлектрофореза в агаровом

геле полученный препарат фермента принадлежит к анодной фракции изоферментов ТАТ (рис. 4, см. вклейку).

Выделение и очистка катодного изофермента ТАТ включают четыре стадии. Этот способ позволяет очистить катодный изофермент ТАТ примерно в 200 раз. Полученная фракция фермента принадлежит к катодной фракции изоферментов ТАТ (см. рис. 4).

Выделяемые таким способом изоферменты ТАТ, вероятно, не составляют в сумме полного набора молекулярных форм растворимой ТАТ печени крыс. При нагревании фракции белков, осаждаемых сульфатом аммония из экстракта печени крыс в пределах 35—85 % насыщения, не только исчезает катодная фракция ТАТ, но и резко уменьшается и дистальная субфракция анодного изофермента [39]. В таком препарате анодного изофермента ТАТ преобладает субфракция, находящаяся ближе к старту. В результате переосаждения сульфатом аммония и нескольких последовательных хроматографий в ходе очистки в составе катодных изоферментов также сохраняется в основном субфракция, лежащая ближе к линии старта [39]. Тем не менее совершенно очевидно, что выделенные изоферменты ТАТ являются представителями двух идентифицированных ранее групп изоферментов — индуцируемой и нениндуцируемой кортизолом (см. рис. 4).

Полученные в наших исследованиях значения кажущихся констант Михаэлиса для индуцируемого анодного изофермента по L-тироzinу ($1,3 \times 10^{-3}$ М) хорошо согласуются с приводимыми в литературе значениями: $1,48 \times 10^{-3}$ М [41], $1,43 \times 10^{-3}$ и $1,5 \times 10^{-3}$ М [42]. Константа Михаэлиса для катодного изофермента по L-тироzinу, равная $4,7 \times 10^{-3}$ М, весьма близка к K_m по L-тироzinу для формы I ($6,0 \times 10^{-3}$ М), выделенной Пито и соавт. с помощью хроматографии на гидроксиланатите [25] (табл. 2 и 3). Этот факт еще раз подтверждает заключение об идентичности выделенного нами из печени крыс катодного изофермента ТАТ и формы I, выделенной из ткани крысы Пито и соавт. [24, 25]. Полученные нами значения K_m для анодного изофермента ТАТ по α -кетоглутарату ($3,5 \times 10^{-4}$ М) несколько меньше, чем значения, полученные другими авторами, но имеют тот же порядок величины [41, 42]. Оказалось, что сродство к акцептору аминогрупп — α -кетоглутаровой кислоте — у катодного изофермента ТАТ на порядок вы-

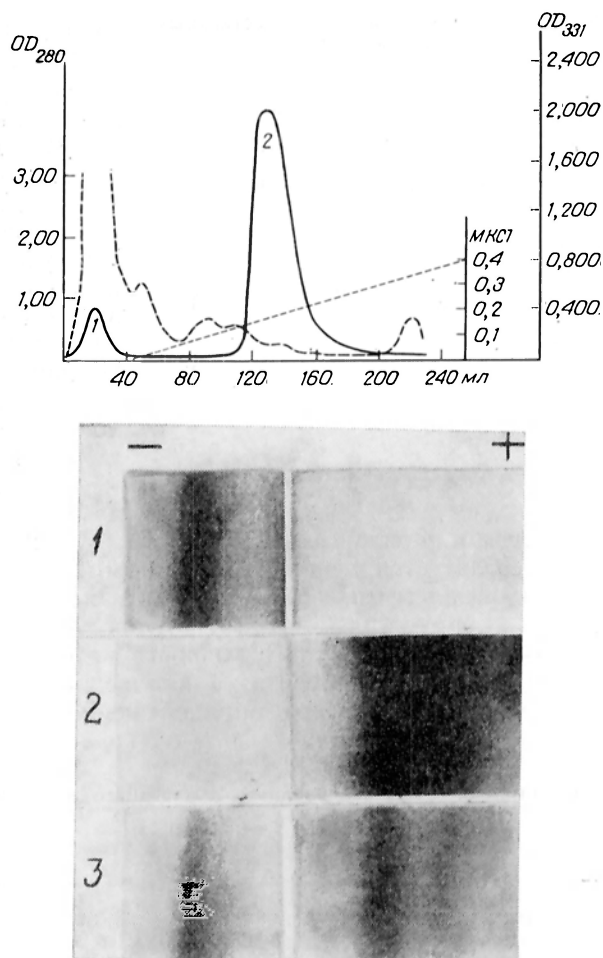


Рис. 3. Хроматография белков экстракта печени крыс на ДЭАЭ-целлюлозе [39].

1 — изоферментный состав первого хроматографического пика ТАТ; 2 — изоферментный состав второго хроматографического пика ТАТ; 3 — изоферменты ТАТ из печени intactных крыс.

ше, чем у анодного изофермента (см. табл. 3). Кроме того, катодный изофермент в отличие от анодного обладает способностью переносить аминокруппу с L-тирозина не только на α -кетоглутарат, но и на оксалоацетат, к которому у него такое же высокое сродство, как и к α -кетоглутарату.

Т а б л и ц а 2
Константы Михаэлиса множественных форм ТАТ

Форма фермента	Л-тирозин	α -Кетоглутарат	Пиридоксаль-фосфат	Пиридоксаль-минифосфат
	мМ		мкМ	
I	6,0	0,9	—	—
II	1,4	1,1	1,3	5,6
III	1,5	1,0	1,6	5,0
IV	1,5	1,2	1,1	6,1
I—IV*	1,5	1,1	1,1	5,2

* Анализировалась смесь 4 форм [25].

сродством к пиридоксаль-5'-фосфату ($K_M = 2,2 \times 10^{-7}$ М); эта величина хорошо согласуется с ранее полученным значением, равным $3 \cdot 10^{-7}$ М [41]. При диализе в течение 30 ч в присутствии L-тирозина удается полностью отделить пиридоксаль-5'-фосфат от анодного изофермента ТАТ и получить неактивный апофермент, активность которого восстанавливается только при добавлении кофермента. Такой же диализ катодного изофермента ТАТ не приводит к отделению пиридоксаль-5'-фосфата и образованию неактив-

Таким образом, катодный изофермент ТАТ не проявляет строгой специфичности к акцентору аминокрупп. Наличие ТАТ с широким сродством к акценторам аминокрупп было обнаружено ранее и в митохондриях печени крыс [45].

Митохондриальная ТАТ существенно отличается от цитоплазматических форм ТАТ по аминокислотному составу и константам Михаэлиса для субстратов [45]. Ее кажущиеся константы Михаэлиса для L-тирозина и α -кетоглутарата составляют $12 \cdot 10^{-3}$ и $0,4 \cdot 10^{-3}$ М соответственно. По данным Миллера и Литвэк, митохондриальная ТАТ идентична митохондриальным аспарат- и аланин-аминотрансферазам [45].

Как видно из табл. 3, анодный изофермент ТАТ обладает высоким

Т а б л и ц а 3
Константы Михаэлиса анодного и катодного изоферментов ТАТ печени крыс [40]

Форма изофермента	Л-тирозин	α -Кетоглутарат	Пиридоксаль-5'-фосфат	Оксалоацетат
Анодная	$1,3 \cdot 10^{-3}$	$3,5 \cdot 10^{-4}$	$2,2 \cdot 10^{-7}$	—
Катодная	$4,7 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^{-5}$	—	$2,5 \cdot 10^{-5}$

ного апофермента [40]. Этот факт свидетельствует, вероятно, о более прочном связывании кофермента.

Очищенные индуцируемый и конститутивный изоферменты ТАТ существенно различаются по термостабильности и чувствительности к протеолитическим ферментам. Так, прогревание катодного изофермента ТАТ при 60 °С в присутствии кофактора ведет к значительной его инактивации, тогда как активность анодного изофермента в этих условиях не изменяется. Прогревание анодного изофермента в отсутствие кофактора в среде или нагревание его апофермента обуславливает быстрое падение ферментативной активности. Налицо защитное действие пиридоксаль-5'-фосфата по отношению к анодному изоферменту ТАТ [40].

Оказалось, что очищенный анодный изофермент ТАТ значительно более чувствителен к инактивирующему действию трипсина, чем изолированный катодный изофермент ТАТ. Кофактор (ПФ) несколько снижает чувствительность к трипсину анодного изофермента и не влияет на чувствительность к трипсину катодного изофермента (рис. 5).

Анодный изофермент ТАТ также более чувствителен к инактивирующему действию химотрипсина по сравнению с катодным изоферментом.

Можно допустить далее, что синтез субъединиц А и К кодируется различными цистронами в геноме печеночных клеток. Каждая субъединица в таком случае кодируется специфической мРНК. Синтез субъединицы А, вероятно, индуцируется кортизолом, а синтез субъединицы К не подлежит гормональному контролю.

Из этой гипотезы следует, что при индукции кортизолом в клетках печени будет усиливаться синтез мРНК, кодирующей субъединицу А, и, следовательно, возрастет синтез анодного изофермента ТАТ. Синтез же катодного изофермента в клетке, по-видимому, целиком лимитируется концентрацией субъединицы К (соответствующей мРНК) и не индуцируется кортизолом. Изложенные представления можно проиллюстрировать схемой

(рис. 11). Можно думать, что анодный и катодный изоферменты ТАТ существуют в клетке в нескольких конформационных состояниях.

В специальных экспериментах мы провели оценку эффективности трансляции поли А⁺-мРНК, выделенной из полирибосом печени интактных и индуцированных кортизолом крыс, по способности таких мРНК программировать *in vitro* синтез индуцируемого изофермента ТАТ. При трансляции в бесклеточной системе из зародышей пшеницы полисомной поли А⁺-мРНК печени синтезируется белок, специфически связываемый антителами к анодному изоферменту ТАТ (табл. 4) [51]. При трансляции *in vitro* полисомной поли А⁺-мРНК из печени крыс, индуцированных кортизолом, наблюдается усиленный примерно в 2 раза по сравнению с контролем синтез индуцируемого изофермента ТАТ (см. табл. 4). Наблюдаемое возрастание синтеза индуцибельного изофермента в бесклеточной белоксинтезирующей системе должно быть следствием усиленного синтеза и накопления в полирибосомах соответствующей специфической мРНК. В усиленный синтез белка-антигена *in vitro* может вносить определенный вклад и вызываемое кортизолом возрастание трансляционной активности мРНК [52].

С помощью методов иммунохимического фракционирования полирибосом удастся выделить специфическую мРНК, кодирующую индуцибельный изофермент ТАТ [53]. Молекулярная масса выделенной таким способом мРНК составляла 5—6·10⁵ дальтон (15—16 S), что соответствует молекулярной массе кодируемого пептида 50 000 — 60 000 дальтон. Такая мРНК обладала матричной активностью в бесклеточной белоксинтезирующей системе и программировала белок, осаждаемый антителами к анодному изоферменту ТАТ и имеющий молекулярную массу примерно 50 000

Т а б л и ц а 4

Определение мРНК для индуцируемого изофермента ТАТ по синтезу специфического продукта в бесклеточной белоксинтезирующей системе из зародышей пшеницы [51]

Тип полиА-содержащей РНК из полирибосом печени крыс	Общий белок, имп/мин	Белок в иммунопреципитате (в имп/мин) специфический Ig (анти-ТАТ)
Эндогенный синтез (без мРНК печени)	18 774	236
РНК из печени интактных крыс	134 316	934
РНК из печени крыс, индуцированных кортизолом	142 776	1981

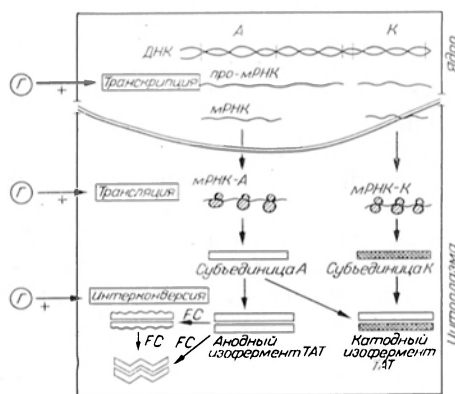


Рис. 11. Биогенез анодного и катодного изоферментов ТАТ в клетках печени. Влияние кортизола на этот процесс.

Г — гормон-индуктор (кортизол); + усиление процесса.

что, несмотря на существенный лаг-период, фаза инактивации катодного изофермента, по-видимому, также соответствует кинетике реакции первого порядка (см. рис. 8) [46].

Результаты исследования очищенных изоферментов ТАТ подтверждают наблюдение, сделанное на экстрактах печени, что индуцируемые кортизолом изоферменты значительно более чувствительны к протеолитической инактивации экзо- и эндогенными протеазами, чем неиндуцируемые молекулярные формы ТАТ [31].

Сопоставление антигенных свойств выделенных изоферментов ТАТ печени показало, что, судя по данным двойной иммунодиффузии и иммуноэлектрофореза (рис. 9 и 10, см. вклейку), очищенные анодный и катодный изоферменты имеют, как сходные, так и отличающиеся антигенные детерминанты [44]. Можно предположить, что различия в антигенных свойствах очищенных анодного и катодного изоферментов ТАТ отражают те различия в их структуре, которые реализуются в различной термостабильности, чувствительности к протеолитическим ферментам и субстратной специфичности, о которых говорилось ранее.

В определенном противоречии с описанными работами, свидетельствующими о существовании конститутивных цитоплазматических форм ТАТ, находятся данные Спенсер и Гелертера [27]. Авторы исследовали молекулярные формы ТАТ, извлеченной из клеток НТС, путем электрофореза в полиакриламидном геле. Они пришли к заключению, что наблюдаемая ими катодная форма ТАТ идентична аспартат-аминотрансферазе печени и, следовательно, специальной катодной формы ТАТ не существует. Следует отметить, что одной из стадий концентрирования фермента в данной работе служило прогревание клеточного экстракта при 65 °С. Как было показано, термолabile катодная форма ТАТ (катодные изоферменты ТАТ) при этом полностью инактивируются [25, 40]. Следовательно, в работе Спенсер и Гелертера катодные изоферменты ТАТ были заведомо исключены из анализа и авторы исследовали анодные формы ТАТ, а также, по-видимому, иные аминотрансферазы клеток гепатомы.

Биогенез множественных форм ТАТ

Здесь следует вернуться к подробному сопоставлению множественных форм ТАТ и обсуждению природы молекулярной гетерогенности этих форм. Как отмечалось выше, по ряду свойств (термочувствительность, сродство к субстратам) выделяемый нами катодный изофермент ТАТ близок к форме I ТАТ, выделенной Пито и соавт. при хроматографии белков печени на гидроксилантитате [12, 24, 25]. Можно думать, что описанные в работах Пито и соавт. [13, 35, 37], Кенин и соавт. [25, 28, 33, 36] три формы ТАТ, способные к интерконверсии, представляют собой различные конформационные состояния одной молекулы. Выделяемый нами анодный изофермент ТАТ, вероятно, идентичен одному из этих конформационных состояний (форм). Не исключено, что указанные формы представляют собой различные конформационные состояния изофермента ТАТ. Возможно, что взаимный переход этих форм также подлежит гормональному контролю.

Согласно литературным и нашим собственным данным, анодный изофермент ТАТ состоит из двух идентичных субъединиц с молекулярной массой 50 000 каждая [49—50]. Обозначим их как субъединицы А. Согласно данным Пито и соавт., молекулярная масса формы I (катодный изофермент ТАТ) составляет примерно 100 000 [25]. Можно предположить, что катодный изофермент ТАТ состоит из двух различных субъединиц, одна из которых (субъединица А) идентична субъединице, входящей в состав анодного изофермента, а другая (субъединица К) отличается от первой по первичной структуре. Наличие идентичных субъединиц, входящих в состав анодного и катодного изоферментов ТАТ, может обеспечить формирование общих антигенных детерминант в молекулах этих изоферментов; различия между ними в этом случае определяются гетерологичной субъединицей К.

В отличие от протеолиза трипсином чувствительность к протеолитической инактивации химотрипсином одинакова у молекул апофермента и голофермента ТАТ (рис. 6).

Различный характер чувствительности изоферментов ТАТ сохраняется и по отношению к собственным протеазам клетки. Так, инактивация анод-

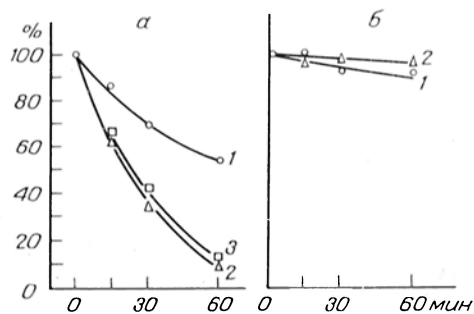


Рис. 5. Влияние трипсина на активность анодного (а) и катодного (б) изоферментов ТАТ печени крыс.

а: 1 — анодный изофермент в присутствии пиридоксаль-5'-фосфата в среде, 2 — то же в его отсутствие, 3 — апофермент анодного изофермента в отсутствие пиридоксаль-5'-фосфата; б: 1 — катодный изофермент в присутствии пиридоксаль-5'-фосфата, 2 — то же в его отсутствие [40]. Здесь и на рис. 6 и 7 по оси абсцисс — время инкубации, по оси ординат — остаточная активность ТАТ.

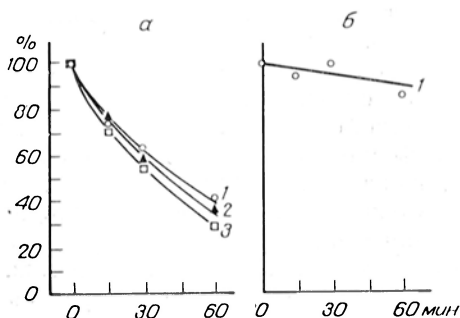


Рис. 6. Влияние химотрипсина на активность анодного (а) и катодного (б) изоферментов ТАТ печени крыс.

а: 1 — анодный изофермент ТАТ в присутствии пиридоксаль-5'-фосфата в среде, 2 — то же в его отсутствие, 3 — апофермент анодного изофермента ТАТ в отсутствие пиридоксаль-5'-фосфата; б: 1 — катодный изофермент ТАТ в присутствии пиридоксаль-5'-фосфата [40].

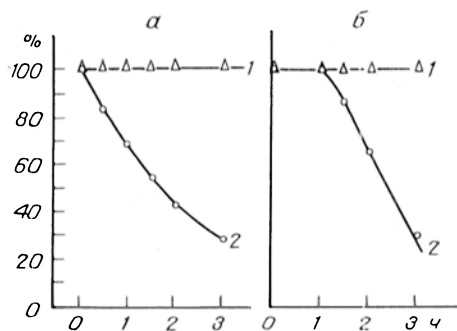


Рис. 7. Влияние лизосомальных препаратов на активность анодного (а) и катодного (б) изоферментов ТАТ печени крыс.

а: 1 — анодный изофермент в отсутствие лизосомальных препаратов, 2 — то же в их присутствии; б: 1 — катодный изофермент в отсутствие лизосомальных препаратов, 2 — то же в их присутствии [46].

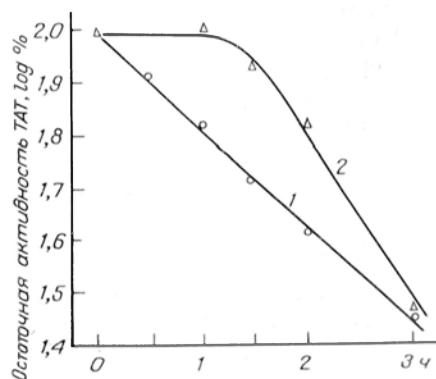


Рис. 8. Кинетика инактивации анодного (1) и катодного (2) изоферментов ТАТ печени крыс под действием лизосомальных препаратов [46].

ного изофермента начинается сразу после добавления лизосом в систему *in vitro*, инактивация же катодного изофермента — после значительного лаг-периода, который продолжается по крайней мере 1 ч (рис. 7). Вероятно, в данном случае инактивация катодного изофермента представляет собой многоступенчатый процесс. Можно думать, что в составе катодного изофермента ТАТ присутствует некая структура-протектор, которая подвергается протеолизу в течение лаг-периода; затем начинается инактивация собственно апофермента.

Анализ кинетики инактивации (рис. 8) показывает, что инактивация анодного изофермента ТАТ в присутствии лизосомальных препаратов хорошо соответствует кинетике реакции первого порядка и, таким образом, кинетике деградации белков животных тканей *in vivo* [46—48]. Интересно,

дальтон [50]. Представляется перспективным выделение таким способом специфической мРНК для катодного (неиндуцируемого) изофермента ТАТ и сопоставление свойств специфических мРНК.

Роль множественных форм ТАТ в ферментном гомеостазе клетки

Следует обсудить физиологическую значимость множественных форм (изоферментов) ТАТ. Известно, что индукционный период при введении кортизола длится от 1 до 5 ч, уже через 6 ч после введения кортизола начинается постиндукционный период, во время которого быстро понижается активность ТАТ, что обусловлено, вероятно, уменьшением концентрации данного индуцибельного фермента в клетках печени. Как уже отмечалось, общая активность ТАТ в постиндукционном периоде понижается за счет уменьшения активности только индуцируемых изоферментов (см. рис. 2) [30, 31].

Индукцируемые анодные изоферменты ТАТ обладают большей чувствительностью к инактивирующему действию протеаз по сравнению с неиндуцируемыми катодными изоферментами [31]. При анализе чувствительности очищенных изоферментов ТАТ к действию трипсина и химотрипсина были выявлены те же закономерности, которые были обнаружены при исследовании изоферментов ТАТ в экстрактах печени (см. рис. 5 и 6). Повышенная чувствительность к протеазам не связана с введением кортизола животным, а является имманентным свойством индуцируемых изоферментов ТАТ [31, 40].

Тот факт, что именно индуцируемые изоферменты ТАТ, которые быстро исчезают в постиндукционном периоде, обладают повышенным сродством к протеолитическим агентам, находится в хорошем соответствии с экспериментальными работами, в которых установлена корреляция между временем полужизни фермента *in vivo* и его чувствительностью к протеазам *in vitro* [47, 48, 54], в том числе к лизосомальным протеазам [55]. Более того, в настоящее время предполагают, что именно различие в чувствительности к протеолитическим агентам и определяет скорость деградации тканевых белков [46, 48, 55—57]. Весьма вероятно, что обнаруженные нами различия в характере чувствительности очищенных изоферментов ТАТ к лизосомальным протеазам *in vitro* (см. рис. 7 и 8) являются причиной, обуславливающей различия в скорости деградации данных изоферментов *in vivo*.

Литвак и Розенфельд [59] обнаружили, что существует корреляция между относительной скоростью диссоциации кофермента и временем полужизни *in vivo* для ряда сложных ферментов. При этом оказалось, что те пиридоксальные ферменты, которые прочно связаны со своим коферментом (пиридоксаль-5'-фосфатом), обладают большим временем полужизни *in vivo*. Этот факт послужил основой для предположения авторов о том, что диссоциация кофермента является лимитирующей стадией в процессе внутриклеточной деградации сложных пиридоксальных ферментов.

Полученные нами данные, свидетельствующие о более прочном связывании пиридоксаль-5'-фосфата катодным изоферментом ТАТ [40], хорошо согласуются с этим предположением. Кроме того, результаты наших экспериментов показывают, что причиной, обуславливающей высокую скорость деградации ферментных белков *in vivo* при диссоциации пиридоксаль-5'-фосфата, может быть высокая чувствительность апоферментов к протеолитическим агентам, которая, возможно, и определяет высокую скорость деградации [46, 47, 54, 55]. Действительно, пиридоксаль-5'-фосфат в определенной степени защищает апофермент анодного изофермента ТАТ от протеолитической деградации под действием трипсина (см. рис. 5).

Повышенная чувствительность анодного изофермента ТАТ к протеолиту объясняется, вероятно, не только более «рыхлой», чем у катодного изофермента, связью кофермента с апоферментом и их диссоциацией, но и особыми структурными свойствами самого апофермента. Это видно из того, что химотрипсин одинаково эффективно инактивирует анодный изофер-

мент ТАТ как в отсутствие, так и в присутствии пиридоксаль-5'-фосфата (см. рис. 6). Не обнаружено также влияния кофермента на чувствительность анодного изофермента ТАТ к лизосомальным протеазам (см. рис. 7 и 8).

Наличие индуцируемых и конститутивных изоферментов у одного и того же фермента и прямая корреляция между индуцибельностью и чувствительностью к протеолитическим факторам позволяют не только обеспечить «аварийную» потребность клетки в этом ферменте (например, при стрессе) за счет избирательной индукции этих изоферментов, но и быстро понизить уровень фермента, когда потребность в нем исчезает. Это существенный момент регуляции клеточного гомеостаза. Вполне вероятно, что одной из важных функций изоферментов вообще является обеспечение оперативной регуляции, которая достигается наличием индуцируемых и в то же время легко гидролизующихся молекулярных форм ферментов [4]. Рассмотренные здесь индуцируемые и конститутивные изоферменты ТАТ печени — конкретный пример регуляторной системы такого рода.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Pitot H. C., Yatvin M. B.* — *Physiol. Rev.*, 1973, v. 53, p. 228—325.
2. *Протасова Т. Н.* Гормональная регуляция активности ферментов. М., 1975, с. 11—43.
3. *Юдаев Н. А., Покровский Б. В., Протасова Т. Н.* — В кн: Биохимия гормонов и гормональной регуляции. М., 1976, с. 326—374.
4. *Salganik R. I.* — In: *The Cell Nucleus*. Ed. H. Bush. New York, 1979, v. 7, p. 327—368.
5. *Kenney F. T., Wick W. D., Greenman D. L.* — *J. cell. comp. Physiol.*, 1965, v. 66, Suppl. 1, p. 125—136.
6. *Schultz G., Killewich L., Chen G. et al.* — *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, 1975, v. 72, p. 1017—1020.
7. *Roewekamp W. G., Hofer E., Sekeris C. E.* — *Europ. J. Biochem.*, 1976, v. 70, p. 259—268.
8. *Sarkar P. K., Griffith B.* — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1976, v. 68, p. 675—681.
9. *Markert C. L., Whitt G. S.* — *Experimentia*, 1968, v. 24, p. 977—1088.
10. *Markert C. L.* — In: *Isozymes*. Ed. C. L. Markert. New York, 1975, v. 1, p. 1—10.
11. *Inoue H., Kasper C. B., Pitot H. C.* — *J. biol. Chem.*, 1971, v. 246, p. 2626—2632.
12. *Pitot H. C., Iwasaki J., Inoue H. et al.* — *Gann Monogr. Cancer Res.*, 1972, v. 13, p. 191—204.
13. *Pitot H. C., Lyons R., Rodriguez J.* — In: *Isozymes*. Ed. C. L. Markert. New York, 1975, v. 2, p. 785—796.
14. *Lin E. C. C., Knox W. E.* — *J. biol. Chem.*, 1958, v. 233, p. 1186—1189.
15. *Lang N. B., Herrlich P., Sekeris C. E.* — *Acta endocr. (Kbh.)*, 1968, v. 57, p. 33—44.
16. *Kenney F. T.* — *J. biol. Chem.*, 1962, v. 237, p. 1610—1614.
17. *Kenney F. T.* — *Ibid.*, p. 3493—3498.
18. *Litwack G., Sears M. L., Diamondstone T. I.* — *Ibid.*, 1963, v. 238, p. 302—305.
19. *Rosen F., Hardling H. R., Millholland R. J. et al.* — *Ibid.*, p. 3725—3729.
20. *Левиц Ф. Б.* — Докл. АН СССР, 1966, т. 168, с. 1422—1424.
21. *Мертвецов Н. П., Сапрыкин В. А.* — Лабор. дело, 1971, № 1, с. 18—19.
22. *Holt P. G., Oliver I. T.* — *FEBS Letters*, 1969, v. 5, p. 89—91.
23. *Holt P. G., Oliver I. T.* — *Int. J. Biochem.*, 1971, v. 2, p. 212—220.
24. *Iwasaki Y., Pitot H. C.* — *Life Sci.*, 1971, v. 10, p. 1071—1079.
25. *Iwasaki Y., Lamar C., Danenberg K. et al.* — *Europ. J. Biochem.*, 1973, v. 34, p. 347—357.
26. *Johnson R. W., Poberson L. E., Kenney F. T.* — *J. biol. Chem.*, 1973, v. 248, p. 4521—4527.
27. *Spencer C. J., Gelehrter T. B.* — *Ibid.*, 1974, v. 249, p. 577—583.
28. *Johnson R. W., Grossman A.* — In: *Isozymes*. Ed. C. L. Markert. New York, 1976, v. 1, p. 419—432.
29. *Beck J.-P., Beck G., Wong K. Y. et al.* — *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, 1972, v. 69, p. 3615—3619.
30. *Mertvetsov N. P., Chesnokov V. N., Salganik R. I.* — *Biochim. biophys. Acta*, 1973, v. 315, p. 61—65.
31. *Мертвецов Н. П., Сапрыкин В. А., Чесноков В. И. и др.* — Биохимия, 1974, т. 39, с. 3—9.
32. *Valeriote F. A., Auricchio F., Tomkins G. M. et al.* — *J. biol. Chem.*, 1969, v. 244, p. 3618—3624.
33. *Johnson R. W., Grossman A.* — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1974, v. 59, p. 520—526.
34. *Smith G. L., Pearce P. H., Oliver I. T.* — *Life Sci.*, 1975, v. 16, p. 437—450.
35. *Rodriguez J. M., Pitot H. C.* — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1975, v. 65, p. 510—518.

36. Aviram M., Hershko A. — Biochim. biophys. Acta, 1977, v. 498, p. 83—90.
37. Rodriguez J. M., Pilot H. C. — Arch. Biochem., 1976, v. 177, p. 185—195.
38. Sadler J. W., Holt P. G., Oliver I. G. — FEBS Letters, 1970, v. 6, p. 46—48.
39. Чесноков В. Н., Мертвецов Н. П. — Изв. Сибир. отд. АН СССР, Сер. биол., 1975, вып. 1, № 5, с. 148—152.
40. Мертвецов Н. П., Чесноков В. Н., Сахно Л. В. и др. — Биохимия, 1976, т. 41, с. 1352—1366.
41. Kenney F. T. — J. biol. Chem., 1959, v. 234, p. 2707—2712.
42. Hayashi S.-I., Granner D. K., Tomkins G. M., — Ibid., 1967, v. 242, p. 3998—4006.
43. Rosenberg J. S., Litwack G. — Ibid., 1970, v. 245, p. 5677—5684.
44. Ильдуганова Н. А., Чесноков В. П., Мертвецов Н. П. и др. — Вопр. мед. химии, 1977, т. 23, с. 226—232.
45. Miller J. E., Litwack G. — J. biol. Chem., 1971, v. 246, p. 3234—3240.
46. Чесноков В. Н. Изучение свойств изоферментов тирозинаминотрансферазы и гексокиназы печени, индуцируемых гормонами. Автореф. дис. канд. Киев, 1976.
47. Bond Y. S. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1971, v. 43, p. 333—339.
48. Goldberg A. L., Dice J. F. — Ann. Rev. Biochem., 1974, v. 43, p. 835—864.
49. Roeselkamp W. G., Sekeris C. E., Staerk J. — FEBS Letters, 1977, v. 73, p. 225—228.
50. Адлер В. В., Мечитов В. Н., Шапот В. С. — Докл. АН СССР, 1977, т. 233, с. 719—721.
51. Мертвецов Н. П., Ильдуганова Н. А., Чесноков В. Н. Биохимия, 1978, т. 43, с. 959—964.
52. Мертвецов Н. П., Чесноков В. Н., Блинова Н. Н. и др. — Там же, с. 919—927.
53. Мертвецов Н. П., Чесноков В. Н., Блинова Н. Н. и др. — Молекулярная биол., 1978, № 4, с. 806—813.
54. Dice J. F., Delinger P. Y., Schimke R. T. — J. biol. Chem., 1973, v. 248, p. 4220—4228.
55. Segal H. L., Winkler J. R., Miyagi M. P. — Ibid., 1974, v. 249, p. 6364—6365.
56. Auricchio F., Mollica L., Liguori A. — Biochem. J., 1972, v. 129, p. 1131—1138.
57. Ray D., Cornell E., Schneider D. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1976, v. 7, p. 1246—1250.

Поступила 26/II 1980 г.

MULTIPLE FORMS OF TYROSINE AMINOTRANSFERASE IN RAT LIVER CELLS AND THEIR ROLE IN CELL HOMEOSTASIS

N. P. Mertvetsov

Special Construction-Technologic Bureau of Biologically Active Substances, Glavmicrobioprom, Novosibirsk

Properties and hormonal regulation of activity of multiple forms of tyrosine aminotransferase in rat liver cells are considered with particular reference to regulation of synthesis of the multiple forms of tyrosine aminotransferase by glucocorticoid hormones. A role of tyrosine aminotransferase multiple forms in the adaptive reactions of cells during induction and postinduction periods is discussed.

УДК 616.153.962.3-074

Г. В. Троицкий, Мухтар Ахмед, Г. Ю. Ажицкий, С. Н. Багдасарьян,
В. А. Гаевская, И. Р. Клишевич, В. Д. Шевцов

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО КОМПОНЕНТА СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА, ХАРАКТЕРНОГО ДЛЯ ПАТОЛОГИИ

Крымский медицинский институт, Симферополь

Методом изоэлектрического фокусирования в борат-полиольной системе охарактеризован альбумин сыворотки крови больных с различной патологией и тяжестью течения болезни. Во всех случаях установлено появление нового изоэлектрического компонента с изоточкой 5,5, который не встречается в норме. Этот белок был выделен и очищен. При изофокусировании в амфолинах его изоточка равна 4,5—4,6. Эти различия объясняются комплексообразованием альбумина с амфолинами. Модифицированный белок иммунохимически соответствует сывороточному альбумину человека, не содержит полимеров, по данным дисперсии оптического вращения (ДОВ)

имеет уменьшенное количество α -спиралей, и одинаковую с нативным альбумином молекулярную массу.

Ранее мы описали структурные изменения альбумина как следствие его постсинтетической модификации в результате лигандирования [1, 2]. В последующем [3] методами дисперсии оптического вращения был обнаружен при патологии сывороточный альбумин человека в частично денатурированном состоянии, на основании чего было высказано предположение о том, что во фракции альбумина содержится модифицированная его форма (A_m). Позднее [2] подобная форма была выделена в денатурированном состоянии методом осаждения ТХУ. Для доказательства существования альбумина A_m необходимы разные и тщательно проверенные методы. В дополнение к ранним публикациям [1—3] мы начали исследование фракций альбумина с помощью изоэлектрического фокусирования, при этом в амфолиновой системе обнаружили при патологии более кислую фракцию [5]. В последующем оказалось, что альбумин изменяет характер своих изофореграмм при хранении его препаратов (старение). Поэтому в настоящей работе мы исследовали альбумин, свежевыделенный из патологической сыворотки, причем в части случаев все белки сыворотки, включая и альбумин, были алкилированы йодоуксусной кислотой для предотвращения процесса старения, вызываемого тиолсульфидным обменом в период выделения альбумина [10]. В дальнейшем этот белок, также как и неалкилированный, анализировался в двух изофокусирующих системах — амфолиновой и борат-полиольной [6—8]. Необходимость сравнения обоих типов градиента связана с выраженным комплексобразованием амфолина с альбумином.

Методика

Выделение альбумина из сыворотки осуществляли методом препаративного электрофореза в полиакриламидном геле по методике, описанной нами ранее [7]. Для алкилирования альбумина в свежую сыворотку крови добавляли монойодоуксусную кислоту из расчета 1,3 г кислоты на 400 мг белка [8] и затем pH сыворотки доводили NaOH до 8,5. После алкилирования сыворотку диализировали против 0,1 М фосфатного буфера pH 7,1; а затем проводили препаративный диск-электрофорез. Выделенный препарат альбумина хранили в замороженном состоянии при температуре -20°C и перед изофокусированием диализировали в течение 24 ч против дистиллированной воды. Изофокусирование в амфолине (pH 4,0—6,0) проводили на аналитической колонке ЛКБ в течение 48 ч при температуре 4°C . Опыт начинали при напряжении 400 В и токе 5 мА, заканчивали при напряжении 1000 В и токе 1—1,5 мА. После фокусирования раствор из колонки с помощью перистальтического насоса подавали через Увикорд на автоматический фракционный коллектор. pH проб измеряли на pH-метре pH-540 при температуре 4°C . Изоэлектрическое фокусирование в борат-полиольной системе проводили на колонке нашей конструкции [6]. Градиент pH был образован на 0,01 М боратном буферном растворе (pH 7,4) путем создания градиента концентрации смеси сахаров и полиолов: маннита, глюкозы, глицерина и сахарозы в соотношении 1 : 1 : 3 : 1. В ряде случаев применяли еще более стабильный pH-градиент, триборат-глицерин. Результаты обоих случаев одинаковы. Градиент pH в интервале 4,0—6,0 создавали предварительно в 20 флаконах путем добавления указанной смеси к буферному раствору под контролем pH-метра до достижения необходимого значения pH в каждом флаконе, в 1-м pH 4,0, во 2-м pH 4,1, в 3-м pH 4,2 и т. д. до pH 6,0 в 20-м флаконе. При этом одновременно возникает и градиент концентрации. Затем в колонку перистальтическим насосом вводили поочередно все растворы начиная с самого кислого, в 18-ю пробу вносили образец белка 8—10 мг предварительно диализованного против данного раствора. После заполнения колонки аппарат подключали к источнику тока. Время фокусирования 20 ч при 20 В/см и токе 2 мА/см². Анализ частоты и иммунохимической идентичности альбумина проверяли методом иммунопреципитации по Оухтерлони и с полипреципитирующей сывороткой, а также с моноспецифической сывороткой против альбумина человека (Берингверке). Анализ дисперсии оптического вращения проводили на спектрополяриметре МО-241 Перкин — Элмер (концентрация белка при измерении 0,5%). Параметры λ_c , a_0 , b_0 рассчитывали по уравнениям Друде и Моффита [3]. Диск-электрофорез проводили в 7% полиакриламидном геле (ПААГ) по общепринятой методике при pH 8,6. Молекулярную массу определяли посредством электрофореза в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия.

Результаты и их обсуждение

Альбумины, выделенные у 64 здоровых людей разного возраста и пола, были проанализированы методом изофокусирования в борат-полиольной

Изменения в изоэлектрических точках альбумина при его хранении и патологии по данным изофокусирования в борат-полиольной системе

Альбумин	Соотношение фракций с данным p_i (в %) и стандартное отклонение ($\pm \sigma$)					
	4,3—4,7	4,7—4,9	4,9—5,2	5,2—5,3	5,3—5,6	5,6—5,8
Свежевыделенный, без алкилирования	4,20 \pm 0,30	15,4 \pm 0,68	65,0 \pm 0,90	15,2 \pm 0,90	0	0
Неалкилированный, хранившийся при 7 °С в течение 1 мес	4,00 \pm 0,35	10,0 \pm 0,90	42,0 \pm 1,00	10,0 \pm 0,80	25,0 \pm 1,00	9,00 \pm 0,90
Свежевыделенный, алкилированный	4,80 \pm 0,34	15,9 \pm 1,00	64,1 \pm 1,20	15,2 \pm 0,70	0	0
Алкилированный, хранившийся при 7 °С в течение 1 мес	5,00 \pm 0,30	8,00 \pm 0,50	58,0 \pm 1,80	7,00 \pm 0,50	11,0 \pm 0,80	0
Выделенный при патологии:						
ревматизм (8) *	10,6 \pm 1,9	5,60 \pm 0,80	51,8 \pm 2,03	10,1 \pm 1,30	14,0 \pm 1,20	3,08 \pm 1,90
рак различных внутренних органов (13) **	6,70 \pm 1,60	4,30 \pm 1,34	18,2 \pm 2,70	17,3 \pm 2,30	45,9 \pm 2,90	9,30 \pm 1,90
рак различных внутренних органов (9) ***	1,40 \pm 0,11	0,85 \pm 0,02	4,85 \pm 1,20	6,40 \pm 1,30	73,2 \pm 3,40	13,3 \pm 3,20

П р и м е ч а н и е. Одна звездочка — легкая форма, две и три — тяжелая или крайне тяжелая. В скобках — число случаев.

системе в идентичных условиях. Анализ изоэлектрических спектров показал, что во всех изученных случаях характер сывороточного альбумина варьирует в небольших пределах. В том случае, когда белки сыворотки были предварительно алкилированы, изофореграмма выделенного альбумина практически не отличалась от неалкилированного белка, несмотря на то что количество SH-групп было снижено с 0,7 до 0,1 М/М и при этом к 130 карбоксильным группам альбумина была добавлена еще одна. Это объясняется тем, что увеличение избыточного отрицательного заряда в

этом случае незначительно и поэтому алкилирование практически не отражается на характере изофореграммы альбумина. Таким образом, алкилирование йодоуксусной кислотой несколько снижает старение при хра-

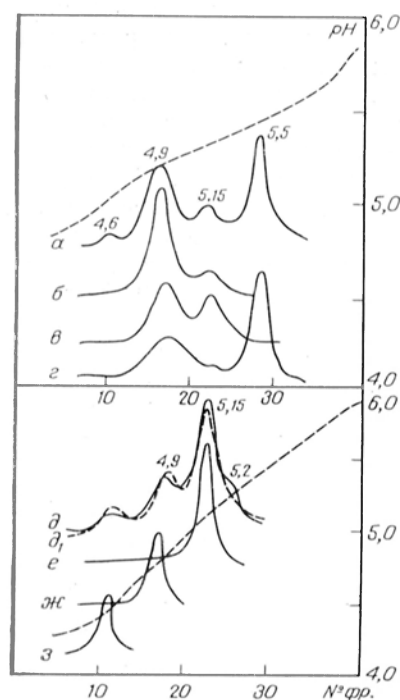


Рис. 1. Изоэлектрическое фокусирование и рефокусирование фракций альбумина из сыворотки здорового человека. Данные, полученные в амфолине pH 4,0—6,0: а — целый альбумин; б — рефокусирование фракции с изоэлектрической точкой pI 4,9; в — тоже с pI 5,15 и з — тоже с pI 5,5. Данные, полученные в борат-полиольном pH-градиенте для того же образца альбумина: а — весь белок; d₁ — он же после алкилирования; е — рефокусирование фракций: с — pI 5,15; жс — pI 4,9; з — pI 4,6.

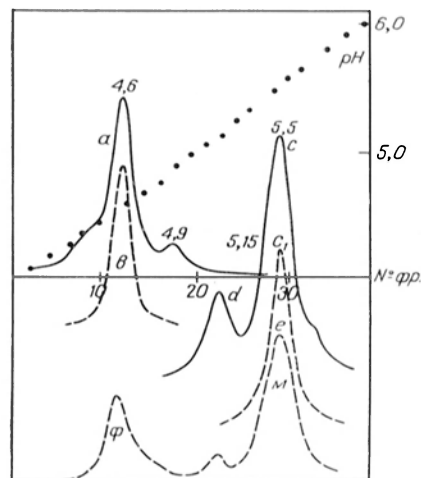


Рис. 2. Изоэлектрическое фокусирование альбумина, выделенного от больного с тяжелой формой рака печени.

В амфолинах: а — весь альбумин; б — рефокусирование «патологической фракции pI 4,6». В борат-полиольном pH-градиенте: тот же альбумин; видно, что вместо фракции 4,6 обнаруживается фракция 5,5, в норме несвойственная этому типу градиента; в — рефокусирование фракции 5,5. «м, ф» — «патологический альбумин» — фракция «с» после инкубации с амфолином и при повторном фокусировании в борат-полиольном pH-градиенте; видно появление добавочной фракции 4,6 «ф» и уменьшение фракции 5,5 «м» (см. текст).

нении (см. таблицу). Сравнение изоэлектрических спектров свежевыделенного альбумина, полученных в амфолине и в борат-полиольной системе, приведено на рис. 1. Сравнение изоэлектрических спектров свежевыделенного неалкилированного альбумина, полученных в амфолине и в борат-полиольной системе, показало, что один и тот же белок дает в амфолине спектр с pI 4,9 — основной пик, 5,1 и 5,5 (см. рис. 1, а), в то время как в борат-полиольной системе основной пик имеет pI 5,15 и малые пики с pI 4,6 и 4,9, а также плечо с pI 5,25 (см. рис. 1, д). Для того чтобы понять причину этого различия, каждый из пиков был накоплен и выделен, а затем подвергнут рефокусированию в амфолинах (см. рис. 1, б, в, з), пик — 4,9 (см. рис. 1, б, в, з), 5,15 (см. рис. 1, в), 5,5 (см. рис. 1, д). Только фракция 4,8 при рефокусировании дает более гомогенный пик, все остальные фракции даже при повторном фокусировании дают дополнительные компоненты, а фракция 5,5 дает весь спектр. Эти данные указывают на выраженность процессов комплексобразования альбумина с амфолинами. Рефокусирование в борат-полиольной системе позволяет выделить каждую

из фракций в гомогенном виде (рис. 1, *е, ж, з*). Естественно теперь сравнить данные для патологической фракции альбумина, полученного от больного с тяжелой формой рака печени, характеристика которого в амфолине была описана нами ранее [5]. В обоих типах градиента (рис. 2) получена высокая степень гомогенности альбумина. В амфолине белок фокусируется в виде пика с pI 4,6 (см. рис. 2, *а*) и при рефокусировании дает гомогенный пик с той же изоточкой (см. рис. 2, *в*). В то же время в борат-полиольной системе спектр этого же белка имеет необычный основной пик с pI 5,5 (см. рис. 2, *с*) и малый компонент с pI 5,15; при рефокусировании удается выделить пик с pI 5,5 в гомогенном виде. Таким образом, обе изофокусирующие системы дают на одном и том же белке различные результаты.

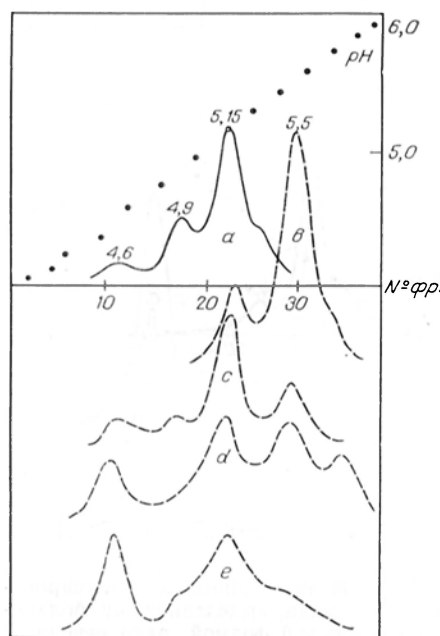


Рис. 3. Изoeлектрическое фокусирование различных образцов альбумина, полученных от больных разной тяжестью заболевания в борат-полиольном pH -градиенте.

а — норма; *с, д, е* — средняя тяжесть рака печени; *в* — тяжелые больные; видно резкое разрастание фракции 5,5.

Для того чтобы объяснить это явление, этот же образец был инкубирован с 1 % амфолином в течение 24 ч при температуре 4 °C (амфолин 4—6 № 37 1809—116, 10.1977 г.), затем альбумин был диализирован против дистиллированной воды в течение 24 ч и исследован в борат-полиольной системе (см. рис. 2). Получены две фракции с pI 4,5—4,6 и 5,5. Это позволяет сделать вывод, что альбумин с pI 4,6 связан с амфолином и не отделился от него во время диализа. Таким образом, хотя для обнаружения фракции альбумина, появляющейся при патологии, могут быть применены обе изофокусирующие системы, предпочтение следует отдавать борат-полиольному изофокусированию, так как в этом случае нет необходимости предпринимать специальные меры по очистке белка от амфолинов, мешающих дальнейшему химическому изучению этого белка, положение pI тоже, видимо, было более правильно в случаях боратного pH -градиента.

В таблице приведены данные по исследованию альбумина при различной патологии и тяжести заболевания. Методом изофокусирования в борат-полиольной системе были изучены альбумины, полученные у больных ра-

ком кишечника, желудка, молочной железы, легких, печени, матки, а также у больных ревматизмом и ишемической болезнью сердца. Результаты исследования показывают, что для всех случаев патологии характерно появление новой фракции с pI 5,5, процентное содержание которой значительно варьирует в зависимости от степени тяжести и вида болезни. Типы изофокусирования для альбуминов, выделенных у больных с различной степенью тяжести патологического процесса, приведены на рис. 3. Во всех изученных случаях фракция с pI 5,5 была накоплена, диализирована против 0,01 М боратного буфера с pH 7,4 и сконцентрирована. Последующее одно- или двукратное рефокусирование позволило получить этот компонент в чистом виде. Иммунохимическое сравнение с альбумином, выделенным у здорового человека, показало их полную идентичность. Анализ диск-электрофореза в присутствии и отсутствии додецилсульфата натрия показал, что оба белка не содержат полимеров, а молекулярные массы их практически одинаковы. Данные ДОВ указывают, что выделенный компонент

умеренно деспирализован и имеет следующие дисперсионные характеристики $\lambda_c = 260$, $a_0 = -340^\circ$, $b_0 = -260^\circ$ (в норме $b_0 = -300^\circ$).

Хорошо известно, что амфолин легко связывается с сывороточным альбумином человека, а это приводит к появлению артефактных фракций при изофокусировании в амфолинах [11, 12]. Это явление связано со способностью альбумина переносить большое количество различных веществ, а также связывать широкий класс органических соединений. Трудность отделения амфолина от альбумина свидетельствует о том, что взаимодействие происходит с одним из активных центров связывания альбумина. Не исключено, что существуют сложные конкурентные взаимоотношения между естественными лигандами альбумина и амфолином. Поэтому применение борат-полиольной системы более желательно, так как сахара и полиолы легко удаляются диализом или гель-фильтрацией.

Исследования последнего времени показали, что сывороточный альбумин труден для изучения прежде всего из-за его микрогетерогенности, которая является следствием естественного лигандирования и может возникать из-за образования конформеров при окислении тиоловой группы или вследствие тиол-дисульфидного обмена; не исключена связь микрогетерогенности с генетическими причинами. Именно поэтому необходимы различные методические подходы.

Сравнение результатов изофокусирования альбумина в амфолиновой и борат-полиольной системе показывает, что различия между изофореграммами наиболее существенны для свежевыделенных препаратов альбумина, в то время как для коммерческих препаратов эти различия минимальны [13]. Это можно объяснить тем, что в процессе промышленного выделения, обработки и последующего хранения альбумин модифицируется и в меньшей мере компенсируется с амфолином, чем нативный. При патологии альбумин, как правило, перегружен различными веществами, что, возможно, и сказывается на характере изoeлектрического спектра. Ранее [4] нами было выявлено, что у патологического альбумина путем переосаждения альбумина из 70 % этанола, содержащего ТХУ, удается отделить нормальный альбумин от патологического компонента ввиду потери модифицированным альбумином способности растворяться в этаноле, содержащем ТХУ. Нагрузка альбумина или денатурация различными лигандами также приводит к появлению этого компонента [4]. В патологическом компоненте изофокусирования (pI 5,5) реакция альбумина с этанолом, содержащим ТХУ, также оказывается положительной, главным образом во фракциях с pI 5,5 (потеря растворимости). Соотношение этих методов требует, однако, специальных исследований. Механизм образования нового компонента альбумина при патологии неясен и в силе остается высказанное ранее предположение [12]: метаболическая перегрузка альбумина с последующим нарушением вторичной структуры, модификация и частичная денатурация. Хотя общность изменений при хранении [11, 12] и при патологии свидетельствует в пользу этого взгляда, она не исключает того, что в каждом случае действуют совершенно разные причины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Троицкий Г. В. — В кн.: Всесоюзный съезд физиологов, биохимиков и фармакологов. 9-й. Тезисы. М., 1959, т. 2, с. 610.
2. Троицкий Г. В., Соркина Д. А., Окулов В. И. — В кн.: Международный биохимический конгресс. 5-й. Рефераты секционных сообщений. М., 1961, т. 2, с. 151—156.
3. Троицкий Г. В., Селиванова С. Ф., Гордеев Ю. И. — Укр. біохім. ж., 1970, т. 42, с. 39—43.
4. Багдасарьян С. И., Троицкий Г. В. — В кн.: Структура, функции и свойства иммуноглобулинов. Киев. 1972, вып. 8, с. 97—99.
5. Гаевская В. А., Ажицкий Г. Ю., Троицкий Г. В. и др. — Клин. хир., 1978, № 10, с. 37—41.
6. Троицкий Г. В., Завьялов В. П., Абрамов В. М. — Докл. АН СССР, 1974, т. 214, с. 955—958.
7. Troitsky G. V., Zav'yalov V. P., Kirjukin I. F. et al. — Biochim. biophys. Acta, 1975, v. 400, p. 21—31.

8. Троицкий Г. В., Ажицкий Г. Ю., Малый К. Д. — Вopr. мед. химии, 1976, т. 22, с. 282—286.
9. Ажицкий Г. Ю., Багдасарьян С. Н. — Лабор. дело, 1975, № 12, с. 712—714.
10. Алексеев Л. П. — В кн.: Современные методы в биохимии. М., 1968, т. 2, с. 310—326.
11. Nikkel H. L., Foster J. F. — Biochemistry (Wash.), 1975, v. 10, p. 4479—4486.
12. Wallevik K — Biochim. biophys. Acta, 1973, v. 322, p. 75—87.
13. Ажицкий Г. Ю., Троицкий Г. В., Малый К. Д. — Биохимия, 1976, т. 41, № 4, с. 597—603.
14. Троицкий Г. В., Багдасарьян С. Н., Толкачева Н. В. и др. — Молекулярная биология, Киев, 1975, вып. 12, с. 89—98.

Поступила 19/VII 1980 г.

ISOLATION AND PURIFICATION OF AN UNSPECIFIC COMPONENT FROM HUMAN SERUM ALBUMIN, TYPICAL FOR PATHOLOGY

G. V. Troitsky, Muchtar Akhmed, G. Yu. Azhitsky, S. N. Bagdasaryan, V. A. Gaeuskaya, I. R. Klishevich, V. D. Shevtsov

Krimean Medical School, Simferopol

Albumin from blood serum of healthy persons and from patients with various pathologies and different severity of diseases was characterized using isoelectric focusing in borate-polyol system. In all the pathologies studied a new component occurred, which had an isoelectric point at pH 5.5 and which was not found in fresh albumin preparations isolated from healthy persons. This fraction was isolated and purified. Its isoelectric point was near pH 4.5-4.6 in isoelectrofocusing with ampholines. The divergences were due to complex formation of albumin with ampholines. The modified protein corresponded immunochemically to the human blood serum albumin, did not contain polymers, had a decreased amount of α -helix structures as shown by dispersion of optic rotation and its molecular mass was similar to the mass of native albumin.

УДК 612.173.1.015.11:577.152.1]-06:[612.273.2+612.223.1:546.264-31]

Н. И. Михалкина, В. С. Сверчкова

АКТИВНОСТЬ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В СЕРДЦЕ КРЫС ПРИ ГИПОКСИЧЕСКИ-ГИПЕРКАПНИЧЕСКИХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

Институт физиологии АН Казахской ССР, Алма-Ата

Известно, что непродолжительная (7, 10, 14 дней) тренировка гипоксией повышает резистентность организма к воздействию экстремальных факторов. Наиболее оптимальным считается месячный срок тренировки [1]. С этой целью применяют и гипоксически-гиперкапнические воздействия с учетом представлений о положительном стимулирующем влиянии углекислоты на оксигенацию органов за счет расширения сосудов, напряжение кислорода в тканях и окислительные процессы и т. д. [2, 3]. Имеются данные об изменении метаболических процессов после одно-, двухкратного гипоксически-гиперкапнического воздействия [4, 5]. Вместе с тем мы не нашли исследований о влиянии многократных гипоксически-гиперкапнических нагрузок на обменные процессы миокарда. В настоящей работе изучена активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в крови и ткани сердца крыс в процессе адаптации животных к действию гипоксически-гиперкапнических экспозиций различной кратности.

Методика

Опыты проведены на 72 белых крысах-самцах массой 150—250 г. Гипоксически-гиперкапнические условия создавали путем ежедневного помещения животных в замкнутое пространство (эксикаторы объемом 7,6 л) в среднем на 1½ ч. К концу экспозиции содержание кислорода в вентилируемом объеме составляло 10%, углекислоты — 8%. Семь опытных групп животных подвергали сочетанному действию гипоксии и гиперкапнии (СДГГ) соответственно в течение 1, 2, 3, 7, 10, 15 и 30 дней; 8-я группа была контрольной. Животных умерщвляли через 1 сут после последнего воздействия под гексеналовым наркозом (0,1 г/100 г массы). Активность ЛДГ определяли в крови и ткани левого и правого желудочков сердца по методике Севела и Товарека [6] и выражали в микромолях пировиноградной кислоты на 1 мл сыворотки или 1 мг ткани за 1 ч при 37 °С. Материал обработан статистически по методу И. А. Ойвина [7].

Результаты и обсуждение

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о фазном характере изменения активности ЛДГ при сочетанном действии гипоксии и гиперкапнии. Как видно из рис. 1, в течение первых 3 дней СДГГ активность ЛДГ понижается. Например, в ткани правого желудочка сердца изменение составило в 1-й день СДГГ $76,55 \pm 9,53\%$, во 2-й — $52,65 \pm 9,67\%$ и в 3-й — $38,18 \pm 3,47\%$ (все изменения рассматриваются по сравнению с контролем, принятым за 100). На 7-й день наблюдается незначи-

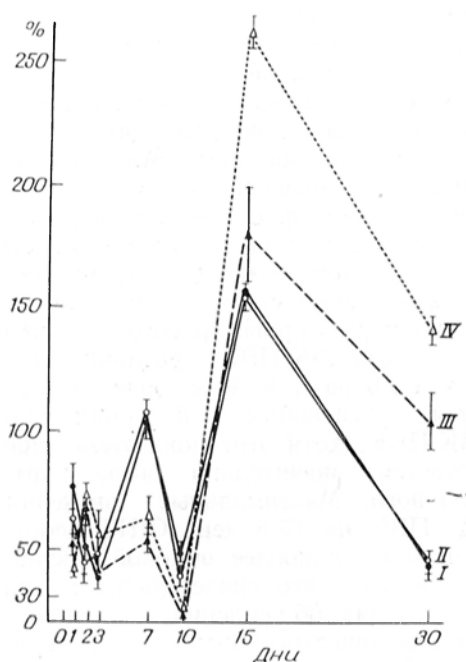


Рис. 1. Активность ЛДГ в сердце крыс при гипоксически-гиперкапнических воздействиях.

I — ткань правого желудочка сердца, II — ткань левого желудочка. Кровь правого (III) и левого (IV) желудочков. По оси абсцисс — длительность воздействия; по оси ординат — изменения, в % к контролю.

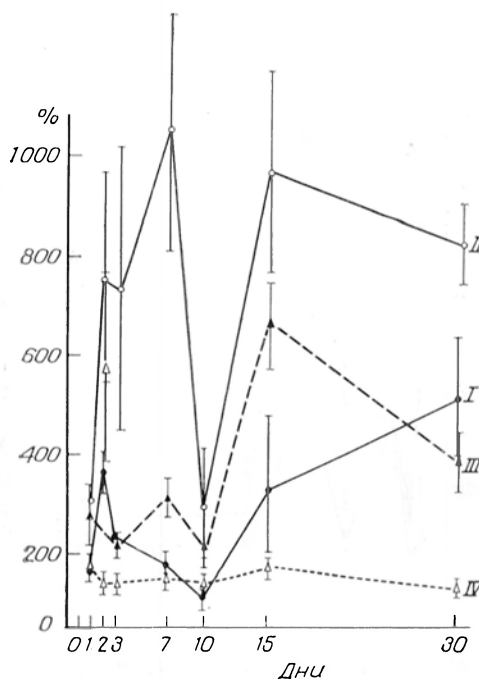


Рис. 2. Изменение отношения МК/ПВК в сердце крыс при гипоксически-гиперкапнических воздействиях.

Обозначения те же, что на рис. 1.

ное повышение активности ЛДГ (в ткани правого желудочка сердца оно составило $102,69 \pm 4,56\%$). К 10-му дню активность ЛДГ минимальна во всех пробах (в ткани правого желудочка, например, она составила $26,62 \pm 1,05\%$). Максимальное повышение активности ЛДГ во всех пробах наблюдалось на 15-й день воздействия. Так, в левом желудочке изменение в ткани составляло $159,76 \pm 4,01\%$, в крови — $154,57 \pm 5,43\%$, в правом — соответственно $182,74 \pm 21,41$ и $263,86 \pm 6,61\%$. 30-дневные гипоксически-гиперкапнические экспозиции вызвали значительное понижение активности ЛДГ в ткани сердца: в правом желудочке — $42,24 \pm 7,03\%$, в левом — $43,03 \pm 5,07\%$; в сыворотке крови правого и левого желудочков сердца активность ЛДГ несколько превышала контрольные значения — соответственно $102,51 \pm 10,99$ и $140,70 \pm 5,67\%$.

О том, что активность ЛДГ имеет фазовый характер при действии различных экстремальных факторов, известно из ряда работ. Так, М. Ф. Выход [18] при экспериментальном стенозе аорты, вызывающем нарушение кислородного режима сердца, через 2 дня после наложения лигатуры на аорту отметил снижение активности ЛДГ, а к 10-му дню — превышение нормальных величин. О фазной активности ЛДГ свидетельствуют исследования, посвященные изучению обменных процессов в организме при значительной

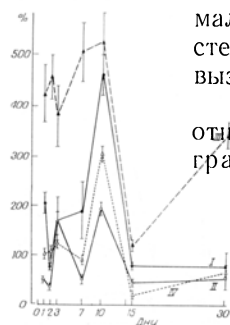


Рис. 3. Содержание ПВК в сердце крыс при гипоксически-гиперкапнических воздействиях.

Обозначения те же, что на рис. 1.

мышечной нагрузке [9—11], а также в условиях горной гипоксии [1, 12]. По мнению В. И. Баева, фазность в активности регулирующих систем является «неспецифической и общей реакцией организма на ряд экстремальных воздействий» [11]. Известно, что периодические изменения систем метаболизма при транспорте кислорода и углекислоты в кровотоке вызывают стабилизацию энергетического статуса [13].

Для анализа активности ЛДГ мы использовали расчетную величину отношения содержания молочной кислоты (МК) к содержанию пируватной (ПВК) — МК/ПВК, которое, по данным наших предыдущих исследований [14] и по мнению ряда авторов, характеризует интенсивность анаэробного гликолиза [13, 15]. Из рис. 2 видно, что даже однократное гипоксически-гиперкапническое воздействие приводит к увеличению отношения МК/ПВК. К 10-му дню значения этого показателя для всех проб минимальны, хотя остаются выше нормы, кроме пробы крови из левого желудочка; на 15-й день они становятся максимальными (например, в крови правого желудочка сердца МК/ПВК увеличивается почти в 6 раз). К 30-му дню отмечается тенденция к снижению МК/ПВК, хотя этот показатель еще остается значительно выше контрольного. Максимальные значения МК/ПВК на 15-й день СДГГ соответствуют наиболее высокой активности ЛДГ, что свидетельствует, на наш взгляд, об усилении анаэробного гликолитического пути в этот период. Аналогичный характер изменений МК/ПВК и активность ЛДГ наглядно иллюстрируют рис. 1 и 2.

Как видно из рис. 3, максимальным содержанием пирувата, который является субстратом ЛДГ и осуществляет регулирование ее активности, становится на 10-й день СДГГ (в ткани и в крови правого и левого желудочков сердца содержание ПВК составляет соответственно $433,45 \pm 85,50$; $172,03 \pm 27,53$; $307,42 \pm 20,13$ и $525,83 \pm 129,18$ %). Значительное накопление пирувата в этот период, с одной стороны, обуславливает низкие значения МК/ПВК, а с другой, возможно, приводит к уменьшению активности ЛДГ. Последнее, вероятно, связано с тем, что ЛДГ в сердце крысы представлена тремя изoenзимами: H_3M , H_2M_2 и H_3 , из которых субъединица H , присущая тканям с выраженным аэробным обменом (сердце, мозг), неактивна при высоких концентрациях пирувата [8, 16]. Наблюдаемое нами к 15-му и 30-му дням СДГГ снижение уровня пирувата, вероятно, можно объяснить усилением его карбоксилирования, которое, согласно имеющимся в литературе данным [11], следует рассматривать как один из механизмов, лежащих в основе приспособительных реакций организма.

Следует также отметить, что в первые дни СДГГ активность ЛДГ выше в пробах ткани, чем в сыворотке крови (например, в 1-й день в ткани правого желудочка сердца она составила $76,55 \pm 9,53$ %, а в крови — $53,99 \pm 4,73$ %). В последующем становилась более высокой активность ЛДГ в пробах крови (на 15-й день в ткани $159,76 \pm 4,01$ %, в крови $182,74 \pm 21,41$ %, на 30-й — соответственно $42,24 \pm 7,03$ и $102,51 \pm 10,99$ %). Этот факт, вероятно, можно объяснить усилением диффузии фермента из миокарда в кровь за счет повышенной проницаемости клеточных мембран

для макромолекул, такое же явление наблюдается при инфаркте миокарда [16] и при гипоксии [17, 18].

Таким образом, активность ЛДГ в условиях СДГГ изменяется однонаправленно в миокарде и сыворотке крови сердца и характеризуется определенной фазностью. Снижение содержания пирувата, стабилизация уровня лактата и активности ЛДГ к 30-му дню свидетельствуют, по нашему мнению, об определенной адаптированности обменных процессов в этот период к повторяющимся гипоксически-гиперкапническим воздействиям.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хавкина И. В. — Космическая биол., 1968, № 4, с. 41.
2. Маршак М. Е. Физиологическое значение углекислоты. М., 1969.
3. Бреслав И. С. Произвольное управление дыхания у человека. Л., 1975, с. 12—17.
4. Stephanek I. — Schweiz. med. Wschr., 1977, Bd 107, S. 1820—1821.
5. Finsterer U. H., Luhr G., Wirth A. E. — Acta anaesth. scand., 1978, v. 22, p. 353—360.
6. Sevela M., Tovarek I. — Cas. Lek. ges., 1959, v. 98, p. 844.
7. Ойвин И. А. — Пат. физиол., 1960, № 4, с. 76—85.
8. Вялых М. Ф. — В кн.: Проблемы биохимической адаптации. М., 1966, с. 86—93.
9. Яковлева Б. П. — Физиология человека, 1979, т. 5, с. 352—354.
10. Баев В. И., Берташ В. И., Булах Е. И. и др. — Физиол. ж. СССР, 1977, № 8, с. 1188—1194.
11. Берашмян В. М., Алтымышев А. А. — Космическая биол., 1974, № 5, с. 39—41.
12. Glender M., Geier Th., Reich I. C. et al. — Acta biol. med. germ., 1977, Bd 36, S. 1213—1220.
13. Михалкина Н. И. — Космическая биол., 1980, № 1, с. 80—82.
14. Alexander C., Liu S. M. — Cardiovasc. Res., 1976, v. 10, p. 341—348.
15. Коровкин Б. Ф., Ешина Е. Ф., Предтеченский А. Н. — Лабор. дело, 1969, № 7, с. 17—20.
16. Guarnieri C., Ferrari R., Nayler W. G. et al. — J. molec. cell. Cardiol., 1977, v. 9, p. 16.
17. Spieckermann P. G., Gebhard M. M., Sakal K. — J. molec. Med., 1977, v. 2, p. 331—335.

Поступила 23/V 1980 г.

HYPOXIA-HYPERCAPNIC EFFECTS ON THE LACTATE DEHYDROGENASE ACTIVITY IN RAT HEART TISSUE

N. I. Mikhalkina, V. S. Sverchkova

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

Activity of lactate dehydrogenase (LDH) was studied in blood and tissues of left and right rat heart ventricles after the simultaneous effect of hypoxia and hypercapnia. The animals were kept in the closed space, where content of gases to the end of the experiment (about 1.5 hr) was equal to: O₂ — 10%, CO₂ — 3%. Activity of LDH was decreased within the first 3 days and the maximal enzymatic activity was observed within 15 days; after 30 days of hypoxic-hypercapnic exposure activity of LDH was significantly decreased in myocardium but it reached the control value in the serum of blood obtained from the heart.

УДК 615.355:577.152.314].034.61

Н. Е. Хурсин

ПОВЫШЕНИЕ ДНК-АЗНОЙ АКТИВНОСТИ МОЧИ КРЫС ПОСЛЕ ВНУТРИБРЮШИННОГО ВВЕДЕНИЯ ДНК-АЗ

Институт проблем онкологии им. Р. Е. Кавецкого АН УССР, Киев

Проблема проницаемости клеток для биологически активных макромолекул заслуживает большого внимания. Достаточно указать на способность вирусов вводить внутрь клетки нуклеиновые кислоты, которые могут привести к возникновению инфекционного процесса. Однако последний может появиться только тогда, когда «местные» нуклеазы не могут разрушить нуклеиновые кислоты до такой степени, чтобы они потеряли биологическую активность. В этом случае добавление нуклеаз экзогенного

происхождения может повысить сопротивляемость клеток, что отмечается рядом авторов [1—3].

Задача данной работы — изучение способности нуклеаз проникать через клеточные барьеры без потери биологической активности. С этой целью была изучена ДНК-азная активность мочи крыс после внутрибрюшинного введения ДНК-аз.

Методика

Белым крысам-самцам массой 200 ± 10 г в брюшную полость вводили смесь ДНК-аз американской фирмы «Worthington» (1 часть) и Минского завода эндокринных препаратов (10 частей) на физиологическом растворе — от 2 до 100 мг в объеме от 2 до 10 мл. Контрольные животные получали такое же количество физиологического раствора. Активность кислых и щелочных ДНК-аз определяли методом горизонтальной вискозиметрии, который обладает наибольшей чувствительностью при изучении эндо-ДНК-аз, преобладающих в моче человека и животных. Полученные данные выражали в виде удельной вязкости.

Пробы для определения ДНК-аз содержали 0,5 мл 0,2% раствора ДНК, 0,5 мл соответствующего буфера, 0,5 мл мочи, разведенной физиологическим раствором в соотношении 1 : 32 для определения активности ДНК-аз в кислой (рН 5,6) и 1 : 100 в щелочной (рН 7,4) средах, толуол, а также магний, который добавляли только в пробы с рН 7,4. Удельную вязкость проб измеряли непосредственно после смешивания действующих ингредиентов, а также через 10 и 30 мин при 45°C . Мочу для исследования брали через 2, 3, 5, 6, 16 и 23 ч после введения в брюшную полость ДНК-аз или физиологического раствора. ДНК получали из эритроцитов птиц солевым методом [4].

Результаты и обсуждение

Результаты определения активности ДНК-аз в щелочной среде представлены на рис. 1, где на оси абсцисс указано время взятия мочи для исследования после введения в брюшную полость раствора ДНК-азы или

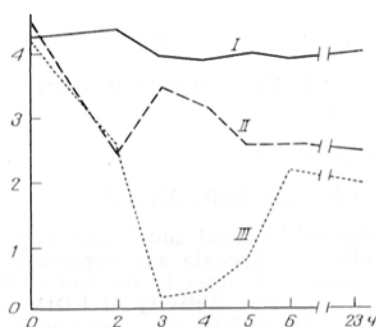


Рис. 1. Изменение активности щелочной ДНК-азы мочи белых крыс.
Объяснения в тексте.

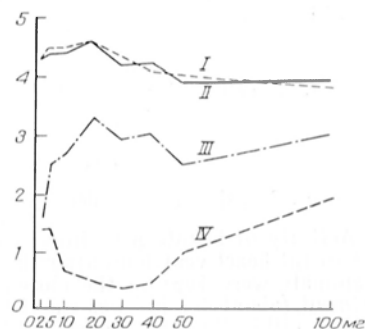


Рис. 2. Зависимость активности кислых ДНК-аз мочи белых крыс от количества вводимого фермента.
Объяснения в тексте.

физиологического раствора, а по оси ординат — удельная вязкость инкубационных смесей. Кривая 1 отражает удельную вязкость инкубационных смесей, не содержавших источника фермента (мочи), кривая 2 — удельную вязкость инкубационных смесей, содержащих мочу тех животных, которым вводили в брюшную полость 5 мл физиологического раствора. Первая точка кривой 2 совпадает с контролем ($4,4 \pm 0,1$ и $4,3 \pm 0,15$), потому что в этом случае удельную вязкость определяли непосредственно после смешивания растворов ДНК и мочи. Все последующие точки получены после 10 мин инкубации проб. Если мочу этих животных исследовать через 2 ч после введения физиологического раствора, то удельная вязкость снизится до $2,45 \pm 0,5$ (т. е. до нормы). В моче, полученной через 3 и 4 ч после введения физиологического раствора, установлено некоторое уменьшение активности ДНК-аз, что можно объяснить разбавлением мочи. Через 5, 6, 23 ч активность ДНК-аз вновь приближалась к норме.

Рис. 4. Электрофоретический анализ изоферментов ТАТ после очистки.

1 — схема распределения изоферментов ТАТ на электрофоретических в агаровом геле; 2 — очищенный анодный изофермент ТАТ; 3 — очищенный катодный изофермент ТАТ [40].

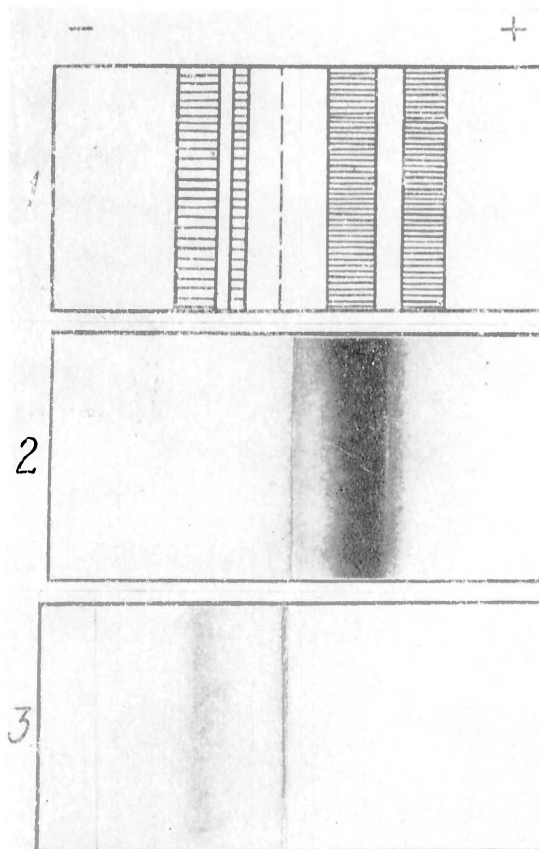


Рис. 9. Иммуноэлектрофорез очищенных анодного и катодного изоферментов ТАТ и суммарного экстракта печени крыс (супернатант 20 000 г).

В лунках содержится: 1: а и б — соответственно 0,05 мл (1 мг/мл и 0,01 мл (1 мг/мл, или 7 ед/мл) очищенного анодного изофермента ТАТ; 2: а — 0,05 мл надосажденной печени питательной крысы (2,4 ед/мл), б — 0,07 мл надосажденной печени крысы, индуцированной кортизолом (15,4 ед/мл); 3: а и б — по 0,05 мл очищенного катодного изофермента ТАТ (0,035 ед/мл). В центральной канавке — γ -глобулин (анти-ТАТ, 60 мг/мл) [44].

Рис. 4

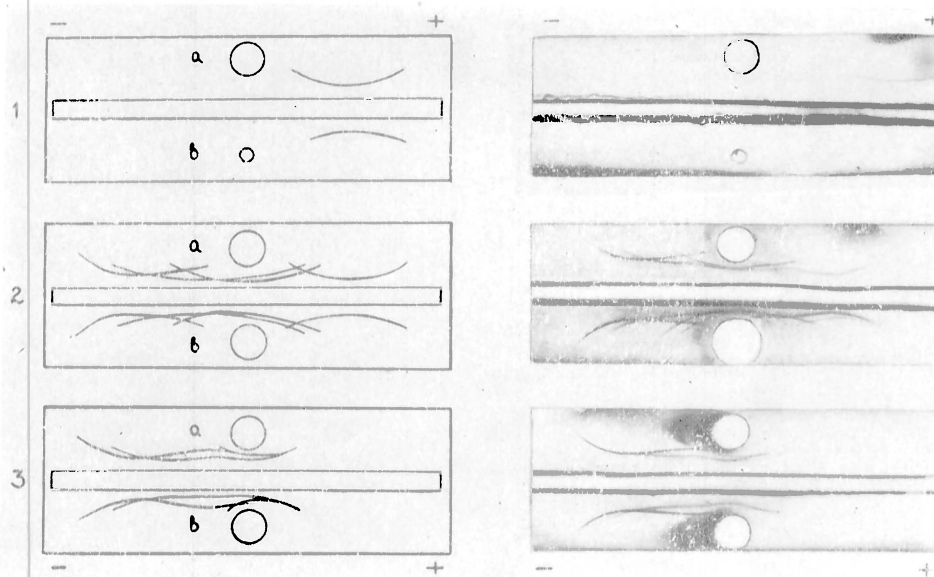
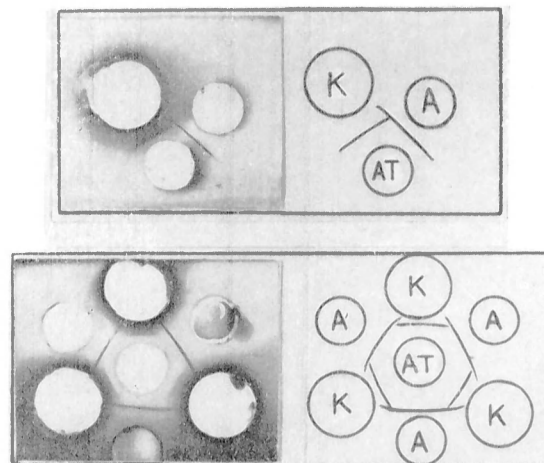


Рис. 9

Рис. 10. Сравнение иммунологических свойств анодного и катодного изоферментов ТАТ методом двойной иммунодиффузии в агаре.

В центральной лунке (АТ) — 0,05 мл γ-глобулина (60 мг/мл), в периферических: А — 0,05 мл анодного изофермента ТАТ (0,1 мг/мл), К — 0,07 мл катодного изофермента ТАТ (0,035 ед/мл) [44].



К ст. Г. А. Галегова и соавт.

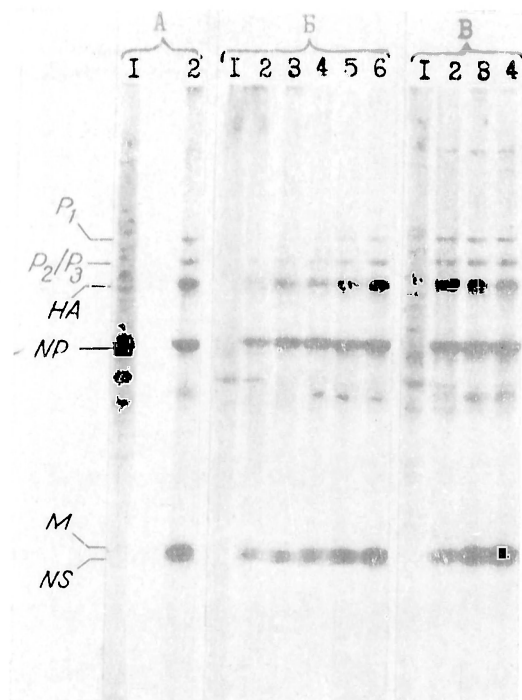


Рис. 4. Образование вирусспецифических полипептидов в клетках, инфицированных вирусом гриппа А. Результаты через 6 ч после инфицирования.

Радиоактивный предшественник ^{14}C -белковый гидролизат хлореллы вводили через 5½ ч после инфицирования клеток (40 мкКи/мл на пробу). А₁ — неинфицированные клетки; А₂ — клетки, инфицированные вирусом. Пробы В₁ и В₂ — ремантадин и амантадин добавлены за 1 ч до инфицирования и присутствуют в течение всего времени инфекции. Пробы В₂ и В₂ — ремантадин и амантадин добавлены непосредственно после инфицирования клеток. Пробы В₃, В₄, В₃ и В₄ — ремантадин добавлен через 1, 2, 3 и 4 ч после инфицирования соответственно. Пробы В₃ и В₄ — амантадин добавлен через 1 и 2 ч после инфицирования соответственно. Здесь и на рис. 5: Р₁, Р₂, Р₃ — белки полимеразы; НА — гемагглютинин; NP — белок нуклеопротеина; М — мембранный белок; NS — неструктурный белок.

К ст. В. В. Калашниковой и соавт.

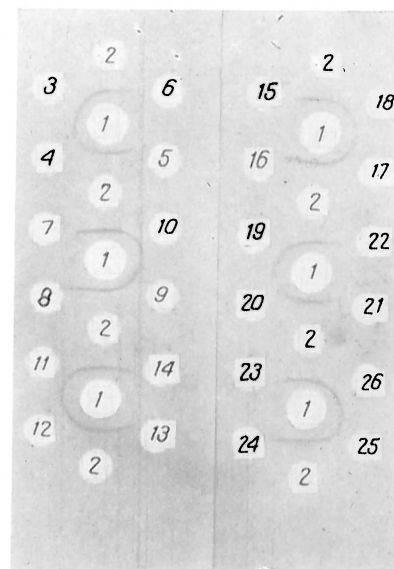


Рис. 1. Иммунодиффузионный анализ ЭПА-2 в экстрактах нормальных и опухолевых тканей с помощью стандартной тест-системы.

1 — антисыворотка к ЭПА-2; 2 — стандартный препарат ЭПА-2. Экстракты: 3 — десмоид (разведен 1:20), 4 — рабдомиосаркомы, 5 — кожи, 6 — мышцы, 7 — хряща, 8 — поджелудочной железы, 9 — рака поджелудочной железы, 10 — поджелудочной железы, 11 — желудка, 12 — аденокарциномы желудка (разведен 1:5), 13 — печени, 14 — желудка, 15 — яичника, 16 — почки, 17 — опухоли Вильмса, 18 — аденокарциномы яичника, 19 — аденокарциномы толстой кишки (разведен 1:5), 20 — толстой кишки, 21 — толстой кишки, 22 — тонкой кишки, 23 — головного мозга, 24 — легкого, 25 — аденокарциномы легкого, 26 — краппофарингитомы.

Кривая 3 резко отличается от предыдущих. Она отражает активность ДНК-аз мочи животных, которым вводили в брюшную полость 5—10 мг ДНК-аз. Если через 2 ч активность ферментов не отличалась от контроля, то уже через 3, 4 и 5 ч активность их в щелочной среде резко повышалась и удельная вязкость проб достигала соответственно $0,2 \pm 0,01$, $0,3 \pm 0,01$ и $0,8 \pm 0,013$. Различие между контрольными и опытными пробами в этих случаях было статистически достоверным ($P < 0,001$).

Увеличение активности ДНК-аз в моче через 3 ч после их внутрибрюшинного введения могло служить указанием на то, что введенные ДНК-азы за этот отрезок времени преодолевали многочисленные клеточные барьеры здорового организма крысы, в том числе почечные, и оказывались в моче с сохранением биологической активности. Через 6 и 23 ч активность ферментов приближалась к контролю.

Опыты II серии с использованием различных количеств ДНК-аз дали возможность выявить некоторые особенности проницаемости этих ферментов. Так, установлено, что 2 мг ДНК-аз, введенных в брюшную полость, не оказывают влияния на активность ферментов мочи, тогда как после введения 5 мг уже можно наблюдать повышение ДНК-азной активности. Мочу в этих опытах собирали в течение 16—17 ч.

Результаты II серии экспериментов представлены на рис. 2. На оси абсцисс указано количество ДНК-аз, вводимых в 5 мл физиологического раствора, на оси ординат — удельная вязкость проб. Время инкубации смесей равно 30 мин, потому что активность ферментов изучали в кислой среде, где она была ниже.

Кривые 1 и 2 — контрольные. Инкубационные смеси, на основании изучения которых они построены, не содержали мочи и ставились параллельно пробам с мочой животных, которым вводили физиологический раствор или фермент.

ДНК в этих контрольных пробах распадалась незначительно, что соответствует общепринятым нормам.

Кривые 2 и 3 вначале совпадают, а затем расходятся. Одна из них (3) отражает активность ДНК-аз мочи крыс, которые получали физиологический раствор, другая (4) — активность ферментов мочи тех животных, которым вводили ДНК-азу, разведенную таким же количеством физиологического раствора. Кривые 2 и 3 показывают, что активность ДНК-аз мочи значительно выше при введении фермента. Кроме того, полученные данные говорят об отсутствии параллельного нарастания активности ДНК-аз мочи при увеличении количества примененного фермента. Введение 10, 20 и 30 мг фермента приводило к увеличению активности ДНК-аз мочи, а при введении 40, 50 и 100 мг наблюдалось уже ее некоторое уменьшение, вероятно, за счет создания более высокого осмотического давления. То, что дальнейшее увеличение количества ДНК-аз, вводимых в брюшную полость, уже не приводило к нарастанию ДНК-азной активности мочи, свидетельствует о наступлении порога, который характеризует пропускную способность клеток брюшной полости и почек. Можно привести некоторые количественные характеристики пропускной способности данных клеток, а также устойчивости ДНК-аз к действию протеолитических ферментов. Если основная часть ДНК-аз выделяется почками в течение 4 ч, то, зная количество вводимого фермента, выделяемой мочи и фермента в ней, можно убедиться, что часть ДНК-аз разрушается протеолитическими ферментами или разносится током крови и ассимилируется клетками различных тканей. Важно, что заведомо большие количества ДНК-аз, введенные в брюшную полость животных, не вызывают видимых неблагоприятных клинических изменений, что подтверждает безопасность их применения.

По нашим данным, полученным экспериментальным путем и с помощью расчетов, при введении в брюшную полость $1,72 \cdot 10^{15}$ молекул ДНК-аз с молекулярной массой 35 000 дальтон в моче оказалось $8,37 \cdot 10^{14}$ молекул, что составляет примерно 49 %.

Способность ДНК-аз проникать через клеточные мембраны без потери биологической активности представляется нам весьма существенной, если

учесть их возможную биологическую роль, в частности способность выступать в качестве защитных факторов организма в случае проникновения во внутреннюю среду чужеродной информации извне в виде экзогенных нуклеиновых кислот.

Известно, что именно нуклеиновые кислоты являются носителями инфекционности [6], особенно при развитии вирусных заболеваний. Однако антитела к чистой двуспиральной нативной ДНК образуются слабо [7], а система интерферона как защитная система организма ориентирована главным образом против белков [8].

Роль нуклеаз как защитных факторов организма может осуществляться не только внутри клеток, но и в секрете потовых желез [9], пищеварительных соках желудочно-кишечного тракта [10], спинномозговой жидкости и других средах организма.

Значение нуклеаз возрастает еще и в связи с тем, что при доброкачественном росте их активность в клетках и тканях повышается (рост плаценты, регенерация печени, размножение микроорганизмов) [11, 12], тогда как при злокачественном росте активность нуклеаз вообще и ДНК-аз в частности, по мнению большинства исследователей, снижается [13—15]

ЛИТЕРАТУРА

1. Демин А. А., Салганик Р. И. — Изв. Сибир. отд. АН СССР. Серия биол. и мед. наук, 1972, № 5, с. 151.
2. Салганик Р. И., Мосолов А. Н., Трухачев А. А. и др. — В кн.: Международный конгресс по микробиологии. 9-й. Тезисы докладов. М., 1966, с. 554.
3. Салганик Р. И., Трухачев А. А. — Изв. Сибир. отд. АН СССР. Серия биол. и мед. наук, 1963, № 2, с. 99.
4. Gottesfeld J. M., Adams N. H., El-Badry A. M. et. al. — Biochim. biophys. Acta, v. 228, p. 365.
5. Шапоп В. С. Нуклеазы. М., 1968, с. 156.
6. Соловьев В. Д., Баландин И. Г. Клетка и вирус. М., 1973.
7. Гольдфарб Д. М., Замчук Л. А. Антитела к нуклеиновым кислотам. М., 1975.
8. Ябров А. А. — Успехи совр. биол., 1972, т. 74, с. 97.
9. Хурсин М. Ю. — Физiol. ж., 1973, т. 19, № 4, с. 552.
10. Адигамов Л. Ф. — Вопр. мед. химии, 1969, № 4, с. 363.
11. Lehman I. R. — Ann. Rev. Biochem., 1967, v. 36, p. 645.
12. Shortman K., Lehman I. R. — J. biol. Chem., 1964, v. 239, p. 2964.
13. Дэвидсон Д. Биохимия нуклеиновых кислот. М., 1968.
14. Wroblewski F., Bodansky O. — Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.), 1950, v. 74, p. 443.
15. Хурсин М. Е., Анистратенко Г. И. — Врач. дело, 1968, № 1, с. 72.

Поступила 28/III 1980 г.

INCREASE IN DNAASE ACTIVITY IN RAT URINE AFTER INTRAPERITONEAL ADMINISTRATION OF DNAASES

N. E. Khursin

R. E. Kavetsky Institute of Oncological Problems, Kiev

After intraperitoneal administration of DNAase into rats maximal increase in the enzymatic activity was observed in urine within 3-4 hrs. This suggests the ability of DNAase to penetrate through cell barriers without a loss of its biological activity. The importance of the phenomenon is discussed considering possible use of DNAases as protector of the body against heterologous nucleic acids.

Г. С. Вартанян, К. Г. Карагезян

НОРМАЛИЗУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ЭКСТРАКТА ПЕРЕСТУПНЯ БЕЛОГО *BRUNIA ALBA L.* НА ФОСФОЛИПИДЫ КРОВИ ПРИ АЛЛОКСАНОВОМ ДИАБЕТЕ

Институт биохимии Армянской ССР, Ереван

Одним из актуальных вопросов современной нейрхимии является изучение особенностей облика и функциональной роли фосфолипидов, выступающих в качестве потенциальных источников энергии как в нормальных условиях, так и при различных функциональных и патологических состояниях организма [1—7].

Известны многочисленные вещества растительного происхождения, оказывающие положительное влияние на течение сахарного диабета [8—11]. Однако до сих пор остается малоизученным биохимический механизм благотворного действия этих активных начал на отдельные метаболические процессы, в том числе на некоторые реакции липидного обмена, наиболее глубоко поражаемые при изученной патологии.

Изложенное послужило основанием для проведения специальных исследований по изучению качественных и количественных изменений содержания общих и индивидуальных фосфолипидов крови белых крыс при экспериментальном аллоксановом диабете до и после применения экстракта переступня белого (ЭПБ).

Методика

Эксперименты проводили на беспородных белых крысах обоего пола массой 170—200 г. В I серии опытов (8 крыс) диабет вызывали внутрибрюшинным введением аллоксана из расчета 15 мг/100 г массы. Во II серии опытов (11 крыс) после введения аллоксана, начиная с 7-го дня заболевания, производили ежедневные внутримышечные инъекции ЭПБ в дозе 0,5 мг/100 г массы. Животных забивали на 20-й день после введения аллоксана. Уровень глюкозы в крови определяли ортотолуидиновым методом, содержание фосфолипидов в цельной крови — методом одномерной восходящей хроматографии на бумаге ФН-II-фильтрак (ГДР), пропитанной кремниевой кислотой по Маринетти и Стотцу [12] в модификации Смирнова и соавт. [13] и Карагезяна [14].

Результаты и обсуждение

Как показали результаты проведенных исследований, аллоксановый диабет сопровождается увеличением содержания всех изученных индивидуальных фракций фосфолипидов в цельной крови, что, естественно, приводит к значительному возрастанию общей суммы фосфолипидов (+47,2 %). В наибольшей степени увеличивается содержание фракций монофосфатидилинозитов (+190 %), фосфатидилсеринов (+183 %), лизофосфатидилхолинов (+117 %) и фосфатидилэтаноламинов (+87,3 %); см. таблицу. Интересно отметить, что наиболее значительные изменения обнаруживаются со стороны кислых фосфолипидов, содержание которых увеличивается на 188 %, в то время как нейтральные фосфолипиды возрастают в несравненно меньшей степени (+34,2 %). Таким образом, хотя изменения в содержании различных по своей природе фосфолипидов протекают в одном и том же направлении, однако степень их выраженности оказывается далеко неоднородной, что, естественно, приводит к значительным отклонениям в картине липид-липидных соотношений.

Это выражается в уменьшении коэффициента отношения суммы нейтральных фосфолипидов к сумме кислых фосфолипидов (НФЛ/КФЛ), постоянство которого может служить одним из показателей надежности физиологического состояния клетки.

Во II серии опытов больным животным ежедневно вводили ЭПБ. Введение этого препарата существенно нормализует содержание в цельной крови общих и индивидуальных фосфолипидов, повышенное при диабете.

Это особенно бросается в глаза при сравнении показателей, отраженных в таблице (см. графы 3 и 6).

Как видно из таблицы, количество монофосфатидилинозитов при диабете превышает исходный уровень на 190 % и почти восстанавливается на 14-й день после введения ЭПБ. Аналогичные закономерности наблюдаются в отношении содержания фосфатидилсеринов, которое при диабете без лечения превышает контроль на +183 %, а после лечения ЭПБ — только на 38 %, а также в отношении лизофосфатидилхолина (+117 и +5,6 %). В некоторых случаях эффект ЭПБ оказывается настолько выраженным, что

Изменения содержания суммарных фосфолипидов и их фракций (в мкг липидного фосфора на 1 мл цельной крови) в крови белых крыс при аллоксановом диабете (I серия опытов) и после введений ЭПБ (II серия); $M \pm m$

Фосфолипиды	Контроль	I серия	Изменение, % от контроля	II серия	Изменение, % от контроля
Лизофосфатидилхолины	$4,83 \pm 0,25$	$10,5 \pm 0,27$	+117	$5,10 \pm 0,26$	+5,6
Монофосфатидилинозиты	$3,64 \pm 0,29$	$10,6 \pm 0,50$	+190	$3,97 \pm 0,29$	+9,0
Сфингомиелины	$13,1 \pm 0,97$	$17,6 \pm 0,67$	+34,4	$12,2 \pm 0,56$	-7,1
Фосфатидилхолины	$54,3 \pm 1,50$	$66,6 \pm 1,51$	+22,5	$66,4 \pm 1,74$	+22,3
Фосфатидилсерины	$3,44 \pm 0,26$	$9,75 \pm 0,45$	+183	$4,74 \pm 0,42$	+37,8
Фосфатидилэтаноламины	$4,24 \pm 0,29$	$7,9 \pm 0,33$	+87,3	$3,52 \pm 0,28$	-17,0
Сумма фосфолипидов	$86,3 \pm 1,53$	$123 \pm 1,34$	+47,2	$95,9 \pm 2,71$	+14,8
Нейтральные фосфолипиды	$76,5 \pm 1,44$	$103 \pm 1,34$	+34,2	$87,2 \pm 2,37$	+14,0
Кислые фосфолипиды	$7,06 \pm 0,46$	$20,3 \pm 0,68$	+188	$8,71 \pm 0,44$	+23,4
Нейтральные кислые фосфолипиды	$11,1 \pm 0,73$	$5,08 \pm 0,19$	-54,4	$10,2 \pm 0,36$	-8,8

количество сфингомиелинов, превосходившее норму при диабете на +34,4 %, после введения ЭПБ оказывается ниже исходного уровня на 7,1 %, а количество фосфатидилэтаноламина — на 17,0 %.

Особый интерес, с нашей точки зрения, представляет факт максимального восстановления величины коэффициента НФЛ/КФЛ. В то время как с развитием заболевания (I серия опытов) этот коэффициент оказывается ниже нормы на 54,4 %, то на фоне введений ЭПБ он отличается от нормы всего лишь на -8,8 %.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют, что введение ЭПБ при аллоксановом диабете способствует нормализации состава фосфолипидов крови, что, несомненно, следует рассматривать как положительное явление в течении этого заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Knouff H. J., Vosk F. — J. Neurochem., 1961, v. 6, p. 171.
2. Карагезян К. Г. — В кн.: Всесоюзная конф. по нейрохимии. 6-я. Тезисы. Л., 1972, с. 83.
3. Карагезян К. Г. — В кн.: Всесоюзная конф. по биохимии нервной системы. 4-я. Тезисы докладов. Тарту, 1966, с. 365.
4. Карагезян К. Г. Фосфолипиды головного мозга, цереброспинальной жидкости, крови и печени при различных функциональных состояниях организма. Автореф. дис. докт. Ереван, 1968.
5. Карагезян К. Г. — В кн.: Вопросы биохимии мозга. Ереван, 1966, т. 2, с. 136.
6. Карагезян К. Г., Амирханян О. М. — Докл. АН СССР, 1971, и. 201, с. 238.
7. Гавская М. С. Биохимия мозга при умирании и оживлении организма. М., 1963.
8. Бездетко Г. Н., Смолина Т. М., Шулятева Л. Д. — В кн.: Научная конф. по фармакологии и лекарственному применению элеутерококка колючего. Л., 1961, с. 34—36.
9. Бездетко Г. Н., Смолина Т. М., Шулятева Л. Д. — В кн.: Совещание по исследованию лекарственных растений Сибири и Дальнего Востока. 2-е. Материалы. Томск, 1961, с. 11—12.
10. Бездетко Г. Н. Влияние экстракта элеутерококка на течение и возникновение экспериментального диабета. Автореф. дис. канд. Хабаровск, 1968.
11. Мищенко Е. Д. — В кн.: Симпозиумы по электроококу и женшеню. Владивосток, 1962, с. 54.

12. Marinetti C. V., Stoltz E. — Biochim. biophys. Acta, 1956, v. 21, p. 168.
13. Смирнов А. А., Чирковская Е. В., Манукян К. Г. — Биохимия, 1961, т. 26, с. 1027.
14. Карагезян К. Г. — Лабор. дело, 1969, № 1, с. 3.

Поступила 23/VII 1980 г.

THE NORMALIZING EFFECT OF BRYONIA ALBA L. ON BLOOD PHOSPHOLIPIDS IN ALLOXANE DIABETES

G. S. Vartanyan, K. G. Karagezyan

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Armenian SSR, Yerevan

Alloxane diabetes in rats was accompanied by a distinct increase in total content of phospholipids and their fractions /especially of acid phospholipids/ in whole blood; the ratio of neutral phospholipids/acid phospholipids was decreased. Content of phospholipids was distinctly normalized in rat blood after intramuscular administration of Bryonia alba extract into the diabetic animals at a dose of 0.5 mg/100 g of body mass.

УДК 615.273.53.033.81

Л. А. Ляпина, А. М. Ульянов, Г. Г. Базазьян, Ж. С. Бонева

ПРОНИКНОВЕНИЕ КОМПЛЕКСА ГЕПАРИН — ТРОМБОПЛАСТИН В ТКАНИ МОЗГА ПРИ ЕГО ВВЕДЕНИИ В ОРГАНИЗМ ЗДОРОВЫХ ЖИВОТНЫХ И ЖИВОТНЫХ, НАХОДЯЩИХСЯ В ПРЕДТРОМБОТИЧЕСКОМ СОСТОЯНИИ, ВЫЗВАННОМ АТЕРОГЕННОЙ ДИЕТОЙ

Лаборатория физиологии и биохимии свертывания крови Московского университета им. М. В. Ломоносова

В предшествующих исследованиях [1, 2] установлено, что после внутривенного введения гепарина или его комплекса с тромбопластином животного в тканях (клетках) мозга образуются комплексы гепарина с тромбопластином, определяемые по активности неферментативного фибринолиза (НФ), а также снижается тромбопластиновая активность в экстрактах из мозга животных. Комплексообразование гепарина с тромбопластином в тканях мозга наблюдалось как у здоровых животных, так и у животных с депрессией функции противосвертывающей системы, вызванной атерогенной диетой [3], но в значительно меньшей степени, чем у здоровых.

Задачей настоящего исследования было выяснение особенностей проникновения гепарина и его комплекса с тромбопластином в ткани мозга с использованием изотопного анализа и изучение состояния функции противосвертывающей системы в процессе поступления в организм здоровых животных и животных с депрессией функции противосвертывающей системы гепарина или его комплекса с тромбопластином.

Методика

В опытах использовано 32 белых крыс-самцов массой в среднем 280 г, из них 12 крыс содержались на атерогенной диете в течение 10 мес, а 20 крыс постоянно содержались на полноценном лабораторном рационе. Тромбопластин получали из мозга крыс общепринятым методом с активностью 13—14 с; комплекс гепарин — тромбопластин (КГТ) получали по методу Б. А. Кудряшова и Л. А. Ляпиной [4]. Все животные получали предварительно инфузию индикаторных доз гепарина-³⁵S (биологическая активность 2 ед., 1 мкКи на 200 г массы тела). Животные были разделены на 4 группы. Крысы 1-й группы получали 0,85% раствор NaCl; 2-й — гепарин в дозе 100 ЕД/200 г и 0,85% раствор NaCl; 3-й — гепарин в дозе 100 ЕД/200 г и тромбопластин в дозе 0,6 мл/200 г; 4-й — комплекс КГТ (1%) в дозе 0,6 мл/200 г. Взятие крови и внутривенное введение препаратов производили через v. jugularis. Кровь брали с 3,8% цитратом натрия через 1, 10 и 40 мин после введения исследуемых препаратов. В плазме крови определяли суммарную фибринолитическую активность (СФА), ее НФ по методу Б. А. Кудряшова и Л. А. Ляпиной [5] на нестабилизированных пластинках фибрина, приготовленных по методу [6], концентрацию фибриногена по методу [7], толерантность плазмы крови к гепарину по методу [8]. Через 40 мин после введения препаратов животных декапитировали, извлекали ткани мозга и подвергали их исследованию. Изучали наличие НФ

Таблица 1

СФА плазмы крови, НФ, концентрация фибриногена (Ф), показатели R и K тромбоэластограммы плазмы крови животных, содержащихся на естественном и атерогенном рационах и получавших КГТ

Группа животных (условия опыта)	Время после введения, мин								
	1						10		
	СФА, мм ²	НФ, мм ²	толерант- ность к ге- парину, с	Ф, мг %	R, с	K, с	СФА, мм ²	НФ, мм ²	толерант- ность к ге- парину, с
Естественный рацион									
1-я группа (NaCl + NaCl)	33±1,1	10±2,4	456±10	288±9	91±3	48±4	33±2	10±2	468±23
2-я группа (гепарин + NaCl)	42±3,6	30±2,2	600±24	380±21	298±10	117±5	72±4	33±3	696±30
<i>P</i>	<0,05	<0,01	<0,05	<0,05	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
3-я группа (гепарин + тромбопластин)	33±1,2	16±3	672±20	—	274±5	114±4	81±9	38±3	660±25
<i>P</i>	>0,5	<0,05	<0,01	—	<0,001	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
4-я группа (КГТ)	32±1,7	8,8±1	762±37	380±12	208±5	61±4	78±7	49±2	792±42
<i>P</i>	>0,5	>0,5	<0,01	<0,05	<0,01	<0,05	<0,01	<0,01	<0,01
Атерогенный рацион									
1-я группа (NaCl + NaCl)	17±0,6	2,7±0,1	180±17	570±23	53±4	30±2	22±2	6±1	196±17
2-я группа (гепарин + NaCl)	17±1,4	5,3±1	970±38	500±15	102±7	43±2	51±3	28±1,7	960±30
<i>P</i>	>0,5	>0,5	<0,01	>0,5	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
3-я группа (гепарин + тромбопластин)	27±2,4	8±0,9	1010±39	551±17	100±5	—	71±5	30±2	1280±37
<i>P</i>	<0,05	<0,05	<0,01	>0,5	<0,01	—	<0,01	<0,01	<0,01
4-я группа (КГТ)	15±1	2±0,7	1800±41	552±25	100±7	46±4	90±8	39±3	1205±24
<i>P</i>	>0,5	>0,5	<0,01	>0,5	<0,01	<0,05	<0,01	<0,01	<0,01
Естественный рацион									
1-я группа (NaCl + NaCl)	285±13	99±4	45±1	32±3	10±1	492±18	295±7	103±5	37±2
2-я группа (гепарин + NaCl)	355±12	222±13	111±7	53±7	26±4	600±20	—	118±10	77±3
<i>P</i>	<0,05	<0,01	<0,01	<0,05	<0,05	<0,05	—	>0,5	<0,05
3-я группа (гепарин + тромбопла- стин)	255±9	128±12	104±5	89±5	51±3	540±17	275±11	226±7	203±9
<i>P</i>	>0,5	<0,05	<0,01	<0,01	<0,001	>0,5	>0,5	<0,01	<0,01
4-я группа (КГТ)	267±12	211±7	62±4	86±9	45±3	678±21	257±10	184±9	63±3
<i>P</i>	>0,5	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,05	>0,1	<0,05	<0,05

Продолжение табл. 1

Группа животных (условия опыта)	Время после введения, мин								
	10			40					
	Ф, мг %	R, с	K, с	СФА, мм²	НФ, мм²	толерантность к гепарину, с	Ф, мг %	R, с	K, с
Атерогенный рацион									
1-я группа (NaCl + NaCl)	585±21	55±4	36±3	24±3	6.6±1	186±14	490±15	50±2	38±1
2-я группа (гепарин + NaCl)	495±21	138±9	81±6	52±4	20±2	496±25	410±12	102±7	33±3
<i>P</i>	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	>0,5	<0,01	>0,5
3-я группа (гепарин + тромбопластин)	460±17	90±9	54±4	64±4	22±1	930±33	400±19	106±9	50±3
<i>P</i>	<0,05	<0,05	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,05	<0,01	<0,05
4-я группа (КГТ)	400±28	144±14	54±2	49±7	24±4	1655±40	403±10	150±80	42±4
<i>P</i>	<0,05	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

Примечание. *P* вычислено по сравнению с показателями в 1-й, контрольной, группе.

Таблица 2

СФА плазмы крови НФ и удельная радиоактивность (*P*) ткани мозга, обусловленная гепарином-³⁵S (в % по отношению к удельной радиоактивности крови на 1-й минуте), у животных, содержащихся на естественном и атерогенном рационах

Группа животных (условия опыта)	Естественный рацион			Атерогенный рацион		
	СФА, мм²	НФ, мм²	<i>P</i> , %	СФА, мм²	НФ, мм²	<i>P</i> , %
1-я группа (NaCl + NaCl)	0,8±0,6 (5)	0,8±0,6 (5)	2,0±1,0 (5)	0±0 (3)	0±0 (3)	0,6±0,2 (3)
2-я группа (гепарин + NaCl)	18,2±3,1 (5)	15,2±2,8 (5)	4±1,1 (5)	13±2,6 (3)	12±4,4 (3)	2,2±0,4 (3)
<i>P</i>	<0,01	<0,01	>0,02	<0,001	<0,001	<0,001
3-я группа (гепарин + тромбопластин)	23,8±3,3 (5)	22,4±7,1 (5)	7±1,5 (5)	13±2,6 (3)	13±2,6 (3)	1,1±0,4 (3)
<i>P</i>	<0,001	<0,001	<0,01	<0,001	<0,001	>0,2
4-я группа (КГТ)	25,8±5,5 (5)	21,2±2,4 (5)	4±1,2 (5)	13±2,0 (3)	11±4,0 (3)	1,0±0,35 (3)
<i>P</i>	<0,001	<0,001	>0,02	<0,001	<0,001	>0,2

Примечание. *P* вычислено по сравнению с показателями в 1-й, контрольной, группе. В скобках указано число животных

в тканях мозга [6] и определяли радиоактивность, связанную с гепарином- ^{35}S . Для определения радиоактивности, связанной с гепарином- ^{35}S , образцы крови (0,05 мл) и ткани мозга (50 мг) обрабатывали по методу [9]. Подсчет радиоактивности проводили на приборе «Mark-11» фирмы «Nuclear Chicago» (США).

Результаты и обсуждение

Как видно из табл. 1, через 10 мин после внутривенного введения комплекса ^{35}S -гепарин — тромбопластин (КГТ) как у здоровых животных, так и у крыс, содержащихся на атерогенном рационе, наблюдалось значительное повышение НФ плазмы крови. Однако у здоровых животных активность НФ плазмы была значительно выше (зоны лизиса составляли 49 и 39 мм^2 соответственно). Вместе с тем у животных, содержащихся на атерогенном рационе и получавших КГТ, НФ плазмы в 4,4—6,1 раза превышал этот показатель у животных 1-й, контрольной, группы, получавших 0,85 % раствор NaCl.

Подобная направленность изменений активности НФ плазмы наблюдалась и в том случае, когда животным вместо КГТ вводили только гепарин (зона лизиса достигала 33,8 мм^2) или гепарин с тромбопластином (зоны лизиса составляли 38,6 мм^2), т. е. НФ плазмы у животных 2-й и 3-й групп превышал уровень в плазме контрольных животных 1-й группы.

Через 40 мин после введения испытуемых препаратов — гепарина (2-я группа), гепарина с тромбопластином (3-я группа) и КГТ (4-я группа) уровень НФ плазмы значительно (в 3—5,1 раза) превышал этот показатель у животных контрольной группы.

Отмечено, что в этот период введения КГТ (4-я группа), гепарина с тромбопластином (3-я группа) животным, содержащимся как на полноценном лабораторном рационе, так и на атерогенной диете, способствовало снижению концентрации фибриногена, более выраженному у животных, содержащихся на атерогенной диете (см. табл. 1). Однако введение одного гепарина (2-я группа) существенно не влияло на изменение концентрации фибриногена.

Показатели R и K тромбоэластограммы плазмы крови животных, содержащихся как на полноценном лабораторном рационе, так и на атерогенной диете, получавших гепарин (2-я группа), гепарин с тромбопластином (3-я группа) и КГТ (4-я группа), свидетельствовали о гипокоагуляции через 10 и 40 мин после введения препаратов по сравнению с показателями у животных контрольной группы.

Толерантность плазмы крови к гепарину при введении КГТ животным, содержащимся на атерогенном и на полноценном лабораторном рационе, снижалась (см. табл. 1). Однако наибольшее снижение толерантности плазмы крови к гепарину наблюдалось у животных с депрессией функции противосвертывающей системы, вызванной содержанием их на атерогенной диете (в 6—10 раз по сравнению с показателями в контрольной группе). Введение одного гепарина или гепарина с тромбопластином также способствовало снижению толерантности плазмы крови к гепарину, но в меньшей степени, чем после введения КГТ (см. табл. 1).

Через 40 мин после введения гепарина (2-я группа), гепарина с тромбопластином (3-я группа) или КГТ (4-я группа) обнаруживается незначительная радиоактивность, обусловленная гепарином- ^{35}S в тканях мозга животных с депрессией функции противосвертывающей системы, в то время как у здоровых животных, содержащихся на полноценном лабораторном рационе, в подобных условиях отмечается заметное накопление меченого гепарина в тканях мозга (табл. 2). Одновременно наблюдается появление неферментативной фибринолитической активности в тканях мозга, причем более значительное у здоровых животных, получавших комплекс КГТ, гепарин с тромбопластином и гепарин (см. табл. 2).

Полученные данные показали, что гепарин или КГТ способен проникать в ткани мозга животных, содержащихся как на естественном, так и на атерогенном рационе. Однако установлен факт резкого ограничения

накопления меченого гепарина-³⁵S и его комплекса с тромбопластином в ткани мозга животных с депрессией функции противосвертывающей системы, вызванной содержанием животных на атерогенном рационе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кудряшов Б. А., Базазьян Г. Г., Ляпина Л. А. и др. — Вестн. Моск. ун-та. Сер. биол., 1979, № 1, с. 27—31.
2. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А., Базазьян Г. Г. — Физиол. ж. СССР, 1978, т. 64, № 10, с. 1451—1455.
3. Базазьян Г. Г., Сытина И. П., Андреев Г. В. и др. — Бюлл. экпер. биол., 1961, № 10, с. 26—29.
4. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А. — Физиол. ж. СССР, 1978, т. 64, № 6, с. 771—776.
5. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А. — Лабор. дело, 1971, № 6, с. 326—329.
6. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А., Баскова И. П. — Вестн. Моск. ун-та. Сер. биол., 1974, № 5, с. 41—45.
7. Bidwell E. — Biochem. J., 1953, v. 55, p. 497—506.
8. Görmesen J. — Brit. J. Haemat., 1959, v. 5, p. 3—7.
9. Озрина Р. Д., Ульянов А. М., Сорвачев К. Ф. — Науч. докл. высш. школы. Биол. науки, 1979, № 4, с. 100—103.

Поступила 23/VII 1980 г.

PENETRATION OF THE HEPARIN-TROMBOPLASTIN COMPLEX INTO BRAIN TISSUES AFTER ADMINISTRATION OF THE COMPLEX INTO HEALTHY ANIMALS AND INTO ANIMALS WITH THE PRETHROMBOTIC STATE CAUSED BY ATHEROGENIC DIET

L. A. Lyapina, A. M. Uljanov, G. G. Bazaz'yan, Z. S. Boneva

Laboratory of Physiology and Biochemistry of Blood Coagulation, M. V. Lomonosov State University, Moscow

The possibility of heparin penetration into brain cells was shown. The penetration occurred apparently in the form of heparin complexes with thromboplastin. The intensity of penetration depended on the functional state of the anticoagulation system. Accumulation of ³⁵S-heparin and of its complex with thromboplastin was distinctly limited in brain tissue of animals with depression of the anticoagulation system followed the long-term maintaining of the animals on an atherogenic diet.

УДК 616-002.5-092.9-07:616.153.1:[577.152.322+577.152.313]

В. Г. Григорян, Т. И. Шинкарева, В. С. Киришча, Г. Г. Цымбаларь,
Л. В. Вангели

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ НАД-ГЛИКОГИДРОЛАЗЫ, КИСЛОЙ И ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗ В ФОРМЕННЫХ ЭЛЕМЕНТАХ КРОВИ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ

Клинико-диагностическая лаборатория Молдавского научно-исследовательского института туберкулеза, Кишинев

Данные литературы свидетельствуют о том, что НАД-гликогидролаза (НАД-аза) и неспецифические фосфоэстеразы играют большую роль в жизнедеятельности организма. К ним относятся щелочная — ЩФ и кислая фосфатазы — КФ (КФ 3.1.3.1; 3.1.3.2). В последние годы определение активности этих ферментов нашло широкое применение в клинике туберкулеза. При этом исследуются не только сывороточные, но и внутриклеточные ферменты крови как более чувствительные показатели патологического состояния организма. НАД-аза (КФ 3.2.2.5) является тонким регулятором уровня никотинамидадениннуклеотидов (НАД, НАД·Н, НАДФ) которые играют важную роль во многих биологических реакциях [1—4].

В литературе имеются сообщения о том, что туберкулезная инфекция вызывает увеличение активности НАД-азы и снижение содержания НАД в органах экспериментальных животных [5—8]. Данные об изменении этих показателей у людей, больных туберкулезом, в литературе мы не нашли.

ЩФ имеет большое значение в фагоцитарной активности нейтрофилов [9], играющих важную роль в патогенезе туберкулезной инфекции. Используя цитохимические методы исследования, ряд авторов обнаружили повышение активности ЩФ нейтрофилов у больных активным туберкулезом легких [10—15]. Нормализация ЩФ происходила, по данным одних исследователей [10], через 2 мес лечения, по данным других [14], через 5 мес. При неактивном процессе в легких фосфатазная активность нейтрофилов не отличалась от таковой у здоровых лиц.

Данные об изменении активности КФ в клетках крови при туберкулезе единичны. Некоторые авторы обнаружили повышение активности КФ в нейтрофилах [15—17]. Следует отметить, что в фагоцитозе у больных туберкулезом могут участвовать, помимо нейтрофилов, и лимфоциты [18]. В литературе мы нашли лишь одно сообщение о повышении активности КФ лимфоцитов у больных с ограниченными формами туберкулеза легких [15].

Вышеуказанные исследования были проведены с применением полуколичественных (цитохимических) методов. Следует отметить, что цитохимические методы, имея большое преимущество перед биохимическими, в случаях когда необходимо выяснить локализацию энзимов, намного уступают последним при необходимости определить количественные изменения активности ферментов. На наш взгляд, применение биохимических (количественных) методов вместо цитохимических позволило бы повысить ценность вышеприведенных тестов.

В связи с этим в настоящем сообщении приводятся данные о влиянии туберкулезной инфекции на активность НАД-азы, ЩК и КФ в форменных элементах крови, определяемых количественными методами.

Методика

В опытах использовали 80 морских свинок; 60 из них заражали вирулентным штаммом микобактерий туберкулеза (H₃₇—RW), 20 служили контролем. В день опыта животных декапитировали; кровь собирали в пробирки, содержащие гепарин. Обследовано 198 здоровых и 202 больных, из них 132 были с активным впервые выявленным туберкулезом легких и 70 больных с неактивным процессом.

Выделение форменных элементов крови. Набирали в пробирку 10 мл крови с 2—3 каплями гепарина, добавляли 3 мл осаждающей смеси (300 мг сахарозы, 300 мг цитрата натрия, 250 мг желатина, 85 мг хлористого натрия на 10 мл воды). Через 30 мин надосадочную жидкость отбирали для последующего выделения нейтрофилов и лимфоцитов, а осадок использовали для получения эритроцитов. Эритроциты трехкратно промывали холодным физиологическим раствором и центрифугировали в течение 15 мин при 100 g. Для выделения нейтрофилов и лимфоцитов отобранную надосадочную жидкость центрифугировали в течение 10 мин при 100 g. Осадок взвешивали в 0,2 мл стандартной антиэритроцитарной сыворотки, разведенной в 10 раз физиологическим раствором. Оставляли при комнатной температуре на 10—15 мин. За это время агрегированные эритроциты оседали на дно пробирки, лейкоциты оставались во взвешенном состоянии. Наслаивали 2 мл физиологического раствора, чтобы можно было полностью отобрать взвешенные лейкоциты. Из полученной взвеси лейкоцитов нейтрофилы отделяли от лимфоцитов путем дробного центрифугирования (по 30 с, при 100 g, 4—5 раз в 2 мл физиологического раствора). При таком режиме центрифугирования нейтрофилы оседали на дно, а во взвеси оставались лимфоциты с примесью некоторого количества эритроцитов и нейтрофилов. Взвесь лимфоцитов после каждого центрифугирования объединяли и из нее получали чистую лимфоцитарную фракцию по методике Т. К. Красавцевой [19] с некоторыми модификациями (использовали физиологический раствор вместо раствора Хэнкса и опустили процедуру пропускания надосадочной жидкости через колонку).

Определение активности ЩФ и КФ. Полученные нейтрофилы или лимфоциты подвергали цитолизу путем трехкратного замораживания и оттаивания. Инкубационная смесь (0,4 мл) содержала 0,1—0,2 мл цитолизата; $1,6 \cdot 10^{-2}$ М β -глицерофосфата; $1 \cdot 10^{-2}$ М медиала. Для КФ pH среды 5,0, для ЩФ—10,5. Время инкубации при определении ЩФ составляло 1 ч, КФ — 18 ч. Активность ферментов выражали в микрограммах неорганического фосфата на 1 г белка за 1 ч инкубации. Белок определяли по методу Лоурн и соавт. [20].

Определение активности НАД-азы. Гемолизировали 1 мл предварительно промытых и плотно отцентрифугированных эритроцитов 4 мл ледяной воды. К 0,5 мл гемолизата приливали 0,5 мл 0,3 М раствора НАД на трис-буфере (pH 7,0). Инкубировали в течение 60 мин. Реакцию останавливали добавлением 0,5 мл 20% ТХУ и в надосадочной жидкости определяли НАД флуориметрическим методом по Хуффу и Перльштейну [21].

Таким образом из небольшого количества крови (10 мл) можно выделить в чистом виде эритроциты, нейтрофилы и лимфоциты в количестве, достаточном для количественного метода определения активности ферментов.

Результаты и обсуждение

Туберкулезный процесс вызывает значительные изменения активности ферментов в форменных элементах крови животных. Так, активность ЩФ нейтрофилов зараженных морских свинок была в 2,5 раза выше, чем у здоровых животных (табл. 1).

Активность КФ лимфоцитов у больных животных изменялась неодинаково. Животных можно было разделить на 3 группы. Морские свинки 1-й группы в ответ на инфекцию реагировали повышением активности фермента, животные 2-й группы — снижением, а активность КФ у животных 3-й группы оставалась в пределах нормы.

Активность НАД-азы эритроцитов у морских свинок, зараженных туберкулезом, была в 2,5 раза выше, чем у здоровых животных (см. табл. 1). Повышение активности фермента отмечалось не у всех животных. У 2 она была в пределах нормы, у 2 — умеренно увеличена (до 15 ед.) и у 4 повышена значительно (более 30 ед.).

Приведенные экспериментальные исследования дали основание полагать, что такие же нарушения можно обнаружить и у больных туберкулезом. Нами обследовано 132 больных с впервые выявленным туберкулезом легких. Формы заболевания были различные: инфильтративно-пневмоническая, гематогенно-диссеминированная и очаговая.

В качестве контроля была обследована группа здоровых лиц (198 человек). Результаты, приведенные в табл. 2, свидетельствуют о том, что изменения активности ЩФ не у всех больных носили однотипный характер. У $\frac{1}{3}$ больных (у 13 из 30) активность фермента была снижена в среднем на 27 %. У большинства обследуемых (17 из 30) ферментативная активность нейтрофилов была на 79,9 % выше, чем у здоровых лиц (см. табл. 2).

Активность КФ нейтрофилов и лимфоцитов у больных с впервые выявленным туберкулезом была выше, чем у здоровых людей, соответственно на 43 и 63,2 % (см. табл. 2). Повышение активности КФ нейтрофилов наблюдалось у 17 (28,8 %) из 59 обследованных больных, лимфоцитов — у 11 (64,7 %) из 17 больных.

Активность НАД-азы эритроцитов у больных туберкулезом превышала нормальный уровень в среднем на 28,8 % у 5 из 26 больных (см. табл. 2).

Как видно из табл. 2, у больных с неактивным процессом активность ЩФ ниже, чем у здоровых лиц. При сравнении с группой больных с впервые выявленным туберкулезом (т. е. активным, нелеченым) обращает на себя внимание, что ни у одного больного неактивным туберкулезом не имело места повышение уровня ЩФ, тогда как у больных активным туберкулезом оно отмечалось в 56,7 % случаев.

Активность КФ лимфоцитов и НАД-азы эритроцитов у больных неактивным туберкулезом практически не отличалась от таковой у здоровых и была достоверно ниже, чем при активном туберкулезном процессе (см. табл. 2).

Т а б л и ц а 1

Изменение активности ферментов форменных элементов крови у морских свинок, зараженных туберкулезом

Животные	ЩФ нейтрофилов	КФ лимфоцитов	НАД-аза эритроцитов
Здоровые	9,95±0,94	1,61±0,06	8,2±1,2
Зараженные туберкулезом	23,3±2,22	$\frac{0,85±0,08}{2,84±0,10}$	21,2±3,8
	$P<0,0001$		$P<0,05$

П р и м е ч а н и е. В числителе — средние показатели у животных с повышенной, в знаменателе — с пониженной активностью фермента ($P<0,01$).

Клинические и экспериментальные исследования показали, что изменения активности НАД-азы в эритроцитах имеют ту же направленность, что и в других органах зараженных туберкулезом животных [5—8]. Этот факт представляется нам важным, так как эритроциты являются объектом, доступным для клинического исследования, и есть возможность определить активность фермента в них при различных формах и фазах туберкулезного процесса в динамике лечения.

Большинство авторов указывали на повышение активности ЩФ нейтрофилов у больных туберкулезом легких. Мы обнаружили увеличение

Т а б л и ц а 2

Активность НАД-азы, ЩФ и КФ в форменных элементах крови у больных туберкулезом

Обследуемые	ЩФ нейтрофилов	КФ нейтрофилов	КФ лимфоцитов	НАД-аза эритроцитов
Здоровые	2,74±0,17 4,91±0,47 $P<0,001$	2,23±0,08 3,19±0,12 $P<0,001$	0,57±0,03 0,93±0,05 $P<0,05$	32,6±1,5 42,0±1,6 $P<0,01$
Больные активным туберкулезом	2,0±0,15 $P<0,01$			
Больные неактивным туберкулезом	1,68±0,18 $P<0,01$ $P_1<0,01$	—	0,76±0,06 $P>0,05$ $P_1<0,05$	37±1,7 $P>0,05$ $P_1<0,05$

П р и м е ч а н и е. В числителе — средние показатели ЩФ в группе лиц с повышенной, в знаменателе — с пониженной активностью фермента; P — достоверность разницы в сравнении со здоровыми людьми; P_1 — достоверность разницы в сравнении с группой больных активным туберкулезом.

активности ЩФ у $2/3$ обследованных больных туберкулезом, у $1/3$ отмечено понижение активности фермента. При экспериментальном туберкулезе у всех морских свинок имело место увеличение ЩФ нейтрофилов.

Активность КФ нейтрофилов и лимфоцитов у больных с впервые выявленным (активным) туберкулезом выше, чем у здоровых. Эти данные совпадают с результатами, полученными Н. Н. Люцинской [15]. При неактивном туберкулезном процессе активность КФ лимфоцитов крови практически не отличалась от нормы. У зараженных животных КФ лимфоцитов изменялась неодинаково. Одна группа морских свинок в ответ на инфекцию реагировала повышением активности фермента, другая — снижением, а активность КФ у животных третьей группы оставалась в пределах нормы.

Неодинаковые изменения активности фермента связаны, вероятно, с циклическим течением туберкулезной инфекции, при развитии которой повышение специфической и неспецифической реактивности организма сменяется ее снижением [22]. По всей вероятности, фаза, сопровождающаяся повышением активности КФ, наступает у всех морских свинок, но она проявляется в разные периоды времени. Фазовость в изменении активности фермента может быть обнаружена при наблюдении в динамике.

Таким образом, наши данные о количественных изменениях активности НАД-азы эритроцитов, ЩФ и КФ нейтрофилов и КФ лимфоцитов при активном и неактивном туберкулезе легких свидетельствуют о том, что эти показатели могут служить дополнительным критерием для выявления активности туберкулезного процесса и динамического наблюдения за лечением больных туберкулезом.

Л И Т Е Р А Т У Р А

- Северин С. Е., Телепнева В. И., Цейтлин Л. А. — Биохимия, 1974, т. 39, № 3, с. 592—598.
- Халмуратов А. Г., Пакирбаева Л. В., Чаговец Р. В. — В кн.: Витамины. Киев, 1974, вып. 7, с. 56—74.

3. Парикбаева Л. В., Шушевич С. И., Халмурадов А. Г. и др. — Укр. біохім. ж., 1975, т. 47, № 1, с. 3—7.
4. Rechsteiner M., Catanzarile V. — J. Cell. Physiol., 1974, v. 84, p. 409—422.
5. Toida J., Ando F., Yamamoto J. — Am. Rev. resp. Dis., 1968, v. 98, p. 424—428.
6. Shan N. S., Mathur P. P., Martin S. P. — Ther. Res., 1966, v. 8, p. 70—73.
7. Shan N. S. — Am. Rev. resp. Dis., 1967, v. 96, p. 11—16.
8. Григорян В. Г. О состоянии биоэнергетических и пластических процессов в организме при длительном введении противотуберкулезных препаратов. Автореф. дис. докт. Кишинев, 1973.
9. Годес Д. Э., Богданович Л. И. — Пробл. туб., 1970, № 1, с. 57—60.
10. Иванов П. Н. — В кн.: Ферменты в лабораторной диагностике. М., 1973, т. 4, с. 60—61.
11. Заенко М. В. — Там же, с. 56—57.
12. Борзенко А. С., Виноградов Т. И., Евтухова Э. В. — Там же, с. 53—55.
13. Ходжаева М. И. — В кн.: Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины. Ташкент, 1975, т. 2, с. 29—30.
14. Джохадзе В. А. — В кн.: Современные клинические и экспериментальные исследования по туберкулезу. М., 1976, с. 27—28.
15. Лоцинская Н. Н. — Пробл. туб., 1978, № 12, с. 43—46.
16. Годес Д. Э. — Клини. мед., 1969, № 12, с. 88—91.
17. Кочикова И. Е., Фрадкин В. А. — Сов. мед., 1967, № 5, с. 17—23.
18. Вильдерман А. М. — Здравоохранение (Кишинев), 1960, № 1, с. 32—36.
19. Красавцева Т. К. и др. — Лабор. дело, 1977, № 2, с. 67—70.
20. Lowry O., Rosbroug H. N. — Цит. Тодоров Й. Клинические лабораторные методы исследования в педиатрии. София, 1963, с. 549.
21. Хуфф, Перльцевейн. — Цит. Петрунькина А. М. Практическая биохимия. М., 1961.
22. Авербах М. М., Занкисова И. Г., Левин В. Р. и др. — В кн.: Цикличность процессов у больных туберкулезом и другими заболеваниями. М., 1973, с. 11—15.

Поступила 23/VII 1980 г.

ALTERATION IN ACTIVITIES OF NAD-GLYCONHYDROLASE, ACID AND ALKALINE PHOSPHATASES IN BLOOD CELLS UNDER CONDITIONS OF TUBERCULOSIS

V. G. Grigoryan, T. I. Shinkareva, V. S. Kiroshka, G. G. Tsymbalar, L. V. Vangeli

Clinico-Diagnostic Laboratory, Institute of Tuberculosis, Kishinev

Activities of NAD-glyconhydrolase from erythrocytes, alkaline and acid phosphatases from neutrophils and acid phosphatase from lymphocytes were studied in patients with pulmonary tuberculosis as well as in experimental animals. Distinct alterations in the activity of the enzymes studied were observed in blood cells of guinea pigs inoculated with tuberculosis. In patients with active pulmonary tuberculosis activities of acid and alkaline phosphatases were altered in leukocytes and the activity of NAD-glyconhydrolase — in erythrocytes. Inactive forms of tuberculosis were accompanied by a slight alteration in the alkaline phosphatase activity, activities of acid phosphatase and NAD-glyconhydrolase were unaltered.

УДК 616.351-006.6-085.849.1-07:616-008.931-074

Б. П. Суринов, А. Б. Комарова

МНОЖЕСТВЕННЫЕ ФОРМЫ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ ТКАНИ РАКА ПРЯМОЙ КИШКИ ПРИ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ

Научно-исследовательский институт медицинской радиологии АМН СССР, Обнинск

Злокачественные опухоли существенно отличаются от нормальных тканей по составу множественных форм ряда ферментов [1]. Определение биохимических изменений под влиянием лучевой терапии позволяет не только изучать отдельные механизмы деградации опухолевых клеток, но и применять полученные данные для оценки эффективности противоопухолевых воздействий [2, 3]. В настоящей работе рассматриваются результаты исследования множественных форм лактатдегидрогеназы (ЛДГ), эстеразы (ЭСТ) и кислой фосфатазы (КФ) в ткани рака прямой кишки до и после лучевой терапии.

Методика

Исследовали опухолевую ткань, а также пограничный с опухолью и нормальный, отдаленный от опухоли, участки стенки прямой кишки у 47 больных раком прямой кишки (аденокарцинома). Из них 13 больных обследовали (биопсия) до проведения лу-

чевой терапии, а 34 проводили предоперационную лучевую терапию на гамма-установке «Рокс» подвижным и статическим методом с 4 полей, определяемых размерами опухоли. При этом 26 больных облучали ежедневно по 6,5 Гр до суммарной очаговой дозы 20 Гр, а 8 больных — по 4 Гр через день до суммарной очаговой дозы 28—40 Гр.

Оперативное удаление рака прямой кишки у больных, облучавшихся до суммарной дозы 20 Гр, осуществляли через 2—5 дней, а у облучавшихся до суммарной дозы 28—40 Гр — через 20—30 дней после окончания лучевой терапии. Кусочки тканей хранили в течение 16—18 ч при -8°C , а затем гомогенизировали с дистиллированной водой в соотношении 1 : 1 в течение 1 мин в стеклянном гомогенизаторе при 100—1500 об/мин. Гомогенат центрифугировали на центрифуге ЦУМ-1 при 9000 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость подвергали электрофорезу в 1,5% агаровом геле с мидиаловым буфером pH 8,6 и определяли активность фракций ЛДГ (лактат дегидрогеназа, НАД, феназинметасульфат, нитросиний тетразолий, pH 7,4), КФ (2-нафтил-фосфат, прочный синий Б, pH 4,8) и ЭСТ (2-нафтилацетат, прочный синий Б, pH 7,8). Энзимогаммы денситометрировали на интегрирующем экстинкциометре ЭРИ-10 (ГДР), активность фракций выражали в условных единицах (усл. ед.), соответствующих единицам оптической плотности ($\text{E} \times 10^{-2}$). Методика подробно описана ранее [4]. Суммарное содержание Н- и М-субъединиц ЛДГ рассчитывали исходя из их содержания в четвертичной структуре изоформ фермента [5]. Результаты обрабатывали статистически, определяя достоверность различий с помощью коэффициента сравнения Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Исследуемые ферменты представлены как в нормальной, так и в опухолевой и пограничной тканях одними и теми же фракциями (табл. 1 и 2). Различия между этими тканями состояли в величинах активностей фракций. Пограничная с опухолью нормальная по морфологическим показателям ткань занимала промежуточное положение по активности фракций ферментов между опухолевой и нормальной тканью. В опухоли без облучения по сравнению с нормальной тканью наибольшей активностью обладали катодные фракции, что соответствует данным о преобладании в злокачественных опухолях М-субъединиц ЛДГ [1]. Так, по нашим результатам (см. табл. 1), в опухоли отношение Н-ЛДГ/М-ЛДГ было равно 0,7, тогда как в нормальной ткани — 1,0.

После облучения активность некоторых фракций ЛДГ менялась, причем по сравнению с необлученной опухолью в сторону нормализации. При облучении до суммарной дозы 20 Гр активность ЛДГ₂, ЛДГ₃ и ЛДГ₅ понижалась, а при облучении до суммарной дозы 28—40 Гр снижалось содержание в опухоли всех фракций ЛДГ. Эти изменения в разной степени проявлялись в снижении содержания Н- и М-субъединиц ЛДГ. Так, преимущественное уменьшение активности ЛДГ₅ в опухоли после облучения понижалось по сравнению с опухолью без облучения общее содержание М-субъединиц, причем в наибольшей степени у больных, облучавшихся до суммарной дозы 28—40 Гр. В последнем случае было достоверно снижено и суммарное содержание Н-субъединиц ЛДГ.

По содержанию фракций ЭСТ опухолевая ткань до облучения отличалась от нормальной стенки тонкой кишки пониженной активностью фракции ЭСТ₁, преобладающей в норме (см. табл. 2). Предоперационная лучевая терапия в суммарной очаговой дозе 20 Гр повышала по сравнению с опухолью без облучения активность ЭСТ₁. Опухолевая ткань при этом практически перестала отличаться от нормальной, за исключением низкой активности ЭСТ₄. В то же время при облучении в более высокой суммарной дозе радиации (28—40 Гр) по сравнению с опухолью без облучения активность фракций ЭСТ существенно не изменялась, а активность фракции ЭСТ₂ даже снижалась.

КФ в нормальной, пограничной и опухолевой тканях выявлялась в виде двух фракций. Количественно оцениваемой использованным здесь методом активностью обладала катодная фракция КФ₂ (см. табл. 2). Ее содержание существенно варьировало у различных больных, вследствие этого достоверных изменений не было выявлено. Наблюдали лишь тенденцию к повышению активности в группе больных, облученных в суммарной очаговой дозе 20 Гр, и снижение ее в ткани опухоли после облучения в более высокой дозе радиации.

Т а б л и ц а 1

Содержание изферментов ЛДГ (в усл. ед.) в нормальной, пограничной и опухолевой тканях в зависимости от дозы облучения

Характер ткани	Число наблюдений	ЛДГ ₁	ЛДГ ₂	ЛДГ ₃	ЛДГ ₄	ЛДГ ₅	Субъединицы ЛДГ		Отношение Н-ЛДГ/М-ЛДГ
							Н	М	
I. Необлученная									
Опухолевая	13	6,5±0,6 P _{I-III} <0,01	16,9±1,3 P _{I-II} <0,01 P _{I-III} <0,01	22,7±0,9 P _{I-II} <0,01 P _{I-III} <0,01	19,7±0,9 P _{I-III} <0,05	20,3±1,3 P _{I-II} <0,01 P _{I-III} <0,001	35,5±0,7 P _{I-III} <0,001	50,7±1,9 P _{I-II} <0,01 P _{I-III} <0,01	0,7±0,1
II. Облученная (20 Гр)									
Нормальная	25	5,6±0,6	12,9±0,8	14,4±1,2	12,9±0,7	7,2±1,0	26,4±1,9	27,6±2,1	1,0±0,1
Пограничная	25	4,7±0,7	11,7±0,7	15,6±1,3	13,2±0,9	8,5±1,2	25,7±1,8	28,8±2,3	0,9±0,1
Опухолевая	26	4,9±0,7	11,6±1,0	14,2±0,2	17,9±1,2	14,4±1,4	30,1±4,2	37,0±3,0	0,8±0,1
III. Облученная (28—40 Гр)									
Нормальная	7	4,2±1,4	11,6±1,8	14,4±2,3	10,7±2,4	4,7±1,2	23,5±4,9	24,0±4,6	1,0±0,1
Пограничная	7	2,1±0,3	9,4±1,3	13,1±1,9	10,5±1,3	4,0±1,1	19,7±2,1	21,7±2,2	0,9±0,1
Опухолевая	8	2,9±0,6	11,8±2,6	14,2±2,6	15,5±1,9	8,6±1,7	23,9±3,5	30,6±4,3	0,8±0,1

Пр и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2 значения P в сравнении групп I, II и III приведены только при достоверных различиях ($P < 0,05$).

Т а б л и ц а 2

Содержание фракций КФ и ЭСТ (в усл. ед.) в нормальной, пограничной и опухолевой тканях в зависимости от дозы облучения

Характер ткани	Число наблюдений	КФ ₀	Число наблюдений	ЭСТ ₁	ЭСТ ₂	ЭСТ ₃	ЭСТ ₄
<i>I. Необлученная</i>							
Опухолевая	13	1,1±0,3	13	4,0±1,0 $P_{I-II} < 0,05$	2,1±0,3 $P_{I-III} < 0,01$	1,0±0,5 $P_{I-II} < 0,01$	2,3±0,7 $P_{I-III} < 0,05$
<i>II. Облученная (20 Гр)</i>							
Нормальная	25	4,2±0,6	22	10,6±1,3	1,5±0,3	2,8±0,6	3,5±0,8
Пограничная	25	4,2±0,9	22	7,9±0,9	1,3±0,3	1,8±0,3	1,9±0,6
Опухолевая	26	4,6±0,8	22	9,6±1,7 $P_{II-III} < 0,05$	1,8±0,4 $P_{II-III} < 0,05$	2,3±0,4	1,6±0,5 $P < 0,01$
<i>III. Облученная (28—40 Гр)</i>							
Нормальная	7	4,2±1,2	7	9,5±1,8	1,0±0,3	2,4±0,9	2,5±1,0
Пограничная	7	2,2±0,7	7	8,6±1,6	0,7±0,2	1,5±0,5	1,8±1,2
Опухолевая	7	2,9±2,0	8	3,3±1,4	0,6±0,3	1,6±0,6	1,1±0,6

При сравнении величин активности фракций ферментов в нормальной и облученной опухолевой тканях было обнаружено, что у больных, облучавшихся до суммарной дозы 20 Гр, активность ЛДГ₄ и ЛДГ₅ была выше ($P < 0,001$), а ЭСТ₄ — ниже ($P < 0,01$), чем в нормальной стенке прямой кишки. В опухоли, облученной до суммарной дозы 28—40 Гр, активность фракций ЛДГ не различалась, а активность доминирующей в норме ЭСТ₁ существенно ($P = 0,02$) ниже, чем в нормальной ткани.

Поскольку активность фракций ферментов в опухолевой и нормальной тканях определялась одновременно при соблюдении строго одинаковых условий, то представилось возможным использовать разностный метод статистического анализа результатов [6]. Для этого рассчитывали разность между активностями фракций ферментов в нормальной и опухолевой тканях индивидуально для каждого больного. При этом оказалось, что средние значения разности между активностями фракций ЛДГ в нормальной и облученной опухолевой тканях у больных, облучавшихся до суммарной дозы 20 Гр, существенны в отношении ЛДГ₄ ($-5,7 \pm 1,2$ усл. ед.; $P < 0,001$) и ЛДГ₅ ($-7,1 \pm 1,5$ усл. ед.; $P < 0,001$), а также М-субъединиц ЛДГ ($-10,4 \pm 1,6$ усл. ед.; $P < 0,001$). У больных, облученных в суммарной очаговой дозе 28—40 Гр, эта разница существенна в отношении ЛДГ₂ ($1,5 \pm 0,3$ усл. ед.; $P < 0,001$), ЛДГ₅ ($-4,1 \pm 1,2$ усл. ед.; $P < 0,02$) и М-субъединиц ЛДГ ($-6,8 \pm 1,2$ усл. ед.; $P < 0,05$). В последней группе больных разница активностей существенна и в отношении ЭСТ₁, где она достигает $6,0 \pm 2,2$ усл. ед. ($P < 0,05$).

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что предоперационная лучевая терапия приводит к снижению активности фракций ЛДГ, преимущественно содержащих М-субъединицы ЛДГ, т. е. тех изоферментов, повышение активности которых сопровождается злокачественный рост [1]. С увеличением суммарной дозы и протяженности облучения эти изменения приобретают более закономерный характер, но при этом снижается активность и тех ферментов, которые характерны для ткани в норме. Последнее наиболее выражено в понижении активности доминирующей в норме фракции ЭСТ₁.

Представленные выше данные об изменении содержания в ткани рака прямой кишки у больных после лучевой терапии множественных форм ЛДГ и ЭСТ соответствуют выводам, сделанным ранее на основании экспериментальных исследований. Лучевые воздействия как в данном случае, так и в клетках экспериментальных опухолей [7] и в нормальных тканях [8, 9] снижают содержание преобладающих до облучения форм ферментов. В отношении фракций ЛДГ в нормальных тканях эти нарушения не зависят от того, относятся они к Н- или М-содержащим фракциям ЛДГ, а определяются величиной активности до облучения [9]. В целом нарушения направлены на снижение тканеспецифических особенностей состава множественных форм ферментов и могут быть обозначены как постлучевая дифференцировка. В опухолевой ткани в постлучевые изменения, очевидно, вовлекаются обменные процессы, сопровождающие злокачественный рост, что и снижает жизнеспособность раковых клеток. Как установлено ранее [3], биохимические изменения не находятся в прямой зависимости от степени лучевого патоморфоза и, следовательно, влияние лучевых воздействий на состояние рассматриваемых здесь ферментных систем не связано непосредственно с повреждением клеточных и тканевых структур.

Таким образом, исследование содержания множественных форм ЛДГ и ЭСТ в опухоли после предоперационной лучевой терапии рака прямой кишки выявило изменения, обратные развивающимся при злокачественном росте — снижение активности М-содержащих фракций ЛДГ, нормализация активности ЭСТ₁. Наряду с этим наблюдаются изменения, указывающие на понижение биохимической дифференцировки (снижение активности ЭСТ₁ и некоторых Н-содержащих фракций ЛДГ после высокой суммарной дозы лучевого воздействия).

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Шапог В. С. Биохимические аспекты опухолевого роста. М., 1975.
2. Лушников Е. Ф. Лучевой патоморфоз опухолей человека. М., 1977.
3. Комарова А. Б., Загребин В. М., Суринов Б. П. — Мед. радиол., 1978, № 5, с. 22.
4. Суриков Б. П., Кашкин К. П., Бочкова Д. Н. и др. — Лабор. дело, 1970, № 4, с. 240.
5. Уилкинсон Дж. Изоферменты. М., 1968.
6. Ойвин И. А. — Пат. физиол., 1960, № 4, с. 76.
7. Суринов Б. П., Кулиш Ю. С., Лавринецкая Т. Е. — Вопр. онкол., 1977, № 6, с. 61.
8. Суриков Б. П. — Радиобиология, 1976, № 3, с. 437.
9. Суриков Б. П. — Там же, 1977, № 4, с. 485.

Поступила 23/VII 1980 г.

MULTIPLE FORMS OF SOME ENZYMES IN TISSUE OF RECTUM CARCINOMA AFTER X-RAY TREATMENT

B. P. Surinov, A. B. Komarova

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

Alterations in activity of multiple forms of lactate dehydrogenase, acid phosphatase and esterase were studied in normal, tumoral and in surrounding tissue of rectum carcinoma developing after X-ray irradiation. The alterations in the activity of multiple forms of the enzymes were observed characteristic for both malignant tumors and normal tissues.

УДК 616.155.392.2-036.12-085.272.7-07:616.155.32-008.939.633.2-074

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

ВЛИЯНИЕ АДЕНОЗИНА НА СИНТЕЗ ПИРИМИДИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ И РНК В НОРМАЛЬНЫХ ЛИМФОЦИТАХ И ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ЛИМФОЛЕЙКОЗЕ

Лаборатория биохимии Научно-исследовательского института гематологии и переливания крови, Ленинград

В последние годы получена обширная информация, что нуклеотиды, в частности аденозин [1—7], играют существенную роль в регуляции пролиферативной активности тканей. Помимо превращения в ИМФ и АМФ, биологическое действие аденозина проявляется в угнетении синтеза нуклеотидов, нуклеиновых кислот и белка [8—12]. Эти данные послужили основанием для изучения влияния аденозина на обмен лейкоцитов при активировании пролиферации кроветворных тканей, вызванной их лейкозным перерождением. Казалось целесообразным осветить участие еще одного дополнительного фактора в регуляции скорости неопластического роста. Интерес к этому направлению исследований усиливается в связи с высокой чувствительностью лимфоцитов к действию аденозина [2], а также потому, что повышение внутриклеточной концентрации свободного аденозина при определенных условиях [13, 14] коррелирует с возникновением острой иммунной недостаточности, часто сопровождающей развитие лейкозов [15—17].

Задачу работы составляет изучение влияния аденозина на синтез пиримидиновых нуклеотидов и РНК из меченых предшественников в лимфоцитах больных хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ), а также на активность ключевых ферментов обмена пиримидиновых нуклеотидов — ОМФ-пирофосфорилазы (КФ 2.4.2.10, оротидин-5'-фосфат:пирофосфат-фосфорибозил-трансфераза) и уридинкиназы (КФ 2.7.1.48, АТФ:уридин-5'-фосфотрансфераза).

М е т о д и к а

Лимфоциты выделяли из дефибринированной крови здоровых людей по методу [18], из крови больных — с помощью желатино-цитратного раствора с последующим дифференциальным центрифугированием [19]. Изолированные лимфоциты инкубировали в присутствии аденозина с 2,3-²³N-аспарагиновой, 2-¹⁴C-оротовой кислотами,

Таблица 1
Подавление аденозиним синтеза пиримидиновых нуклеотидов и РНК в лимфоцитах человека ($M \pm m$)

Исследованные	2- ³ H-аспарагиновая кислота				2- ¹⁴ C-оротовая кислота				5- ³ H-уридин			
	нуклеотиды		РНК		нуклеотиды		РНК		нуклеотиды		РНК	
	контроль	± аденозин	контроль	± аденозин	контроль	± аденозин	контроль	± аденозин	контроль	± аденозин	контроль	± аденозин
Больные хроническим лимфлейкозом	715 ± 46	250 ± 18	91 ± 12	—	1341 ± 115	193 ± 22	298 ± 39	128 ± 17	14408 ± 450	3733 ± 200	500 ± 12	275 ± 30
Здоровые доноры	433 ± 50	—	81 ± 8,2	—	1212 ± 143	165 ± 23	182 ± 19	117 ± 27	3099 ± 250	1089 ± 13	201 ± 35	175 ± 33

Средние данные 6 опытов

Примечание. 0,1 мл лимфоцитов ($2 \cdot 10^6$ клеток) инкубировали 60 мин при 37 °C в Кресс-Ринг-р-фосфатном буфере, содержащем ЭДТА в конечной концентрации 0,1%. К инкубационной среде добавляли (в ммоль): глицин — 5, NaHCO_3 — 15, никотинамид — 5, АТФ — 1,25, глюкозу — 30, радиоактивные предшественники — 0,5 (удельная радиоактивность в имп/мин/мк моль: 2,3-³H-аспарата — $1 \cdot 10^6$, 2-¹⁴C-орота — $2 \cdot 10^4$, 5-³H-уридина — $1 \cdot 10^6$). Объем инкубационной смеси 1 мл. Результаты выражены в пмоль превращаемого предшественника (в мкг ДНК/ч).

а также с ³H-уридином. Состав инкубационной среды и время инкубации приводятся в примечании к табл. 1. Проникнувшие клетки отмывали физиологическим раствором хлористого натрия с ЭДТА в конечной концентрации 0,1% и дважды экстрагировали 0,5 М хлорной кислотой при 0 °C. Экстракты после нейтрализации высушивали над КОН, полученные осадки растворяли в воде и подвергали хроматографическому разделению [20]. О синтезе РНК судили по ее радиоактивности, которую определяли после щелочного гидролиза кислотонерастворимого осадка клеток [20]. Активность ОМФ-пирофосфорилазы и уридинкиназы определяли в экстрактах ацетоновых порошков лимфоцитов, как указано в работе [20]. При определении активности ОМФ-пирофосфорилазы лимфоцитов использовали фосфорибозилпирофосфат (ФРФФ), синтезированный в лаборатории [21]. Дрожжевую ОМФ-декарбоксилазу не вводили в реакционную смесь, так как добавление препарата не отражалось существенно на уровне активности фермента лимфоцитов, поскольку, по данным работы [22], активность ОМФ-декарбоксилазы лимфоцитов более чем в 2 раза превышает уровень активности ОМФ-пирофосфорилазы. Состав реакционной смеси, составленной для определения активности ферментов, приводится в примечании к табл. 2. Необходимо указать, что в работе исследовали лейкемические формы с количеством лимфобластов, не превышающем 7%.

Результаты и обсуждение

Меченые предшественники — аспарагиновая, оротовая кислоты и уридин — включаются в пиримидиновые нуклеотиды и в РНК лимфоцитов здоровых и больных ХЛЛ с различной скоростью, которая определяется особенностями их метаболических превращений.

Синтез нуклеотидов из аспарагиновой и оротовой кислот происходит по пути *de novo*, начинающемуся конденсацией аспарагиновой кислоты с карбамилфосфатом и заканчивающемуся образованием УМФ. Следовательно, аспарагиновая кислота проходит весь путь *de novo*, и обнаружение радиоактивной метки этого предшественника в УМФ указывает на осуществление в лимфоцитах всех его стадий. Вопрос о синтезе нуклеотидов в лимфоцитах этим путем в течение длительного времени оставался спорным, и лишь сравнительно не-

давно были получены экспериментальные доказательства его осуществления [23, 24].

По данным табл. 1, скорость синтеза пириимидиновых нуклеотидов из аспарагиновой кислоты в лимфоцитах при ХЛЛ соответствует включению 715 нмоль/ч в пул кислоторастворимых нуклеотидов.

Путь метаболических превращений оротовой кислоты значительно короче, чем аспарагиновой, так как ее увеличение в синтезе пириимидиновых нуклеотидов *de novo* ограничивается конечными стадиями этого процесса.

Т а б л и ц а 2

Изменение активности ОМФ-пирофосфорилазы и уридинкиназы лимфоцитов в присутствии экзогенного аденозина

Исследованные лимфоциты	ОМФ-пирофосфорилаза			Уридинкиназа		
	контроль	+аденозин	тор- можес- ние, %	контроль	+аденозин	тор- можес- ние, %
Хронический лимфолейкоз (средние данные 7 опытов)	521±87,5	397±46,3	24	379±52,2	194±20,1	55
Здоровые доноры (средние данные 5 опытов)	334±34,2	260±27,1	22	233±19,8	170±18,3	34

П р и м е ч а н и е. Состав инкубационной среды при определении активности ОМФ-пирофосфорилазы: экстракта клеток — 100—150 мкг белка, 10 мкмоль Na_2HPO_4 pH 7,5, 0,25 мкмоль ФРФФ, 0,6 мкмоль 2- ^{14}C -оротата (удельная радиоактивность $1,2—1 \cdot 10^6$ имп/мин/мкмоль) в общем объеме пробы 0,4 мл. Условия инкубации — 2 мин при 37 °С. Реакцию останавливали нагреванием проб 1½ мин в кипящей водной бане. Активность уридинкиназы определяли в среде следующего состава: 75 мкмоль трис-НСl-буфера pH 7,4, 10 мкмоль MgCl_2 , 1,25 мкмоль АТФ, 0,5 мкмоль 5- ^3H -уридина (удельная радиоактивность $1 \cdot 10^6$ имп/мин/мкмоль). Общий объем проб 0,35 мл. Результаты выражены в нмоль/мг белка в 1 ч.

В присутствии ОМФ-пирофосфорилазы и ФРФФ оротовая кислота превращается в оротидинмонофосфат, который декарбоксилируется с образованием УМФ. Поэтому синтез УМФ из оротовой кислоты протекает значительно быстрее, чем из аспарагиновой кислоты. В течение часа в нуклеотиды включается 1341 пкмоль оротовой кислоты.

Наилучшим предшественником пириимидиновых нуклеотидов и РНК как в нормальных, так и в лейкозных лимфоцитах из исследованных нами является уридин. Минувя пути *de novo*, под влиянием уридинкиназы он фосфорилируется в УМФ. Как показано в табл. 1 и было отмечено нами ранее [20], скорость альтернативного пути синтеза нуклеотидов в кроветворных тканях превышает скорость синтеза *de novo* и особенно резко в лейкозных клетках.

Аденозин является сильным ингибитором обмена нуклеотидов и синтеза РНК. Скорость включения аспарагиновой кислоты в нуклеотиды в присутствии аденозина (конечная концентрация 2 мМ) затормаживается приблизительно на 65 %, оротовой кислоты — на 85 % и уридина — на 75 %. Эти данные свидетельствуют о том, что ферменты, участвующие в синтезе нуклеотидов *de novo* и альтернативным путем, ингибируются аденозином.

Чтобы получить экспериментальные подтверждения блокирования аденозином ферментативных стадий синтеза нуклеотидов, исследовали действие экзогенного аденозина на активность ОМФ-пирофосфорилазы и уридинкиназы. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Можно видеть, что активность обоих ферментов под влиянием аденозина снижается, причем активность уридинкиназы изменяется заметнее, чем ОМФ-пирофосфорилазы. Обнаруженные различия активности ферментов, зависящие от присутствия аденозина, полностью согласуются с данными табл. 1. Очевидно, альтернативный путь синтеза нуклеотидов более резко угнетается аденозином, чем путь *de novo*.

Таким образом, аденозин оказывает ингибирующее влияние на внутриклеточный обмен лимфоцитов здоровых людей и больных ХЛЛ. Блокируя синтез нуклеотидов и РНК, он тем самым подавляет пролиферативную активность клеток, поэтому его можно рассматривать как один из факторов, участвующих в ее регуляции. Биологическую роль этого фактора в нормальных клетках оценить трудно, так как при высокой координации обменных процессов свободный аденозин не накапливается в клетках в значительной концентрации [25]. Однако при заболеваниях неопластического характера значение его, по-видимому, возрастает. На это указывает нарушение обмена аденозина, сопутствующее развитию некоторых из них. Так, при остром лейкозе в лимфо- и миелоблестах периферической крови активируются процессы катаболизма, о чем можно судить по многократному увеличению активности аденозиндезаминазы в этих клетках [26—28]. Очевидно, в зависимости от концентрации влияние аденозина на внутриклеточный обмен может существенно меняться.

Свойство аденозина ингибировать обмен нуклеотидов и нуклеиновых кислот широко используется для создания лечебных препаратов, способных ограничивать скорость неопластического роста, составной частью которых является аденозин или его производные.

По данным табл. 1, синтез нуклеотидов и РНК в лимфоцитах как здоровых, так и больных людей подавляется в присутствии аденозина приблизительно одинаково. Таким образом, специфического действия аденозина на обмен лимфоцитов при ХЛЛ обнаружить не удалось.

Поскольку влияние аденозина на активность ОМФ-пирофосфорилазы и уридинкиназы исследовали на бесклеточных экстрактах, отмеченное угнетение их активности является, по-видимому, результатом действия аденозина на молекулы самих ферментов. В присутствии аденозина может нарушаться конформация ферментных молекул, что влечет за собой изменение уровня каталитической активности.

Угнетение ОМФ-пирофосфорилазной реакции и накопление оротата в фибробластах и лимфоцитах, инкубируемых с аденозином, наблюдали в более ранних работах [8], однако причину его видели в инактивировании аденозином рибозофосфат-пирофосфокиназы и в ограничении синтеза ФРФФ [29, 30]. Данные настоящей работы указывают на возможность непосредственного влияния аденозина на ключевые ферменты синтеза пиримидиновых нуклеотидов. Они интересны также еще и тем, что подчеркивают взаимосвязь, существующую между интермедиатами пуринового и пиримидинового обмена, а также дают информацию о биохимических механизмах, лежащих в основе этой взаимосвязи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Snyder F. F., Mendelsohn H., Seegmiller J. E. — J. clin. Invest., 1976, v. 58, p. 654—666.
2. Carson D. A., Kaye J., Seegmiller J. E. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, p. 5677—5681.
3. Fischer D., Van der Weyden M. B., Snyderman R. et al. — J. clin. Invest., 1976, v. 58, p. 399—407.
4. Carson D. A., Seegmiller J. E. — Ibid., v. 57, p. 274—282.
5. Fox I. H., Keystone E. C., Gladman D. D. et al. — Immunol. Commun., 1975, v. 4, p. 419—427.
6. Ullman B., Cohen A., Marlin D. W. — Cell, 1976, v. 9, p. 205—211.
7. Fox I. H., Kelley W. N. — Ann. Rev. Biochem., 1978, v. 47, p. 655—686.
8. Snyder F. F., Seegmiller J. E. — FEBS Letters, 1976, v. 66, p. 102—106.
9. Green H., Chan T. S. — Science, 1973, v. 182, p. 836—839.
10. Ischii K., Green H. — J. Cell. Sci., 1973, v. 13, p. 429—439.
11. Ворновицкая Г. А., Иоаннисянц И. А., Илларион Б. С. — Вopr. мед. химии, 1975, № 2, с. 182—187.
12. Foltinova I., Kuzela S. — Neoplasma, 1976, v. 23, p. 223—226.
13. Giblett E. R., Anderson J. E. — Lancet, 1972, v. 2, p. 1067—1069.
14. Dissing J., Knudsen B. — Ibid., p. 1316.
15. Tung R., Silber R., Oqaglati F. et al. — J. clin. Invest., 1976, v. 57, p. 756—761.
16. Ramol B., Brok-Simoni F., Barnea N. et al. — Brit. J. Haemat., 1977, v. 36, p. 67—70.

17. Hirschhorn R., Martiniuk F., Rosen F. S. — Clin. Immunol. Immunopath., 1978, v. 9, p. 287—292.
18. Coulson A. S., Chalmers D. G. — Lancet, 1964, v. 1, p. 468—469.
19. Луганова И. С., Сейц И. Ф. Метод выделения лейкоцитов, тромбоцитов и эритроцитов из крови человека. Л., 1971.
20. Филиппова В. Н., Филиановская Л. И., Блинов М. Н. и др. — Вопр. мед. химии, 1979, № 6, с. 694—698.
21. Филиппова В. Н., Филиановская Л. И., Блинов М. Н. — Там же, 1975, № 6, с. 663—665.
22. Pausch J., Keppler D., Decker K. — Biochim. biophys. Acta, 1972, v. 258, p. 395—403.
23. Lucas J. — Science, 1967, v. 156, p. 1237—1239.
24. Ito K., Uchino H. — J. biol. Chem., 1973, v. 248, p. 389—392.
25. Potter Van R. — Nucleic Acid Outlines Minneapolis, 1961, v. 1, p. 151.
26. Smyth J. F., Harrap K. R. — Brit. J. Cancer, 1975, v. 31, p. 544.
27. Meier J., Coleman M. S., Hutton J. J. — Ibid., 1976, v. 33, p. 312.
28. Smyth J. F., Polack D. G., Holiman B. J. et al. — J. clin. Invest., 1978, v. 62, p. 710—712.
29. Planet G., Fox I. H. — J. biol. Chem., 1976, v. 251, p. 5839—5844.
30. Ito K., Uchino H. — Ibid., p. 1427—1430.

Поступила 23/VII 1980 г.

EFFECT OF ADENOSINE ON SYNTHESIS OF PYRIMIDINE NUCLEOTIDES AND RNA IN NORMAL LYMPHOCYTES AND UNDER CONDITIONS OF CHRONIC LYMPHOID LEUKOSIS

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

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

Effect of exogenous adenosine on synthesis of pyrimidine nucleotides and RNA was studied in lymphocytes of the patients with leukemic form of chronic lymphoid leukosis. In presence of adenosine lymphocytes were incubated in mixtures containing the precursors — 2,3-²H-aspartic and 2-¹⁴C-uracil acids as well as 5-³H-uridine. Effect of adenosine on the activity of key enzymes of pyrimidine nucleotide synthesis (orotidine monophosphate pyrophosphorylase and uridine kinase) was studied. The enzymatic activity was estimated using radiochemical procedures in extracts of lymphocytes stored at — 20° after acetone drying. Adenosine similarly inhibited synthesis of pyrimidine nucleotides and RNA in normal and leukemic leukocytes. One of the mechanisms, by means of which the inhibitory effect of adenosine was realized, was related to the enzymatic activity of orotidine monophosphate pyrophosphorylase and uridine kinase.

УДК 616.441-092.9-07:[616.12+616.36]-008.932.95/.96-074

Я. Х. Туракулов, Т. С. Саатов, М. Т. Рахимджанова, Г. Исмаилходжаева

ОКИСЛЕНИЕ ПАЛЬМИТИЛКАРНИТИНА МИТОХОНДРИЯМИ СЕРДЦА И ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ТИРЕОИДНОЙ ПАТОЛОГИИ

Институт биохимии АН Узбекской ССР, Ташкент

Жирные кислоты с длинной углеводородной цепью, существующие после активации в виде ацил-КоА и переносимые внутрь митохондрий с помощью карнитинового шунта, являются хорошими субстратами дыхания, чье окисление сопряжено с фосфорилированием АДФ [1, 2]. В изолированных митохондриях сердца и печени они считаются главным эндогенным субстратом дыхания. На преимущественное использование жирных кислот под влиянием избыточных количеств тиреоидных гормонов в организме указывает снижение дыхательного коэффициента и усиление поглощения ¹⁵С-пальмитата при перфузии органов [3, 4]. Это свидетельствует о важной роли окисления свободных жирных кислот (СЖК) в осуществлении гормональной регуляции энергетического метаболизма клетки. Настоящая работа посвящена изучению окисления жирных кислот с длинной (C₁₆) и средней цепью (C₈) митохондриями различных органов крыс в норме, при избытке и недостатке тиреоидных гормонов в организме.

Методика

Экспериментальный гипертиреоз и тиреотоксикоз у крыс вызывали внутрибрюшинным введением тироксина в течение 5 дней по 1 и 40 мг на 1 кг массы тела, гипотиреоидное состояние — путем удаления щитовидной железы. Животных забивали на 40—45-й день после тиреоидэктомии. Критерием оценки тиреоидного статуса служили уровень белковосвязанного йода в крови и изменение массы животных. Животных разделяли на 4 группы: 1-я группа — контрольные, 2-я — получающие тироксин в концентрации 1 мг на 1 кг массы (гипертиреоз), 3-я — получающие тироксин в концентрации 40 мг на 1 кг массы (тиреотоксикоз), 4-я — тиреоидэктомизированные. Митохондрии выделяли на холоде методом дифференциального центрифугирования [5] в растворе: сахара — 0,25 М, трис — 10 мМ, ЭДТА — 1 мМ pH 7,4 для митохондрий печени, а для митохондрий сердца: сахара — 0,3 М, ЭДТА — $1,10^{-2}$ М pH 7,4 с последующим суспендированием в среде: сахара — 0,3 М, трис-HCl — 10 мМ pH 7,4. Скорость дыхания митохондрий регистрировали полярографическим методом при помощи вращающегося платинового электрода в стандартных условиях в ячейке полярографа объемом 1 мл при 25 °С. Среда измерения для митохондрий сердца содержала сахара — 0,3 М, KCl — 10 мМ, KH_2PO_4 — 5 мМ, ЭДТА — 1 мМ pH 7,4. Среда инкубации для митохондрий печени содержала сахара — 0,25 М, трис-HCl — 10 мМ, ЭДТА — 1 мМ pH 7,4. Субстратом окисления были сукцинат (10 мМ); α -кетоглутарат (10 мМ), каприлат (100 мкМ); конечная концентрация пальмитилкарнитина (производства фирмы «Sigma», США) 0,1 мкМ. Акцептором фосфата служил АДФ (200 мкМ). Скорость дыхания в различных метаболических состояниях митохондрий (V_2 , V_3 , V_4 , $V_{\text{лиф}}$) рассчитывалась за 1 мин на 1 мг белка. Белок определяли по методу Лоури [6]. СЖК миокарда и печени выделяли после разделения общих липидов на тонком слое силикагеля КСК в системе гексан — диэтиловый эфир — уксусная кислота (80 : 20 : 1,5). Количество СЖК измеряли по методу [7]. Общие кетоновые тела и ацетоацетат в ткани сердца и печени определяли по методу [8] с использованием щелочного салицилового альдегида.

Результаты и их обсуждение

С целью изучения особенностей окисления жирных кислот с различной длиной цепи митохондриями сердца и печени при действии тиреоидных гормонов мы анализировали скорость окисления длинноцепочечных жирных

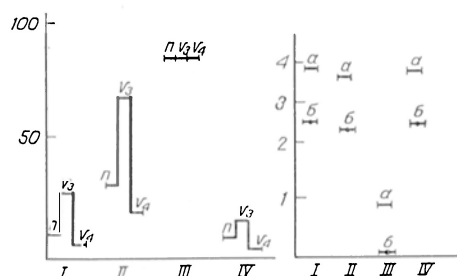


Рис. 1. Дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий сердца нормальных, тиреоидэктомизированных крыс и при введении разных доз тироксина *in vivo*.

л — пальмитилкарнитин; 3 — состояние 3; 4 — состояние 4; а — дыхательный контроль; б — отношение АДФ/0. I — норма; II — гипертиреоз; III — тиреотоксикоз; IV — тиреоидэктомия.

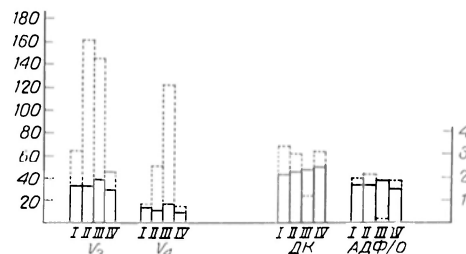


Рис. 2. Параметры окислительного фосфорилирования митохондрий мозга и печени крыс в норме, при введении разных доз тироксина и при тиреоидэктомии.

Сплошные линии — скорость окисления сукцината (10 мМ) митохондриями мозга; пунктир — скорость окисления сукцината митохондриями печени. I — норма; II — гипертиреоз; III — тиреотоксикоз; IV — тиреоидэктомия.

кислот (C_{16}) и жирных кислот со средней цепью (C_8) в условиях экспериментального тиреотоксикоза и тиреоидэктомии. Интактность митохондрий контролировали с использованием в качестве субстрата окисления α -кетоглутарат и сукцинат. В наших экспериментах окисление каприлата как в гомогенатах, так и в митохондриях сердца и в печени протекало без добавления карнитина. Однако имеются исследования [9], указывающие на зависимость окисления коротко- и среднецепочечных жирных кислот от присутствия карнитина, с чем наши данные не согласуются. Карнитиинезависимое окисление длинноцепочечных жирных кислот в митохондриях печени составляет только 15—20 % от общего уровня [10]. В связи с этим

для определения скорости окисления длинноцепочечных жирных кислот в основном использовали пальмитилкарнитин. Как видно из данных рис. 1 и таблицы, стимулирующие дозы тироксина в митохондриях сердца и печени при использовании в качестве субстрата окисления как каприлата, так и пальмитилкарнитина ускоряют дыхание во всех метаболических состояниях митохондрий. Ускоренный транспорт электронов по дыхательной цепи не сопровождался изменением дыхательного контроля и коэффициента АДФ/О. Вызываемое тироксином увеличение интенсивности окисления пальмитилкарнитина более выражено в сердечной ткани. Причины ускорения окисления жирных кислот, по-видимому, обусловлены изменением ферментативной активности на каком-то этапе или этапах окислительного превращения жирных кислот. Под действием стимулирующей дозы тирокси-

Дыхание и окислительное фосфорилирование в митохондриях печени в норме, под действием различных концентраций тироксина (T_4) и при тиреоидэктомии (среднее из 6 определений)

Условия опыта	Каприлат			Пальмитилкарнитин		
	дыхание, ммкат O_2 /мин на 1 мг белка (состояние 3)	ДК	АДФ/О	дыхание, ммкат O_2 /мин на 1 мг белка (состояние 3)	ДК	АДФ/О
Норма	$35,3 \pm 1,50$	$3,4 \pm 0,5$	$2,5 \pm 0,12$	$22,6 \pm 1,3$	$3,8 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,09$
T_4 1 мг/кг	$68,7 \pm 2,58$	$2,9 \pm 0,37$	$2,6 \pm 0,06$	$45,2 \pm 3,6$	$2,7 \pm 0,04$	$2,6 \pm 0,1$
T_4 40 мг/кг	$76,5 \pm 5,6$	$1,1 \pm 0,06$	—	$50,2 \pm 1,0$	$1,0 \pm 0,00$	—
Тиреоидэктомия	$23,5 \pm 1,1$	$3,4 \pm 0,15$	$2,6 \pm 0,11$	$14,7 \pm 0,9$	$3,9 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,09$

на увеличивается уровень эндогенного карнитина и активность карнитин-трансферазы [11], что вызывает ускорение процессов активации жирных кислот и трансмембранного перехода их с последующим вступлением в цикл окисления. В митохондриях мозга интактных животных окисление жирных кислот не происходит [12]. В связи с этим для определения скорости дыхания в митохондриях мозга использовали в качестве субстрата окисления сукцинат и α -кетоглутарат. Интенсивность окисления сукцината и α -кетоглутарата во всех метаболических состояниях митохондрий у гипертиреоидных крыс не отличалась от контрольных величин (рис. 2). Это свидетельствует об отсутствии чувствительности мозговой ткани и ее метаболизма к действию гормонов щитовидной железы [13]. Полученные данные коррелируют с результатами наших предыдущих исследований, где было показано, что тиреоидные гормоны, достоверно стимулируя активность аденилатциклазной системы ряда органов, не оказывали эффекта на ткани мозга [14].

Под действием токсических доз гормонов щитовидной железы в митохондриях сердца и печени при дыхании на каприлате и пальмитилкарнитине наблюдается ускоренный перенос электронов как на фосфорилирующем, так и на нефосфорилирующем пути окисления. Наибольший прирост по сравнению с контролем отмечается в состоянии V_4 . За счет большего (в процентном отношении) увеличения скорости свободного окисления наблюдается достоверное разобщение (ДК снижается до единицы, АДФ/О измерить не удастся), хотя вклад фосфорилирующего окисления намного больше, чем в контроле. Разобщающий эффект высоких доз тиреоидных гормонов на дыхание митохондрий как в сердце, так и в печени был отчетливо выражен, что является результатом их действия на структуру и функцию митохондрий [15]. Возможно, метаболический эффект тироксина в сердце и печени опосредован активацией аденилатциклазы и вследствие этого повышением концентрации цАМФ [14]. цАМФ усиливает липолиз, повышается уровень жирных кислот. Имеющее место увеличение содержания СЖК в этих условиях (в сердце $460 \pm 40,0$ мкг/г, в норме $202 \pm 30,0$ мкг/г; в печени $982 \pm 30,0$ мкг/г, в норме $320 \pm 25,0$ мкг/г) может выступать в роли патогенетического фактора, так как избыточное количество СЖК внутри клетки вызывает набухание митохондрий и уменьшает энергетическую эффективность

окисления. Параллельное определение кетоновых тел показывает увеличение суммарного количества их в печени и сердце на 33 и 20 % соответственно. Содержание ацетоацетата в сердце оставалось без существенных изменений, а в печени увеличивалось на 42 %.

В митохондриях мозга у экспериментальных животных при использовании в качестве субстрата окисления сукцината и α -кетоглутарата, как в 1-й серии опытов, повышение потребления кислорода не наблюдается, величина дыхательного контроля и АДФ/О не отличались от контрольного уровня.

У тиреоидэктомизированных животных интенсивность окисления каприлата и пальмитилкарнитина в митохондриях сердца и печени в состоянии 3 и 4 было ниже контрольного уровня; величина дыхательного контроля и АДФ/О — показатель сопряженности процессов переноса электронов — изменялись незначительно. Это коррелирует со снижением активности дыхательных ферментов при тиреоидэктомии [16]. В митохондриях мозга и при тиреоидэктомии показатели дыхания при использовании сукцината и α -кетоглутарата в качестве субстрата окисления были в пределах контрольных величин.

Таким образом, в зависимости от дозы тиреоидного гормона получены разные эффекты на окисление каприлата и пальмитилкарнитина, стимулирующие дозы тироксина и тиреоидэктомия вели к изменению уровня переноса электронов по дыхательной цепи, в одном случае повышая его, в другом — снижая, но дыхательный контроль и АДФ/О изменялись незначительно. Токсические же дозы приводили к быстрому окислению обоих субстратов и нарушению окислительного фосфорилирования. Отсутствие эффекта тиреоидных гормонов и тиреоидэктомии на интенсивность окисления субстратов в мозге свидетельствует о нечувствительности мозга к действию тиреоидных гормонов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Screde J., Bremer J.* — Acta Chem. scand., 1965, v. 19, p. 1995—1997.
2. *Bremer J., Daviles E.* — Biochim. biophys. Acta, 1972, v. 275, p. 298—301.
3. *Bing R. J.* — Physiol. Rev., 1965, v. 45, p. 171.
4. *Gold M., Scot J., Spitser J.* Am. J. Physiol., 1967, v. 213, p. 239.
5. *Schneider W. C., Hogeboom G. H.* — J. biol. Chem., 1950, v. 183, p. 123—128.
6. *Lowery Q. H., Rosserbrough N. J., Farr A. Z. et al.* — Ibid., 1951, v. 193, p. 265.
7. *Haya K., Michio U. J.* — Lipid Res., 1965, v. 6, p. 16.
8. *Bloom W., Atlanta M.* — J. Lab. clin. Med., 1958, v. 51, p. 824.
9. *Bode C., Klingenberg M.* — Biochem. J., 1965, v. 341, p. 271.
10. *Harano V., Kowal J., Russel V. et al.* — Arch. Biochem., 1972, v. 153, p. 12.
11. *Bressler R., Wittels B.* — J. clin. Invest., 1966, v. 45, p. 8.
12. *Ленинджер А.* Биохимия, М., 1974.
13. *Weis A. K.* — Fed. Proc., 1960, v. 19, Suppl. 5, p. 137.
14. *Туракулов Я. Х., Саатов Т. С., Халиков С. К. и др.* — Докл. АН СССР, 1976, т. 229, № 3, с. 758.
15. *Lehninger A. L., Ray B. L., Schmider H.* — J. Biophys. Biochem. Cytol., 1959, v. 5, p. 97.
16. *Clot J.-P., Baudry M., Raymond M.* — Biochimie, 1973, v. 55, p. 451—456.

Поступила 23/VII 1980 г.

OXIDATION OF PALMITYL CARNITINE IN MITOCHONDRIA OF RAT HEART AND LIVER TISSUES UNDER CONDITIONS OF THYROID PATHOLOGY

Ya. Kh. Turakulov, T. S. Saatov, M. T. Rakhimdzhanova, G. Ismailkhodzhaeva

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Uzbek SSR, Tashkent

Effects were studied of various doses of thyroid hormones and thyroidectomy on oxidation of palmityl carnitine and caprylate in heart and liver mitochondria as well as on the rate of oxidation of succinate and α -ketoglutarate in brain mitochondria. Depending on the dose of the thyroid hormone the rate of fatty acid oxidation varied. The stimulatory doses of thyroxine and thyroidectomy altered (increased or decreased) the rate of electron transport in the respiratory chain but the respiratory control and the ADP/O ratio were only slightly changed. Toxic doses led to fast oxidation of the both substrates and to uncoupling of the oxidative phosphorylation. Thyroid hormones and thyroidectomy did not affect the succinate oxidation in brain mitochondria; this data suggest insensitivity of the brain tissue to the effect of thyroid hormones.

С. А. Котова, С. И. Ялгут

СОДЕРЖАНИЕ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Отдел аллергологии Института проблем онкологии АН УССР, Киев

Адренергическая и холинергическая регуляция функций клеток реализуется через системы циклических нуклеотидов — аденозинмонофосфата (цАМФ) и гуанозинмонофосфата (цГМФ). Наиболее распространенная теория бронхиальной астмы [1] связывает развитие заболевания со снижением чувствительности β -адренергических рецепторов клеток к действию адреналина. При этом нарушение адренергической реакции цАМФ-зависимых реакций клетки вызывает повреждение гомеостатического контроля бронхального тонуса и приводит к развитию бронхоспазма. Дальнейшими исследованиями [2, 3] было показано, что самостоятельное значение в развитии бронхоспазма имеет повышенная чувствительность α -адренергических и холинергических рецепторов. В связи с этим выдвинуто предположение [4, 5], что решающее значение имеет не абсолютное содержание в клетке каждого из нуклеотидов, а их динамическое соотношение, определяемое конкурентными влияниями различных медиаторов и гормонов и активностью соответствующих им рецепторных систем. С целью дальнейшего изучения этого вопроса нами было проведено определение соотношения циклических нуклеотидов в плазме крови больных бронхиальной астмой.

Методика

Уровень цАМФ и цГМФ определяли в плазме крови 42 больных бронхиальной астмой и 10 здоровых лиц. Кровь для исследования брали утром натощак до приема фармакологических препаратов. Обследуемые были разделены на 5 групп. 1-ю группу составили здоровые лица, во 2-ю группу включены больные бронхиальной астмой в стадии ремиссии, в 3-ю — с приступами затрудненного дыхания 1—2 раза в сутки, которые легко купируются, в 4-ю — с постоянным умеренным бронхоспазмом, требующим регулярного приема бронхолитических средств, в 5-ю — с частыми приступами бронхиальной астмы на фоне постоянного бронхоспазма при постоянном приеме бронхолитических средств и гормонотерапии. Содержание цАМФ и цГМФ определяли методом конкурентного изотопного связывания [6] при помощи стандартных наборов фирмы «Amersham» (Англия).

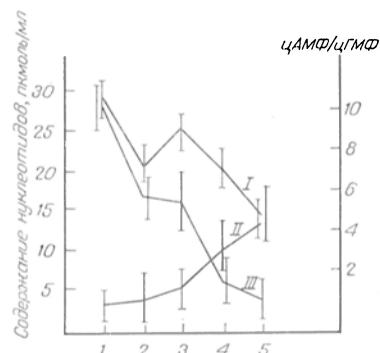
Результаты и обсуждение

На рисунке представлены результаты определения циклических нуклеотидов в плазме и величина коэффициента цАМФ/цГМФ. Как видно, соотношение нуклеотидов изменяется пропорционально тяжести заболевания: уменьшается количество цАМФ, возрастает количество цГМФ. Соответственно уменьшается коэффициент цАМФ/цГМФ.

В табл. 1 приведены результаты определения содержания нуклеотидов в плазме крови больных 2, 3 и 4-й групп в зависимости от формы бронхиальной астмы (атопическая или инфекционная). Достоверных различий в содержании цАМФ между группами не наблюдалось. Содержание цГМФ в плазме больных с инфекционной формой астмы было достоверно выше, чем у больных с атопической формой. В табл. 2 приведены результаты определения циклических нуклеотидов у 7 больных с тяжелым течением астмы (у 5 инфекционного генеза, у 2 инфекционного и атопического генеза) в динамике: в периоде обострения и после достигнутого клинического улучшения. Как видно из табл. 2, улучшение состояния больных сопровождалось увеличением коэффициента цАМФ/цГМФ преимущественно за счет увеличения содержания цАМФ, в то время как содержание цГМФ продолжает оставаться повышенным.

В свете современных представлений об особенностях регуляции бронхального тонуса мы можем указать на несколько факторов, объясняющих

полученные нами результаты. Показано, что функциональная неполноценность β -адренергических рецепторов и повышение тонуса холинергической регуляции независимо друг от друга могут определять развитие бронхоспазма при различных патогенетических вариантах астмы. Подтверждением этого являются данные, указывающие на ослабление центральных (в гипоталамусе) [7] и периферических (в лимфоцитах, клетках гладкой мускулатуры бронхов и др.) [8, 9] механизмов адренергической регуляции у больных с атопической формой астмы. Однако нам не удалось выявить различий в содержании цАМФ в плазме больных в зависимости от формы астмы. Уровень цГМФ был достоверно выше при инфекционной форме астмы. Это согласуется с данными, указывающими, что у больных повышена чувствительность бронхиального дерева к ацетилхолину [10]. Кроме того, результаты, приведенные в табл. 2, показывают, что нарушения в регуляции уровня цГМФ являются более устойчивыми, чем нарушения в уровне цАМФ, так как клиническое улучшение приводит к нормализации уровня цАМФ, в то время как содержание цГМФ продолжает оставаться повышенным. Эти данные могут свидетельствовать о патогенетических особенностях холинергической регуляции у больных бронхиальной астмой.



Содержание циклических нуклеотидов в плазме больных бронхиальной астмой в зависимости от тяжести заболевания.

1 — здоровые люди; 2 — больные в стадии ремиссии; 3 — с единичными приступами астмы; 4 — с постоянным бронхоспазмом; 5 — с частыми приступами астмы. I — содержание цАМФ; II — содержание цГМФ; III — соотношение цАМФ/цГМФ.

Как следует из результатов, приведенных на рисунке, прогрессирование заболевания сопровождается достоверными изменениями в уровне циклических нуклеотидов в плазме (снижение цАМФ и повышение цГМФ). Аналогичные результаты были получены при обследовании детей, больных бронхиальной астмой [11].

Наряду с парогенетическими особенностями регуляции, обсуждавшимися выше, указанные изменения может вызвать ряд факторов, возникающих уже в процессе заболевания. Установлено, что активность аденилатциклазы

Т а б л и ц а 1

Содержание циклических нуклеотидов в плазме в зависимости от формы бронхиальной астмы

Форма бронхиальной астмы	Число больных	Содержание нуклеотидов в плазме, пикомоль/мл	
		цАМФ	цГМФ
Атопическая	7	22,0±2,7	2,3±0,35
Инфекционно-аллергическая	9	20,0±1,3	5,3±0,4

Т а б л и ц а 2

Содержание циклических нуклеотидов в плазме крови в динамике заболевания

Обследованный	Содержание нуклеотидов в динамике заболевания, пикомоль/мл			
	обострение заболевания		клиническое улучшение	
	цАМФ	цГМФ	цАМФ	цГМФ
А	20,0	7,6	32,0	5,9
Б	22,0	3,1	26,0	3,4
В	12,2	6,5	22,4	6,0
Г	18,1	4,0	24,5	4,5
Д	12,2	11,6	19,8	9,8
Е	12,6	3,5	17,0	1,0
Ж	18,0	5,8	25,5	4,8
	16,4±1,4	6,0±1,2	23,8±2,1	5,1±1,2

падает в условиях постоянной гиперкатехоламинемии и частого применения фармакологических средств (β -стимуляторов), направленного на повышение содержания цАМФ в клетках [12]. Кроме этого, соотношение нуклеотидов изменяется в пользу цГМФ при действии повышенных концентраций медиаторов аллергии на клетки. Возможно, однако, что изме-

нение в соотношении нуклеотидов отражает не только патогенетические, но и компенсаторные механизмы, так как показано, что повышение тонуса холинергической регуляции является важным приспособительным механизмом при хронической гипоксии [13].

Необходимо также учитывать возможность нарушения внутриклеточных систем, обеспечивающих поддержание динамического равновесия в содержании нуклеотидов. Установлено, что изменение концентрации одного из нуклеотидов влияет на уровень его антагониста через буферные системы клетки, которыми, вероятно, являются простагландины [14], путем восстановления динамического равновесия.

Другой возможный путь нарушения регуляции через фосфодиэстеразы цАМФ и цГМФ — ферменты, метаболизирующие нуклеотиды. В частности, показано повышение активности фосфодиэстеразы цАМФ в период обострения бронхиальной астмы [15, 16], что может быть причиной снижения уровня цАМФ в клетках и соответственно его концентрации в плазме.

Таким образом, содержание циклических нуклеотидов в плазме и соотношение между ними изменяются в зависимости от формы бронхиальной астмы, выраженности клинических проявлений и динамики заболевания. Указанные изменения отражают особенности регуляции у больных бронхиальной астмой, возможно, имеют патогенетический характер и нуждаются в дальнейшем изучении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Szcutivani A. — J. Allergy, 1968, v. 42, p. 203—232.
2. Fisherman E., Cohen G. — Ann. Allergy, 1974, v. 33, p. 86—101.
3. Allounyan R. — In: European Congress of Allergology and Clinical Immunology. 9-th. Proceedings. London, 1975, p. 121—132.
4. Жихарев С. С., Минеев В. Н., Нефедьев С. Н. и др. — В кн.: Симпозиум аллергологических и иммунологических о-в социалистических стран. 3-й. Тезисы. Сухуми, 1979, с. 116.
5. Дорофеев Г. И., Кожмякин Л. А., Ивашкин В. Т. Циклические нуклеотиды и адаптация организма. Л., 1978.
6. Федоров Н. А. Биологическое и клиническое значение циклических нуклеотидов. М., 1979.
7. Szczeclic A., Podolec Z. — Int. Arch. Allergy, 1976, v. 50, p. 329—340.
8. Parker C. W., Smith V. W. — J. clin. Invest., 1973, v. 52, p. 48—59.
9. Жихарев С. С. — Тер. арх., 1977, № 3, с. 131—135.
10. Orenek J., Gayraud P., Smith A. et al. — Am. Rev. resp. Dis., 1977, v. 115, p. 937—943.
11. Кожмякин Л. А., Коростовцев Д. С. — Вопр. охр. мат., 1978, № 10, с. 39—42.
12. Взаимодействие гормонов с рецепторами. М., 1979.
13. Кожмякин Л. А., Коростовцев Д. С. — Докл. АН СССР, 1977, т. 237, с. 1519—1521.
14. Junod A. — Am. Rev. resp. Dis., 1975, v. 112, p. 93—108.
15. Ялут С. И., Данилова С. А., Кульчицкий О. К. — Вопр. мед. химии, 1979, № 4, с. 392—394.
16. Muo S., Ise T., Shibahara S. et al. — Ann. Allergy, 1976, v. 37, p. 201.

Поступила 23/VII 1980 г.

CONTENT OF CYCLIC NUCLEOTIDES IN BLOOD PLASMA OF PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA

S. A. Kotova, S. I. Yalut

Institute of Oncologic Problems, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

The ratio of cAMP and cGMP in blood plasma of patients with bronchial asthma was altered depending on the severity of the disease. There was noted a decrease in cAMP content and an increase — in cGMP. Distinct alterations in the cAMP content were not observed in infectious and atopic forms of the asthma. Content of cGMP was higher in blood plasma of patients with infectious form of the asthma as compared with the atopic one. Dynamics of improvement in the patients with the severe type of bronchial asthma was accompanied by the increase in the ratio cAMP/cGMP due to an increase in the cAMP content, while the content of cGMP remained elevated.

В. П. Комов, Н. В. Кириллова

БИОСИНТЕЗ И РАСПАД АЛЬДОЛАЗЫ В ПЕЧЕНИ КРЫС — НОСИТЕЛЕЙ ОПУХОЛИ

Химико-фармацевтический институт, Ленинград

В тканях млекопитающих обнаружены три формы альдолазы (КФ 4.1.2.13): А — мышечная, В — печеночная и С — мозговая. Большие успехи в исследовании структуры, механизма действия и оборота в тканях относятся прежде всего к альдолазе, выделенной из мышц и мозга [1—4]. Показано, что биосинтез и каталитические функции А-формы альдолазы существенно трансформируются в процессе роста опухоли [5, 6]. Что касается В-формы фермента, то она исследована гораздо в меньшей степени [7, 8]. В литературе ничего не известно также о влиянии неоплазмы на биосинтез и распад фермента в печени опухоленосителей. Мы изучали влияние перевивной опухоли на биосинтез, время функционирования и распад альдолазы в печени крыс.

Методика

Работу проводили на беспородных крысах-самцах массой 140—160 г. Животных декапировали, перфузированную печень гомогенизировали в буфере, содержащем 0,25 М сахарозу, 1 ммоль ЭДТА pH 7,4 из расчета 10 мл буфера на каждый грамм ткани. Полученный гомогенат центрифугировали при 105 000 g 90 мин. Надосадочную жидкость гепатоцитов выделяли альдолазу. Выделение фермента включало следующие стадии: 1) фракционное осаждение — цитозоль дважды насыщали сульфатом аммония до 40 и 75%. Через 30 мин осадки центрифугировали при 7000 g 20 мин. Надосадочную жидкость отбрасывали, осадки растворяли в буфере А (5 ммоль трис-солянокислого, 1 ммоль ЭДТА pH 7,4); гель-фильтрация на сефадексе Г-150 (колонка 300×15 мм) — элюцию проводили буфером Б (5 ммоль трис-солянокислого, 1 ммоль ЭДТА, 0,2 ммоль меркаптоэтанол pH 7,5); 3) ионообменная хроматография на ДЭАЭ-сефадексе А-50 и ДЭАЭ-целлюлозе (колонки соответственно 300×15 и 100×10 мм). Для элюции служил буфер В (линейный градиент хлорида натрия от 0 до 0,3 М в буфере Б). Данные представлены на рис. 1. В результате проведенной работы альдолаза была очищена в 90—95 раз. Соотношение скоростей ферментативных реакций с ФДФ и ФМФ составляло 1,16—1,21, что характерно для альдолаз печени [4, 9]. Кроме того, полученную альдолазу подвергали диск-электрофорезу в 7% полиакриламидном геле. Электрофоретическое разделение проводили в трис-глициновом буфере pH 8,3; сила тока 2,5 и 5 мА на столбик геля, продолжительность электрофореза 6 ч. Для выявления зон альдолазы использовали инкубационную среду, описанную ранее [10]. Окрашенные гели сканировали на приборе «Хромоскан» (Англия). Была получена одна белковая зона, в которой локализовалась вся альдолазная активность. Активность фермента определяли по методу Пинто и соавт. [11], концентрацию белка — по Лоури [12]. В качестве опухолевого штамма использовали лимфосаркому Плисса. Радионуклид ^3H -лейцин (удельная радиоактивность 157 мКи/ммоль) вводили животным внутрибрюшинно в дозе 550 мКи на 1 кг массы. Радиоактивность проб оценивали на приборе «Изокап-300» (США), используя толуоловый сцинтиллятор. Молекулярную гетерогенность альдолазы сыворотки крови крыс исследовали методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле в условиях, описанных выше, продолжительность электрофореза $2\frac{1}{2}$ ч. Константы скоростей синтеза и деструкции альдолазы определяли по методу Шимке [13], время полужизни фермента — по [14]. Все операции проводили при 0—3 °C.

Результаты и обсуждение

Инъекция крысам H^3 -лейцина приводит к его включению в синтезированные *de novo* белки печени, в том числе и в альдолазу. Стационарная фаза этого процесса наступает через 6 ч после введения радионуклида в кровяное русло (рис. 2). Распад альдолазы в печени оценивали в интервале 2—7 сут после инъекции H^3 -лейцина и перевивки лимфосаркомы Плисса. Тангенс угла наклона экспериментальной кривой (рис. 3) численно равен константе скорости распада альдолазного белка *in vivo* [13]. Данные, характеризующие оборот альдолазы в растворимой фракции печени крыс, представлены в табл. 1. Другие авторы определили количество альдолазы, а также ее оборот в печени крыс [15]. Наши данные о содержании альдолазы в растворимой фракции гепатоцитов крыс, а также о скорости ее образова-

ния и распада совпадают с их результатами, хотя выделение из печени гомогенного фермента осуществлялось различными методами. Из табл. 1 видно, что в процессе роста лимфосаркомы Плисса синтез альдолазы в растворимой фракции клеток печени ингибируется почти в 2 раза в отличие от А-формы фермента, синтез которой стимулируется в опухолевых клетках и тка-

нях организмов-опухоленосителей [16, 17]. Альдолаза, образованная в печени, «экспортируется» в кровь. Мы исследовали изменение спектра изоформ альдолазы в сыворотке крови крыс-опухоленосителей (табл. 2). В сы-

Т а б л и ц а 1

Оборот альдолазы в печени крыс

Индекс	Контроль	Опыт
K_d , дни ⁻¹	0,213	0,179
K_s , $\left(\frac{\text{мкг энзима}}{\text{на 1 г ткани} \cdot \text{день}} \right)$	974	516
$t_{1/2}$, (дни)	3,25	3,88
E , $\left(\frac{\text{мкг энзима}}{\text{на 1 г ткани}} \right)$	4563	2895

П р и м е ч а н и е. K_s в опытах рассчитано на 5-е сутки после перевивки опухоли.

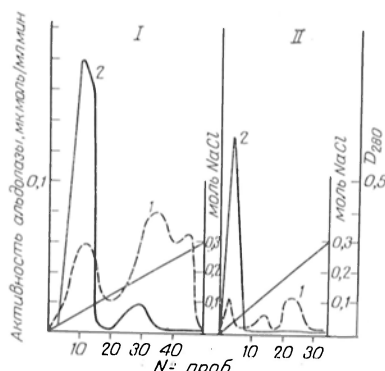


Рис. 1. Ионообменная хроматография альдолазы печени крыс на ДЭАЭ-сепадексе А-50 (I) и ДЭАЭ-целлюлозе (II).

Выход белка контролировали спектрофотометрически при 280 нм (1). Активность альдолазы (2) определяли по методу Пип-то и соавт.

воротке крови обнаружены мышечная, печеночная формы альдолазы, а также их гибриды [18, 19]. Учитывая различие по электрофоретической подвижности, 1-я и 2-я изоформы альдолазы были идентифицированы как мышечная и гибридная формы, а 3-я — как печеночная форма фермента.

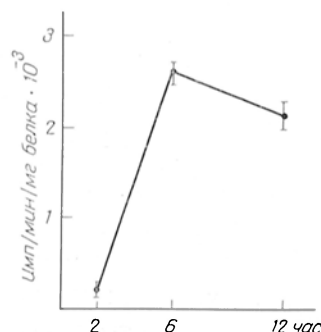


Рис. 2. Скорость включения ³H-лейцина в альдолазу печени intact-ных крыс.

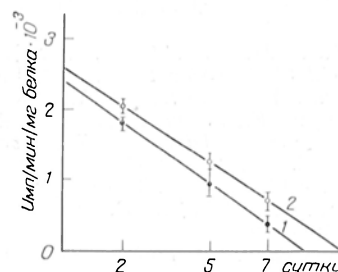


Рис. 3. Скорость деструкции альдолазы печени крыс у контрольных (1) и опытных (2) животных.

На разных этапах развития опухоли спектр изоформ фермента претерпевает существенные изменения. Увеличивается содержание А и гибридной форм альдолазы, что совпадает с данными литературы [20]. Интересно отметить, что частичное подавление биосинтеза альдолазы в гепатоцитах не сказывается на содержании В-формы фермента в кровяном русле. Общее количество В-формы альдолазы в крови крыс-опухоленосителей даже несколько больше по сравнению с нормой, причем через 7 сут после перевивки опухоли животным выявлены 2 фракции с различной электрофоретической подвижностью. Связанные с мембранами полирибосомы, как правило, участвуют в синтезе «экспортных» белков, а свободные синтезируют ферменты для нужд самой клетки [21]. Исходя из этого соображения, можно полагать, что неоплазма, в частности лимфосаркома Плисса, ингибирует биосинтез альдола-

зы, осуществляемый преимущественно свободными полирибосомами. Образование «экспортной» альдолазы при этом несколько трансформируется, но не ингибируется. Таким образом, можно отметить избирательное дейст-

Т а б л и ц а 2

Активность изоформ альдолазы сыворотки крови крыс

Время после перевивки опухоли, сут	Активность изоформ энзима, мкмоль на 1 мл за 1 мин			
	I	II	III	IV
Контроль	0,130±0,0045	0,060±0,0028	0,085±0,0036	—
2	0,150±0,0095	0,235±0,0021	0,170±0,0017	—
7	0,080±0,0020	0,160±0,0030	0,160±0,0030	0,020±0,0049
14	0,155±0,0021	0,115±0,0077	0,145±0,0021	—

вие неоплазмы на рибосомальный синтез белков, в частности альдолазы в печени крыс.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Lebherz H.* — J. biol. Chem., 1975, v. 250, p. 5967—5975.
2. *Lebherz H.* — Ibid., p. 5976—5981.
3. *Penchoet E., Kochman M., Rutter W.* — Biochemistry (Wash.), 1969, v. 8, p. 4391—4395.
4. *Rutter W., Rajkumar T., Penchoet E. et al.* — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1968, v. 150, p. 102—107.
5. *Hadjidov D., Dikov A.* — Arch. Geschwulstforsch., 1970, Bd 35, S. 245—250.
6. *Schapira F.* — Bull. Soc. Chim. Biol., 1947, v. 49, p. 1647—1664.
7. *Eagles P., Igbal M.* — Biochem. J., 1973, v. 133, p. 429—439.
8. *Schapira F., Nardman J.* — Clin. chim. Acta, 1969, v. 26, p. 189—195.
9. *Rutter W., Blosstein R., Woodfin B. et al.* — Advanc. Enzyme. Regulat., 1963, v. 1, p. 39—56.
10. *Комов В. П., Кириллова Н. В., Елинов Н. П.* — Вopr. онкол., 1976, № 4, с. 78—81.
11. *Pinto P. V., Paul A. D., Kaplan A.* — Clin. Chem., 1969, v. 15, p. 339—342.
12. *Lowry O., Rosenberg A., Farr A. et al.* — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 165—176.
13. *Schimke R., Bradley M.* — In: Proteases and Biological Control. New York, 1975, p. 515—530.
14. *Arias J. M., Doubl D., Shimke R. T.* — J. biol. Chem., 1969, v. 244, p. 3303—3315.
15. *Kuehl L., Sumsion E. N.* — J. biol. Chem., 1970, v. 245, p. 6616—6623.
16. *Ikehara Y., Endo H., Okada Y.* — Arch. Biochem., 1970, v. 136, p. 491—497.
17. *Schapira F., Josipavicz A.* — C. R. Soc. Biol. (Paris), 1970, v. 164, p. 31—36.
18. *Pfleiderer G., Dikov A., Falkenberg F.* — Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 1974, Bd 355, S. 233—238.
19. *Rutter W. J.* — In: The Enzymes. New York, 1961, v. 5, p. 341—366.
20. *Kiyoshi N., Hirojoshi S., Akira K. et al.* — J. Jap. Soc. Cancer Ther., 1970, № 6, p. 105—106.
21. *Sakamoto T., Higashi T.* — J. Biochem. (Tokyo), 1973, v. 73, p. 1083—1088.

Поступила 26/II 1980 г.

BIOSYNTHESIS AND DEGRADATION OF ALDOLASE IN LIVER TISSUE OF TUMOR-BEARING RATS

V. P. Komov, N. V. Kirillova

Chemico-Pharmaceutical Institute, Leningrad

Turnover of liver tissue aldolase as well as molecular heterogeneity of the blood serum enzyme were studied in normal and tumor-bearing rats. Different rates of synthesis and degradation of the enzyme were found in liver tissues of intact and impaired animals.

А. Ю. Лебенка, Ю. А. Рачкус, С. И. Канопкайте

ВЛИЯНИЕ S-МЕТИЛМЕТИОНИНА НА МЕТАБОЛИЗМ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ У *E. coli*

Институт биохимии АН Литовской ССР, Вильнюс

Почти 40 лет назад было обнаружено, что некоторые растительные пищевые продукты обладают противоязвенной активностью. Особенно хороший эффект отмечен при использовании сока из свежей капусты и других овощей, с помощью которых удалось успешно лечить язву желудка и двенадцатиперстной кишки [1—4]. Позже из растительных источников был выделен противоязвенный фактор, который оказался аналогичным ранее синтезированному S-метилметионину (SMM),—витамин U. Предполагают, что положительное действие SMM как противоязвенного фактора заключается в его действии на тиминовый и холиновый обмен в слизистой оболочке желудка, что, по-видимому, повышает ее сопротивляемость к изъязвлению [5]. Кроме того, SMM участвует в инактивировании гистамина [6], который, как известно, в избыточном количестве способен возбуждать вегетативную нервную систему и провоцировать язву желудка. В литературе также имеются данные, указывающие на возможность использования SMM при лечении гастритов с пониженной кислотностью [2, 7, 8], при подавлении развития экспериментального атеросклероза [9—11], а также в качестве радиозащитного фактора [12, 13] и при лечении ряда других заболеваний.

Хотя физиологический эффект SMM очевиден и SMM широко используется на практике как у нас в стране, так и за рубежом, однако многие аспекты его биохимии изучены недостаточно, в частности участие в метаболизме нуклеиновых кислот. Целью настоящей работы было изучение сравнительного влияния SMM и метионина на метаболизм ДНК и РНК в культуре *E. coli* MRE-600.

Методика

Клетки *E. coli* MRE-600 выращивали при 37 °C на качалках в минеральной среде M9 [14] с добавлением 0,4% глюкозы. Культуру выращивали в колбах Эрленмейера вместимостью 1 л, содержащих по 0,2 л среды. Через 4 ч после посева культуры в среду вносили метионин или SMM в концентрации $2,7 \cdot 10^{-5}$ М, и клетки продолжали выращивать до середины логарифмической фазы роста. В конце выращивания в среду добавляли $2\text{-}^{14}\text{C}$ -уридин с удельной радиоактивностью 55,5 мКи/ммоль или 5-метил- ^3H -тимидин с удельной радиоактивностью 7000 мКи/ммоль («Изотоп», Ленинград). В случае внесения уридина конечная концентрация изотопа составляла 0,7 мКи на 1 мл среды, длительность инкубации — 10 мин, а при использовании тимидина конечная концентрация изотопа достигала 1 мКи/мл и инкубация продолжалась 40 мин. После инкубации среду быстро охлаждали и клетки собирали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 20 мин. Собранные клетки дважды отмывали 0,15 М NaCl, содержащим 0,2 М KCl. Из полученных клеток *E. coli* MRE-600 выделяли и очищали тотальную РНК по способу [15]. ДНК выделяли модифицированным методом Мармура [16]. Электрофорез РНК вели в 2,5% полиакриламидном геле (ПААГ), содержащем агарозу (до 0,5%), по методу [17, 18]. Продолжительность электрофореза составляла $1\frac{1}{2}$ —2 ч, сила тока — 5 мА на трубку, длина геля — 90 мм. Гели из трубок удаляли, фиксировали и окрашивали.

После отмывки гели замораживали при —20 °C и разрезали на кусочки длиной 1,5 мм. Последние помещали в сцинтилляционные сосуды, к каждому добавляли по 1 мл 30% H_2O_2 и инкубировали в течение ночи при 60 °C. К образовавшейся жидкости приливали 10 мл сцинтиллятора [19], радиоактивность считали на приборе SL-300 фирмы «Intertechnique» (Франция).

Результаты и обсуждение

Определение включения тимидина в ДНК *E. coli* MRE-600 при выращивании культуры в среде с SMM или метионином показало, что SMM увеличивает включение метки (табл. 1) на 20% по сравнению с культурой, росшей при наличии в среде метионина.

Проведенные аналогичные эксперименты по включению уридина в суммарную РНК растущих клеток *E. coli* MRE-600 с SMM или метионином показали, что и в этом случае имеются различия, причем более отчетливые, чем при включении метки в ДНК. Инкубация в течение 10 мин культуры *E. coli*, росшей в среде с SMM, с меченым уридином на 47 % увеличивает

Т а б л и ц а 2

Включение $2\text{-}^{14}\text{C}$ -уридина в суммарную РНК клеток *E. coli* MRE-600, выращенных в среде с метионином или SMM

Компонент среды	Характеристика включения	
	имп/мин на 1 О. Е. суммарный РНК	%
Метионин	2300665	100,0
SMM	340144	147,4

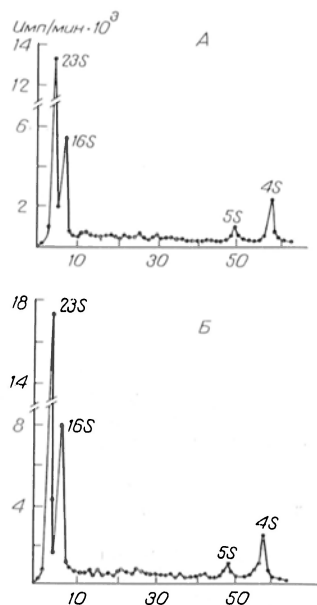
Т а б л и ц а 1

Влияние метионина и SMM на включение 5-метил- ^3H -тимидина в *E. coli* MRE-600

Компонент среды	Характеристика включения	
	имп/мин на 1 О. Е. ДНК	%
Метионин	3582	100,0
SMM	4306	120,2

включение метки интенсивнее, чем при росте культуры с метионином (табл. 2).

Для изучения эффективности включения метки в отдельные фракции РНК нами был применен метод электрофореза РНК в ПААГ. Используя



Электрофоретическое разделение в ПААГ 18 мкг суммарной ^{14}C -РНК клеток *E. coli* MRE-600, выращенных на среде с метионином (А) и S-метилметионином (Б).

По оси ординат — характеристика включения λ (в имп/мин · 10^3).

одинаковые количества РНК для электрофореза и определяя радиоактивность в отдельных фракциях РНК, мы смогли выявить предполагаемые различия (см. рисунок). Видно, что высокополимерные РНК выявляются в виде двух острых пиков (23S и 16S), четко отделяясь друг от друга. Хорошее разделение получается у низкополимерных (5S и 4S) РНК. Значительных примесей других веществ и деградации анализируемых препаратов выявить не удастся. Величины радиоактивности, выявляемые в отдельных зонах разных категорий РНК, выделенных из клеток, росших с SMM или с метионином, приведены в табл. 3. Видно, что SMM и метионин стимулируют включение уридина во все анализируемые фракции РНК, но не в одинаковой степени. Большая радиоактивность обнаружена во всех фракциях РНК культуры *E. coli*, росшей на среде с SMM. Степень радиоактивности отдельных фракций РНК неодинакова. По абсолютному количеству метки в низкомолекулярные РНК (4S и 5S) уридин включается в 1,81 и 1,72 раза соответственно эффективнее при росте культуры с SMM. Под влиянием SMM в 4S РНК появляется на 10 % метки больше, чем в 5S РНК. Эта разница еще более отчетливо выявляется у высокополимерных РНК — 16S РНК содержит на 54 % больше метки, чем 23S РНК. По абсолютному количеству метки уридин в 16S РНК включается в 2,17 раза, а в 23S РНК — в 1,63 раза эффективнее, чем при наличии в среде метионина. Подсчет общей радиоактивности, найденный на электрофореграмме, и относительной радиоактивности в процентах для каждой категории РНК (см. табл. 3) показал, что существенной разницы между 4S и 5S РНК выявить не удастся (она составляет лишь 0,3 %). В высокополимерных РНК, т. е. в 16S, под влия-

нием SMM соотношение доли от общей радиоактивности увеличивается на 4,5 % и в такой же степени уменьшается в 23 S РНК.

Полученные нами данные относительно влияния SMM и метионина на включение уридина и тимидина в нуклеиновые кислоты показали, что их метаболизм в клетках *E. coli* MRE-600, по-видимому, в некоторой степени имеет отличительные черты. Это отчетливо видно из проведенных определений включения метки в ДНК и РНК. В обоих случаях при использовании одинаковых концентраций SMM и метионина наблюдалась более сильная стимуляция включения радиоактивности при росте культуры в среде с SMM. Механизм такого влияния пока полностью не ясен. В качестве объяс-

Т а б л и ц а 3

Относительное распределение метки между отдельными категориями РНК *E. coli* MRE-600, росшей на среде с SMM или с метионином

Показатель	Компонент среды	Фракция РНК				Суммарная ЕРНК
		4S	5S	16S	23S	
Распределение абсолютной радиоактивности в РНК	SMM	7988	3754	11 100	20 986	43 829
	Метионин	4403	2174	5 107	12 876	24 560
Процент от общей найденной радиоактивности в РНК	SMM	18,22	8,56	25,32	47,88	99,98
	Метионин	17,92	8,85	20,79	52,42	99,98
Сравнительная радиоактивность, % от включения метионина	Метионин	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	SMM	181,4	172,6	217,3	162,9	178,4

нения можно привести некоторые данные литературы, указывающие на участие метионина в посттранскрипционных модификациях нуклеиновых кислот, в частности в метилтрансферазных реакциях [20]. Поскольку SMM по структуре и свойствам очень близок к метионину [2], то и известные его функции могут совпадать с функциями, присущими метионину. Кроме того, они могут быть выражены сильнее, так как SMM является макроэргическим соединением [21]. Такое предположение подтверждают полученные нами ранее данные [15], показавшие, что SMM аналогично метионину может участвовать в метилировании как низкополимерных (4 S), так и высокополимерных (16 S и 23 S) прокариотических РНК. Большинство оснований метилируется обоими донорами метильных групп — метионином и SMM. Разница проявляется лишь в количественной стороне процесса. Другая часть оснований может модифицироваться лишь посредством SMM либо только метионином. Например, 2-метиладенин в 4 S РНК, N²-метилгуанин в 23 S РНК модифицируются лишь посредством SMM, а N²-диметилгуанин в 4 S РНК, 1-метиладенин в 16 S РНК, 1-метиладенин в 16 S РНК — метионином.

Поскольку предполагается, что процесс модификации является высокоспецифическим явлением [20] и каждое основание, а также положение в основании метилируется своим особым ферментом, то можно думать, что в клетках прокариотов присутствуют ферменты, которые используют метильные группы только от SMM. Способность SMM легко отдавать свои СН₃-группы другим акцепторам наблюдалась и в эукариотических клетках [22].

В опытах с клетками *S. cerevisiae* показано, что некоторые стороны метаболизма S-аденозилметионина и SMM-различаются. Добавление SMM в среду в концентрации 0,1 мМ индуцирует активность S-аденозилметионингомоцистеинметилтрансферазы и в противоположность S-аденозилметионину слабо репрессирует метионаденозилтрансферазу [23], причем индуктивное действие SMM на S-аденозилметионингомоцистеинметилтрансферазу не сопровождается изменением пула S-аденозилметионина, S-аде-

нозилгомоцистеина и метионина в клетках. Влияние SMM на другие биосинтетические ферменты метионина слабо выражено или вообще отсутствует.

Таким образом, полученные результаты показали, что SMM ускоряет включение метки как в ДНК, так и в РНК. Следовательно, положительный физиологический эффект SMM можно рассматривать как результат процесса ускорения синтеза нуклеиновых кислот. Неясно, однако, каким путем проявляется данный стимулирующий эффект: либо путем участия SMM в ускорении метилирования макромолекул [15], либо посредством других, еще не выясненных механизмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Заиконникова И. В., Уразаева Л. Г. — В кн.: Витамин U (S-метилметионин). Природа, свойства, применение. М., 1973, с. 25.
2. Букин В. Н., Хучуа Г. Н. — Там же, с. 7.
3. Bersin T., Müller A., Strehler E. — *Arzneimittel-Forsch.*, 1956, Bd 6, S. 174.
4. Strehler E. — *Gastroenterologia* (Basel), 1955, Bd 84, S. 119.
5. Salo K. — *Jap. J. clin. exp. Med.*, 1956, v. 36, p. 1139.
6. Suzue R. — *Bull. Inst. chem. Res.*, 1967, v. 45, p. 201.
7. Трусов В. В., Орешков Т. М. — В кн.: Витамин U (S-метилметионин). Природа, свойства, применение. М., 1973, с. 112.
8. Франк Ю. П., Коржукова П. И. — Там же, с. 61.
9. Nakamura K., Ariyama H. — *Bull. Agricult. Chem.*, 1959, v. 23, p. 348.
10. Nakamura K., Ariyama H. — *Tohoku J. Agricult. Res.*, 1961, v. 12, p. 49.
11. Nakamura K., Ariyama H. — *Ibid.*, p. 383.
12. Kojima K. — *Uraku kэнкю*, 1960, v. 30, p. 3820.
13. Villa F., Candura M., Pisani A. — *Folia med. (Napoli)*, 1960, v. 43, p. 881.
14. Адамс М. Бактериофаги. М., 1961.
15. Лебенка А. Ю., Рачкус Ю. А., Канопкайте С. И. — *Прикладная биохим.*, 1979, № 5, с. 693.
16. Marmur J. — *J. molec. Biol.*, 1961, v. 3, p. 208.
17. Dingman C. N., Peaseock A. C. — *Biochemistry* (Wash.), 1968, v. 7, p. 659.
18. Станкявичюте Ю. В. — В кн.: Методы в биохимии. Вильнюс, 1975, с. 227.
19. Bray G. A. — *Analyt. Biochem.*, 1960, v. 1, p. 279.
20. Венкстерн Т. В. — *Успехи биол. химии*, 1976, т. 17, с. 3.
21. Букин В. Н., Арешкина Л. Я., Хучуа Г. Н. — В кн.: Витамин U (S-метилметионин). Природа, свойства, применение. М., 1973, с. 22.
22. Jakob K. M., Tal I. — *Biochim. biophys. Acta*, 1973, v. 308, p. 296.
23. Ferro A. J., Spence. — *J. Bact.*, 1973, v. 116, p. 812.

Поступила 12/III 1980 г.

THE INFLUENCE OF S-METHYLMETHIONINE ON THE METABOLISM OF NUCLEIC ACIDS IN *ESCHERICHIA COLI*

A. J. Lebionka, J. A. Rachkus, S. J. Kanopkaite

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Lithuanian SSR, Vilnius

The influence of S-methylmethionine /SMM/ on metabolism of nucleic acids in *E. coli* MRE-600 has been studied. The influence of SMM was compared with that of methionine. Addition of SMM to the medium at the concentration of $2.7 \cdot 10^{-5}$ M increased the incorporation of 5-methyl- ^3H -thymidine into DNA by about 20% and the incorporation of 2- ^{14}C -uridine into the total RNA of the cells by about 47%. The electrophoretic separation of RNA in polyacrylamide gels showed that SMM stimulated the incorporation of the label into 4 S, 5 S, 16 S and 23 S RNA with different intensity. The highest stimulation of the label incorporation has been observed in 16 S RNA.

М. Н. Блинов, И. С. Луганова, А. Д. Владимирова

Ленинградский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови

Вопрос об изменении активности сывороточной (РНК-азы) при заболеваниях неопластической природы уже в течение ряда лет является предметом многочисленных исследований [1—6]. Имеющиеся литературные данные достаточно разноречивы и не позволяют прийти к однозначному заключению о направленности изменений активности РНК-азы сыворотки крови при опухолевых заболеваниях. Одни исследователи не отмечали изменений РНК-азной активности в сыворотке крови больных с различной локализацией неоплазм [2, 3], другие наблюдали заметное увеличение активности этого фермента в сыворотке крови у онкологических больных [4], а также зависимость уровня РНК-азной активности от вида опухоли [7]. Неоднозначны ее литературные данные об активности РНК-азы в сыворотке крови больных лейкозами. Так, ряд исследователей [6, 8] сообщают о значительном увеличении (в несколько раз) РНК-азной активности сыворотки крови больных хроническим миелолейкозом, другие авторы [9] установили повышение активности этого энзима только у 1 из 9 больных лейкозами.

Все указанные данные базировались на измерении РНК-азной активности сыворотки крови с использованием в качестве субстрата реакции нативной РНК (главным образом дрожжевой). В последние годы появились сообщения о целесообразности применения для этой цели синтетических полирибонуклеотидов или их дуплексов (ПолиУ, полиЦ, полиУ—полиА). Подобная постановка опытов, по мнению предложивших ее авторов, позволяет получать более воспроизводимые результаты, что обусловлено гомогенностью синтетических субстратов. Кроме того, деградация нативной РНК может быть результатом действия не одного, а нескольких ферментов различной специфичности, что затрудняет интерпретацию получаемых данных. Результаты, полученные группой авторов [10, 11], обобщивших большой экспериментальный материал (385 больных с опухолями различной локализации и 168 здоровых людей), свидетельствуют о достаточно высокой информативности и диагностической ценности определения сывороточных нуклеаз при использовании в качестве субстрата полиУ, полиЦ и полиУ—полиА, поскольку при всех опухолевых заболеваниях удалось выявить статистически достоверное увеличение этого показателя.

Учитывая вышеизложенное, мы провели работу по изучению РНК-азной активности сыворотки крови больных с различными формами лейкозов — острым лейкозом (ОЛ), хроническим миелолейкозом (ХМЛ), хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ), а также миелофиброзом (МФ) с использованием в качестве субстратов реакции как нативную РНК, так и синтетические полирибонуклеотиды.

Методика

Сыворотки получали из крови здоровых лиц, а также больных с различными формами лейкоза и МФ и использовали их в опытах в этот же день. Все обследованные больные находились в развернутой фазе заболевания и не имели нарушений функции почек.

РНК-азную активность в сыворотке крови определяли спектрофотометрически тиопиновым методом [12], используя в качестве субстрата коммерческую дрожжевую РНК, предварительно освобожденную от низкополимерных примесей солевым осаждением и последующим троекратным и переосаждением 70% этанолом. Активность РНК-азы выражали в условных единицах снижения оптической плотности при 625 нм за 1 мин в расчете на 1 мл сыворотки.

Для определения нуклеазной активности использовали также полиУ и полиА фирмы «Рсаиал» и полиУ—полиА, полученную методом гибридизации односпиральных полинуклеотидов (полиУ и полиА) в двуспиральные [9].

Нуклеазную активность к синтетическим полирибонуклеотидам определяли описанным методом [9] с некоторыми модификациями. Состав проб представлен в табл. 1. После инкубации к пробам добавляли 2 н. HClO_4 , содержащую 20 мМ азотнокислого лантана (1 мл к пробам с полиУ и 2 мл к пробам с полиУ—полиА), и помещали их в ледяную баню на 15 мин. Осадок отделяли центрифугированием, надосадочную жидкость осторожно сливали и разводили в 2 раза 1 н. HClO_4 . Контрольные пробы были

Т а б л и ц а 1

Состав проб и условия определения нуклеазной активности полиУ и полиУ — полиА

Компоненты и условия опытов	Нуклеазная активность	
	полиУ	полиУ — полиА
Сыворотка крови, мл	0,01	0,1
Трис-НСI-буфер (0,2 М соответственно рН 7,0 и 7,5), мл	0,5	0,5
Вода, мл	0,3	0,3
Бычий сывороточный альбумин (5 мг/мл), мл	0,1	—
Полинуклеотиды (2,5 мг/мл), мл	0,1	0,1
Время инкубации, мин	15	10
Температура инкубации, °С	25	37

Т а б л и ц а 2

РНК-азная активность сыворотки крови при использовании в качестве субстрата нативной РНК

Сыворотка крови	n	Активность РНК-азы в условных единицах	P
Здоровые	12	$169 \pm 12,2$ (120—238)	—
Больные:			
ХМЛ	5	$444 \pm 47,1$ (320—544)	$<0,001$
ХЛЛ	9	$173 \pm 19,7$ (90—320)	$>0,5$
МФ	7	$166 \pm 21,9$ (80—242)	$>0,5$

Примечание. Здесь и в табл. 3 в скобках указаны пределы колебаний энзиматической активности.

аналогичны опытным, но HClO_4 вносили в них немедленно. Пробы фотометрировали при 260 нм против воды и находили разность экстинкции между опытными и контрольными пробам. За единицу активности фермента принимали прирост оптической плотности на одну оптическую единицу за 15 мин инкубации в расчете на 1 мл сыворотки.

Результаты и обсуждение

В табл. 2 представлены данные об определении РНК-азной активности сыворотки крови при использовании в качестве субстрата дрожжевой РНК.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что только при ХМЛ имеет место значительное (более чем в $2^{1/2}$ раза) повышение РНК-азной активности сыворотки крови. У всех больных этой группы активность фермента была выше статистически определяемой (с 99 % долей вероятности, т. е. $M \pm 3 \sigma$) верхней границы активности данного энзима в сыворотке крови здоровых доноров. При ХЛЛ и МФ РНК-азная активность сыворотки была близка к нормальным величинам, и только у 1 больного ХЛЛ она превышала границы нормы, определенной с 95 % вероятностью (т. е. $M \pm 2 \sigma$). Следовательно, повышение активности сывороточной РНК-азы в отношении нативной РНК имеет место только при ХМЛ.

Иные результаты были получены при изучении активности сывороточных нуклеаз с использованием синтетических полинуклеотидов (табл. 3).

Прежде всего обращает на себя внимание тот факт, что нуклеазная активность сыворотки крови в значительной мере зависит от субстрата реакции, и к полиУ она почти на порядок выше, чем к двуспиральному полинуклеотиду полиУ—полиА.

Исследования показали, что при гематологических заболеваниях не имеется четкой корреляции между нуклеазной активностью к нативной РНК и синтетическим полинуклеотидам. Так, нуклеазная активность по отношению к полиУ оказалась заметно и статистически значимо выше во всех группах больных, чем у здоровых лиц. ПолиУ—полиА-нуклеазная

активность сыворотки крови больных с различными формами лейкоза и МФ также была увеличена по сравнению с нормой, однако достоверное повышение регистрировалось только у больных ОЛ.

Таким образом, складывается впечатление, что определение нуклеазной активности с использованием в качестве субстрата полиУ является более специфическим тестом, позволяющим с большей долей вероятности судить о нарушении рибонуклеазной активности при лейкозах.

Т а б л и ц а 3

Нуклеазная активность сыворотки крови к синтетическим полинуклеотидам

Обследованная группа	Субстрат реакции					
	полиУ			полиУ — полиА		
	$M \pm m$	n	P	$M \pm m$	n	P
Здоровые	$51,3 \pm 3,6$ (30,2—65,2)	13	—	$7,8 \pm 0,65$ (3,5—11,4)	15	—
Больные:						
ОЛ	$78,6 \pm 12,5$ (45,8—143,8)	7	$<0,05$	$11,6 \pm 1,64$ (7,5—21,5)	7	$<0,05$
ХМЛ	$95,9 \pm 11,3$ (51,2—193,0)	13	$<0,001$	$8,7 \pm 0,87$ (3,6—15,3)	13	$>0,2$
ХЛЛ	$104,4 \pm 11,9$ (47,4—187,4)	16	$<0,001$	$9,5 \pm 0,97$ (5,1—20,1)	16	$>0,1$
МФ	$129,5 \pm 22,8$ (67,4—238,2)	9	$<0,01$	$13,9 \pm 3,7$ (4,5—38,6)	9	$>0,05$

Не менее важным является и вопрос о том, у какого числа обследованных больных имеет место изменение (повышение) активности сывороточной рибонуклеазы. Об изменении того или иного показателя при патологии с высокой степенью достоверности (95 %) можно судить, если он выходит за пределы нормальных значений, рассчитанных как $M_{\text{норма}} \pm 2 \sigma$. Мы проанализировали с этой точки зрения полученные результаты и определили, как часто в той или иной группе больных нуклеазная активность превышает нормальный предел $M \pm 2 \sigma$, т. е. 74 ед. для полиУ, 12,8 ед. для полиУ—полиА и 246,6 ед. для РНК (табл. 4).

Из табл. 4 видно, что более чем у половины больных лейкозами и МФ нуклеазная активность к полиУ достоверно повышена, тогда как при использовании полиУ—полиА ее процент был значительно ниже. Результаты классического определения РНК-азной активности в сыворотке крови, полученные измерением гидролиза нативной РНК, оказались информативными только у больных ХМЛ.

Повышение РНК-азной активности сыворотки к одному из субстратов не всегда сопровождалось аналогичными изменениями в отношении другого субстрата. Так, в ряде случаев у больных повышалась только полиУ-нуклеазная активность, тогда как полиУ—полиА-нуклеаза была нормальной. Реже наблюдался противоположный эффект. Поэтому можно считать, что повышение нуклеазной активности у данного больного имеет место, если оно отмечается хотя бы к одному из субстратов (независимо от того, изменилась ли активность фермента к другому субстрату). С учетом этой предпосылки процент больных с повышенной активностью нуклеаз возрастает до 57,1 при ОЛ, 76,9 при ХМЛ и 75 при ХЛЛ.

Таким образом, наши данные свидетельствуют о существовании определенной взаимосвязи между нуклеазной активностью сыворотки крови и заболеваниями крови неопластической природы. Использование синтетических полинуклеотидов (особенно полиУ) позволяет выявить повышение нуклеазной активности гораздо более четко, чем это регистрируется с помощью классического метода определения энзиматической деградации нативной РНК.

Трудно сказать, чем обусловлено повышение активности сывороточной РНК-азы при патологии системы крови. Поскольку известно, что источником РНК-азы могут быть белые клетки крови [13], можно предположить, что их повышенный распад при лейкозах приводит к изменению нуклеазной активности сыворотки крови. Возможно, что как и у больных раком, увеличение нуклеазной активности при лейкозах происходит за счет появления в сыворотке крови РНК-аз, отсутствующих в норме [14].

Повышение активности РНК-азы может играть определенную защитную роль. Так, имеются данные, что сывороточные РНК-азы разрушают вирусные РНК и тем самым подавляют инфекционность и размножение он-

Т а б л и ц а 4

Количество больных с повышенной активностью сывороточных нуклеаз, установленной при использовании различных субстратов

Диагноз	Повышение нуклеазной активности к различным субстратам		
	РНК	полиУ	полиУ — полиА
ОЛ	—	3 из 7 (42,8%)	2 из 7 (28,5%)
ХМЛ	5 из 5 (100%)	8 из 13 (61,5%)	2 из 13 (15,4%)
ХЛЛ	1 из 9 (11,1%)	11 из 16 (68,7%)	2 из 16 (12,5%)
МФ	0 из 7	7 из 9 (77,8%)	3 из 9 (33,3%)

корнавирусов [15, 16]. Показано также, что РНК-азы сыворотки крови больных опухолями (в отличие от РНК-аз сыворотки здоровых людей) могут взаимодействовать с обратными транскриптазами онкохелеродных РНК-содержащих вирусов с образованием неактивного комплекса и тем самым контролировать их способность к интеграции в геном клетки-хозяина [17]. Вопрос о том, какая из перечисленных причин является основной в повышении РНК-азной активности при заболеваниях крови опухолевой природы, остается открытым, и для его решения необходимы дальнейшие исследования.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Shanot B. C.* Нуклеазы. М., 1968, с. 69.
2. *Metals P., Mandel P.* — Bull. Soc. Chim. Biol., 1955, v. 37, p. 999.
3. *Houck J. C., Berman L. B.* — J. appl. Physiol., 1958, v. 12, p. 473.
4. *Magliarise J. F.* — Proc. Am. Ass. Cancer Res., 1958, v. 2, p. 327.
5. *Zytka J., Cantero A.* — Canad. Med. Ass. J., 1962, v. 86, p. 482.
6. *Шляховенко В. А.* — В кн.: Механизмы лейкозогенеза. Киев, 1975, с. 38.
7. *Chretien P. B., Matthews W., Twomey P. L.* — Cancer (Philad.), 197, v. 31, p. 175.
8. *Aleksandrowicz J., Spierer L.* — Sang, 1955, v. 26, p. 212.
9. *Lovy A. L., Rottino A.* — Clin. Chem., 1960, v. 6, p. 43.
10. *Drake W. P., Schmukler M., Pendegraft W. et al.* — J. nat. Cancer Inst., 1975, v. 55, p. 1055.
11. *Maor D., Mardiney M. R.* — CRC Crit. Rev. Lab. Sci., 1979, v. 10, p. 89.
12. *Shapira R.* — Analyt. Biochem., 1962, v. 3, p. 308.
13. *Rabinovitch M., Liverman B., Fausto N.* — J. Lab. clin. Med., 1959, v. 53, p. 563.
14. *Akagi K., Murai K., Hirao N. et al.* — Biochim. biophys. Acta, 1976, v. 442, p. 368.
15. *Herriott R. M., Connolly J. H., Gupta S.* — Nature, 1961, v. 189, p. 817.
16. *Welsh R. M., Cooper N. R., Jensen F. C. et al.* — Ibid., 1975, v. 257, p. 612.
17. *Bandyopadhyay A. K., Levy C. C., Mardiney M. R.* — J. biol. Chem., 1977, v. 252, p. 7783.

Поступила 18/III 1980 г.

NUCLEASE ACTIVITY OF BLOOD SERUM FROM HEALTHY PERSONS AND FROM PATIENTS WITH SOME HEMATOLOGIC IMPAIRMENTS

M. N. Blinov, I. S. Lukanova, A. D. Vladimirova

Institute of Hematology and Blood Transfusion, Leningrad

Nuclease activity was studied using as a substrate native RNA as well as synthetic polyribonucleotides polyU and polyU-polyA in blood serum of healthy persons and of patients with leukoses and myelofibrosis. In the hematologic impairments no distinct correlation was observed between the nuclease activity with either native RNA

or the polyribonucleotides as substrates. The RNAse activity was markedly increased only under conditions of chronic myeloleukosis, whereas a significant increase in the nuclease activity using polyU was found in 42.8% of the patients with acute leukosis, in 61.5% of the patients with chronic myeloleukosis, in 68.7% of the patients with chronic lympholeukosis and in 77.8% of the patients with myelofibrosis; the elevation in the nuclease activity with polyU-polyA as a substrate observed in 28.5%, 15.4%, 12.5% and 33.3% of the patients, respectively.

УДК 616-008.938.57-07:616.155.1-008.931:577.152.2]-074

Л. А. Александрова, А. М. Шапошников

АКТИВНОСТЬ ПУРИНФОСФОΡΙБОЗИЛТРАНСФЕРАЗ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ СИНДРОМЕ ЛЕШ — НИХАНА

Отдел биохимии Центральной научно-исследовательской лаборатории I Ленинградского медицинского института им. акад. И. П. Павлова

Классический вариант синдрома Леш — Нихана (СЛН) характеризуется различной степенью умственной отсталости, агрессивным или аутоагрессивным (деструктивным) поведением, хореоатетозными гиперкинезами, гиперурикемией и отложением мочевой кислоты (МК) в тканях [1]. Деструктивное поведение проявляется в откусывании губ, вырывании ногтей или откусывании фаланг пальцев рук, а также в повреждении других частей своего тела. Агрессивность больных направлена на самих себя, а также на окружающих людей и предметы. Заболевание наследуется рецессивным путем, сцеплено с полом, т. е. молекулярный генетический дефект находится в X-хромосоме [2], поэтому большинство больных мужского пола. Установлено, что при классической форме СЛН полностью отсутствует или резко снижена активность гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы (ГГФРТ; КФ 2.4.2.8)—фермента, необходимого для нормального синтеза пурипнуклеотидов, что и ведет к увеличению уровня МК в организме больного [3]. Характерно, что отсутствие активности ГГФРТ сопровождается некоторым увеличением активности аденинфосфорибозилтрансферазы (АФРТ; КФ 2.4.2.7) [4]. Эти пурипфосфорибозилтрансферазы катализируют реакции реутилизации пурипновых оснований (гуанина, гипоксантина и аденина) с образованием соответствующих мононуклеотидов (ГМФ, ИМФ и АМФ). Гетерогенность мутаций структурного гена ГГФРТ при СЛН показана при изучении синтеза и свойств этого фермента и влияния различных мутантных вариантов фермента на регуляцию обмена пурипнов [5]. Генетическая гетерогенность СЛН проявляется не только синтезом различных мутантных вариантов ГГФРТ, но и нарушением активности других ферментов: АФРТ [6, 7], синтетазы и амидотрансферазы, фосфорибозилпирофосфата (КФ 2.7.6.1; КФ 2.4.2.14) [8, 9]. Наличие молекулярных дефектов при СЛН с однотипной клинической картиной требует точной дифференциальной диагностики молекулярного дефекта у каждого больного, так как от этого зависит выработка конкретных терапевтических мероприятий. Гиперурикемия обнаружена также при различных патологических состояниях наследственной природы [10].

В задачу настоящей работы входило выявление первичного ферментативного дефекта и степени его влияния на фенотипическое проявление у больных с СЛН, а также определение активности пурипфосфорибозилтрансфераз у больных с гиперурикемией разной этиологии. Следует отметить, что такое исследование у нас в стране проведено впервые.

М е т о д и к а

Выявление больных с СЛН проводили среди контингента умственно отсталых людей мужского пола с наличием основных симптомов болезни. О наличии нарушения обмена пурипнов судили по содержанию МК в крови и моче. Учитывая специфическую картину нарушения поведения и психоневрологических расстройств при СЛН, контрольную группу составили здоровые дети и взрослые мужского пола (32 человека в возрасте от 1 $\frac{1}{2}$ до 15 лет и 45 человек в возрасте от 18 до 50 лет соответственно), а также

30 больных с умеренной отсталостью (фенилкетонурия у 9, недифференцированные олигофрении у 21), а также 53 больных с параноидной формой психоза, 22 больных эпилепсией, 30 больных хроническим алкоголизмом, 21 больной ревматизмом и 48 больных с различными формами психоза. Определение МК в сыворотке крови и моче проводили уриказным спектрофотометрическим методом [11]. Активность ГГФРТ и АФРТ определяли в гемолизатах эритроцитов. Для предотвращения свертывания крови использовали 15% раствор версена. Гемолизат получали двукратным замораживанием и оттаиванием предварительно отмытых 0,154 М раствором NaCl эритроцитов. Для проведения реакции приготавливали реакционную смесь следующего состава: 0,30 мкмоль $8\text{-}^{14}\text{C}$ -гипоксантина или 0,85 мкмоль ^{14}C -8-аденина; 0,25 фосфорибозилпирофосфата (ФРПФ) фирмы «Calbiochem» или эквивалентное количество ФРПФ, синтезированного по методу В. Н. Филипповой [12]; 50 мМ трис-HCl-буфер pH 7,4, содержащий 0,1 MgCl_2 и 250—400 мкг белка гемолизата эритроцитов. Общий объем пробы 0,4 мл. Инкубацию проводили при 37° С в течение 15 мин. Реакцию останавливали внесением 0,1 мл 50% ТХУ. Реакционную депротеинизированную смесь разделяли с помощью горизонтального высоковольтного электрофореза на бумаге натман 3ММ в 0,02 М цитратном буфере pH 6,0 при напряжении 5 кВ в течение 20 мин. Про-

Т а б л и ц а 1

Клинико-биохимические показатели больных с синдромом Леш — Нихана

Больной	Возраст, годы	Клинический симптом						Содержание МК		Активность ферментов	
		умственная отсталость	аутоагрессия	агрессия	хореоатетоз	гиперкинез		в сыворотке крови, %	в моче, мг/сут	ГГФРТ	АФРТ
С.	2 $\frac{1}{2}$	И	+	—	+	—		9,1	1138	0	—
Ф. С.	12	ИМ	+	+	—	—		7,5	1125	120	5
К.	14	Д	+	—	—	—		8,5	750	118	235
Ф. Д.	5	ИМ	+	+	+	+		9,0	500	122	—
Ч.	4	Д	—	+	+	+		5,6	180	63	26
И.	6	И	+	—	—	—		3,8	24*	14	30
Е.	8	И	+	—	—	—		0,8	14*	56	21
А.	11	И	+	+	+	+		4,8	63*	110	32
З.	5	И	+	+	+	+		7,7	93*	129	20
Здоровые дети								3,2±0,33 (32)	645±18 (32)	121±3,2 (28)	25±3 (18)
Олигофрены	1 $\frac{1}{2}$ — 15							3,4±0,30 (9)	27,2±3,2* (54)	119±5,3 (6)	24±3,0 (6)

* Содержание МК в моче выражено в миллиграмм-процентах. В скобках указано число больных.

П р и м е ч а н и е. И — идиотия; ИМ — имбецильность; Д — дебильность.

дукт реакции ^{14}C -ИМФ или ^{14}C -АМФ выявляли в УФ-свете. Пятна, соответствующие указанным нуклеотидам, вырезали и считали радиоактивность на сцинтилляционном счетчике ИЗОКАП-300 (СИЛА). Контролем служила проба, содержащая ФРПФ. Активность ФРПФ-трансфераз выражали в наномолях ^{14}C -ИМФ или ^{14}C -АМФ, образованных за 1 ч в расчете на 1 мг белка гемолизата эритроцитов. Содержание белка определяли по методу Лоури [13]. Статистическую обработку данных проводили по общепринятому методу с учетом критерия Стьюдента [14]. Для изучения влияния NaF на активность ГГФРТ в реакционную смесь добавляли NaF, растворенный в 50 мМ трис-HCl-буфере pH 7,4 в конечных концентрациях 5 и 20 мМ. Стабильность фермента изучали, измеряя активность ГГФРТ в гемолизатах, выдержанных при 4 °С в течение 24, 48 и 72 ч. Исследование температурной чувствительности ГГФРТ проводили путем прогревания гемолизата при 60 °С в течение 5, 10 и 15 мин и измеряя активность фермента в обычных условиях.

Результаты и обсуждение

В результате проведенного обследования было выявлено 9 мальчиков с клинической картиной, характерной для СЛН (табл. 1).

Умственная отсталость в степени идиотии установлена у 5 больных, имбецильность — у 2 и дебильность — у 2 больных. У всех обследованных наблюдалось аутоагрессивное и (или) агрессивное поведение, имелись де-

фекты верхней и (или) нижней губы, языка, у 3 больных отсутствовали ногтевые фаланги I и II пальцев рук, а у 4 — ногти на руках из-за постоянного грызения и кусания. У 4 больных аутоагрессивное поведение сочеталось с агрессивным. Все больные имели дисплазию зубов и выраженную дизартрию. Поражение экстрапирамидной системы мозга представлено у большинства больных хореоатетозными гиперкинезами, парезами верхних или нижних конечностей. У 1 больного имелись деформации коленных, лучезапястных и голеностопных суставов.

Из табл. 1 видно, что у 7 больных имелась гиперурикемия, у 1 — гипоурикемия и у 1 содержание МК в сыворотке крови практически не отличалось от уровня в крови здоровых детей. Экскреция МК с мочой у 5 больных была увеличена, у 1 — резко снижена, у остальных не отличалась от показателей у здоровых детей.

Как видно из табл. 2, гиперурикемия у больных с недифференцированной олигофренией, шизофренией, эпилепсией, хроническим алкоголизмом и псориазом имела в 72, 13, 34, 63, 57 и 50 % наблюдений. При СЛН гиперурикемия обнаружена у 55 % больных. Эти данные показывают, что показатель уровня МК в крови является необходимым, так как свидетельствует о нарушении обмена пуринов, но недостаточно информативным для диагностики СЛН. При определении активности ГГФРТ в гемолизатах эритроцитов больных с СЛН установлено, что активность фермента у 1 больного отсутствовала, у 2 была снижена на 50 %, у 1 — на 85 %, а у 5 была в пределах нормы. Активность АФРТ у 2 больных была увеличена на 20 %, у 1 — на 84 %, у 2 снижена на 20 %, у 1 — на 80 % и у 1 не изменена.

При обследовании родителей больных с СЛН существенных изменений не найдено (табл. 3), за исключением отца больного и матери больного Ч., у которых активность АФРТ была увеличена на 36 % по сравнению с контролем. Содержание МК в сыворотке крови у матери больного Ф. Д. и матери больного З. оказалось выше, чем у здоровых людей, на 37 и 17 % соответственно.

Исследование влияния NaF на активность ГГФРТ показало, что у здоровых людей это соединение ингибирует активность фермента при концентрациях 5 и 20 мМ на 6 и 30 % соответственно. Как видно из табл. 4, у больных Ч. и З. активность фермента снижалась при указанных концентрациях NaF на 21, 49, 27 и 70 % соответственно. У родителей больного Ч. и матери больного З. NaF ингибировал активность ГГФРТ так же, как и у здоровых людей (табл. 4).

Т а б л и ц а 2

Содержание МК в сыворотке крови, частота гиперурикемии (ГУ) и активность ГГФРТ и АФРТ эритроцитов (в нмоль на 1 мг белка за 1 ч) при патологических состояниях

Диагноз	Содержание МК, мг%	Частота ГУ, %	Активность, нмоль на 1 мг белка за 1 ч	
			ГГФРТ	АФРТ
Недифференцированная олигофрения: взрослые	5,0±0,30 (12)	72	136±8,0 (10)	23±3,0 (10)
дети	3,4±0,33 (9)	0	119±5,3 (6)	24±3,0 (6)
Шизофрения, параноидная форма	4,7±0,2 (53)	13	126±3,8 (58)	24±0,4 (58)
Эпилепсия	5,9±0,39 (23)	34	142±5,6 (25)	23±1,55 (25)
Хронический алкоголизм	8,2±0,18 (30)	63	121±10,0 (5)	24±1,6 (5)
Псориаз	6,8±0,20 (48)	50	118±2,5 (48)	—
Ревматизм	7,7±0,48	57	—	—
Здоровые взрослые в возрасте 18—50 лет	4,5±0,2	0	121±3,6 (25)	25±2,5 (28)

П р и м е ч а н и е. В скобках указано число больных.

Исследование стабильности ГГФРТ (см. рисунок, А) показало, что при хранении гемолизата при 4 °С активность фермента эритроцитов здоровых людей снижалась и через 72 ч составляла всего 28% от исходной. В то же время активность фермента эритроцитов больных З. и Ч. пропала полностью соответственно через 48 и 72 ч. Изучение температурной чувствительности ГГФРТ эритроцитов здоровых людей и больных с СЛН показало (см. рисунок, Б), что у больного Ч. фермент отличался большей, а у больного З. меньшей термостабильностью по сравнению с ГГФРТ здоровых людей.

Т а б л и ц а 3

Содержание МК в сыворотке крови и моче и активность ГГФРТ и АФРТ эритроцитов у больных с СЛН и их родителей

Семья	Возраст, годы	Содержание МК		Активность, нмоль на 1 мг белка за 1 ч	
		в крови, мг%	в моче, мг/сут	ГГФРТ	АФРТ
Больной Ч.					
Его родители:	4	5,6	180	63	26
мать	32	5,4		106	32
отец	32	6,4		120	28
Больной К.	14	8,5	750	118	235
Его родители:					
мать	48	5,0	476	—	—
отец	47	5,8	525	—	—
Больной Ф. Д.	5	9,0	500	122	—
Его родители:					
мать	35	6,6	517	—	—
Больной З.	5	7,7	93	129	20
Его родители:					
мать	37	5,6		112	25
Больной И.	6	3,8	24	14	30
Его родители:					
отец	32	4,5		98	34
Здоровые люди:					
мужчины	25—50	5,7±0,4 (23)	767±137 (12)	121±3,6 (25)	25±2,5 (28)
женщины		4,8±0,4 (19)	725±74 (22)		

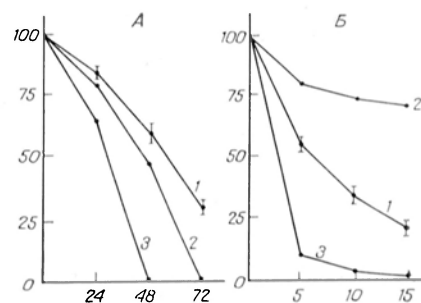
Таким образом, проведенные исследования показали, что у всех больных с СЛН имеются различные нарушения активности ФРПФ-трансфераз, что свидетельствует о неоднородности генетического дефекта. Наряду с полным отсутствием активности ГГФРТ (больной С.) наблюдались частичная недостаточность (больные И., Е. и Ч.) и нормальная активность этого фермента (больные З., Ф. С., Ф. Д. и К.). Каждая из форм фермента, по-видимому, связана с синтезом различных по структуре, каталитическим и физико-химическим свойствам молекул фермента. Об этом свидетельствует обнаружение форм фермента с нормальной активностью, но с измененными ингибиторными свойствами и повышенной термостабильностью (больной З.), а также вариант ГГФРТ с пониженной активностью, повышенной термоустойчивостью и снижением устойчивости при хранении (больной Ч.). В настоящее время известно около 20 форм ГГФРТ, различающихся между собой по кинетическим, электрофоретическим, ингибиторным свойствам, а также по термостабильности и оптимуму pH [15—18]. Столь большое разнообразие дефектов ГГФРТ создает необходимость изучения ряда физико-химических свойств фермента для идентификации варианта фермента в каждом отдельном случае. Выявление АФРТ с высокой активностью у больного К. свидетельствует о наличии у него редкого варианта синдрома. Нарушение каталити-

ческих свойств этого фермента может быть вызвано как изменением структуры каталитического центра, так и ускорением синтеза этого фермента. Установлено, что при СЛН, кроме нарушений обмена пуринов, изменен метаболизм биогенных аминов (БА) [19]. Наличие изменений активности ГГФРТ

Т а б л и ц а 4

Ингибирование активности ГГФРТ эритроцитов больных с СЛН, их родителей и у здоровых людей

Семья	Активность ГГФРТ, нмоль на 1 мг белка за 1 ч		
	без NaF	5 мм NaF	20 мм NaF
Больной Ч.	63	50	32
Его родители:			
мать	106	100	85
отец	120	110	100
Больной З.	129	94	39
Его родители:			
мать	112	108	95
Здоровые люди (n=5)	123±4,5	116±4,2	86±5,0



Стабильность (А) и термическая инактивация (Б) ГГФРТ эритроцитов больных с СЛН и здоровых людей.

По оси абсцисс — время (А — в ч; Б — в мин); по оси ординат — активность ГГФРТ (в % от исходной). 1 — ГГФРТ здоровых людей; 2 — ГГФРТ больного Ч.; 3 — ГГФРТ больного З.

при эпилепсии также связано с нарушением метаболизма БА [20]. Является ли нарушение метаболизма БА первичным, а изменение активности ГГФРТ — вторичным, или наоборот, покажут дальнейшие исследования. Вариабельность первичных энзиматических дефектов при СЛН свидетельствует о значительной гетерогенности синдрома и обуславливает индивидуальные особенности обмена МК и разнообразие клинических проявлений.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Lesh M., Nyhan W. L. — Am. J. Med., 1964, v. 36, p. 561.
2. Nyhan W. L., Pesck J., Sweetman H. et al. — Pediat. Res., 1967, v. 1, p. 5.
3. Seegmiller J. E. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1967, v. 57, p. 1737.
4. Pubin C. S., Balis M. E., Piomelli S. et al. — J. Lab. clin. Med., 1969, v. 74, p. 732.
5. Kelley W. N. — Fed. Proc., 1968, v. 27, p. 1047.
6. Kelley W. N., Levy R. J., Rosenbloom F. M. et al. — J. clin. Invest., 1968, v. 47, p. 2281.
7. Fox J. H., Meade J. C., Kelley W. N. — Am. J. Med., 1973, v. 55, p. 614.
8. Becker M. A., Moyer L. et al. — In: Purine Metabolism in Man. New York, 1974, v. 1, p. 307.
9. Maicolongo R. et al. — Ital. J. Biochem., 1976, v. 25, p. 272.
10. Newcombe D. S. — Inherited Biochemical Disorders and Uric Acid Metabolism. Baltimore, 1975.
11. Kageyama N. — Clin. chim. Acta, 1971, v. 31, p. 421.
12. Филиппова В. Н., Филиановская Л. Н., Блинов М. Н. — Вopr. мед. химии, 1975, № 6, с. 663.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al. — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265.
14. Плохинский Н. А. — Биометрия. М., 1970.
15. Emmerson B. T., Thompson L. — Quart. J. Med., 1973, v. 42, p. 423.
16. Bakay B., Nyhan W. L. — Biochem. Genet., 1972, v. 6, p. 139.
17. Sweetman L., Hoch M. A., Bakay B. et al. — J. Pediat., 1978, v. 92, p. 385.
18. Шапошников А. М., Александрова Л. А. — Ж. невропатол. и психиатр., 1979, № 10, с. 1379.
19. Breakefield X. — Science, 1976, v. 192, p. 1018.
20. Шапошников А. М., Тинтерис Л. В., Добросоцкая Л. В. и др. — В кн.: Проблемы принудительного лечения психических больных. М., 1978, с. 163.

Поступила 2/IV 1980 г.

ACTIVITY OF ERYTHROCYTE PURINE PHOSPHORIBOSYL TRANSFERASES IN LESH-NYHAN SYNDROME

L. A. Alexandrova, A. M. Shaposhnikov

Department of Biochemistry, Central Research Laboratory, I. P. Pavlov Medical School,
Leningrad

The Lesh-Nyhan syndrome was detected in nine boys among a contingent of mentally retarded patients. Various impairments of purine bases reutilization were observed and partial deficiency in activity of guanine hypoxanthine phosphoribosyl transferase, hyperactivity of adenine phosphoribosyl transferase as well as normal activity but altered stability and sensitivity to inhibitors of guanine hypoxanthine phosphoribosyl transferase. These data suggest distinct heterogeneity in the Lesh-Nyhan patients.

УДК 576.851.48.098.31:577.152.314

Н. Г. Лопатина, И. И. Никольская, Е. Д. Свердлов, С. С. Дебов

ИЗУЧЕНИЕ САЙТ-СПЕЦИФИЧНОСТИ ДНК-МЕТИЛАЗ АДЕНИНА ИЗ КЛЕТОК E. COLI

Лаборатория энзимологии АМН СССР, Москва

Ранее было показано присутствие в клетках E. coli СК 5 индивидуальных ДНК-метилаз, 2 из которых метилируют цитозин с образованием 5'-метилцитозина (5-МЦ) и 3 — аденин с образованием 6'-метиламинопурина (6-МАП) [1]. ДНК-метилазы аденина отличаются по сродству к катиониту и при хроматографии на фосфоцеллюлозе Р-11 (ФЦ-Р11) элюируются различными концентрациями NaCl—0,16, 0,23 и 0,7 М. В соответствии с этим исследуемые ферменты были обозначены как ДМ-А₁₆, ДМ-А₂₃ и ДМ-А₇₀. Однако полученные результаты не давали достаточной информации для того, чтобы решить вопрос, являются ли эти ферментные фракции изоферментами или это ферменты, отличающиеся по специфичности к метилируемой последовательности.

Для решения поставленной задачи в настоящем исследовании использовали два метода: метод дополнительного метилирования, с помощью которого были получены косвенные данные в пользу того, что в изученном объекте присутствуют аденинспецифические метилазы, отличающиеся по сайт-специфичности, а также метод ближайших соседей, в результате применения которого на примере ферментов ДМ-А₂₃ и ДМ-А₇₀ были получены прямые доказательства этого положения.

Методика

Донором метильных групп служил ³H-S-аденозил-L-метионин (³H-SAM) фирмы «Amersham» (Англия) с удельной радиоактивностью 7,9 Ки/ммоль. Дезоксинуклеозидтрифосфаты 5' (α-Р³²) — препараты фирмы «Amersham».

ДНК тимуса — коммерческий препарат фирмы «Calbiochem» (США). Ферментные препараты — бактериальная щелочная фосфатаза, фосфодиэстеразы селезенки и змеиного яда, ДНК-аза I и ДНК-аза II — препараты фирмы «Worthington» (США). Фосфоцеллюлоза Р-11 (ФЦ-Р11) — коммерческий препарат фирмы «Whatman». Тонкослойную хроматографию вели на пластинках с ДЭАЭ-целлюлозой фирмы «Reanal» (Венгрия). Для автордиографии использовали пленку РТ-1 отечественного производства. Радиоактивность просчитывали на фильтрах GF/C фирмы «Whatman». Культуру клеток E. coli СК выращивали на синтетической среде М-9 [2] до стационарной фазы роста. Получение индивидуальных фракций фермента с помощью хроматографии на ФЦ-Р11 проводили по методике, описанной ранее [1]. Метилирование акцепторной ДНК in vitro проводили, как описано ранее [1]. Для удаления концевых фосфатных групп 0,2 мг ДНК инкубировали с 2,5 ед. активности щелочной фосфатазы. Ограниченный гидролиз-«никкирование» ДНК проводили с помощью инкубации субстрата с ДНК-азой II из расчета 2 ед. активности фермента на 0,5 мг ДНК. ДНК-азу II использовали для получения олигонуклеотидов с 3'-концевыми фосфатными группами, при этом 0,5 мг ДНК инкубировали с 1,5 ед. фермента.

«Никк»-трансляцию ДНК проводили в присутствии 5 ед. активности ДНК-полимеразы I и 1,5 мкКи одного из четырех (α-Р³²) и трех немеченых дезоксинуклеозидтрифосфатов. При хроматографии 3'-дезоксинуклеозидмонофосфатов использовали

пластины с FND-целлюлозой. Растворитель для первого направления изомасляная кислота — аммиак — вода (66 : 1 : 33), для второго направления HCl — пропанол — вода (17,6 : 68 : 4,4).

Результаты и обсуждение

Как указывалось выше, косвенные данные в пользу того, что в исследуемом объекте присутствуют аденинспецифические метилазы, отличающиеся по сайт-специфичности, были получены с помощью теста дополнитель-

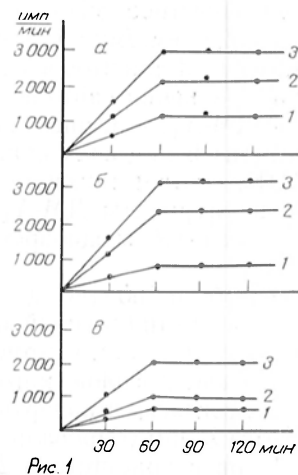


Рис. 1. Сравнение сайт-специфичности ДНК-метилаз аденина *E. coli* СК.

По оси абсцисс — время инкубации в присутствии ^3H -SAM (в мин); по оси ординат — радиоактивность. *а*: 1 — метилирование ДНК ДМ-А₁₆, 2 — ДНК ДМ-А₂₃, 3 — совместное действие ферментов; *б*: 1 — метилирование ДНК ДМ-А₂₃, 2 — ДНК ДМ-А₇₀, 3 — совместное действие ферментов; *в*: 1 — метилирование ДНК ДМ-А₁₆, 2 — ДНК ДМ-А₇₀, 3 — совместное действие ферментов.

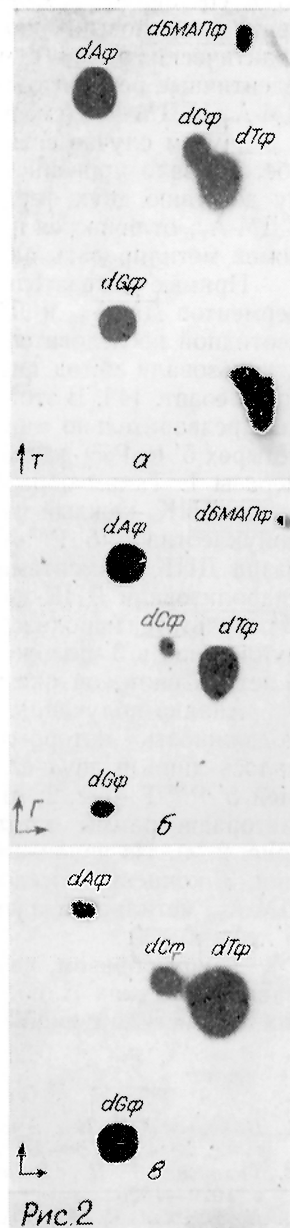


Рис. 2. Авторадиограммы 3'-P³²-МНД, полученных при гидролизе P³²-ДНК фага λ , содержащих 6-МАП.

а — авторадиограмма 3'-P³²-МНД, полученных после фосфодиэстеразного гидролиза ДНК-P³²-Т, метилированной ДМ-А₂₃; *б* — то же для ДНК-P³²-Г, метилированной ДМ-А₇₀; *в* — то же для неметилированной ДНК-P³²-Г. P³²-ДНК фага λ подвергали исчерпывающему гидролизу фосфодиэстеразой селенки и полученные 3'-P³²-МНД разделяли с помощью тонкослойной хроматографии на пластинах с FND-целлюлозой. Растворитель в I направлении изомасляная кислота — NH₄OH — H₂O (66 : 1 : 33) во II направлении HCl — пропанол — H₂O (17,6 : 68 : 14,4) [4]. Пластины авторадиографировали в течение 6—8 ч. Величины R_f для стандартных 3'-МНД в используемых растворителях определяли в модельных экспериментах.

ного метилирования, модифицированного ранее Никольской [3]. В этой серии экспериментов с помощью теста дополнительного метилирования сравнивали специфичность к метилируемой последовательности ДМ-А₁₆ с ДМ-А₂₃, ДМ-А₂₃ с ДМ-А₇₀ и ДМ-А₁₆ с ДМ-А₇₀. Согласно предложенной схеме эксперимента по дополнительному метилированию, опытная

проба содержала акценторную ДНК, ^3H -SAM и два фермента, специфичность которых нужно было сравнить. В двух контрольных пробах акценторная ДНК инкубировалась с каждым из ферментов в отдельности. В том случае, если ферменты узнают разные последовательности в молекуле ДНК, их совместное действие будет равно сумме действий каждого из ферментов в отдельности. Результаты этой серии экспериментов представлены на рис. 1, а—в. Как видно из рис. 1, а, при метилировании ДНК тимуса ферментом ДМ-А₁₆ за 1 ч реакция выходит на плато и радиоактивность пробы достигает 1100 имп/мин (кривая 1), а при использовании ДМ-А₂₃ радиоактивность ДНК составляет 2215 имп/мин (кривая 2). Совместное действие ферментов приводит к повышению радиоактивности до 3250 имп/мин (кривая 3), что практически равно сумме действий каждого из ферментов в отдельности. Идентичные результаты были получены при сравнении сайт-специфичности ДМ-А₂₃ и ДМ-А₇₀ (см. рис. 1, б) и ДМ-А₇₀ и ДМ-А₁₆ (см. рис. 1, в). И в том и в другом случае совместное действие метилаз в пределах ошибки опыта обеспечивало уровень радиоактивности ДНК, соответствующий суммарному действию двух ферментов. Следовательно, ферменты ДМ-А₁₆, ДМ-А₂₃ и ДМ-А₇₀ отличаются по сайт-специфичности и способны одновременно и без помех метилировать акценторную ДНК.

Прямые доказательства этого положения были получены на примере ферментов ДМ-А₂₃ и ДМ-А₇₀ при исследовании метилируемой ими динуклеотидной последовательности в составе сайта узнавания. С этой целью мы использовали метод анализа ближайших соседей, предложенный Корнбергом и соавт. [4]. В этой серии экспериментов, согласно стандартной методике, предварительно «никированную» ДНК фага λ инкубировали с одним из четырех 5' (α - P^{32})-дезоксинуклеозидтрифосфатов в присутствии ДНК-полимеразы I. Таким образом, нами было получено и проанализировано 4 образца ДНК, каждый из которых был мечен по одному из 5'- P^{32} -дезоксимонуклеотидов (5'- P^{32} -МНД). Затем проводили метилирование каждого образца ДНК ферментами ДМ-А₂₃ и ДМ-А₇₀. Далее метилированную ДНК гидролизовали ДНК-азой II и фосфодиэстеразой селезенки до 3'- P^{32} -МНД. В результате гидролиза меченый фосфат переносился из 5'-положения одного нуклеотида в 3'-положение соседнего. В том случае, если этим соседом был 6-метиладенин, он оказывался меченым по P^{32} с 3'-конца.

Анализ полученных 3'- P^{32} -МНД показал, что появление пятого пятна, подвижность которого соответствовала подвижности 3'- P^{32} -6-МАП, отмечалось лишь в двух случаях: при метилировании ДМ-А₂₃ ДНК, содержащей 5'- P^{32} -Т (рис. 2, а), и ДМ-А₇₀ ДНК, содержащей 5'- P^{32} -Г (рис. 2, б). Авторадиограммы остальных опытных проб не отличались от контроля (рис. 2, в). Из изложенного следует, что метилаза ДМ-А₂₃ метилирует аденин, 3'-концевым соседом которого является тимин-5'...А—Т...3', а фермент ДМ-А₇₀ метилирует аденин, 3'-концевым соседом которого является гуанин-5'...А—Г...3'.

Таким образом, нами были получены прямые доказательства существования в клетках *E. coli* СК метилаз аденина, различающихся по специфичности к метилируемой последовательности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Никольская И. И., Александрова С. С., Лопатина Н. Г. и др. — Биохимия, 1977 т. 42, № 4, с. 598—608.
2. Тихоненко Т. И., Винецкий Ю. П., Земцова Э. В. — Микробиология, 1961, № 6, с. 1020—1025.
3. Никольская И. И., Тедиашивили М. И., Васильева М. Б. и др. — Вopr. вирусол., 1978, № 6, с. 724—731.
4. Kaiser J. J., Kornberg A. D. — J. biol. Chem., 1961, v. 236, p. 864—875.
5. Raetting R., Kersten H., Weissenbach J. et al. — Nucl. Acid. Res., 1977, v. 4, p. 1769—1782.

Поступила 7/V 1980 г.

пластины с FND-целлюлозой. Растворитель для первого направления изомасляная кислота — аммиак — вода (66 : 1 : 33), для второго направления HCl — пропанол — вода (17,6 : 68 : 4,4).

Результаты и обсуждение

Как указывалось выше, косвенные данные в пользу того, что в исследуемом объекте присутствуют аденинспецифические метилазы, отличающиеся по сайт-специфичности, были получены с помощью теста дополнитель-

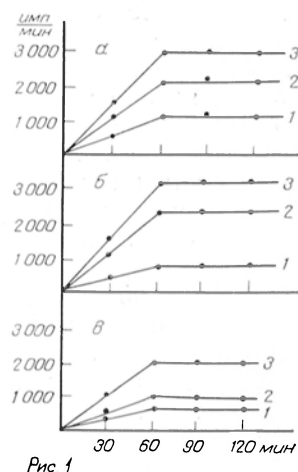


Рис. 1

Рис. 1. Сравнение сайт-специфичности ДНК-метилаз аденина *E. coli* СК.

По оси абсцисс — время инкубации в присутствии ^3H -SAM (в мин); по оси ординат — радиоактивность. а: 1 — метилирование ДНК ДМ-А₁₆, 2 — ДНК ДМ-А₂₃, 3 — совместное действие ферментов; б: 1 — метилирование ДНК ДМ-А₂₃, 2 — ДНК ДМ-А₇₀, 3 — совместное действие ферментов; в: 1 — метилирование ДНК ДМ-А₁₆, 2 — ДНК ДМ-А₇₀, 3 — совместное действие ферментов.

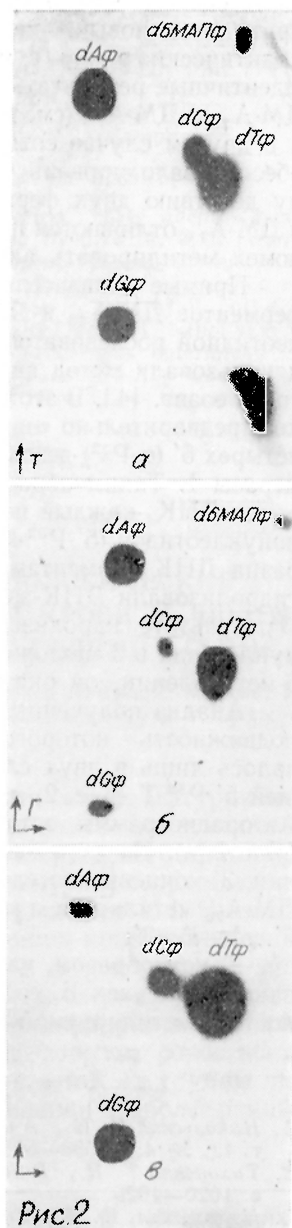


Рис. 2

Рис. 2. Авторадиограммы 3'-P³²-МНД, полученных при гидролизе P³²-ДНК фага λ, содержащих 6-МАП.

а — авторадиограмма 3'-P³²-МНД, полученных после фосфодиэстеразного гидролиза ДНК-P³²-Т, метилированной ДМ-А₂₃; б — то же для ДНК-P³²-Г, метилированной ДМ-А₇₀; в — то же для неметилированной ДНК-P³²-Г. P³²-ДНК фага λ подвергали исчерпывающему гидролизу фосфодиэстеразой селененки и полученные 3'-P³²-МНД разделяли с помощью тонкослойной хроматографии на пластинах с FND-целлюлозой. Растворитель в I направлении изомасляная кислота — NH₄OH — H₂O (66 : 1 : 33) по II направлению HCl — пропанол — H₂O (17,6 : 68 : 14,4) [4]. Пластины авторадиографировали в течение 6—8 ч. Величины R_f для стандартных 3'-МНД в используемых растворителях определяли в модельных экспериментах.

ного метилирования, модифицированного ранее Никольской [3]. В этой серии экспериментов с помощью теста дополнительного метилирования сравнивали специфичность к метилируемой последовательности ДМ-А₁₆ с ДМ-А₂₃, ДМ-А₂₃ с ДМ-А₇₀ и ДМ-А₁₆ с ДМ-А₇₀. Согласно предложенной схеме эксперимента по дополнительному метилированию, опытная

положительная реакция (ПР) — при разведениях 1 : 960 и 1920; слабая реакция (СР) — при разведениях 1 : 240 и 480; очень слабая реакция (ОСР) — при разведениях 1 : 60 и 120; отрицательная реакция (ОР) — снижение оптической плотности при разведении лизата 1 : 30. Рабочие свинцового цеха были объединены в 2 группы: 1-ю составили рабочие, перенесшие в прошлом свинцовую интоксикацию и продолжающие работать в контакте со свинцом, 2-ю — рабочие без свинцовой интоксикации, но длительно работающие в свинцовом цехе.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 суммированы результаты обследования рабочих свинцового цеха на интенсивность антиэритроцитарных аутоантител в зависимости от группы и стажа работы. У 68% рабочих 1-й группы реакция была положительной, при этом у 70% высокой интенсивности. Разница между группами с разным стажем оказалась недостоверной. Положительные реакции наблюдались у 77% обследованных 2-й группы, при этом высокой интенсивности только у 29%. В контрольной группе реакции оказались отрицательными. Полученные данные позволяют предположить, что антиэритроцитарные антитела у работающих в свинцовом цехе появляются под воздействием факторов производственной среды. Такое предположение подтверждают данные обследования 80 рабочих других цехов. Реакции высокой интенсивности были обнаружены в основном у рабочих, которые вследствие свинцовой инток-

Т а б л и ц а 1

Зависимость интенсивности антителиобразования от стажа работы в свинцовом цехе (в %

Титры ауто-антител	Стаж работы, годы					
	до 5		5 — 10		более 10	
	группа обследованных					
	1-я (n=5)	2-я (n=32)	1-я (n=14)	2-я (n=33)	1-я (n=47)	2-я (n=46)
РГР и ГР	80,0	34,3	85,8	15,9	67,9	39,0
СР и ОСР	20,0	43,8	14,2	57,6	17,0	41,3
ОР	—	21,9	—	24,2	15,1	9,6

П р и м е ч а н и е. n — число обследованных.

сикации были переведены из свинцового цеха. Известно, что свинец может образовывать ковалентные связи с аминными и сульфгидрильными группами белков и приводить к глубоким нарушениям ультраструктуры клеток крови при сатурнизме [8]. С учетом этого можно предположить, что при образовании прочного комплекса свинца с макромолекулами наряду с изменением биологических свойств изменяются их антигенные особенности.

Для выявления диагностической ценности антиэритроцитарных аутоантител при воздействии свинца полученные данные были сопоставлены с кардинальными признаками сатурнизма в периферической крови (количеством гемоглобина, числом ретикулоцитов и базофильно-зернистых эритроцитов, содержанием свободного протопорфирина IX в эритроцитах) и копропорфирина в моче (табл. 2).

Из 52 обследованных с низким уровнем гемоглобина у 43 (82,7%) были обнаружены положительные реакции на антитела, в том числе у 33 (63,4%) высокой интенсивности. При нормальном уровне гемоглобина положительные реакции были обнаружены у 80,4% обследованных, в том числе у 40,1% высокой интенсивности. Это свидетельствует, что повышенное образование аутоантител предшествует во времени снижению уровня гемоглобина. Аналогичные результаты получены при сопоставлении титров аутоантител с содержанием в крови базофильно-зернистых эритроцитов и ретикулоцитов. В этом плане особенно интересным нам представляется факт обнаружения аутоантител до появления ретикулоцитов, считающихся не только кардинальным симптомом сатурнизма, но и ранним показателем воздействия свинца. Этот факт, на наш взгляд, повышает диагностическую ценность определения антиэритроцитарных аутоантител.

Укажем также на существенное значение данных сопоставления титров аутоантител с нарушением порфиринового обмена, так как, по современным представлениям, нарушение этого обмена считается одним из наиболее ранних признаков воздействия свинца. Установлено, что количество обследованных с высокими титрами аутоантител в сыворотке крови оказывается

значительным как при нормальном содержании копропорфирина (51,8%), так и при повышенной экскреции его с мочой (52,5%). При этом в обоих случаях высокие титры аутоантител наиболее часто обнаруживались у перенесших свинцовую интоксикацию, составляя соответственно 85,6 и 73,0%.

Высокие титры аутоантител обнаружены у $1/3$ обследованных рабочих без указания в анамнезе на свинцовую интоксикацию при отсутствии копропорфирурии.

Полученные результаты позволяют заключить, что повышенные титры аутоантител в сыворотке крови при свинцовой интоксикации появляются значительно раньше, чем копропорфирурия. Учитывая, что увеличение содержания свободного протопорфирина IX в эритроцитах считается более ранним проявлением нарушения порфиринового обмена, чем копропорфирурия, мы считали целесообразным сопоставить полученные результаты с

Т а б л и ц а 2

Антиэритроцитарные аутоантитела и кардинальные симптомы воздействия свинца (в %)

Показатель	РПР и ПР		СР и ОСР		ОР	
	группа обследованных					
	1-я	2-я	1-я	2-я	1-я	2-я
Гемоглобин						
норма	76,4	55,0	17,7	41,6	5,9	26,4
ниже нормы	68,8	22,0	15,7	25,0	15,5	20,0
Базофильно-зернистые эритроциты						
норма	70,6	27,6	17,6	46,2	11,8	26,2
выше нормы	75,1	50,0	15,6	37,5	9,3	12,5
Ретикулоциты						
норма	68,0	27,7	16,0	44,6	12,0	27,7
выше нормы	73,1	34,8	17,1	47,8	9,8	17,4
Свободный протопорфирин IX в эритроцитах						
норма	100,0	27,6	—	50,0	—	22,2
выше нормы	73,4	50,0	40,6	22,4	18,3	4,2
Копропорфирин в моче						
норма	85,6	31,5	9,6	43,0	4,8	25,5
выше нормы	73,0	34,9	16,2	39,0	10,0	25,8

количественным содержанием свободного протопорфирина IX в эритроцитах. Оказалось, что у всех рабочих, перенесших свинцовую интоксикацию, у которых оставалось нормальным количество свободного протопорфирина IX, в эритроцитах всегда определялись высокие титры аутоантител. При увеличении содержания протопорфирина число обследованных с высокими титрами аутоантител несколько понижается (73,4%). В группе обследованных без свинцового отравления интенсивность реакции в 2 раза чаще обнаруживалась с повышением содержания протопорфирина IX в эритроцитах (50,0%).

Таким образом, при сопоставлении уровня аутоантител с количеством свободного протопорфирина IX в эритроцитах удалось установить, что у людей, подвергающихся воздействию свинца, антиэритроцитарные аутоантитела обнаруживаются раньше, чем нарушения в порфириновом обмене.

Сопоставление титров аутоантител с кардинальными симптомами сатурнизма показало, что усиленное образование антиэритроцитарных аутоантител при воздействии свинца наступает значительно раньше, чем характерные, специфические изменения в периферической крови и в обмене порфиринов.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Алданазаров А. Т. Изменения системы крови при сатурнизме. Алма-Ата, 1974.
2. Крылов А. А., Фрумкина Б. З. — Тер. арх., 1962, № 11, с. 95—96.
3. Алданазаров А. Т. — В кн.: Механизмы регулирования жизнедеятельности организма в условиях патологии. Баку, 1970, с. 381—382.

4. Балаховский С. Д., Балаховский И. С. Методы химического анализа крови. М., 1953.
5. Алмазов В. А., Рябов С. И. Методы функционального исследования системы крови. Л., 1963.
6. Алексеева О. Г., Орлова А. А.— Сов. мед., 1966, № 7, с. 86—89.
7. Алексеева О. Г.— Радиобиология, 1966, № 5, с. 708—712.
8. Хачиров Д. Г.— Гиг. труда, 1975, № 6, с. 51—52.

Поступила 12/V 1980 г.

УДК 618.2-07:616.153.963.1-074

Р. М. Зорина, Н. А. Зорин

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ α_2 -ГЛИКОПРОТЕИНА, СВЯЗАННОГО С БЕРЕМЕННОСТЬЮ, В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ДОНОРОВ

Кафедра акушерства и гинекологии № 1 и Центральная научно-исследовательская лаборатория Новокузнецкого института усовершенствования врачей

α_2 -Гликопротеин, связанный с беременностью (α_2 -ГП), синтезируется лейкоцитами [1] и обладает выраженными иммунодепрессивными свойствами [2, 3]. Концентрация его в сыворотке крови мужчин и небеременных женщин не превышает 10 мкг/мл [4]. Влияние пола, возраста и эритроцитарных антигенов на концентрацию этого белка в сыворотке крови здоровых лиц до настоящего времени практически не изучалось, что и послужило предпосылкой для проведения настоящей работы.

М е т о д и к а

Для исследования использовано 129 образцов сыворотки крови 63 мужчин в возрасте от 20 до 49 лет и 66 женщин в возрасте от 20 до 43 лет, однократно сдавших кровь в Новокузнецкой станции переливания крови. Концентрацию α_2 -ГП определяли при помощи метода ракетного иммуноэлектрофореза [5] и выражали в условных единицах (усл. ед.). За 100 усл. ед. принимали концентрацию этого белка в смеси сыворотки крови, полученной от беременных женщин (III триместр беременности). Антисыворотку к α_2 -ГП получали путем иммунизации кроликов под конъюнктиву века [6] сывороткой крови беременных женщин с последующим истощением ее сухой плазмой крови человека. Полученная антисыворотка образовывала преципитаты лишь с α_2 -ГП у всех обследованных.

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

Концентрация α_2 -ГП в сыворотке крови женщин-доноров колеблется от следовых количеств до 25 усл. ед. ($4,2 \pm 0,4$). У женщин-доноров его концентрация статистически достоверно ниже ($P < 0,001$), чем у мужчин,—

Т а б л и ц а 1

Концентрация α_2 -ГП (в усл. ед.) в сыворотке крови доноров разных возрастных групп

Обследуемые	Возраст, годы			
	20—25	26—30	31—35	старше 35
Мужчины	$1,2 \pm 0,3$ (21)	$1,8 \pm 0,8$ (11)	$0,7 \pm 0,2$ (6)	$2,7 \pm 1,1$ (10)
Женщины	$2,1 \pm 0,3$ (17)	$4,1 \pm 1,0$ (11)	$5,7 \pm 1,1$ (8)	$5,4 \pm 1,4$ (8)
<i>P</i>	$> 0,25$	$< 0,05$	$< 0,001$	$> 0,25$

П р и м е ч а н и е. В скобках указано число лиц в каждой группе; *P* — показатель достоверности различий между мужчинами и женщинами в каждой возрастной группе.

$1,7 \pm 0,3$ (от следовых количеств до 10,6 усл. ед.). Следует отметить, что у 15% женщин и 35% мужчин этот белок выявляется лишь в следовых концентрациях (менее 0,5 усл. ед.)

В табл. 1 приведены концентрации α_2 -ГП у доноров разного возраста. Можно отметить тенденцию к нарастанию концентрации исследуемого бел-

ка пропорционально возрасту доноров вне зависимости от их пола. У мужчин 20—35 лет частота выявления α_2 -ГП в следовых количествах составляет 35—50%. У лиц старше 35 лет наименьшая концентрация его 1,1 усл. ед., а наибольшая — 10,9 усл. ед. У женщин-доноров эта тенденция имеет несколько иной характер. В частности, у женщин 20—25 лет частота выявления α_2 -ГП в минорных концентрациях составляет 29%, 26—30 лет — 18%, тогда как в старших возрастных группах наименьшая концентрация его составляет 2,4 усл. ед. Можно полагать, что более высокая концентрация исследуемого белка у женщин по сравнению с мужчинами связана с репродуктивной функцией — перенесенными ранее гестоспецифическими беременностями, после которых в сыворотке крови сохраняется сравнительно высокий уровень α_2 -ГП [4, 7].

Данные о влиянии группы на концентрацию α_2 -ГП в сыворотке крови доноров представлены в табл. 2. У мужчин с группой крови I—II концентрация и частота выявления этого белка в минорных концентрациях практически не различаются. Однако у мужчин с группой крови III концентрация его статистически достоверно ($P < 0,001$) снижена. Причина этого явления связана с высокой частотой выявления минорных концентраций α_2 -ГП (53%).

У женщин с группой крови I концентрация α_2 -ГП статистически достоверно ($P < 0,001$) выше, чем у других женщин, у которых она сходна. Связь между групповой принадлежностью крови и частотой выявления исследуемого белка в минорных концентрациях выражена резче, чем у мужчин. Так, у женщин с группой крови I она составляет всего 4%, с группой крови II — 19% и с группой крови III — 29%.

Следует отметить, что в каждой из возрастных групп были равномерно представлены лица с разными группами крови. Следовательно, концентрация α_2 -ГП, помимо возраста, связана и с групповой принадлежностью крови. «Малопродуцирующие» индивидуумы имеют наибольшее представительство среди лиц обоего пола с группой крови III. Наибольшие же концентрации этого белка — у доноров с группой крови I. Природа связи между эритроцитарными антигенами и биосинтезом α_2 -ГП, осуществляемым в лейкоцитах [1], остается пока еще неясной.

Какой-либо связи между резус-принадлежностью крови доноров и концентрацией α_2 -ГП не было обнаружено.

Таким образом, результаты исследования показывают, что между концентрацией α_2 -ГП в сыворотке крови и полом, возрастом и групповой принадлежностью крови доноров имеется определенная взаимосвязь. Вероятно, она в определенной мере может объяснить широкую вариабельность концентраций этого белка у здоровых людей. Эта вариабельность в еще большей степени проявляется при беременности [4, 7]. Это в значительной мере препятствует установлению связей между особенностями течения беременности и концентрацией α_2 -ГП — одного из белков «зоны беременности». Возможно, с учетом полученных данных, а также по мере выявления пока еще неизвестных факторов удастся приблизиться к окончательному выяснению причин вариабельности биосинтеза α_2 -ГП.

Т а б л и ц а 2

Концентрация α_2 -ГП (в усл. ед.) у доноров с разной групповой принадлежностью крови

Обследуемые	Группа крови			
	I (0)	II (A)	III (B)	IV (AB)
Мужчины	2,2±0,5 (29)	1,8±0,5 (17)	0,7±0,1 (15)	1,2±0,8 (2)
Женщины	7,3±1,2 (25)	3,8±0,5 (21)	3,3±0,5 (17)	3,1±1,3 (3)
<i>P</i>	<0,001	<0,05	<0,001	—

П р и м е ч а н и е. В скобках указано число лиц в каждой группе; *P* — показатель достоверности различий между мужчинами и женщинами с одинаковой группой крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Stimson W. H., Blackstock J. C.*— *Experientia* (Basel), 1975, v. 15, p. 371—373.
2. *Schoultz B. von, Stigbrand T., Tarnvic A.*— *FEBS Letters*, 1975, v. 38, p. 23—26.
3. *Straube W., Klaisch B., Hofmann R. et al.*— *Arch. Gynäk.*, 1975, Bd 218, S. 313—322.
4. *Bohn H.*— *Blut*, 1973, Bd 26, S. 205—209.
5. *Weeke B.*— В кн.: *Руководство по количественному иммуноэлектрофорезу. Метод и применение.* М., 1977, с. 41—57.
6. *Иммунохимический анализ.* М., 1968, с. 8—9.
7. *Schoultz B.*— *Am. J. Obstet. Gynec.*, 1974, v. 15, p. 792—797.

Поступила 14/V 1980 г.

CONTENT OF ALPHA₂-GLYCOPROTEIN, RELATED TO PREGNANCY, IN DONOR BLOOD SERUM

R. M. Zorina, N. A. Zorin

Institute for Postgraduate Training of Physicians, Novokuznetsk

Content of α_2 -glycoprotein, related to pregnancy, was studied in blood of donors of different age, blood groups and its Rh factor content. Concentration of the glycoprotein was increased in the blood of aged donors; also there was a correlation with the blood groups. The Rh factor presence did not affect the α_2 -glycoprotein concentration.

УДК 612.351.11:577.152.354

Г. Д. Исаханян, В. З. Горкин

ЧАСТИЧНАЯ ОЧИСТКА И СВОЙСТВА АДЕНИЛАТДЕЗАМИНАЗЫ ИЗ СУБФРАКЦИИ РАСТВОРИМЫХ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ БЕЛКОВ ПЕЧЕНИ КРЫС

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Аденилатдезаминазы (КФ 3.5.4.6) катализируют реакцию гидролитического дезаминирования адениловой кислоты (АМФ) с образованием инозиновой кислоты и аммиака [1]. Аденилатдезаминазы выделены из ряда биологических объектов, очищены и охарактеризованы с применением современных энзимологических и физико-химических методов [2]. Но биологические функции этих ферментов, особенно патогенетическое значение нарушений их активности в организме, еще мало изучены. Известно, однако, что при многих патологических состояниях, которые сопровождаются накоплением в тканях липидных перекисей [3], имеет место стимуляция аденилатдезаминазной активности в митохондриальной фракции печени [4, 5]. Установлено, что такой стимуляции аденилатдезаминазной активности принадлежит определенная патогенетическая роль в развитии лучевых поражений и реакции организма на рост опухоли [5, 6]. Известно также, что структурные аналоги АМФ, устраняющие стимуляцию аденилатдезаминазной активности, оказывают благотворное действие при лучевых поражениях и экспериментальных опухолях [7, 8]. В связи с дальнейшими исследованиями этих проблем важно выяснить свойства митохондриальных аденилатдезаминаз в норме. Однако свойства этих ферментов изучены относительно мало. Известно лишь, что аденилатдезаминазная активность в мозге крыс и скелетной мышце кролика определяется как в растворимой, так и в митохондриальной фракции тканевых гомогенатов [9, 10]. В эритроцитах человека аденилатдезаминаза находится как в растворимой фракции, так и во фракции структурно-связанных белков [11]. В мозге крыс аденилатдезаминазная активность обнаружена в осадке, полученном после центрифугирования при 75 000 g, и в надосадочной жидкости [12]. В митохондриальной фракции гомогената печени крыс аденилатдезаминазная активность обнаружена и в субфракции митохондриальных мембран, и в субфракции растворимых митохондриальных белков [13].

В задачу настоящей работы входили выделение и очистка аденилатдезаминазы из субфракции растворимых митохондриальных белков печени крыс, а также характеристика некоторых свойств полученных ферментных препаратов.

Методика

Размельченную ножницами и промытую несколько раз охлажденным физиологическим раствором ткань печени белых беспородных крыс-самцов (150—200 г) гомогенизировали в 10-кратном объеме 0,25 М водного раствора сахарозы. Митохондриальную фракцию выделяли методом дифференциального центрифугирования [14]. Экспериментальные пробы (конечный объем 1,8 мл), содержащие 0,2—2,0 мг белка, 10 мМ АМФ и 0,1 М трис-буфер pH 7,4, инкубировали 30 мин при 37 °С. После фиксации проб трихлоруксусной кислотой (конечная концентрация 5%) содержание аммиака в безбелковых фильтратах определяли методом изотермической диффузии в чашках Конвея с последующей нesslerизацией. Количество освободившегося в этих условиях аммиака было прямо пропорционально времени инкубации, что позволяло находить начальную скорость реакции. Содержание белка определяли по методу Лоури. Электрофорез в 7,5% полиакриламидном геле [15] проводили в трис-глициновом буфере pH 8,3 в течение 120 мин при силе тока 5 мА на трубку, каждая из которых содержала по 50 мкг белка. Электрофореграммы обрабатывали 1% раствором красителя амидо черного и отмывали 7% уксусной кислотой в течение 40—50 ч. Использовали следующие реагенты: аденозин-5'-монофосфат (АМФ, динатриевая соль), аденозин-5'-дифосфат (АДФ, динатриевая соль), аденозин-5'-трифосфат (АТФ, динатриевая соль), аденозин, гуанозин, аденозин-2', 3'-монофосфат (2',3'-АМФ), дезоксицитидин-5'-монофосфат (дЦМФ, динатриевая соль), никотинамидадениндинуклеотид (НАД) (препараты фирмы «Реанал», Венгрия), аденозин-3', 5'-циклофосфат (3',5'-цАМФ, фирма «Флюка», Швейцария), флавинадениндинуклеотид (ФАД, фирма «Серва», ФРГ), тирамин·НСl (фирма «Мерк», ФРГ), путресцин·2НСl (фирма «Кальбайкем», США).

Результаты и обсуждение

Очистка аденилатдезаминазы из субфракции растворимых митохондриальных белков печени крыс

Суспензия митохондрий. Осадок митохондрий, выделенных, как указано в методике, суспендировали в 0,04 М трис-буфере pH 7,4. К суспензии добавляли β-меркаптоэтанол (конечная концентрация 0,05%).

Субфракция растворимых митохондриальных белков. Суспензию митохондрий подвергали двукратному замораживанию в жидком азоте и оттаи-

Т а б л и ц а 1

Очистка аденилатдезаминазы митохондриальной фракции печени крыс

Этап очистки	Объем, мл	Белок, мг/мл	Общее содержание белка, мг	Удельная активность, нмоль NH ₃ на 1 мг белка за 1 мин	Общая активность, нмоль NH ₃ за 1 мин	Выход, %	Степень бел. ка
Суспензия митохондрий	150	20,80	3120,0	2,8	8736	100	1,0
Субфракция растворимых митохондриальных белков	110	5,90	649,0	8,9	5647	62	3,1
Адсорбция на ДЭАЭ-целлюлозе и элюция 0,3 М трис-буфером	40	0,42	16,8	162,4	2728	31	58,0
Высаливание сульфатом лития	6	1,61	9,7	159,2	1538	17	57,0

ванию, а затем центрифугировали (40 000 g, 60 мин). В полученной надосадочной жидкости (субфракция растворимых митохондриальных белков) содержалось около 60% аденилатдезаминазной активности митохондриальной фракции (табл. 1). Удельная активность в субфракции растворимых митохондриальных белков превышала в 3 раза таковую митохондриальной фракции (см. табл. 1).

Адсорбция на ДЭАЭ-целлюлозе и элюция 0,3 М трис-буфером. К полученной субфракции растворимых митохондриальных белков добавляли уравновешенную в 0,04 М трис-буфере рН 7,4 ДЭАЭ-целлюлозу в соотношении 1,5—2,0 г сухой массы на 100 мг белка. При таком соотношении анионит/белок все белки, обладающие аденилатдезаминазной активностью, адсорбировались на ДЭАЭ-целлюлозе. После 60 мин выдерживания при 4 °С осадок сорбента отделяли фильтрованием на воронке Бюхнера. Адсорбированный белок элюировали с ДЭАЭ-целлюлозы трис-буфером возрастающей концентрации (рис. 1). Для этого собранный на фильтре осадок ДЭАЭ-целлюлозы суспендировали в 40 мл 0,1 М трис-буфера рН 7,4, тщательно перемешивали и оставляли на 15 мин при 4 °С. Осадок ДЭАЭ-целлюлозы вновь отделяли фильтрованием, а в фильтрате изме-

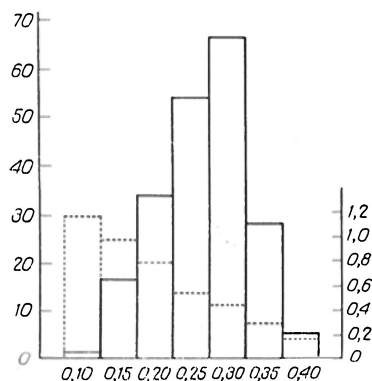


Рис. 1. Ступенчатая элюция аденилатдезаминазы, адсорбированной на ДЭАЭ-целлюлозе.

Представлен пример типичного опыта. К субфракции растворимых митохондриальных белков печени крысы (110 мл, 5,9 мг белка/мл с удельной активностью 8,9 ионмоль аммиака на 1 мг белка за 1 мин) для адсорбции фермента добавляли ДЭАЭ-целлюлозу в соотношениях, указанных в тексте. Условия элюции описаны в тексте. По оси ординат — слева скорость аденилатдезаминазной реакции (ионмоль аммиака за 1 мин на 1 мл — сплошные линии), справа — содержание белка (в мг/мл — пунктирные линии); по оси абсцисс — концентрация триса (в М) в порциях (по 40 мл) буферных растворов рН 7,4, которыми производилась элюция.

ряли аденилатдезаминазную активность. Эту процедуру повторяли 7 раз при постоянном повышении концентрации трис-буфера до 0,4 М. Фракция белков, которую элюировали 0,3 М трис-буфером, содержала около 30% аденилатдезаминазной активности митохондриальной фракции (см. табл. 1). Удельная активность в этой фракции была в 12—15 раз выше, чем во фракции растворимых митохондриальных белков (см. табл. 1). Содержание белка в указанной фракции составляло всего 0,40—0,50 мг/мл.

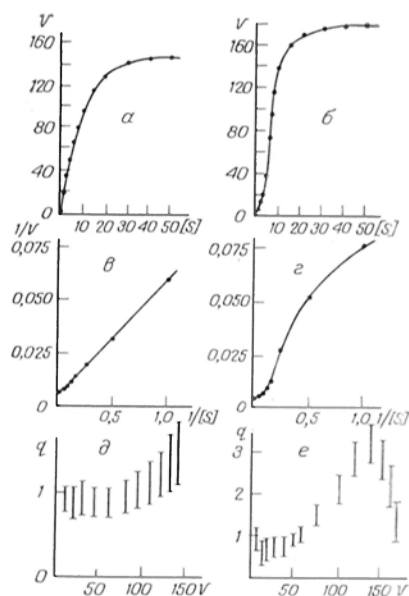


Рис. 2. Зависимость между концентрацией АМФ и скоростью его дезаминирования частично очищенными препаратами аденилатдезаминазы при различной концентрации белка в ферментных препаратах.

Для ферментного препарата, содержащего 0,4—0,5 мг белка/мл (а), и для ферментного препарата, содержащего 1,5—2,0 мг белка/мл (б), представлены кривые зависимости V от $[S]_0$ в координатах Михаэлиса — Ментен и в координатах Лайнуингера — Берка (в, г), а также зависимость между скоростью реакции и величиной коэффициента q (д, е), вычисленного по формуле 117:

$$q = \frac{\lg [(1/V' - 1/V)/(1/V' - 1/V'')]}{\lg \kappa}$$

где V , V' , V'' — значение скоростей реакции при концентрациях субстрата, равных $[S]$, $[S]_0/\kappa$ и $\kappa[S]$ соответственно; κ — постоянный множитель; при $\kappa > 1$. В нашем случае $\kappa = 2$. Абсолютную ошибку измерения величины q (Δq) — на рисунке, д и е — вертикальные линии, вычисляли по формуле [30]:

$$\Delta q = \frac{\Delta V}{2,3 \lg \kappa} \sqrt{\left[\frac{a^2 (b-c)}{(b-a)(a-c)} \right]^2 + \left[\frac{b^2}{(b-a)} \right]^2 + \left[\frac{c^2}{(a-c)} \right]^2}$$

где ΔV — ошибка измерения величины V , V' и V'' ; $a = 1/V$, $b = 1/V'$, $c = 1/V''$. Представлены примеры типичных опытов: V — скорость дезаминирования (в ионмоль аммиака на 1 мг белка за 1 мин); $[S]$ — концентрация АМФ (в мМ).

Высаливание сульфатом лития. К фракции, полученной на предыдущем этапе очистки, добавляли сульфат лития до получения насыщенного при 4 °С раствора (26 г безводного сульфата лития на 100 мл раствора) и оставляли на 30 мин при этой температуре. Образующийся осадок отделяли центрифугированием (40 000 g, 30 мин), суспендировали его в минимальном объеме 0,1 М трис-буфера pH 7,4 и диализовали против 500-кратного объема 0,005 М трис-буфера в течение 20—22 ч в присутствии β-меркаптоэтанола (0,05%). Как видно из табл. 1, в полученных ферментных препаратах содержание белка было 1,5—2,0 мг/мл, но удельная активность их существенно не изменялась. Таким образом достигалось сгущение ферментного препарата.

Результаты электрофоретических исследований в полиакриламидном геле указывают на то, что полученные ферментные препараты негомогенны. При условиях, описанных в методике, в них удавалось обнаружить 8 белковых полос, распределение аденилатдезаминазной активности в которых не было исследовано.

Свойства частично очищенных препаратов

Скорость реакции как функция концентрации субстрата. При исследовании зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата (V от $[S]$) нами было установлено, что форма описывающих эту зависимость кривых может изменяться от содержания белка в ферментных препаратах (рис. 2). При содержании белка в них от 0,4 до 0,5 мг/мл кривая зависимости V от $[S]$ в отсутствие активаторов напоминала гиперболу (рис. 2, а). В координатах Лайнуиве-

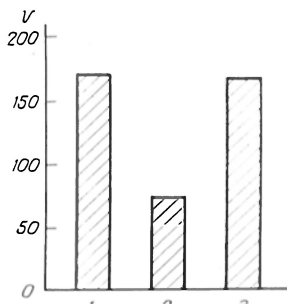


Рис. 3. Обратимое снижение при диализе активности частично очищенных препаратов аденилатдезаминазы (с содержанием белка 0,4—0,5 мг/мл).

1 — удельная активность ферментного препарата при диализе; 2 — удельная активность того же препарата после диализа против 500-кратного объема 0,005 М трис-буфера pH 7,4 в течение 18—20 ч в присутствии β-меркаптоэтанола (0,05%). 3 — удельная активность диализованного ферментного препарата после добавления к нему прогорелого (10 мин при 100 °С) ферментного препарата. Представлен пример типичного опыта. V — скорость реакции (в нмоль аммиака на 1 мг белка за 1 мин).

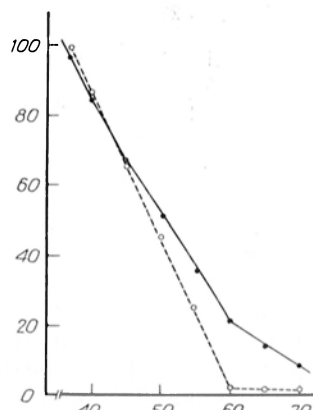


Рис. 4. Влияние контролируемого нагревания на активность частично очищенных препаратов аденилатдезаминазы.

По оси ординат — остаточная активность (в % к контрольным пробам, которые выдерживали 10 мин при 20 °С) в ферментных препаратах с содержанием белка 0,4—0,5 мг/мл (пунктирная линия) и 1,5—2 мг/мл (сплошная линия); по оси абсцисс — температура (в °С). Представлен пример типичного опыта (из серии, включающей 4 опыта).

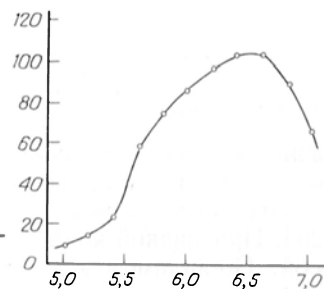


Рис. 5. Зависимость скорости ферментативного дезаминирования ЛМФ от pH среды.

В пробы (конечный объем 1,8 мл) вносили по 0,4 мл препарата аденилатдезаминазы, содержащей 1,5—2,0 мг белка/мл, ЛМФ (10 мМ) и 0,1 М цитратные буферные растворы. Условия определения см. в «Методике». По оси ординат — скорость дезаминирования (в нмоль аммиака на 1 мг белка за 1 мин); по оси абсцисс — pH среды.

ра — Берка мы получили, однако, вогнутую кривую (см. рис. 2, в), что указывает на отклонение от гиперболической зависимости. Кажущиеся величины K_m и V_{max} равны соответственно $1,2 \cdot 10^{-2}$ М и 200 нмоль аммиака на 1 мг белка за 1 мин. Рассчитанная «разностным» методом [16] величина коэффициента Хилла (q) позволяет проверить выполнимость уравнения Михаэлиса — Ментен. Как видно на рис. 2, д, коэффициент заметно превышает единицу лишь при больших скоростях реакции, наблюдаемых при $V = 1,5 \cdot 10^{-2}$ М, что указывает на отклонение нашей экспериментальной кривой от гиперболической [17].

На рис. 2, б представлена зависимость скорости реакции ферментного препарата с содержанием белка от 1,5 до 2 мг/мл (после сгущения сульфатом лития) от концентрации АМФ. Как видно, в отсутствие активаторов форма характеризующей эту зависимость кривой по сравнению с кривой на рис. 2, а резко изменена. В координатах Лайнуивера — Берка мы не получали прямой линии (см. рис. 2, в); в этом случае вычисление кажущихся величин K_m и V_{max} не было возможно. Кривая зависимости коэффициента q от скорости реакции имеет ярко выраженный пик (см. рис. 2, е), характерный для S-образных кривых [17]. Для большинства изученных ранее аденилатдезаминаз [18, 19] зависимость V от $[S]$ в отсутствие активаторов описывалась S-об-

Т а б л и ц а 2

Деаминазирование некоторых азотистых соединений частично очищенными препаратами аденилатдезаминаз митохондрий печени крыс

Азотистое соединение	Оптимальная концентрация, мМ		Удельная активность, нмоль аммиака на 1 мг белка за 1 мин	
	А	Б	А	Б
АМФ	50	50	191,8	185,1
АДФ	25	5	94,0	27,7
АТФ	5	0,1—25	3,1	0
2',3'-АМФ	0,1—25	0,1—25	0	0
3',5'-АМФ	0,1—25	0,1—25	0	0
дЦМФ	0,1—25	0,1—25	0	0
Аденозин	0,1—25	0,1—25	0	0
Гуанозин	0,5	0,1—25	2,0	0
НАД	1	0,5	34,5	11,6
ФАД	1	0,1	149,8	24,1
Тирамин	0,1—25	0,1—25	0	0
Путресцин	25	25	21,7	20,3

П р и м е ч а н и е. Представлены результаты типичного опыта из серии, включающей 7 опытов. Пробы содержали одно из исследованных соединений, 0,1 М трис-буфер рН 7,4 и ферментный препарат. А — данные для ферментного препарата с содержанием белка 0,4—0,5 мг/мл; Б — данные для ферментного препарата с содержанием белка 1,5—2 мг/мл.

разной кривой. В зависимости от содержания белка в ферментном препарате форма кривой зависимости V от $[S]$ для аденилатдезаминазы из скелетной мышцы кролика может варьировать от S-образной до гиперболической [20]. При низкой концентрации белка указанная кривая была гиперболической. По-видимому, это явление обусловлено агрегацией и деагрегацией субъединиц в молекуле фермента [21].

Содержание белка в исследованных нами ферментных препаратах, различающихся формой кривых, характеризующих зависимость V от $[S]$, было разное, однако в инкубационные пробы, где протекала реакция, мы вносили одинаковое количество белка. Можно предположить, что то время, в течение которого мы измеряли скорость реакции (30 мин), меньше, чем время, в течение которого происходит деагрегация молекулы фермента. Действительно, в тех случаях, когда скорость реакции измеряли не непосредственно, а спустя 5—6 ч после предварительного разведения препарата с содержанием белка от 1,5—2 до 0,4—0,5 мг/мл, кривая зависимости V от $[S]$ теряла S-образную форму, приближаясь по форме к обычной гиперболе.

Диализ. При диализе препарата аденилатдезаминазы с содержанием белка 0,4—0,5 мг/мл ферментативная активность снижалась примерно на 50% (рис. 3). При добавлении полностью инактивированного кипячением ферментного препарата активность диализованного ферментного препарата возвращалась к исходному уровню (см. рис. 3). Эти данные указывают на наличие низкомолекулярного термостабильного компонента в исследованном нами ферментном препарате. При диализе ферментного препарата с содержанием белка 1,5—2 мг/мл снижения активности не наблюдали. Однако активность снижалась примерно на 50%, если диализу подвергали фермент-

ный препарат, предварительно разведенный до концентрации белка 0,4—0,5 мг/мл. Можно предположить, что устойчивость комплекса низкомолекулярного компонента с молекулой фермента убывает при диссоциации последнего на субъединицы. Полученные нами данные согласуются с имеющимися в литературе сведениями о том, что в состоящей из субъединиц молекуле аденилатдезаминазы из скелетных мышц кролика присутствует необходимый для ферментативной активности цинк [22].

Деаминарование различных нуклеотидов. Аденилатдезаминазы, выделенные из различных биологических источников, характеризуются узкой субстратной специфичностью [2]. Так, фермент из скелетных мышц кролика [23] не деаминирует АДФ, 3'-АМФ, 3',5'-цАМФ, аденозин, а фермент из эритроцитов цыпленка [18] не деаминирует НАД, ФАД и слабо деаминирует АДФ (13% по сравнению с АМФ). Аденилатдезаминаза из семян гороха не деаминирует аденин, аденозин, АДФ, АТФ и НАД. Данные о свойствах частично очищенных препаратов аденилатдезаминазы из субфракции растворимых митохондриальных белков печени крыс деаминировать некоторые азотистые соединения приведены в табл. 2. Как видно из табл. 2, деаминированию под действием ферментного препарата с содержанием белка 0,4—0,5 мг/мл практически не подвергались структурные аналоги субстрата — 2', 3'-АМФ и 3',5'-цАМФ, а также аденозин, гуанозин, дЦМФ и АТФ. Интенсивному деаминированию подвергался АДФ (скорость деаминирования составляла примерно 50% скорости деаминирования АМФ), а также НАД (примерно 20% по сравнению с АМФ) и особенно ФАД (около 80% по сравнению с АМФ). Субстрат моноаминоксидазы — тирамин — не подвергался при этих условиях деаминированию, а путресцин—субстрат диаминоксидазы — деаминировался со скоростью, составляющей примерно 10% скорости деаминирования АМФ. Поскольку исследованные нами ферментные препараты негомогенны, нет основания предполагать, что АМФ, АДФ, НАД и ФАД деаминировались одним ферментом. За последнее время получены данные [24] о существовании в печени кролика не только растворимой, но и структурно-связанной формы диаминоксидазы. Деаминирование путресцина в наших опытах, вероятно, связано с примесями в частично очищенных препаратах аденилатдезаминаз еще неидентифицированной формы нефлавиновой аминоксидазы [25].

При сгущении препаратов аденилатдезаминазы мы наблюдали торможение свойства деаминировать АДФ, НАД и ФАД (см. табл. 2). Так, в расчете на 1 мг белка при найденных в предварительных опытах оптимальных концентрациях субстратов скорость деаминирования АДФ составляла примерно 15%, НАД — около 6% и ФАД — примерно 15% по сравнению со скоростью деаминирования АМФ. Скорость и оптимальные условия деаминирования путресцина при этом не изменялись (см. табл. 2). Высокая скорость деаминирования АДФ, НАД и ФАД ферментными препаратами с содержанием белка 0,4—0,5 мг/мл, возможно, обусловлена изменением свойств (диссоциацией) аденилатдезаминаз и (или) имеющихся в препаратах белковых примесей.

Контролируемое нагревание. При исследовании воздействия на частично очищенные препараты аденилатдезаминазы (содержание белка 0,4—0,5 мг/мл) контролируемого нагревания было установлено, что при 60 °С достигается полная инактивация фермента, причем по мере повышения от 20 до 60 °С температуры, при которой ферментный препарат подвергался преинкубации в течение 10 мин до момента добавления субстрата (рис. 4), имеет место строго равномерная убыль ферментативной активности. Эти данные указывают на отсутствие в таком ферментном препарате форм с различной термостабильностью. Однако сгущенный (содержание белка 1,5—2 мг/мл) ферментный препарат при тех же условиях терял активность неравномерно (см. рис. 4), что указывает на возможное наличие в ферментных препаратах по крайней мере 3 форм с различной термостабильностью. Аналогичные данные были получены при изучении аденилатдезаминазы из мозга крыс, где также обнаружены 3 изоформы фермента с различной термостабильностью [26].

Свойства различных аденилатдезаминаз инаktivироваться при контролируемом нагревании довольно вариабелны. Так, частично очищенный препарат фермента из эритроцитов цыпленка при нагревании в течение 5 мин при 50 °С терял примерно 80 % активности [18], в то время как при очистке аденилатдезаминазы из растворимой фракции гомогената печени крыс применялось контролируемое нагревание в течение 5 мин при 55 °С [19], что указывает на значительную термостабильность фермента. Однако сопоставление этих данных как между собой, так и с результатами наших опытов затруднено тем, что не все исследователи указывают содержание белка непосредственно в инкубационных пробах и не учитывают время, которое проходит между приготовлением проб и измерением активности.

pH-оптимум действия. pH-оптимум действия для аденилатдезаминаз, выделенных из различных биологических объектов, различен. Так, для аденилатдезаминазы из мозга телят [27] pH-оптимум равен 6,2, а фермент из эритроцитов цыпленка [18] имеет pH-оптимум 7,1. Кроме того, 2 формы аденилатдезаминазы из растворимой фракции гомогената печени крыс, которые разделяются на фосфоцеллюлозе, имеют разные pH-оптимумы активности [28]. Аденилатдезаминазная активность ферментного препарата из субфракции растворимых митохондриальных белков, определяемая в 0,1 М цитратном буфере, достигала максимума при pH 6,4—6,6 (рис. 5). Мы не обнаруживали различий в положении pH-оптимума для препаратов аденилатдезаминазы с различным содержанием белка.

Ингибиторы и активаторы. Неорганический фосфат в концентрации 8 мМ тормозит активность аденилатдезаминазы из семян гороха на 76 % [1]. Активность структурно-связанной аденилатдезаминазы из мозга крыс [12] в присутствии 2 мМ неорганического фосфата тормозится на 50 %. В наших опытах активность частично очищенного ферментного препарата, содержащего 0,4—0,5 мг/мл белка, неорганический фосфат (15 мМ) тормозил на 80 %.

Для большинства аденилатдезаминаз ионы K^+ и АТФ являются активаторами. Так, в присутствии ионов K^+ наблюдали активацию фермента из эритроцитов человека [18], а фермент из растворимой фракции гомогената печени крыс активировался в присутствии ионов K^+ и АТФ [19]. Однако аденилатдезаминазы из эритроцитов кошки и собаки ионами K^+ и целым рядом других ионов не активировались [29]. На активность изучаемых нами ферментных препаратов с содержанием белка 1,5—2 мг/мл ионы K^+ (1—150 мМ) не влияли. Мы не наблюдали стимуляции при pH 6,4—6,6 аденилатдезаминазной активности также в присутствии АТФ (0,1—10 мМ) при концентрации АМФ 10 мМ. Однако при уменьшении концентрации АМФ до 2 мМ в присутствии 1 мМ АТФ наблюдалась стимуляция аденилатдезаминазной активности примерно в 2 раза. Для выяснения значения этого феномена требуются дальнейшие исследования.

Авторы благодарят Б. И. Курганова за ценную консультацию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Turner D. N., Turner J. F. — Biochem. J., 1961, v. 79, p. 128.
2. Акопян Ж. И., Горкин В. З. — Успехи совр. биол., 1973, № 1 (4), с. 54.
3. Воскресенский О. Н., Левицкий А. Н. — Вopr. мед. химии, 1970, № 6, с. 563.
4. Горкин В. З. — Там же, 1972, № 2, с. 118.
5. Grokin V. Z. — Advanc. Pharmacol., 1973, v. 11, p. 1.
6. Шапоп В. С. — Пат. физиол., 1974, № 3, с. 3.
7. Зейналов Т. А., Кулыгина А. А., Рязанов В. М. и др. — Радиобиология, 1975, № 1, с. 16.
8. Хужабмердиев М., Романова Л. А., Нейфах Е. А. и др. — Вopr. мед. химии, 1973, № 4, с. 415.
9. Ogasawara N., Yashino M., Kawamura Y. — Biochim. biophys. Acta, 1972, v. 258, p. 680.
10. Фердман Д. Л., Нечипоренко З. Ю. — Укр. бiохiм. ж., 1970, т. 42, с. 155.
11. Rao S. N., Hara L., Askari A. — Biochim. biophys. Acta, 1968, v. 151, p. 651.
12. Lee Y. P., Wang M. H. — J. biol. Chem., 1968, v. 243, p. 2260.
13. Исаханян Г. Д., Горкин В. З. — Вopr. мед. химии, 1976, № 3, с. 380.
14. Schneider W. C. — Ibid., 1948, v. 178, p. 259.

15. Davis B. J.— Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964, v. 121, p. 404.
16. Казан Э. С., Хашимов Д. И., Курганов Б. И.—Биохимия, 1971, № 1, с. 152.
17. Курганов Б. И., Поляновский О. Л.— Ж. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева, 1971, т. 16, с. 412.
18. Kawamura Y.— J. Biochem. (Tokyo), 1972, v. 72, p. 21.
19. Smith L. D., Kizer D. E.— Biochim. biophys. Acta, 1969, v. 191, p. 415.
20. Ellis K. J., Kuntz K., Sturtevant I. M.— J. biol. Chem., 1971, v. 246, p. 6631.
21. Boosman A., Sannous D., Choison O.— Biochem. biophys. Res. Commun., 1971, v. 45, p. 1025.
22. Zielke C. L., Suelter C. H.— J. biol. Chem., 1971, v. 246, p. 2179.
23. Zielke C. L., Suelter C. H.— Ibid., p. 1313.
24. Argento-Ceru M. P., Sartori C., Autuori F.— Europ. J. Biochem., 1973, v. 34, p. 369.
25. Inamasu M., Jasuhobu K. T., Konig W. A.— J. biol. Chem., 1974, v. 249, p. 5265.
26. Ogasawara N., Goto H., Watanabe T. et al.— Biochim. biophys. Acta, 1974, v. 364, p. 353.
27. Sellow B., Lowenstein I. M.— J. biol. Chem., 1967, v. 242, p. 607.
28. Ogasawara N., Goto H., Watanabe T. et al.— FEBS Letters, 1974, v. 44, p. 63.
29. Askari A., Franklin J. E.— Biochim. biophys. Acta, 1965, v. 110, p. 162.
30. Курганов Б. И., Дорожко А. И., Синельникова Э. М. и др.— Докл. АН СССР, 1972, т. 203, с. 1414.

Поступила 14/V 1980 г.

PARTIAL PURIFICATION AND PROPERTIES OF THE AMP-DEAMINASE FROM SUBFRACTION OF SOLUBLE MITOCHONDRIAL PROTEINS OF RAT LIVER

G. D. Isakhanian, V. Z. Gorkin

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

Isolation and partial purification of AMP-deaminase from subfraction of soluble proteins of the mitochondrial fraction from rat liver is described. The enzyme preparations obtained deaminated AMP at the highest rate from pH 6.4 to 6.6. At the optimal pH value and in presence of optimal AMP concentrations the AMP-deaminase preparation was not activated by ATP or K^+ and was inhibited by inorganic phosphate. Relationship was noted between both the content of protein in the enzyme preparations and length of the interval from composing the samples to monitoring the enzymatic activity and the following parameters of the AMP-deaminase: /a/ shape of curves describing the rate of AMP deamination as a function of the nucleotide concentration, /b/ reversible decrease in the AMP-deaminating activity after dialysis, /c/ properties to deaminate, besides AMP, also some other nucleotides /ADP, NAD, FAD/, /d/ dynamics of inactivation of the enzyme preparations by controlled heating. The properties of the partially purified AMP-deaminase from the subfraction of rat liver soluble mitochondrial proteins were not identical with those described previously for other AMP-deaminases.

УДК 616-008.939.22-074:543.05

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

ИЗВЛЕЧЕНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА ИЗ ТЕНЕЙ ЭРИТРОЦИТОВ, МИКРОСОМ И ПЛАЗМЫ КРОВИ СПЕЦИФИЧНЫМ СОРБЕНТОМ И ФОСФОЛИПИДНЫМИ ЛИПОСОМАМИ

II Московский медицинский институт им. Н. И. Пирогова

Поиск путей эффективного снижения содержания холестерина в организме человека является важной задачей современной медицины [1]. Потребность в методах, позволяющих избирательно извлекать холестерин из биологических мембран, обусловлена также необходимостью выяснения роли этого соединения в структуре и функционировании последних.

С указанной целью может быть применен специфичный к холестерину сорбент МГУ-1. Представило определенный интерес выяснить способность сорбента МГУ-1 извлекать холестерин из плазмы крови и биологических мембран в сравнении с аналогичной способностью липосом из фосфатидилхолина.

Методика

Микросомальную фракцию из печени белых крыс-самцов выделяли ранее описанным методом [2]. В работе использовали фракцию тяжелых микросом. Для отделения легких микросом исходные микросомы, ресуспендированные в среде, содержащей 0,15 М KCl, 10 мМ трис-HCl-буфера pH 7,4, наслаивали на 20 мл 0,5 М сахарозы, 0,5 М NaCl, 100 мМ трис-HCl-буфера pH 7,4 в пробирках к ротору SW-25 и центрифугировали на ультрацентрифуге «Beckman L5-65» при 100 000 g в течение 180 мин.

Тени эритроцитов кроликов получали по методу Доджа и соавт. [3].

Однослойные липосомы из яичного фосфатидилхолина либо фосфатидилхолина и холестерина приготавливали на ультразвуковом дезинтеграторе MS E100 wt [4]. Озвученные липиды центрифугировали на ультрацентрифуге «Beckman L5-65» при 300 000 g в течение 70 мин для осаждения многослойных липосом.

С целью извлечения холестерина из плазмы крови, мембран теней эритроцитов и микросом сорбентом МГУ-1 пробирку, содержащую 1 г сорбента и 5 мл плазмы крови либо 1 г сорбента и 5—10 мг фосфолипида теней эритроцитов или микросом, осторожно вращали в течение 3—5 мин, после чего отделяли от сорбента биологический материал декантированием.

Для извлечения холестерина из мембран теней эритроцитов и микросом фосфолипидными липосомами биологические мембраны инкубировали с липосомами из фосфатидилхолина при 30 °C в течение 3 ч в случае микросом и в течение 12 ч в случае теней эритроцитов в среде, содержащей 2 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотрептола, 100 мМ трис-HCl-буфера pH 7,4. Липосомы брали в опыт в 4—6-кратном избытке по фосфолипиду по отношению к биологическим мембранам. По окончании инкубирования смесь охлаждали до комнатной температуры и наслаивали на 3 мл 0,5 М сахарозы, 0,5 М NaCl, 100 мМ трис-HCl-буфера pH 7,4 в пробирках к ротору SW-40 и центрифугировали на ультрацентрифуге «Beckman L5-65» при 280 000 g в течение 90 мин. Фракцию липосом, содержащуюся в верхнем слое градиента, осторожно отсасывали. Поверхность осадка биологических мембран и стенки пробирки дважды смывали 5 мл 5 мМ трис-HCl-буфера pH 7,4. Для встраивания холестерина в мембраны микросом использовали липосомы из фосфатидилхолина и холестерина. Все процедуры аналогичны описанным выше.

Экстракцию липидов из препаратов микросом и теней эритроцитов проводили методом Фолча и соавт. [5]. В липидных экстрактах определяли содержание фосфолипидов по R_f [6] и холестерина по реакции с хлорным железом и серной кислотой [7]. Уровень белка в препаратах микросом и теней эритроцитов определяли по методу Лоури и соавт. [8] в присутствии 0,1 % дезоксихолата натрия. Содержание цитохромов b_5 и P-450 в препаратах микросом измеряли методом Омуре и Сато [9].

Результаты и обсуждение

В указанных выше условиях сорбент МГУ-1 извлекал из плазмы крови до 70% холестерина липопротеидов. При этом содержание холестерина в плазме крови снижалось с $0,82 \pm 0,110$ до $0,25 \pm 0,025$ мг/мл.

Из мембран теней эритроцитов сорбент удалял 28% холестерина при расчете как на фосфолипиды, так и на белок (табл. 1). Содержание холестерина в мембранах микросом при их обработке сорбентом не изменялось.

Т а б л и ц а 1
Извлечение холестерина из теней эритроцитов и микросом сорбентом МГУ-1

Мембраны	Холестерин/фосфолипиды, моль/моль	Холестерин/белок, масса/масса
Тени эритроцитов:		
до извлечения	$0,96 \pm 0,021$	$0,2 \pm 0,011$
после извлечения	$0,69 \pm 0,026$	$0,18 \pm 0,009$
	$< 0,001$	$< 0,001$
Микросомы:		
до извлечения	$0,17 \pm 0,013$	$0,048 \pm 0,003$
после извлечения	$0,17 \pm 0,013$	$0,049 \pm 0,005$
		$> 0,5$

Примечание. Даны средние значения и стандартные отклонения для 6 опытов.

Результаты извлечения холестерина из мембран теней эритроцитов и микросом фосфолипидными липосомами представлены в табл. 2. Инкубирование с липосомами снижало содержание холестерина в тенях эритроцитов на 64% при расчете на фосфолипиды и на 44% при расчете на белок. Эта раз-

ница, очевидно, была связана со встраиванием фосфолипида из липосом в мембраны эритроцитов и отчасти с переносом белка из мембран эритроцитов на липосомы, на что указывало увеличение отношения фосфолипида/белок в эритроцитарных мембранах с 0,52 до 0,82.

После инкубирования с липосомами из фосфатидилхолина содержание холестерина в мембранах микросом было снижено на 20% в расчете на фос-

Т а б л и ц а 2

Изменения химического состава теней эритроцитов и микросом при извлечении холестерина липосомами из яичного фосфатидилхолина

Мембраны	Холестерин/фос- фолициды, моль/моль	Холестерин/бе- лок, масса/масса	Фосфолициды/бе- лок, масса/масса
Тени эритроцитов ($n=6$):			
до извлечения	$0,96 \pm 0,021$	$0,25 \pm 0,011$	$0,52 \pm 0,012$
после извлечения	$0,35 \pm 0,016$	$0,14 \pm 0,009$	$0,82 \pm 0,021$
P	$<0,001$	$<0,001$	$<0,001$
Микросомы ($n=22$):			
до извлечения	$0,19 \pm 0,006$	$0,059 \pm 0,002$	$0,62 \pm 0,017$
после извлечения	$0,14 \pm 0,005$	$0,057 \pm 0,003$	$0,81 \pm 0,043$
P	$<0,001$	$>0,5$	$<0,001$

фолициды. Однако в расчете на белок содержание холестерина в микросомах оставалось практически неизменным. В то же время в микросомах происходило выраженное снижение содержания цитохромов b_5 и $P-450$. Удельное содержание цитохрома b_5 в мембранах микросом уменьшалось с $0,66 \pm 0,021$ до $0,52 \pm 0,014$ нмоль на 1 мг белка, а цитохрома $P-450$ — с $0,75 \pm 0,020$ до $0,53 \pm 0,014$ нмоль на 1 мг белка. Снижение содержания цитохромов в мембранах микросом при инкубации последних с липосомами ясно указывает на неспецифический характер извлечения холестерина из биологических мембран фосфолипидными липосомами.

Исследование изменения абсолютного содержания определяемых компонентов в мембранах микросом (табл. 3) выявило увеличение содержания

Т а б л и ц а 3

Абсолютные изменения содержания белка, фосфолипидов, холестерина, цитохромов b_5 и $P-450$ в микросомах после инкубирования с липосомами из яичного фосфатидилхолина

Условия определения	Белок, мг	Фосфолипи- ды, мг	Холестерин, мг	Цитохром b_5 , нмоль	Цитохром $P-450$, нмоль
До инкубирования	100	$62 \pm 1,6$	$5,8 \pm 0,23$	$66 \pm 1,9$	$75 \pm 2,1$
После инкубирования	$95 \pm 0,9$	$75 \pm 4,0$	$5,3 \pm 0,23$	$50 \pm 1,3$	$50 \pm 1,7$
P		$<0,01$	$>0,1$	$<0,001$	$<0,001$

П р и м е ч а н и е. Даны средние значения и стандартные отклонения для 22 опытов. Результаты всех опытов пересчитаны на 100 мг белка микросом.

фосфолипидов на 21%, снижение содержания цитохромов b_5 и $P-450$ на 25 и 31% соответственно и незначительное снижение уровня белка и холестерина. Таким образом, уменьшение отношения холестерин/фосфолипиды в микросомах было преимущественно связано с увеличением содержания фосфолипидов.

Полученные результаты свидетельствуют, что применение специфического к холестерину сорбента или фосфолипидных липосом позволяет достигнуть истинного выведения холестерина из мембран эритроцитов, но не микросом. В первую очередь это может быть объяснено различной локализацией холестерина в мембранах теней эритроцитов и микросом. В мембране эритроцита большая часть холестерина присутствует во внешнем листке липидного бислоя [10] и поэтому доступна для липосом [11] и сорбента.

Топография холестерина в мембранах микросом неизвестна. Невозможность извлечения холестерина из мембран микросом может быть связана с его преимущественным расположением во внутреннем листке липидного бислоя этих мембран.

Для проверки этого предположения мы провели извлечение холестерина из микросом, в которые он был предварительно встроен из обогащенных хо-

лестеринном липосом. Вводимый в мембраны микросом холестерин должен был располагаться во внешнем листке бислоя [11] и быть доступным для извлечения. Инкубирование таких микросом с липосомами из фосфатидилхолина, действительно, сопровождалось снижением содержания холестерина в мембранах микросом при расчете как на фосфолипиды, так и на белок (табл. 4).

Т а б л и ц а 4
Извлечение холестерина из микросом, в которые предварительно был встроен холестерин, липосомами из яичного фосфатидилхолина

Условия определения	Холестерин/фосфолипиды, моль/моль	Холестерин/белок, масса/масса
До извлечения	$0,38 \pm 0,030$	$0,113 \pm 0,012$
После извлечения	$0,24 \pm 0,014$	$0,080 \pm 0,006$
<i>P</i>	$< 0,01$	$< 0,05$

П р и м е ч а н и е. Даны средние значения и стандартные отклонения для 6 опытов.

На основании полученных результатов можно утверждать, что сорбент МГУ-1 позволяет эффективно извлекать холестерин из плазмы крови и плазматических мембран клеток. Выведение холестерина из биологических мембран фосфолипидными липосомами не является избирательным.

Выражаем искреннюю признательность сотрудникам кафедры химической эизимологии МГУ — члену-корр. АН СССР И. В. Березину, кандидатам химических наук А. М. Егорову, А. В. Апаничеву и И. П. Андриановой за любезное предоставление специфичного к холестерину сорбента.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Лопухин Ю. М., Молоденков М. И. Гемосорбция. М., 1978.
2. Арчаков А. И., Бачманова Г. И., Блиндер Л. В. и др. — Биохимия, 1977, т. 42, с. 100.
3. Dodge J. T., Mitchell C., Hanahan D. J. — Arch. Biochem., 1963, v. 100, p. 119.
4. Barenholtz Y. — Biochemistry (Wash.), 1977, v. 16, p. 2806.
5. Folch J., Lees M., Stanley G. H. S. — J. biol. Chem., 1957, v. 226, p. 497.
6. Леменовская А. Ф., Коев Я. М., Перевозчикова К. М. и др. — Биохимия, 1976, т. 41, с. 1000.
7. Webster D. — Clin. chim. Acta, 1962, v. 7, p. 277.
8. Lowry O. H., Rosenbrough N. I., Farr A. L. et al. — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265.
9. Omura T., Sato R. — Ibid., 1964, v. 239, p. 2370.
10. Fisher K. A. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1976, v. 73, p. 173.
11. Brucdorfer K. A., Graham J. M. — In: Biological Membranes. Ed. D. Chapman, D. F. Wallach. London, 1976, v. 3, p. 103.

Поступила 14/V 1980 г.

ISOLATION OF CHOLESTEROL FROM ERYTHROCYTE SHADOWS, MICROSO- MES AND BLOOD PLASMA USING SPECIFIC SORBENT AND PHOSPHOLIPID LIPOSOMES

E. A. Borodin, V. I. Sergienko, E. M. Khalilov, A. I. Archakov, Yu. M. Lopukhin

N. I. Pirogov II Medical School, Moscow

A sorbent specific for cholesterol enabled to isolate effectively the substance from blood plasma and membranes of erythrocyte shadows. Cholesterol was not isolated from microsomal membranes neither with the sorbent MGU-1 nor by means of phospholipid liposomes. The phenomenon was apparently related to the localization of cholesterol on the inner surface of lipid bilayer of microsomal membranes.

А. И. Воскобоев, В. А. Аверин

СОДЕРЖАНИЕ СВОБОДНОГО И СВЯЗАННОГО ТИАМИНДИФОСФАТА В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ ОРГАНИЗМА ТИАМИНОМ

Отдел регуляции обмена веществ АН Белорусской ССР, Гродно

Для протекания ТДФ-зависимых ферментативных реакций важно соотношение свободной и связанной форм кофермента. Ранее нами при определении количества свободного и связанного тиаминадифосфата (ТДФ) в гиалоплазме печени крыс при различных B_1 -авитаминозных состояниях [1] было показано, что активность транскетолазы (один из ТДФ-зависимых ферментов) изменяется лишь с уменьшением белковосвязанного, а не свободного ТДФ. Характерно также, что при авитаминозе B_1 апоформа транскетолазы не накапливается. В отношении митохондрий, где локализованы системы окислительного декарбоксилирования α -кетокислот, у которых ТДФ тоже выступает в качестве кофермента, имеются аналогичные наблюдения [2, 3]. Инкубация нативных митохондрий в сахарозофосфатном буфере приводила к удалению 70% слабосвязанной формы ТДФ, однако это не сказывалось заметным образом на скорости окислительного декарбоксилирования. При инкубации митохондрий животных с дефицитом тиамина выведения слабосвязанной формы ТДФ не наблюдалось.

Считается, что при авитаминозе B_1 апоформа пируватдекарбоксилазы сохраняется [2, 4], поскольку добавка *in vitro* ТДФ приводит к нормализации ферментативной активности. Не исключено, однако, что ТДФ-эффект может быть связан с переходом неактивной формы пируватдегидрогеназного комплекса в активную [5].

Данная работа посвящена изучению динамики соотношения свободной и связанной форм ТДФ в митохондриях печени крыс при моделировании B_1 -авитаминозных и гипервитаминозных состояний.

Методика

Для создания пищевого авитаминоза крыс массой 140—160 г содержали на диете с дефицитом витамина B_1 в течение 30 дней [6]. Животных 1-й группы забивали через 5, 10, 15, 20, 25 и 30 дней содержания на диете. Животным 2-й группы через 30 дней авитаминоза вводили тиамин в дозе 2 мг на 100 г массы тела и забивали через 3 и 24 ч после инъекции. Состояние гипервитаминоза создавали введением тиамина в дозе 2, 4, 8, 10, 20 и 40 мг на 100 г массы тела.

Выделение митохондрий и определение свободной и связанной форм ТДФ. Животных декапитировали, печень перфузировали охлажденной 0,25 М сахарозой. Ткань продавливали через пресс и гомогенизировали в стеклянном стакане с тефлоновым пестиком. Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования в среде, содержащей 0,25 М сахарозу, 0,01 М трис-буфер, pH 7,4. Чистоту фракций контролировали под электронным микроскопом. Полученные митохондрии обрабатывали 0,4% тритоном X-100 и центрифугировали 30 мин при 80 000 g. Осадок отбрасывали, супернатант в объеме 1 мл наносили на колонку с сефадексом G-50, уравновешенную 0,01 М трис-HCl-буфером, pH 7,4. В элюируемых фракциях определяли белковосвязанный и свободный ТДФ ферментативным [8] и флюорометрическим [9] методами. В белковых фракциях определяли ТДФ после предварительной денатурации белка нагреванием или обработкой 10% ТХУ.

При проведении опытов с использованием тиазол-2- 14 C-тиамина животным вводили по 150 мкг меченого препарата и забивали их через 12 ч после инъекции. В этом случае митохондрии при выделении отмывали до исчезновения счета в промывной жидкости. Разделение на колонке с сефадексом проводили, как указано выше. В элюируемых фракциях определяли белок по Лоури [7] и измеряли радиоактивность на сцинтиляционном счетчике Марк-II (фирма «Nuclear chichago», CIIA).

Для качественного анализа метки объединенные фракции 1-го и 2-го пиков радиоактивности концентрировали и хроматографировали на бумаге в системе бутанол — этанол — вода (2 : 1 : 1) в течение 18 ч. В качестве метчиков использовали тиамин, ТДФ, ТТФ. После проявления хроматограмм пятна элюировали водой и определяли концентрацию веществ.

Выделение тиаминсвязывающего белка и определение активности. Митохондрии подвергали холодному осмотическому шоку по методу Нея и Хеппела [14]. Осадок

митохондрий суспендировали в 10-кратном объеме трис-НСI-буфера, рН 8,0, содержащего 30% сахарозу. К суспензии добавляли ЭДТА до концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ М и перемешивали 10 мин при 26 °С с последующим центрифугированием (20 000 g, 10 мин). Надосадок удаляли, а осадок ресуспендировали в охлажденном растворе, содержащем 0,01 М трис-буфер и $MgCl_2$ ($5 \cdot 10^{-1}$ М), оставляли на 10 мин в ледяной бане. После центрифугирования (см. выше) раствор, содержащий тиаминсвязывающий белок, концентрировали до объема 1 мл против полиэтиленгликоля. Связывание тиамина исследовали методом равновесного диализа. Для этого в камеру, разделенную мембраной, помещали с одной стороны белок, с другой трис-НСI-буфер, рН 7,2, содержащий ^{14}C -тиамин или ^{14}C -ТДФ. Диализ проводили при активном встряхивании. Измеряли радиоактивность в промежутке 5—24 ч. При определении тиаминсвязывающей активности методом гель-фильтрации белок обрабатывали 6 М мочевиной и после ее удаления инкубировали 60 мин при 26 °С в среде, содержащей 100 мкг ^{14}C -тиамина, Mg^{2+} в концентрации $2 \cdot 10^{-3}$ М. Смесь после инкубации наносили на колонку с сефадексом G-25, уравновешенную трис-НСI-буфером, рН 7,2, содержащим 50 мкг немеченого тиамина на 1 мл буфера. Элюцию вели исходным буфером.

Определение тиаминпирофосфокиназной активности в митохондриях печени крыс. Условия проведения реакции и концентрации ингредиентов описаны в работах [20]. Тиаминпирофосфокиназную реакцию проводили с интактными митохондриями, разрушенными тритоном X-100, заморозкой и оттаиванием в жидком азоте. В качестве ингибитора фосфатазной реакции использовали NaF в концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ М. Продукты реакции разделяли хроматографией на колонке с ДЭАЭ-сефадексом А-25 [21]. Определяли количество синтезированного ТДФ ферментативным и радиоизотопным методами.

В работе использовали препараты ТДФ фирмы «Ferak» (Западный Берлин), АТФ фирмы «Reanal» (Венгрия), полиэтиленгликоль фирмы «Merck» (ФРГ), [^{14}C -тиамин] — тиамин с удельной радиоактивностью 14 мКи/моль фирмы «Amersham» (Англия), сефадексы G-25, G-50 фирмы «Pharmacia» (Швеция). Все другие реактивы отечественного производства высокой степени чистоты.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены результаты разделения связанной и свободной форм ТДФ в митохондриях печени крыс после инъекции ^{14}C -тиамина. Видно, что количество связанной с белком метки составляет около 22%, а свободной—78%. Диализ фракций 1-го пика даже в течение 3 сут не приводил

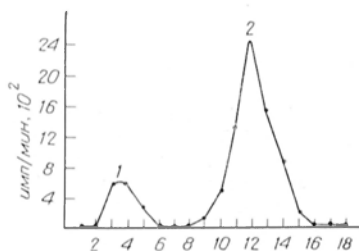


Рис. 1. Разделение связанной (1) и свободной (2) форм ТДФ в митохондриях печени крыс после инъекции ^{14}C -тиамина.

Здесь и на рис. 4 по оси абсцисс — номер фракции.

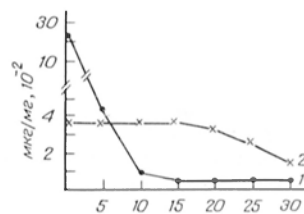


Рис. 2. Изменение уровня свободной (1) и связанной (2) форм ТДФ в митохондриях печени крыс в условиях пищевого В₁-авитаминоза.

По оси абсцисс — сутки эксперимента.

к отрыву метки, в то время как при диализе фракций 2-го пика уже через 3 ч наблюдалось динамическое равновесие по обе стороны мембраны. Полученные данные согласуются с результатами Кислинга [2, 3]. Хроматография депротенизированных фракций 1-го пика показала, что 98% радиоактивности составляет ТДФ, во фракциях 2-го пика его около 80%. Определение свободной и связанной форм ТДФ в дальнейшем производили тioxромным методом.

По аналогии с предыдущими исследованиями по содержанию ТДФ в гяалолазме крыс при пищевом авитаминозе [1] представляло интерес определить соотношение двух форм ТДФ в митохондриях. Из рис. 2 видно, что у интактных животных соотношение связанной и свободной форм ТДФ равно 1 : 4. Такая же величина получена с использованием метки. При авитаминозе в первую очередь понижается уровень свободной формы,

к 10-м суткам эксперимента он составляет 5%, к 20-м суткам — 1%. Содержание связанной формы ТДФ начинает уменьшаться только на 20-е сутки опыта. С этого периода отмечается снижение активности дегидрогеназы α -кетокислот [22].

В этой связи представляет интерес вопрос о том, сохраняется апоформа указанных выше ферментов или она деградирует, как и апотранскетолаза [1]. Имеющиеся данные о восстановлении активности дегидрогеназных комплексов α -кетокислот до нормы в короткий промежуток времени после введения тиамин крысам с гиповитаминозом или при инкубации митохондрий *in vitro* с ТДФ [2, 3] позволяют сделать вывод о возможности сохранения апоформы.

В результате наших исследований по определению свободной и связанной форм ТДФ у животных с авитаминозом спустя 3 и 24 ч после инъекции тиамин в дозе 2 мг на 100 г (рис. 3) показано, что количество связанного

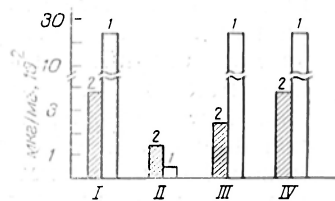


Рис. 3. Количество свободной (1) и связанной (2) форм ТДФ в митохондриях печени крыс.

I — в норме; II — после 30 дней В₁-авитаминоза; III — через 3 ч после введения тиамин; IV — через 24 ч после введения тиамин.

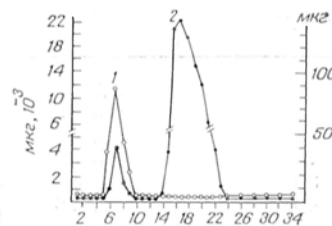


Рис. 4. Гель-фильтрация тиаминсвязывающего белка, полученного методом холодового шока.

1 — профиль элюции белка; 2 — профиль элюции ¹⁴C-тиамин.

ТДФ возрастает к 3 ч с 42 до 70% нормы. Исходя из того, что уровень свободной формы ТДФ восстанавливается уже к 3 ч после введения тиамин, можно утверждать, что после 30 дней авитаминоза сохраняется значительная часть апоформы. Восстановление содержания связанного с белком ТДФ к 24 ч до уровня в контроле связано, по-видимому, с наработкой апофермента *de novo*.

Оставался невыясненным вопрос о происхождении митохондриального ТДФ. Некоторые исследователи указывают на отсутствие тиаминпирофосфокиназы в этих органеллах [16, 19]. С другой стороны, имеются работы, в которых отмечается автономный синтез ТДФ в митохондриях, причем с более высокой скоростью, чем в гиалоплазме [15, 23]. Предпринятые нами попытки обнаружить биосинтез ТДФ в митохондриях печени крыс оказались безуспешными. Варьирование концентраций тиамин, АТФ, ионов Mg^{+2} и белка митохондрий, детекция продуктов реакции ферментативным и радиометрическим методами дали отрицательный результат. На этом основании был сделан вывод, что ТДФ поступает в митохондрии из растворимой части клеток, а также предположено наличие специфической транспортной системы. Косвенным доказательством существования такой системы у митохондрий послужили результаты опытов по определению уровня свободной и связанной форм ТДФ при нагрузке организма тиамин.

Как было показано ранее [1], введение крысам тиамин в дозе 2 мг на 100 г массы тела в норме приводит к увеличению содержания ТДФ на 100%, что свидетельствует об активном его биосинтезе в тиаминпирофосфокиназной реакции. Из таблицы видно, что при инъекции тиамин в дозе 2—40 мг на 100 г массы в митохондриях количество связанного ТДФ не увеличивается. При введении 40 мг тиамин на 100 г массы отмечено увеличение свободной формы в 2 раза при определении тиамин флюорометрическим методом. При проверке ферментативным методом и ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-сефадексе А-25 обнаружено увеличение в мито-

хондриях концентрации тиамин; содержание свободного ТДФ остается постоянным.

Полученные данные еще раз подтверждают, что синтеза ТДФ в митохондриях не происходит, а также то, что в митохондриях существует система, которая жестко контролирует поступление кофермента через мембрану.

В связи с этим нами была предпринята попытка выделить тиаминсвязывающий белок из митохондрий печени крыс. Такой белок был выделен

Содержание свободной и связанной форм ТДФ в митохондриях печени крыс при нагрузке организма тиаминном

Вводимая доза тиамина, мг на 100 г	ТДФ, связанная форма	ТДФ, свободная форма
	мкг на 1 мг белка	
Контроль	0,0380*	0,2260
2	0,0367	0,2410
4	0,0372	0,2395
8	0,0380	0,2298
10	0,0378	0,2370
20	0,0383	0,2430
40	0,0376	0,2470

* Для определения эффекта дозы в каждом конкретном случае использовали группу животных численностью 6—8 особей.

ранее из цитоплазматических мембран *Lactobacillus casei* [11], клеточной стенки *E. coli* [12], из белка куриных яиц [10]. Считается доказанным его важная роль в мембранном транспорте ТДФ.

На рис. 4 представлены данные по гель-фильтрации белкового препарата митохондрий, полученного методом холодового шока после предварительной инкубации с ^{14}C -тиамином. Видно, что метка с колонки элюируется двумя пиками. В 1-м представлен белковосвязанный тиамин, во 2-м — свободный.

Удельная тиаминсвязывающая активность составляет 0,088 нмоль на 1 мг белка, что соответствует данным для аналогичного препарата из *E. coli* [12]. Замена ^{14}C -тиамина на ^{14}C -ТДФ дает сходные результаты. Отсюда можно сделать вывод, что тиамин и его фосфорный эфир обладают одинаковым сродством к белку и, кроме того, что данный белок не может быть фрагментом пируватдегидрогеназного комплекса, поскольку последний связывает исключительно ТДФ. Тот факт, что повышение концентрации ТДФ в гиалоплазме не приводит к увеличению его содержания в митохондриях, дает основание полагать, что его поступление лимитируется и пассивный транспорт отсутствует. Можно допустить, что ТДФ переносится через мембраны митохондрий в результате реакции ТТФ→ТДФ обмена, как это было показано для адениловых нуклеотидов [13]. Считается также, что системы, осуществляющие транспорт посредством лигандсвязывающих белков, получают энергию для переноса преимущественно через энергию фосфатной связи [24]. Известно, что количество ТТФ в клетке постоянно и отклонение от нормы приводит к тяжелым заболеваниям [25]. Возможно, уровень ТТФ в гиалоплазме может служить лимитирующим фактором концентрации ТДФ в митохондриях. Дальнейшие исследования по очистке и изучению свойств тиаминсвязывающего белка из митохондрий и клеток печени позволят выяснить механизмы транспорта и перераспределения витамина B_1 в различных органах и тканях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Островский Ю. М., Воскобоев А. И., Гриценко Э. А. и др.— Прикладная биохим., 1979, № 5, с. 728.
2. Kiessling K. H., Lundquist C. G.— Exp. cell. Res., 1962, v. 26, p. 189.
3. Kiessling K. H., Lundquist C. G.— Ibid., 1962, v. 26, p. 198.
4. Takahachi K., Nakamura A., Nose Y.— J. Vitaminol., 1971, v. 17, p. 207.
5. Reed L. G., Pettit F. H., Roche T. E. et al.— In: Protein Phosphorylation in Control Mechanisms. New York, 1973, p. 83.
6. Nose Y., Takahachi K., Nakamura A.— J. nutr. Sci. Vitaminol., 1976, v. 22, p. 55.
7. Lowry R., Rosenbrough N. J., Farr A. L. et al.— J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265.
8. Ullrich J.— Meth. Enzymol., 1970, v. 18, p. 109.

9. Bessey O. A., Lowry O. H., Davis E.— J. biol. Chem., 1952, v. 195, p. 453.
10. Kalappogowda M., Radhakantha A.— Biochem. J., 1979, v. 177, p. 887.
11. Henderson G. B., Zevely E. M., Kander R. J. et al.— J. Supramol. Struct., 1971, v. 6, p. 239.
12. Nishino A.— Vitamins, 1976, v. 50, p. 365.
13. Reynafarye B., Lehninger A. L.— Proc. nat. Acad. Sci., USA, 1978, v. 75, p. 4788.
14. Nossal N. G., Heppel L. A.— J. biol. Chem., 1966, v. 24, p. 3055.
15. Лейс И. Ф.— В кн.: Витамины. Киев, 1976, вып. 9, с. 30.
16. Deus B., Blum H.— Biochim. biophys. Acta, 1970, v. 219, p. 489.
17. Cusaro G., Rindi G., Sciorelli G.— Int. J. Vitam. nutr. Res., 1977, v. 42, p. 99.
18. Cooper J. R., Kalyanpur S. G.— Pharmacologist, 1963, v. 5, p. 263.
19. Komai T., Kawai K., Shindo H.— J. nutr. Sci. Vitaminol., 1974, v. 20, p. 163.
20. Воскобоев А. И., Черников И. П., Островский Ю. М.— Прикладная биохим., 1975, № 2, с. 230.
21. Воскобоев А. И., Арцукевич И. М., Островский Ю. М.— Биохимия, 1978, т. 43, с. 460.
22. Якубчик Т. Н., Островский Ю. М.— Вопр. питания, 1978, № 1, с. 50.
23. Лейс И. Ф.— В кн.: Митохондрии. Биохимические функции в системе клеточных органелл. М., 1969, с. 151.
24. Oxender D. L., Quay S.— Ann. N. Y. Acad. Sci., 1975, v. 264, p. 358.
25. Pincus J. H., Solitare G. B., Cooper J. R.— Arch. Neurol. (Chic.), 1976, v. 33, p. 759.

Поступила 21/V 1980 г.

FREE AND BOUND THIAMINE PYROPHOSPHATE LEVEL IN RAT LIVER MITOCHONDRIA IN VARIOUS SATURATION OF THE BODY WITH THIAMINE

A. I. Voskoboyev, V. A. Averin

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

Content of free and bound thiamine pyrophosphate /TPP/ was measured by means of gel filtration and equilibrium dialysis procedures in mitochondria of normal rats, the rats under conditions of alimentary B₁ avitaminosis and loading with thiamine. The content of protein-bound TPP was stable and equal to 20% of its total level in the mitochondria of control rats and in the rats loaded with thiamine. The content of free form of TPP was decreased in B₁ avitaminosis; a severe form of the avitaminosis was accompanied by a decrease in content of the bound form. Concentration of the free form of TPP did not increase if the organism of the rats was loaded with thiamine. These data suggest existence of specific systems controlling the vitamin uptake in mitochondria. The active transport of thiamine across the mitochondrial membranes is considered as the most important process. Administration of the high doses of the vitamin led only to an increase in the non-coenzymatic form of the vitamin, indicating the absence of thiamine pyrophosphokinase in rat liver mitochondria. A possible mechanism of TPP transport in mitochondria is discussed.

УДК 615.277.3.015.4

А. Н. Кожухов

О БИОТРАНСФОРМАЦИИ ФТОРАФУРА

Институт органического синтеза АН Латвийской ССР, Рига

Химиотерапевтический механизм действия отечественного противоопухолевого препарата фторафура (ФТ) заключается в длительном высвобождении в организме опухоленосителя активного цитостатика — 5-фторурацила (5-ФУ) [1, 2]. В связи с этим в исследованиях по биохимическому превращению ФТ центральное место отведено изучению реакции биотрансформации препарата до 5-ФУ. В опытах *in vitro* показано, что в расщеплении псевдогликозидной связи С — N молекулы ФТ принимает участие микросомальная фракция печени [2, 3]. Кроме того, в эксперименте *in vivo* установлено, что после применения индуктора микросомальной НАДФ-Н-зависимой монооксигеназной системы печени наблюдается усиление цитостатического эффекта ФТ за счет повышения концентрации 5-ФУ в плазме крови животных-опухоленосителей [3]. Однако дальнейшие исследования в этом направлении связаны с трудностью экспериментального определения

скорости образования в организме 5-ФУ. В результате быстрого катаболизма и анаболизма 5-ФУ его количество в биологическом материале, взятом после введения ФТ экспериментальным животным, не отражает скорость биотрансформации препарата [4]. В настоящей работе изложен метод косвенного определения скорости псевдогликозидной связи С—N в молекуле ФТ и приведены данные по биотрансформации ФТ в условиях *in vivo*.

Методика

Опыты проводили на белых нелинейных крысах-самках массой 170—200 г. Использовали $2\text{-}^{14}\text{C}$ -ФТ, $2', 5'\text{-}^{14}\text{C}$ -ФТ и $2\text{-}^{14}\text{C}$ -5-ФУ с удельной радиоактивностью 2,8, 33,0 и 17,0 мкКи/мг соответственно. Препараты применяли однократно внутривенно в дозах: для ФТ — 150 мг/кг, для 5-ФУ — 15 мг/кг (количество введенной радиоактивности 11 мкКи/кг). В опытах с индуктором или ингибитором НАДФ·Н-зависимой монооксигеназной системы печени крысам предварительно вводили фенобарбитал (внутривенно, 3 дня по 80 мг/кг), растворенный в 0,02 н. NaOH, или CoCl_2 (подкожно, 2 дня по 20 мг/кг). Для изучения конкурентного ингибирования реакции разрыва связи С—N в молекуле ФТ крысам одновременно с $2', 5'\text{-}^{14}\text{C}$ -ФТ внутривенно вводили пиримидиннуклеозиды и нуклеотиды в дозах, эквивалентных дозе ФТ. Контрольной группе животных вводили эквивалентный объем 0,9% раствора NaCl. При изучении процесса экскреции экспериментальных животных помещали в обменные клетки «Симакс» фирмы «Kavalier» (ЧССР). Радиоактивность в моче и фекалиях определяли по методу [5], а в выдыхаемом воздухе — по методу [6] через 1, 2, 3, 6, 10, 16, 24 и 48 ч с момента введения препаратов. Для идентификации ФТ и 5-ФУ в моче использовали тонкослойную хроматографию в системе растворителей хлороформ — метанол (9 : 1) [7]. Радиоактивность определяли на сцинтилляционном счетчике «SL-30» фирмы «Intertechnique» (Франция) с коррекцией результатов на 100% эффективность счета. Содержание микросомального белка и цитохрома P_{450} в печени крыс оценивали по методам [8 и 9] соответственно.

Результаты и обсуждение

Данные об экскреции $2\text{-}^{14}\text{C}$ -ФТ и его метаболитов у крыс представлены в табл. 1. Видно, что в течение 48-часового периода выводится 93,5% от введенной дозы $2\text{-}^{14}\text{C}$ -ФТ, при этом через легкие выделяется 49,4%, через

Таблица 1

Кумулятивное выведение с мочой и выдыхаемым воздухом $2\text{-}^{14}\text{C}$ -ФТ и его метаболитов после однократного внутривенного введения препарата крысам

Время	Экскреция, % от введенной дозы			
	$^{14}\text{CO}_2$	$2\text{-}^{14}\text{C}$ -ФТ и его метаболиты с мочой	$2\text{-}^{14}\text{C}$ -ФТ с мочой	$2\text{-}^{14}\text{C}$ -5-ФУ с мочой
1	$4,0 \pm 0,2$	$5,0 \pm 0,2$	$3,9 \pm 0,3$	$0,09 \pm 0,01$
3	$11,8 \pm 0,6$	$13,2 \pm 0,5$	$9,8 \pm 0,6$	$0,24 \pm 0,02$
6	$23,0 \pm 1,1$	$25,5 \pm 1,0$	$18,4 \pm 1,2$	$0,54 \pm 0,04$
10	$37,5 \pm 1,8$	$32,5 \pm 1,4$	$23,1 \pm 1,5$	$0,73 \pm 0,05$
16	$42,1 \pm 2,0$	$38,1 \pm 1,7$	$26,7 \pm 1,7$	$0,92 \pm 0,07$
24	$44,9 \pm 2,0$	$40,5 \pm 1,9$	$28,3 \pm 1,8$	$1,01 \pm 0,07$
48	$49,4 \pm 2,5$	$42,6 \pm 1,9$	$29,6 \pm 2,0$	$1,10 \pm 0,09$

почки — 42,6% и с калом — 1,5%. Количество экскретируемого с мочой неизмененного $2\text{-}^{14}\text{C}$ -ФТ составляет примерно 30% от введенной дозы, остальная часть препарата расщепляется до $2\text{-}^{14}\text{C}$ -5-ФУ и подлежит дальнейшей биотрансформации. Поскольку выделение радиоактивности через легкие является эффективным показателем очищения организма после введения экзогенного $2\text{-}^{14}\text{C}$ -5-ФУ (табл. 2), очевидно, что и в случае $2\text{-}^{14}\text{C}$ -5-ФУ, образованного в результате метаболизма $2\text{-}^{14}\text{C}$ -ФТ, элиминации $^{14}\text{CO}_2$ является основным путем выведения радиоактивной метки (см. схему, а).

Лимитирующей стадией биотрансформации $2\text{-}^{14}\text{C}$ -ФТ *in vivo* является расщепление связи С—N в молекуле препарата ($\text{V}_{\text{ФТ} \rightarrow 5\text{-ФУ}}$), на что указывает низкая скорость элиминации $^{14}\text{CO}_2$ после введения крысам $2\text{-}^{14}\text{C}$ -ФТ

($V_{\text{ФТ} \rightarrow \text{CO}_2}$; см. табл. 1) по сравнению со скоростью образования $^{14}\text{CO}_2$ при биотрансформации 2- ^{14}C -5-ФУ ($V_{5\text{-ФУ} \rightarrow \text{CO}_2}$; см. табл. 2).

На рис. 1 приведены данные о влиянии индуктора (фенобарбитала) и ингибитора (CoCl_2) микросомальной НАДФ·Н-зависимой монооксигеназной системы печени крыс на скорость метаболизма 2- ^{14}C -ФТ до $^{14}\text{CO}_2$. Предвари-

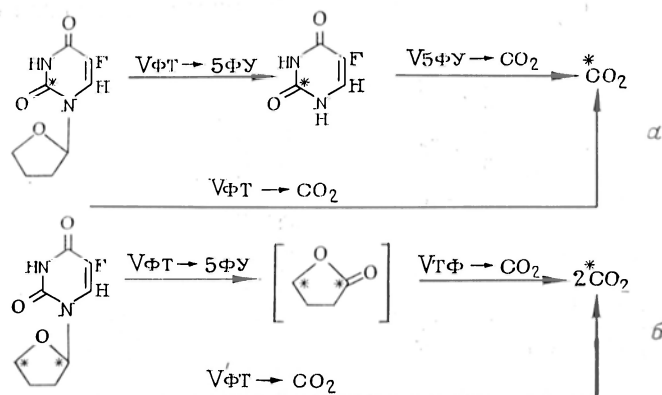


Схема биохимического окисления 2- ^{14}C -ФТ (а) и 2',5'- ^{14}C -ФТ (б).

тельная обработка экспериментальных животных фенобарбиталом в 1,9 раза увеличивает, а CoCl_2 — в 1,8 раза понижает $V_{\text{ФТ} \rightarrow \text{CO}_2}$ за начальный 10-часовой период после введения 2- ^{14}C -ФТ. В аналогичных условиях эксперимента не выявлено влияния фенобарбитала или CoCl_2 на скорость катаболизма экзогенно введенного 2- ^{14}C -5-ФУ до $^{14}\text{CO}_2$. Таким образом, $V_{\text{ФТ} \rightarrow \text{CO}_2}$ отражает любое изменение $V_{\text{ФТ} \rightarrow 5\text{-ФУ}}$ за счет индукции или депрессии ак-

Таблица 2

Кумулятивное выведение с мочой и выдыхаемым воздухом 2- ^{14}C -5-ФУ и его метаболитов после однократного внутривенного введения препарата крысам

Время, ч	Экскреция, % от введенной дозы		
	$^{14}\text{C}_2$	2- ^{14}C -5-ФУ и его метаболитов с мочой	2- ^{14}C -5-ФУ с мочой
1	23,2±1,8	3,0±0,2	0,85±0,06
2	47,8±2,9	5,2±0,2	1,15±0,08
3	67,9±3,7	8,3±0,5	1,30±0,09
6	71,0±3,9	10,0±0,6	1,48±0,10
10	72,5±4,4	14,1±0,7	1,59±0,12
16	73,2±4,6	15,5±0,7	1,61±0,14
24	73,8±4,6	16,1±0,7	1,61±0,14
48	74,8±5,0	17,3±0,8	1,61±0,14

Таблица 3

Кумулятивное выведение с мочой и выдыхаемым воздухом 2',5'- ^{14}C -ФТ и его метаболитов после однократного внутривенного введения препарата крысам

Время, ч	Экскреция, от введенной дозы		
	$^{14}\text{CO}_2$	2',5'- ^{14}C -ФТ и его метаболитов с мочой	2',5'- ^{14}C -ФС с мочой
1	3,6±0,2	7,0±0,4	4,0±0,3
3	9,1±0,5	15,3±0,8	10,1±0,6
6	19,2±1,2	24,5±1,4	18,0±1,1
10	31,4±1,7	31,0±1,8	23,0±1,4
16	37,0±2,0	35,5±1,9	26,5±1,7
24	47,1±2,3	38,8±2,0	28,3±1,8
48	53,0±2,4	41,1±2,1	29,4±2,1

тивности фермента, участвующего в расщеплении связи С—N молекулы 2- ^{14}C -ФТ.

Изменение скорости биотрансформации 2- ^{14}C -ФТ коррелирует с количественным изменением цитохрома P_{450} в микросомальной фракции печени крыс. Удельное содержание цитохрома P_{450} в печени экспериментальных животных, обработанных фенобарбиталом, составляет 224 %, обработанных CoCl_2 —57 % по отношению к контролю ($0,78 \pm 0,07$ мкмоль на 1 мг микросомального белка).

Полученные результаты свидетельствуют о прямой зависимости скорости активации 2- ^{14}C -ФТ до 2- ^{14}C -5-ФУ от функционального состояния НАДФ·Н-зависимой монооксигеназной системы эндоплазматического ре-

тикулума печени крыс. Тем не менее это не исключает участие других ферментных систем, в частности пиримидиннуклеозидфосфорилазы в разрыве псевдогликозидной связи С—N молекулы ФТ. Ранее было показано, что пиримидиннуклеозидфосфорилаза, ответственная за катаболизм природных и некоторых аномальных нуклеозидов [10], не расщепляет ФТ в условиях *in vitro* [1]. Однако открытие в опытах *in vivo* новых промежуточных метаболитов ФТ [11—13], обладающих более близким структурным сходством

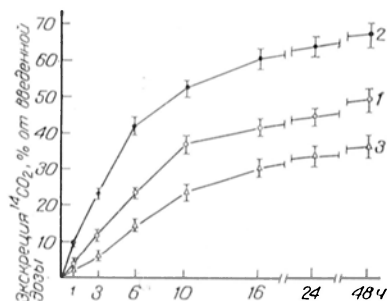


Рис. 1. Влияние фенобарбитала и CoCl_2 на скорость биотрансформации $2\text{-}^{14}\text{C}$ -ФТ до $^{14}\text{CO}_2$.

Здесь и на рис. 2 кривые образования $^{14}\text{CO}_2$: 1 — у интактной группы животных; 2 — у крыс после предварительного введения фенобарбитала (3 дня по 80 мг/кг); 3 — у крыс после предварительного введения CoCl_2 (2 дня по 20 мг/кг).

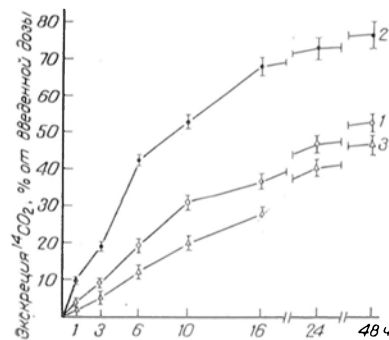


Рис. 2. Влияние фенобарбитала и CoCl_2 на скорость биотрансформации $2',5'\text{-}^{14}\text{C}$ -ФТ до $^{14}\text{CO}_2$.

с природными нуклеозидами, вновь выдвинуло проблему возможного участия пиримидиннуклеозидфосфорилазы в биотрансформации ФТ.

Для решения этого вопроса *in vivo* мы использовали меченный по тетрагидрофурановой части $2',5'\text{-}^{14}\text{C}$ -ФТ. Данные о кумулятивном выведении с мочой и выдыхаемым воздухом $2',5'\text{-}^{14}\text{C}$ -ФТ и его метаболитов после внутривенного введения препарата крысам представлены в табл. 3. Поскольку за 48-часовой период большая часть от введенной радиоактивности (53,0%) экскретируется в виде $^{14}\text{CO}_2$, очевидно, что биохимическое окисление затрагивает оба меченых углеродных атома тетрагидрофурановой группировки $2',5'\text{-}^{14}\text{C}$ -ФТ.

Реакция окисления тетрагидрофуранового остатка $2',5'\text{-}^{14}\text{C}$ -ФТ в организме экспериментальных животных ($V_{\text{ФТ} \rightarrow \text{CO}_2}$) следует за предварительным разрывом связи С—N в молекуле препарата (см. схему, б). Об этом свидетельствуют данные, приведенные на рис. 2. Увеличение или снижение $V_{\text{ФТ} \rightarrow 5\text{-ФУ}}$ за счет индукции (фенобарбиталом) или депрессии (CoCl_2) НАДФ·Н-зависимой монооксигеназной системы печени вызывает сходные изменения в скорости экскреции $^{14}\text{CO}_2$ после введения крысам $2',5'\text{-}^{14}\text{C}$ -ФТ ($V'_{\text{ФТ} \rightarrow \text{CO}_2}$).

Таким образом, скорость биотрансформации тетрагидрофурановой группировки $2',5'\text{-}^{14}\text{C}$ -ФТ до $^{14}\text{CO}_2$ отражает сдвиги в скорости разрыва псевдогликозидной связи С—N препарата. Следовательно, если пиримидиннуклеозидфосфорилаза или иной фермент нуклеинового обмена принимает участие в метаболизме ФТ до 5-ФУ, то совместное введение крысам $2',5'\text{-}^{14}\text{C}$ -ФТ и конкурентных ингибиторов этих ферментов должно привести к снижению скорости образования $^{14}\text{CO}_2$ по сравнению с контролем. Однако в наших опытах с одновременным введением экспериментальным животным эквивалентных доз $2',5'\text{-}^{14}\text{C}$ -ФТ и ряда субстратов, участвующих в нуклеиновом обмене (уридина, 2'-дезоксидуридина, цитозина, 2'-дезоксидцитозина, тимидина, УМФ, дУМФ, ЦМФ, дЦМФ, ТМФ, УДФ, дУДФ, ТДФ, УТФ, дУТФ, ТТФ), не найдено изменения скорости образования $^{14}\text{CO}_2$ по сравнению с контролем. Эти данные указывают на незначительную роль ферментов нуклеинового обмена в разрыве псевдогликозидной связи С—N молекулы ФТ *in vivo*. Обнаруженное в эксперименте *in vitro* расщепление одного из

промежуточных метаболитов препарата (4'-ОН-ФТ) под действием тимидинфосфорилазы до 5-ФУ [12], очевидно, составляет минорный путь биотрансформации ФТ in vivo.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мейрен Д. В., Урбанович Э. Л., Гилев А. П. и др. — В кн.: Экспериментальная и клиническая фармакотерапия. Рига, 1977, вып. 7, с. 44.
2. Cohen A. M. — Drug. Metab. Disposit., 1975, v. 3, p. 303.
3. Ohira S., Maezawa S., Watanabe K. et al. — Chemotherapy (Tokyo), 1975, v. 8, p. 197.
4. Wu A. T., Ichwandt H.-J., Finn C. et al. — Res. Commun. chem. Path. Pharmacol., 1976, v. 14, p. 89.
5. Mahin D. T., Lofberg R. T. — Analyt. Biochem., 1966, v. 16, p. 500.
6. Jeffay H., Alvarez Y. — Analyt. Chem., 1961, v. 33, p. 612.
7. Horowitz J. P., McCormick J. J., Pholips K. D. et al. — Cancer Res., 1975, v. 35, p. 1301.
8. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. М., 1971.
9. Schenkman J. B., Remmer H., Estabrook R. W. — Molec. Pharmacol., 1967, v. 3, p. 113.
10. Langen P. Antimetabolite des Nucleinsäure-Stoffwechsels. Biochemische Grundlagen der Wirkung. Berlin, 1968.
11. Au J. L., Wu A. T., Friedman M. A. et al. — Cancer Treatm. Rep., 1979, v. 63, p. 343.
12. Benvenuto I. A., Liehr I. G., Winkler T. et al. — Cancer Res., 1979, v. 39, p. 3199.
13. Wu A. T., Au J. L., Sadee W. — Ibid., 1978, v. 38, p. 210.

Поступила 21/V 1980 г.

BIOTRANSFORMATION OF FTORAFUR

A. N. Kozhukhova

Institute of Organic Synthesis, Academy of Sciences of the Latvian SSR, Riga

Biotransformation of ftorafur /FT/ was studied using 2-¹⁴C-ftorafur and 2;5'-¹⁴C-ftorafur. Both pyrimidine and tetrahydrofurane moieties of the FT underwent degradation to CO₂ in rats. The cleavage of the pseudoglycosidic bonds C-N and formation of 5-fluorouracil was one of the steps of the FT metabolism that limited the velocity of the whole biotransformation process. Liver tissue NADPH-linked monooxygenating system was shown to participate in the process. The data obtained suggest that the role of enzymes involved in metabolism of nucleic acids was not significant in the FT metabolism under the conditions studied in vivo.

УДК 612.397.2.014.46:612.452.018

И. В. Мосина

ВЛИЯНИЕ L-ДОФА НА НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

Рядом авторов показана существенная роль адренергических факторов в регуляции липидного обмена [1, 2]. В эксперименте установлено, что под влиянием адреналина и норадреналина увеличивается липолиз в жировой ткани [3, 4], повышается содержание холестерина и атерогенных липопротеидов в крови [5, 6].

Влияние на липидный обмен дофамина, также являющегося адренергическим медиатором, менее изучено. Некоторые авторы отметили способность предшественника биосинтеза L-ДОФА увеличивать содержание неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК) в крови экспериментальных животных и человека [7, 8].

L-ДОФА применяется для лечения болезни Паркинсона [9, 10]. Следует отметить, что в ряде случаев этому заболеванию предшествует атеросклероз сосудов головного мозга [11, 12]. Поэтому представляется важным изучение влияния L-ДОФА на липидный обмен, определенные изменения которого

могут увеличивать или, наоборот, уменьшать атеросклеротические изменения сосудов.

В данной работе изучалось действие L-ДОФА на некоторые показатели липидного обмена в опытах на интактных животных и в условиях экспериментальной гиперлипидемии.

Методика

Опыты проведены на мышах (20—25 г), крысах (180—220 г) и морских свинках-самцах (250—300 г). L-ДОФА вводили в дозе 100 мг/кг перорально в течение 8—45 дней. В опытах с тритоном WR-1339 препарат вводили дважды внутрибрюшинно за 24 ч до применения тритона и одновременно с ним. Тритон WR-1339 применяли в дозе 225 мг/кг внутрибрюшинно, адреналин — 1,5 мг/кг внутрибрюшинно, эуфиллин — 25 мг/кг внутрибрюшинно. L-ДОФА вводили перорально в течение 3 дней, последний раз за 30 мин до введения в опытах с адреналином и эуфиллином. Дексаметазон крысы получали в дозе 0,1 мг/кг внутримышечно в течение 9 дней. Гипофизэктомия у крыс осуществляли трансаурикально [13]. Полноту удаления гипофиза оценивали визуально. В опытах на крысах гиперлипидемию вызывали одновременным введением перорально холестерина 0,2 г, витамина D₂ 10 000 ЕД, сметаны 1,5 мл на животных массой 200 г в течение 3 нед. Морские свинки получали холестерин в дозе 0,3 г/кг с кормом в течение 6 нед. Острую токсичность L-ДОФА определяли в опытах на мышах. Пероральное введение препарата в дозе 4 г/кг не оказало токсического действия; ЛД₅₀ при внутрибрюшинном введении составило 2750 мг/кг. Содержание общего холестерина [14] и триглицеридов [15] определяли в сыворотке крови и печени, НЭЖК [16], 11-оксикортикостероидов (11-ОКС) [17] — в сыворотке крови. Полученные данные обрабатывали статистически [18].

Результаты и обсуждение

В опытах на интактных животных было установлено, что введение в течение 9 дней L-ДОФА мышам и морским свинкам приводило к снижению содержания холестерина и (или) триглицеридов в крови (табл. 1). Кроме

Таблица 1

Влияние L-ДОФА на содержание холестерина и триглицеридов при введении в течение 9 дней

Группа животных	Холестерин		Триглицериды	
	сыворотка, мг/100 мл	печень, мг/г	сыворотка, мг/100 мл	печень, мг/г
Мыши-самцы:				
интактные (30)	61,3±4,3	4,81±0,32	152,8±7,5	8,68±0,52
получавшие L-ДОФА (30)	47,3±5,7*	3,75±0,37	128,3±15,1*	7,83±0,97
Крысы-самцы:				
интактные (18)	41,8±1,92	3,01±0,06	64,0±2,2	8,4±2,48
получавшие L-ДОФА (20)	43,1±1,4	3,07±0,07	69,4±5,2	8,3±2,73
Морские свинки-самцы:				
интактные (6)	35,0±4,0	2,68±0,34	46,2±8,0	11,6±0,38
получавшие L-ДОФА (6)	29,5±4,4	2,30±0,12	17,5±3,0**	6,94±0,9**

Примечание. В скобках — число животных.

* $P < 0,05$.

** $P < 0,01$.

того, наблюдалась тенденция к снижению содержания холестерина и триглицеридов в печени этих животных.

Опыты на крысах показали, что введение L-ДОФА в течение 9 дней не оказало существенного влияния на уровень холестерина и триглицеридов у этих животных, однако отчетливо снизило содержание 11-ОКС в крови (см. рис. 1 и 2). Следует отметить, что при однократном введении L-ДОФА (100 мг/кг перорально) наблюдается увеличение уровня 11-ОКС в крови через 2 ч ($62,6 \pm 10,9$ мкг/100 мл против $27,6 \pm 3,6$ мкг/100 мл в контроле). У гипофизэктомизированных крыс не наблюдалось изменений концентрации 11-ОКС под влиянием L-ДОФА (см. рис. 1 и 2).

В условиях гиперлипидемии, развивающейся при введении тритона WR-1339 крысам, применение L-ДОФА обусловило задержку гиперлипидемии, уменьшило содержание холестерина и в меньшей степени триглицеридов

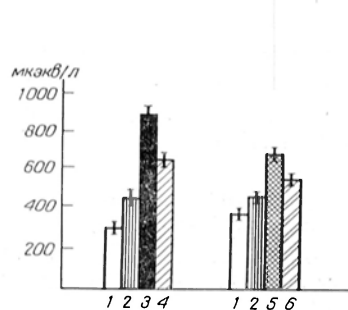


Рис. 1. Влияние L-ДОФА на содержание НЭЖК в сыворотке крови крыс (в мг/100 мл).

1 — физиологический раствор; 2 — L-ДОФА; 3 — адреналин; 4 — адреналин + L-ДОФА; 5 — зэфиллин; 6 — зэфиллин + L-ДОФА.

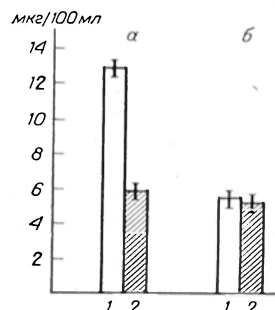


Рис. 2. Влияние L-ДОФА на содержание 11-ОКС в сыворотке крови крыс (в мг/100 мл).

а — интактные животные: 1 — физиологический раствор, 2 — L-ДОФА; б — гипофизэктомизированные животные: 1 — физиологический раствор, 2 — L-ДОФА.

дов в крови. В опытах с введением дексаметазона крысам наблюдалось увеличение содержания холестерина и триглицеридов. В этих условиях под влиянием L-ДОФА отмечено отчетливое снижение уровня этих липидных компонентов в сыворотке крови (табл. 2).

Т а б л и ц а 2

Влияние L-ДОФА на липидные показатели при различных видах гиперлипидемий

Группа животных	Холестерин			Триглицериды	
	сыворотка, мг/100 мл	печень, мг/г	аорта, мг/г	сыворотка, мг/100 мл	печень, мг/г
Крысы-самцы:					
контроль (12)	43,6±2,88	—	—	63,3±10,8	—
тритон (13)	169±11,5	—	—	382±28,8	—
тритон + L-ДОФА (13)	57,6±9,9**	—	—	238±12,6**	—
Крысы-самцы:					
контроль (7)	60,2±1,8	3,74±0,13	—	57,0±6,3	6,3±0,37
дексаметазон (9)	92,0±4,8	4,85±0,16	—	132±3,6	11,8±0,3
дексаметазон + L-ДОФА (9)	60,3±3,9*	3,48±0,75	—	87,5±5,2**	7,2±0,63
Крысы-самцы:					
контроль (9)	65,0±4,2	2,68±0,14	—	89,1±15,1	7,26±0,88
специальная диета + L-ДОФА (9)	85,8±3,8*	3,06±0,14	—	96,0±12,9**	10,6±0,78
специальная диета (9)	106±5,5	3,49±0,16	—	166±16,8	12,9±1,22
Морские свинки-самцы:					
контроль (9)	58,2±2,6	2,43±0,55	1,70±0,08	64,4±3,1	7,49±0,29
холестерин (9)	297±13,2	10,2±0,21	2,71±0,16	257±18,0	21,5±0,75
холестерин + L-ДОФА (9)	114±9,0**	5,18±0,19**	2,14±0,01	191±8,4*	18,3±1,29

* $P < 0,05$. ** $P < 0,01$.

Примечание. В скобках — число животных.

В следующей серии опытов на крысах, получавших диету, содержащую холестерин, сметану и витамин D₂, отмечено повышение содержания холестерина и триглицеридов в сыворотке крови и печени и гиполлипидемическое действие L-ДОФА. При введении холестерина морским свинкам в течение 45 дней было показано возрастание уровней холестерина и триглицеридов

сыворотки крови и печени. Под влиянием L-ДОФА наблюдался значительный гиполипидемический эффект (см. табл. 2).

Таким образом, полученные данные показали, что L-ДОФА оказывает гиполипидемическое действие в условиях экспериментальных гиперлипидемий, вызванных разными способами.

Для выяснения влияния L-ДОФА на липолиз были проведены опыты с определением содержания НЭЖК в крови интактных крыс и в условиях стимуляции липолиза введением адреналина или эуфиллина. Как видно из рисунков, содержание НЭЖК в сыворотке крови крыс, получавших L-ДОФА, было увеличено. Однако стимулированный адреналином липолиз достоверно угнетался под влиянием L-ДОФА. Менее выраженный эффект L-ДОФА наблюдался при стимуляции липолиза, вызванного эуфиллином.

Обобщая полученные данные, необходимо отметить, что действие предшественника биосинтеза катехоламинов L-ДОФА на изученные показатели обмена липидов существенно отличаются от эффектов как адреналина, так и норадrenalина. В то же время L-ДОФА, как и катехоламины, обладает способностью увеличивать уровень НЭЖК в крови интактных животных. Как отмечалось выше, применение этого препарата у человека также сопровождается увеличением содержания НЭЖК в крови. Обращает внимание способность препарата при хроническом применении угнетать функцию гипоталамико-адреналовой системы. В то же время при однократной инъекции L-ДОФА крысам наблюдалось достоверное увеличение уровня 11-ОКС в крови. По-видимому, для проявления угнетающего действия препарата на гипоталамические центры регуляции секреции АКТГ необходимо накопление определенного уровня дофамина, который, как известно из литературы, ингибирует систему гипоталамуса — кора надпочечников [14].

Тот факт, что L-ДОФА снижает степень экспериментальной гиперлипидемии, является положительным свойством препарата, особенно при применении его в клинике у больных болезнью Паркинсона.

ЛИТЕРАТУРА

1. George R., Ramasarma T.— Biochem. J., 1977, v. 162, p. 493—499.
2. Wenke M.— Advanc. Lipid Res., 1966, v. 4, p. 69—105.
3. Высоцкий Р. Я., Лиенкалне Д. П., Мелзобс М. Я.— Изв. АН Латв. ССР, 1975, № 1, с. 59—61.
4. Himms-Hagen J.— In: Handbook of Experimental Pharmacology. Berlin, 1972, v. 33, p. 369—482.
5. Margolis S., Capuzzi D.— In: Blood Lipids and Lipoproteins. Ed. G. Nelson. New York, 1972, p. 825—880.
6. Попов А. В. О значении симпатoadреналовой системы и функционального состояния щитовидной железы в патогенезе нарушений липидного обмена и экспериментального атеросклероза. Автореф. дис. канд. Л., 1968.
7. Nervonen R., Vapaatalo H., Westerman E.— Acta pharmacol. (Kbh.), 1971, v. 29, Suppl. 4, p. 40.
8. Pinter E. J., Tolis G.— In: International Symposium on Atherosclerosis. 3-d. Abstracts. Berlin, 1973, N 333.
10. Столярова А. Т., Кистенев Б. А.— Ж. невропатол. и психиатр., 1973, № 2, с. 199—205.
11. Грбеза Б., Величович А.— Венгерская фармакотер., 1977, № 3, с. 106—108.
12. Олейник Л. И.— В кн.: Лекарственная терапия в пожилом и старческом возрасте. Киев, 1968, с. 364.
13. Федотов В. П., Баграмян Э. Р.— Пробл. эндокринолог., 1968, № 4, с. 114—117.
14. Bregdon J. H.— In: Lipids and the Steroids Hormones in Clinical Medicine. Philadelphia, 1960, p. 6.
15. Nery B., Frings C.— Clin. Chem., 1973, v. 19, p. 1201.
16. Itaya K., Ui M.— J. Lipid Res., 1965, v. 6, p. 16.
17. Панков Ю. А., Усватова И. Я.— В кн.: Методы исследования некоторых гормонов и медиаторов. М., 1965, с. 137—145.
18. Бельский М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Л., 1963.

Поступила 5/VI 1980 г.

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

L-DOPA, which is a metabolic precursor of catecholamines, reduced the manifestations of hyperlipidemia developed in animals after administration of Triton WR-1339, dexametasone or cholesterol. At the same time, L-DOPA decreased the rate of lipolysis, induced by adrenaline injection, as well as the content of 11-hydrocorticosteroids in blood plasma.

УДК 576.858.75.098.396.095.18:615.281.8

Г. А. Галегов, А. С. Владыко, Г. Л. Линицкая, В. М. Шобухов

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ СОЛЯНОКИСЛЫХ АМАНТАДИНА (1-АМИНОАДАМАНТАНА И РЕМАНТАДИНА (α -МЕТИЛ-1-АДАМАНТАНМЕТИЛАМИНА) НА ОБРАЗОВАНИЕ БЕЛКОВ ВИРУСА ГРИППА А

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

Каркасная структура углеводов ряда адамантана играет фундаментальную роль в обеспечении противогриппозной активности двух практически значимых препаратов — амантадина и ремантадина. Наличие незамещенной аминогруппы в этих препаратах также определяет их антигриппозную активность [1].

В последние годы были предприняты принципиальные исследования, указывающие на способность этих соединений ингибировать синтез вирусспецифических макромолекул. В ходе исследований по изучению действия этих соединений на репродукцию вируса гриппа было установлено, что амантадин проявляет свою активность главным образом в условиях его введения до инфицирования клеток вирусом гриппа. В аналогичных условиях отмечается и более выраженное ингибирование ремантадина и вместе с тем оно сохраняется при добавлении препарата через 1, 2 и даже 3 ч после инфицирования, т. е. в те сроки, когда эффект амантадина фактически отсутствует [1—5].

Таким образом, несмотря на существенное сходство, в характере антигриппозного действия у амантадина и ремантадина наблюдаются выраженные различия. В плане дальнейшего развития этого вопроса мы изучали действие этих препаратов на образование вирусспецифических белков в сравнительном аспекте.

М е т о д и к а

В работе использовали 48-часовую культуру первично трипсицизированных фибробластов эмбрионов кур. В качестве инфекционного материала служил вирус гриппа А (классической чумы птиц, штамм Вейбридж (H₁N₁)). Инфекционный титр определяли методом бляшек под агаровым покрытием. Множественность инфицирования 10—15 БОЕ/клетка. Для определения внутриклеточных гемагглютининов клетки после трехкратного замораживания и оттаивания в 1 мл физиологического раствора центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин при температуре 5°C. Супернатант использовали для количественного определения гемагглютининов с помощью титрования по обычной методике. Анализ белков инфицированных клеток проводили с помощью электрофореза в 7—13% полиакриламидном пластинчатом геле, содержащем додецилсульфат натрия. Система буферных растворов была аналогична таковой по методу Лэммли [6]. Подробно условия электрофореза описаны ранее [7, 8]. По завершении электрофореза гелевую пластину высушивали и подвергали автордиографии. Сканирование радиоавтографов осуществляли в хромоскане фирмы «Joyce Loeble» модель 200/201 в видимом свете с использованием красного фильтра. Активность вирусиндуцированной РНК-зависимой РНК-полимеразы определяли по описанному ранее методу [9, 10]. В качестве источника фермента использовали микросомальную фракцию, полученную после высокоскоростного дифференциального центрифугирования. Количество белка в пробах определяли по методу Лоури [11]. Концентрация ремантадина и амантадина равнялась 50 мкг/мл. Статистическую обработку получен-

ных данных проводили методом рангов с использованием критерия Вилкоксона [12]. Различия в действии амантадина и ремантадина считали достоверными при $P < 0,05$.

Ремантадин (α -метил-1-адамантанметиламин солянокислый) и амантадин 1-аминоадамантан солянокислый, синтезированные в Институте органического синтеза АН Латвийской ССР и в Киевском политехническом институте, любезно представлены Я. Ю. Полисом, А. Г. Юрченко и С. Д. Исаевым. Актиномицин D фирмы «Calbiochem» АТФ, ГТФ, ЦТФ — фирмы «Serva», H^3 -УТФ (удельная активность 25 ки/ммоль) — СССР ^{14}C -белковый гидролизат хлореллы (1000 мкКи/мл) — фирмы «IIVVVR», Чехословакия.

Результаты и обсуждение

Как следует из данных, приводимых на рис. 1, амантадин и ремантадин в условиях одноциклового опыта эффективно подавляют репродукцию вируса гриппа, в первую очередь в условиях предварительного введения. Мень-

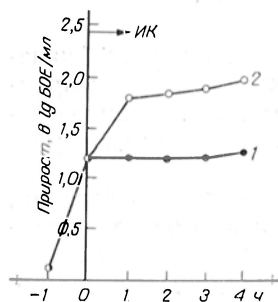


Рис. 1. Сравнительное ингибирующее действие амантадина и ремантадина на инфекционный титр вируса гриппа А. Результаты через 7 ч после инфицирования.

Стрелка (ИК) — величина инфекционного титра в контрольных культурах. 1 — ремантадин, 2 — амантадин. По оси абсцисс — время введения препаратов, по оси ординат — величина инфекционного титра.

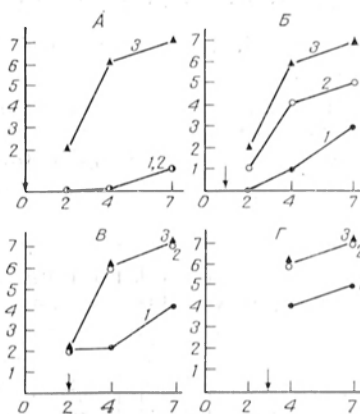


Рис. 2. Влияние амантадина и ремантадина на динамику образования внутриклеточных гемагглютининов.

А, Б, В — введение препаратов непосредственно, через 1, 2 и 3 ч после инфицирования. 1 — ремантадин; 2 — амантадин; 3 — инфицированная культура. По оси абсцисс — срок после инфицирования (в ч), по оси ординат — титр гемагглютининов в лг.

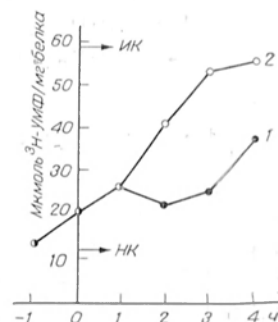


Рис. 3. Влияние амантадина и ремантадина на индукцию вирусспецифической РНК-полимеразы в культуре клеток, инфицированных вирусом гриппа А.

Нижняя стрелка (НК) — уровень ферментативной активности в неинфицированных культурах, без препаратов; верхняя стрелка (ИК) — уровень ферментативной активности в инфицированных культурах, без препаратов; учет активности фермента через 5 1/2 ч после инфицирования. По оси абсцисс — время введения препаратов, по оси ординат — удельная активность.

шее, но выраженное ингибиторное действие сохраняется и при введении препаратов непосредственно после заражения. Однако в последующем действие ремантадина продолжает оставаться на предыдущем уровне, в то время как действие амантадина значительно снижается, вплоть до отсутствия эффекта. Следует отметить, что ингибиторный эффект ремантадина сохраняется даже в том случае, если его добавлять через 4 ч после заражения клеток.

Результаты сравнительного действия двух препаратов на формирование внутриклеточных гемагглютининов (рис. 2) показывают, что, несмотря на односторонний ингибиторный эффект двух препаратов в условиях их введения непосредственно после заражения, ингибиторное действие ремантадина продолжает сохраняться при его добавлении и в последующие часы после инфицирования, в частности после первого и второго часов инфекции.

На рис. 3 показано сравнительное действие амантадина и ремантадина на индукцию РНК-зависимой РНК-полимеразы. Из него следует, что ингибирующий эффект амантадина имеет место в условиях введения препарата

до инфицирования, непосредственно после него и через 1 ч после заражения. Эффект препарата при введении в последующие часы значительно снижается. С другой стороны, у ремантадина ингибирование индукции РНК-полимеразной активности продолжает наблюдаться в условиях введения препарата через 1, 2 и 3 ч, после инфицирования.

На рис. 4 (см. вклейку) и 5 показано образование вирусспецифических белков вируса гриппа (полипептидов) в ходе их электрофоретического разделения в условиях присутствия амантадина и ремантадина, которые вводились в разные часы после инфицирования. Как следует из приводимой электрофореграммы (рис. 4), в пробах из инфицированных клеток выявляются новые полосы ^{14}C -белков (A_2), которые отсутствуют в пробе, получен-

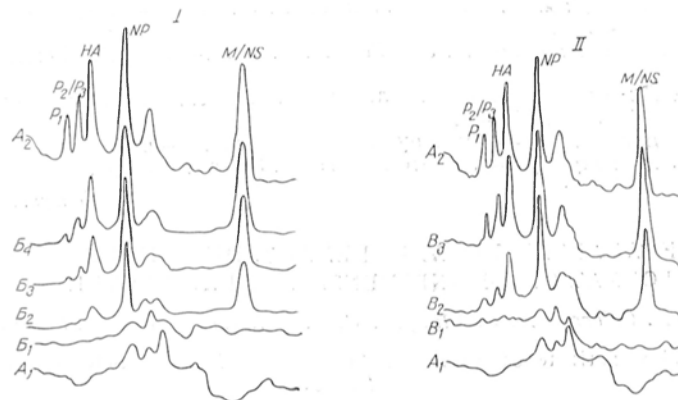


Рис. 5. Образование полипептидов в клетках, инфицированных вирусом гриппа.

Денситограммы авторадииограмм, представленных на рис. 4:
I — в присутствии ремантадина, II — в присутствии амантадина.

ной из неинфицированных клеток (A_1). На авторадииограмме показано, что предварительное инфицирование введением двух препаратов вызывает полное подавление синтеза вирусспецифических полипептидов (B_1 , B_1). При введении препаратов непосредственно после инфицирования наблюдалось существенное подавление под действием ремантадина синтеза белков, которое было крайне незначительным в аналогичной пробе с амантадином (B_2 , B_2). При введении ремантадина через 1, 2 и даже 3 ч отмечалось выраженное подавление синтеза вирусспецифических полипептидов, которое уже не имело места в случае с амантадином.

Приведенные на рис. 5 результаты сканирования полученных авторадииограмм также подтверждают данные, представленные на рис. 4.

Полученные нами результаты позволяют обнаружить и сходство, и различия в действии ремантадина и амантадина на репродукцию вируса гриппа и образование вирусспецифических белков. Обращает на себя внимание тот факт, что ингибирующее действие препаратов в условиях их раннего введения может быть объяснено их способностью ингибировать депротенинизацию («раздевание») проникших в клетку частиц вируса гриппа [13, 14]. В этом случае становятся невозможными синтез комплементарных РНК вируса гриппа (плюс цепей) и последующая их трансляция, в ходе которой синтезируются вирусспецифические белки.

Наблюдаемая нами способность ремантадина подавлять образование белков вируса гриппа в условиях его добавления через 1 и 2 ч после инфицирования и практически отсутствие такого эффекта у амантадина показывают, что ремантадин проявляет антигриппозное действие также после завершения процесса депротенинизации и, по-видимому, синтеза комплементарных РНК.

Таким образом, ремантадин может действовать в условиях данной конкретной системы в течение значительной части цикла репродукции вируса гриппа.

1. Hoffman C. E.— In: Selective Inhibitors of Viral Infections. Cleveland, 1973, p. 199—211.
2. Galegov G. A., Pushkarskaya N. L., Lavrov S. V.— Lancet, 1967, v. 18, p. 1006.
3. McGahen J. W., Neumayer E. M., Grunert R. R. et al.— Ann. N. Y. Acad. Sci., 1970, v. 173, p. 557—567.
4. Indulen M. K., Kalnina V. A.— Acta virol., 1973, v. 17, p. 273—280.
5. Skehel J. J., Hay A. J., Armstrong J. A.— J. gen. Virol., 1978, v. 38, p. 97—110.
6. Laemmly U. K.— Nature, 1970, v. 227, p. 680—685.
7. Журнов О. П., Букринская А. Г.— Вopr. вирусол., 1977, № 5, с. 571—577.
8. Яцына А. А. Исследование механизма антигриппозного действия ремантадина (солянокислого α -метил-1-адамантанметиламина). Дис. канд. М., 1979.
9. Mahy B. W. J., Bromley P. A.— J. Virol., 1970, v. 3, p. 259—268.
10. Галегов Г. А., Яцына А. А., Луницкая Г. Л. и др.— Биохимия, 1976, т. 41, № 12, с. 2237—2239.
11. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. et al.— J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265—275.
12. Урбах В. Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. М., 1975, с. 110—116.
13. Kato N., Eggers H. J.— Virology, 1969, v. 37, p. 632—641.
14. Koff N. S., Knight V.— J. Virol., 1979, v. 31, p. 261—263.

Поступила 23/VI 1980 г.

EFFECT OF AMANTADINE AND REMANTADINE HYDROCHLORIDES ON FORMATION OF INFLUENZA A VIRAL PROTEINS

G. A. Galegov, A. S. Vladyko, G. L. Linitskaya, V. M. Shobukhov

D. I. Ivanovsky Institute of Virology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Inhibitory effect of amantadine /1-amino adamantane/ and remantadine / α -methyl-1-adamantane methylamine/ hydrochlorides on reproduction of influenza A virus as well as, in particular, on formation of virus specific proteins was studied in cell culture. These drugs were dissimilar; they resembled each other in the patterns of their effect as a function of the course of administration into the cells infected with the virus. Both preparations inhibited the synthesis of virus specific proteins exhibiting distinct effects under conditions of preliminary or immediate administration following the infection. At the same time, the inhibitory properties of remantadine were maintained at the subsequent period after infection; these were not observed in the amantadine treatment.

УДК 616-008.922.1-008.64-053.31-092.9-085.31:547.963.32

Ю. А. Юрков, В. В. Алатырцев, О. Д. Кузьминов

К ВОПРОСУ ОБ ЭФФЕКТИВНОСТИ И МЕХАНИЗМАХ ПРОТИВОГИПОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ АТФ НА ОРГАНИЗМ НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫСЯТ

Научно-исследовательский институт педиатрии АМН СССР, Москва

Экспериментальные исследования, выполненные на взрослых крысах, свидетельствуют о высокой эффективности противогипоксического действия однократных больших доз АТФ [1, 2]. Однако особенности влияния этого соединения на устойчивость новорожденных животных к гипоксии до настоящего времени изучены еще крайне недостаточно. В литературе имеется сообщение о том, что в результате профилактического введения АТФ в кровь у новорожденных крысят уменьшается степень ацидоза, вызываемого прерывистой кратковременной гипоксией [3].

Полученные за последние годы данные позволяют предполагать, что плазматические мембраны эритроцитов непроницаемы для экзогенной АТФ [4, 5]. Вместе с тем на внутриклеточный обмен веществ могут оказывать влияние продукты ее расщепления [4—7]. В частности, аденозин и неорганический фосфат — соединения, образующиеся при распаде АТФ, способны проникать в клетки и включаться в реакции синтеза адениловых нуклеотидов и гликолиза. В серии опытов на эритроцитах человека [8], крысы, кро-

лика [9, 10] установлено, что добавление к инкубационной среде аденозина и P_n может приводить к повышению внутриэритроцитарной концентрации АТФ и 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ). Последние фосфоорганические соединения, как известно, играют важную роль в процессах адаптации к гипоксии, участвуя в механизмах регуляции кислородно-транспортной функции гемоглобина [11].

В настоящей работе поставлена задача изучить эффективность влияния экзогенной АТФ на резистентность новорожденных крысят к острой гипоксии и выяснить характер ее воздействия на содержание АТФ и 2,3-ДФГ в эритроцитах при физиологических условиях и острой гипоксии.

М е т о д и к а

Экспериментальные исследования проводили на 386 новорожденных крысятах линии Вистар 5—7 дней жизни со средней массой 13,5 г. Поставлены три серии опытов. В каждой серии в контроле и опыте использовали новорожденных одного помета.

Животных I серии испытывали на устойчивость к острой гипоксии по времени остановки дыхания после предварительного внутривентриального введения однократной дозы АТФ. Одной группе животных (20 крысят) АТФ вводили в дозе 20 мг/кг, другой (19 крысят) — 100 мг/кг. Контрольным крысятам, число которых соответствовало числу подопытных, инъекцировали физиологический раствор в том же объеме. Спустя 50—60 мин после инъекций животных помещали в прогретую до 30 °С камеру из органического стекла, в которую затем подавалась гипоксическая смесь (2% O_2 + 98% N_2). Содержание кислорода в камере достигало 2% через 25 мин после начала подачи газовой смеси.

Во II и III серии опытов исследовали влияние АТФ в дозе 100 мг/кг на содержание 2,3-ДФГ и АТФ в эритроцитах, а также кислотно-щелочной баланс крови у крысят при физиологических условиях и воздействии на животных острой гипоксии. Крысят II серии содержали в камере при 30 °С в условиях дыхания воздухом. Кровь получали путем декапитации, от животных первой группы — спустя 1 ч 10 мин, от животных второй — 1 ч 40 мин после введения АТФ. Крысят III серии подвергали острой гипоксии по методике, описанной выше. В этой серии также исследовали 2 группы животных, из которых одна находилась в условиях гипоксии в течение 15 мин, а другая — в течение 35 мин. Время, прошедшее от момента введения АТФ крысятам до взятия крови в III серии, было близко к таковому во II серии исследований.

Эритроциты выделяли сразу после забора крови в 20 объемах 0,9% NaCl с гепарином путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 10 мин при 2 °С. В целях получения необходимого для анализа количества эритроцитов объединяли пробы крови от 2 крысят. Белки эритроцитов денатурировали 0,6 н. $HClO_4$ в соотношении 1 : 4 и осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 3000 об/мин. Содержание 2,3-ДФГ и АТФ в нейтрализованном супернатанте определяли спектрофотометрическим микрометодом, используя наборы фирмы «Boehringer, Mannheim GMBH» и оптическую приставку по А. А. Покровскому [12]. Число эритроцитов в осадке подсчитывали на целлюлозно-микрометодом.

Показатели кислотно-щелочного баланса крови определялись на аппарате микро-Астрон.

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

При введении АТФ в дозе 20 мг/кг продолжительность жизни крысят в условиях гипоксии составляла в среднем $41 \pm 1,4$ мин, а у контрольных животных — $38 \pm 2,0$ мин. Различия по времени остановки дыхания между подопытными и контрольными крысятами в 3 мин было статистически недостоверно ($P > 0,02$). При введении АТФ в дозе 100 мг/кг продолжительность жизни у подопытных и контрольных крысят составляла соответственно $46 \pm 1,5$ и $41 \pm 1,2$ мин. Выживаемость подопытных крысят по сравнению с контрольными увеличивалась на 5 мин ($P < 0,02$).

В эритроцитах контрольных крысят отношение между содержанием 2,3-ДФГ и АТФ равнялось в среднем 2,2 (табл. 1, 2). Это соответствует литературным сведениям о более низком содержании 2,3-ДФГ и высоком содержании АТФ в эритроцитах новорожденных крысят по сравнению с эритроцитами взрослых животных, у которых коэффициент 2,3-ДФГ/АТФ близок к 5 [13].

У подопытных крысят II серии через 1 ч 10 мин после введения АТФ содержание 2,3-ДФГ в эритроцитах повышалось на 19% ($P < 0,02$), тогда как содержание АТФ оставалось без изменений. Спустя 1 ч 40 мин после инъекции АТФ содержание 2,3-ДФГ снижалось до уровня этого метаболита у

контрольных животных, а содержание АТФ увеличивалось на 26 % ($P < 0,02$).

Статистически достоверных различий между содержанием 2,3-ДФГ и АТФ в эритроцитах у контрольных и подопытных животных, подвергнутых гипоксии в течение 15 мин (III серия опытов), не было обнаружено (табл. 2). Однако следует отметить, что средний уровень 2,3-ДФГ у подопытных животных на 16 % превышал его уровень у контрольных крысят. У подопытных и контрольных животных, под-

Т а б л и ц а 1

Влияние АТФ на содержание в эритроцитах у новорожденных крыс 2,3-ДФГ и АТФ ($M \pm m$)

Исследуемая группа	2,3-ДФГ	АТФ
	ммоль на 10^{12} эритроцитов	
Контрольная	$0,62 \pm 0,030$ (17)	$0,28 \pm 0,016$ (17)
Опытная (через 1 ч. 10 мин после введения АТФ)	$0,74 \pm 0,041$ (17) $P < 0,02$	$0,29 \pm 0,012$ (17)
Контрольная	$0,69 \pm 0,066$ (11)	$0,31 \pm 0,015$ (12)
Опытная (через 1 ч. 40 мин после введения АТФ)	$0,69 \pm 0,059$ (11)	$0,39 \pm 0,024$ (12) $P < 0,02$

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

Т а б л и ц а 2

Влияние АТФ на содержание 2,3-ДФГ и АТФ в эритроцитах у новорожденных крыс при острой гипоксии

Исследуемая группа	2,3-ДФГ	АТФ
	ммоль на 10^{12} эритроцитов	
Контрольные (интактные животные)	$0,68 \pm 0,066$ (10)	$0,28 \pm 0,024$ (10)
Контрольная (гипоксия 10 мин)	$0,66 \pm 0,055$ (10)	$0,29 \pm 0,023$ (10)
Опытная (гипоксия 15 мин)	$0,77 \pm 0,051$ (10)	$0,31 \pm 0,017$ (10)
Контрольная (интактные животные)	$0,66 \pm 0,031$ (22)	$0,32 \pm 0,013$ (20)
Контрольная (гипоксия 35 мин)	$0,54 \pm 0,029$ (22) $P < 0,01$	$0,31 \pm 0,018$ (20)
Опытная (гипоксия 35 мин)	$0,49 \pm 0,022$ (22) $P < 0,001$	$0,37 \pm 0,017$ (20) $P < 0,02$

вергнутых гипоксии в течение 35 мин, содержание 2,3-ДФГ снижалось по сравнению с крысятами, дышавшими воздухом, соответственно на 26 % ($P < 0,001$) и 15 % ($P < 0,01$). Кроме того, у подопытных крысят этой группы отмечалось повышение содержания АТФ на 15 % ($P < 0,02$).

В крови у животных II серии через 2 ч 40 мин после инъекции АТФ изменений в рН и других показателях кислотно-щелочного баланса не было выявлено (см. рисунок). У всех животных III серии через 15 мин после начала гипоксии наблюдались признаки развития компенсированного ацидоза. При этом снижение показателей стандартных бикарбонатов (SB) и дефицита оснований (BE) было выражено в большей степени у контрольных крысят, чем у подопытных ($P < 0,05$). Спустя 35 мин от начала подачи гипоксической смеси в крови у животных наблюдался декомпенсированный метаболический ацидоз с более заметным снижением рН у контрольных крысят ($P < 0,01$).

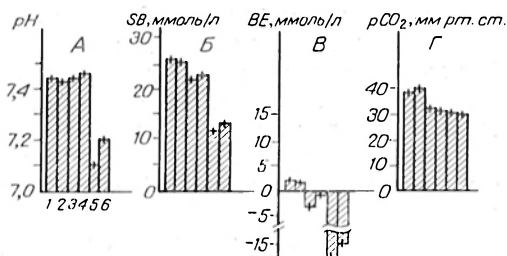
Есть основание предполагать, что благоприятные условия для повышения синтеза 2,3-ДФГ и АТФ в процессе гликолиза в эритроцитах у подопытных крысят создаются благодаря превращению продукта расщепления экзогенной АТФ — аденозина в инозин [10]. Образование в цепи последующих превращений рибозо-5-фосфата способствует усилению синтеза глицероаль-

дегид-3-фосфата и фруктозо-6-фосфата в реакциях пентозного цикла. В свою очередь повышение концентрации последних соединений, как известно, способно усилить интенсивность реакций гликолиза [8, 14]. Другой вероятной причиной повышения содержания АТФ в эритроцитах у подопытных крысят может являться включение аденозина в прямой путь синтеза адениловых нуклеотидов. Данные, полученные при изучении метаболизма аденозина в эритроцитах, свидетельствует о том, что это соединение включается в указанный путь в ходе реакции его фосфорилирования в АМФ при участии аденозинкиназы [4, 10]. Последующая цепь реакций $\text{АМФ} \rightarrow \text{АДФ} \rightarrow \text{АТФ}$, катализируемых соответственно аденилаткиназой и ферментами гликолиза — фосфоглицераткиназой и пируваткиназой, приводит к образованию АТФ.

Можно предположить, что под влиянием продуктов распада экзогенной АТФ, в частности АМФ, эритроциты новорожденных крысят способны увеличивать потребление глюкозы. Косвенно на такую возможность указывают данные о повышении потребления глюкозы эритроцитами взрослых крыс при добавлении к инкубационной среде АМФ [15]. Следует также отметить, что изменения в процессах синтеза и расщепления 2,3-ДФГ и АТФ в эритроцитах у подопытных крысят могут быть связаны с многообразным влиянием экзогенной АТФ и продуктов ее распада на метаболизм других тканей. Установлено, что введение АТФ взрослым животным может приводить к повышению потребления кислорода тканями головного мозга [2, 16], к снижению концентрации АТФ в печени и увеличению ее содержания в крови [17], повышению концентрации в крови пировиноградной кислоты [18, 19] и адреналина [19]. Заслуживает внимания предположение о том, что циркулирующие в крови АТФ и аденозин способны оказывать влияние на метаболизм органов и тканей, воздействуя на рецепторы аденилатциклазной системы [16].

Механизмы, определяющие различия в динамике изменения содержания 2,3-ДФГ и АТФ в эритроцитах крысят при физиологических условиях, во многом остаются неясными. Не исключено, что при наших экспериментальных условиях характер изменений внутриэритроцитарной концентрации аденозина у крысят способствует на определенных этапах времени после введения АТФ высокой скорости фосфорилирования аденозина в АМФ, а не процессу его дезаминирования. В пользу последнего предположения свидетельствуют данные о более высоком сродстве к аденозину аденозинкиназы, по сравнению с аденозиндеаминазой [20].

Согласно литературным сведениям [9], скорость распада 2,3-ДФГ при ацидозе в эритроцитах взрослых крыс в условиях *in vitro* значительно выше, чем в эритроцитах человека и кролика. Установленное нами существенное понижение концентрации 2,3-ДФГ в эритроцитах новорожденных крысят за относительно короткий срок из экспозиции в условиях гипоксии указывает на высокую чувствительность реакций синтеза и расщепления 2,3-ДФГ к внутриэритроцитарным изменениям рН и на ранних этапах постнатального развития этого вида животных. Результаты исследований, проведенных на эритроцитах человека, показали, что при ацидозе наблюдаются ингибирование активности гексокиназы, фосфоглицераткиназы и 2,3-ДФГ-мутаза — ферментов гликолиза, ответственных за синтез 2,3-ДФГ, и активация 2,3-ДФГ-фосфатазы — фермента, расщепляющего этот метаболит [21—24].



Влияние АТФ на кислотно-щелочной баланс крови у новорожденных крысят.

А — концентрация ионов водорода (рН); Б — стандартные бикарбонаты (SB); В — избыток буферных оснований (BE); Г — парциальное давление CO_2 в крови (р/CO₂).

1 — контроль, 2 — опыт (через 1 ч 40 мин после введения АТФ); гипоксия 15 мин; 3 — контроль, 4 — опыт, гипоксия 35 мин; 5 — контроль, 6 — опыт.

Как промежуточный метаболит гликолиза, 2,3-ДФГ может служить источником энергии, способствуя при распаде образованию фосфоэнолпирувата и, следовательно, синтезу АТФ [14]. Такой зависимостью между этими процессами, возможно, объясняется отсутствие изменений в содержании АТФ наряду со значительным снижением содержания 2,3-ДФГ в эритроцитах контрольных крысят в условиях гипоксии.

Известно, что увеличение концентрации 2,3-ДФГ и АТФ в эритроцитах при адаптации человека, крысы и ряда других животных к гипоксии повышает величину P_{50} , способствуя тем самым переходу кислорода от гемоглобина к тканям [24—27]. Основной причиной повышения концентрации указанных фосфоорганических соединений в эритроцитах при гипоксии является усиление процессов гликолиза в результате развивающегося алкалоза и увеличения связывания 2,3-ДФГ с дезоксигемоглобином [28, 29]. Наблюдаемое нами повышение концентрации 2,3-ДФГ и АТФ в эритроцитах у опытных крысят, по-видимому, также должно улучшать оксигенацию тканей при легких и средних степенях нарастающей гипоксии. С другой стороны, имеются сведения о том, что при тяжелой острой гипоксии у крыс с низким содержанием 2,3-ДФГ в эритроцитах повышенное сродство гемоглобина к O_2 обеспечивает более эффективную оксигенацию тканей, чем у животных с нормальным уровнем 2,3-ДФГ в эритроцитах и сродством гемоглобина к кислороду [30]. Последние данные дают основание рассматривать снижение содержания 2,3-ДФГ в эритроцитах новорожденных крысят как процесс, способствующий транспорту кислорода к тканям в условиях тяжелой острой гипоксии. Таким образом, полученные результаты позволяют считать, что в механизмах, определяющих повышение устойчивости новорожденных крысят к острой гипоксии под влиянием профилактического введения АТФ, определенную роль могут играть изменения в эритроцитах концентрации 2,3-ДФГ и АТФ, повышающих эффективность кислородно-транспортной функции гемоглобина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мацынин В. В.— Учен. записки Кабардино-Балкар. ун-та. 1967, вып. 33, с. 205—206.
2. Лукненко П. И.— Фармакол. и токсикол., 1973, № 5, с. 618—620.
3. Hanikova M., Znamenacek K., Krabec Z.— Z. Kinderheilk., 1973, Bd 114, S. 305—312.
4. Parker J. C.— Am. J. Physiol., 1970, v. 218, p. 1568—1574.
5. Hamasaki N., Harasaki H., Tomoda A. et al.— Acta biol. med. germ., 1977, Bd 36, S. 913—918.
6. Forrester T., Morrison L. M.— J. Physiol. (Lond.), 1975, v. 248, p. 25—26.
7. Frick G. P., Lovenstein I. M.— J. biol. Chem., 1978, v. 253, p. 1240—1244.
8. Zachara B.— Transfusion (Philad.), 1977, v. 17, p. 628—637.
9. Torrance J. D.— In: Erythrocytes, Thrombocytes Leukocytes. Ed. E. Gerlach et al. Stuttgart, 1973, p. 161—164.
10. McManus T. J., Lambe C.— Ibid., p. 135—139.
11. Ермоленко В. М., Балкаров И. М., Кондачихин М. А.— Тер. арх., 1977, № 7, с. 131—139.
12. Биохимические методы исследования в клинике. Под. ред. А. А. Покровского. М., 1969, с. 42—51.
13. Planet G., Fox I. H.— J. biol. Chem., 1976, v. 251, p. 5839—5844.
14. Rapoport S.— Försvarmedicin (Stockh.), 1969, v. 5, p. 168—174.
15. Loque J., Roncales P., Tejero C. et al.— Acta biol. med. germ., 1977, Bd 36, S. 631—638.
16. Forrester T., Harper A. M., Mackenzie E. T. et al.— J. Physiol. (Lond.), 1979, v. 296, p. 343—355.
17. Атабекова Г. А., Коцеев Н. Н., Романцев Е. Ф.— Вопр. мед. химии., 1978, № 3, с. 401—404.
18. Matejebuh D., Jankobuh B., Павлобuh М.— Срп. арх. целок. лек., 1973, т. 101, с. 1—7.
19. Mirza A., Crisan I., Manta A. et al.— Timosoara med., 1979, v. 24, p. 30—33.
20. Perreft D., Deon B.— Biochem. biophys. Res. Commun., 1977, v. 77, p. 374—378.
21. Burr J. M.— Comp. Biochem. Physiol., 1972, v. 41-B, p. 687—694.
22. Rapoport I., Rapoport T. A., Rapoport S. M.— Acta biol. med. germ., 1978, Bd 37, S. 393—401.
23. Rapoport J., Berger H., Elsner R. et al.— Europ. J. Biochem., 1977, v. 73, p. 421—427.

24. Momsen G., Westergaard-Bogind B.— Arch. Biochem., 1978, v. 190, p. 67—84.
25. Duhm J., Gerlach E.— Pflügers Arch., 1971, Bd 326, S. 254.
26. Baumann R., Bauer Ch., Bartels H.— Resp. Physiol., 1971, v. 11, p. 135—144.
27. Сидановский Л. Н.— Бюлл. exper. биол., 1976, № 4, с. 415—416.
28. Grant R.— Biochim. biophys. Acta, 1970, v. 215, p. 409—411.
29. Hamasaki N., Minakami S.— J. Biochem. (Tokyo), 1970, v. 68, p. 157—161.
30. Turek L., Kreuzer F., Ringnala B. E. M.— Pflügers Arch., 1978, Bd 376, S. 7—13.

Поступила 30/VI 1980 г.

ON THE EFFICIENCY AND MECHANISMS OF ANTIHYPOXIC EFFECT OF ATP IN NEWBORN RATS

Yu. A. Yurkov, V. V. Alatyrtsev, O. D. Kuz'minov

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

Effect of ATP administered at the doses of 20 mg and 100 mg per kg of body mass/ on sensitivity of 5-7 days old rats to acute hypoxia as well as content of 2,3-DPH and ATP in erythrocytes were studied. ATP exhibited the most effective anti-hypoxic influence at a dose of 100 mg/kg. After administration of ATP a dissimilar increase in content of 2,3-DPH and ATP was observed in erythrocytes of newborn rats maintained under conditions of normal atmospheric pressure. At the hypoxic step of compensated metabolic acidosis of blood the increase in content of 2,3-DPH, caused by the ATP administration, was combined with a less distinct alterations in acid-alkaline balance /SB, BE/. Under conditions of decompensated metabolic acidosis preadministration of ATP did not prevent the pH dependent decrease in 2,3-DPH content in erythrocytes but slightly increased the ATP content. The alterations in content of 2,3-DPH and ATP, which occurred in erythrocytes apparently due to the effect of products of ATP dephosphorylation and which improved the oxygen transport by hemoglobin under conditions of oxygen deficiency, might be responsible for the positive influence of ATP on the stability of newborn rats to acute hypoxia. * *

УДК 616-008.939.623-097.3-074

В. В. Калашиков, С. Г. Волощук, Д. М. Фалалеева, Ю. С. Татаринов

ИММУНОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЭМБРИОНАЛЬНОГО ПРЕАЛЬБУМИНА-2 (ЭПА-2) В ТКАНЯХ ПЛОДА И ВЗРОСЛОГО ЧЕЛОВЕКА

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

Ранее нами был описан белок с электрофоретической подвижностью преальбуминов, который был обнаружен в амниотической жидкости и сыворотке крови плодов человека [1]. Этот белок отсутствовал в сыворотке крови доноров и беременных женщин и не был идентичен эмбриональному преальбумину-1 (ЭПА-1) [2], в связи с чем он был назван эмбриональным преальбумином-2 (ЭПА-2). В настоящем сообщении приводятся результаты иммунохимического анализа ЭПА-2 в экстрактах органов и тканей плода и взрослого человека, а также в тканевых экстрактах некоторых опухолей.

Методика

Антисыворотки к ЭПА-2 получали путем иммунизации кроликов гликопротеидной фракцией амниотической жидкости плодов человека 18—20 нед эмбриогенеза [1]. Иммунодиффузионный анализ ЭПА-2 в тканевых экстрактах проводили с помощью стандартной тест-системы к данному белку по методу Храмковой и Абелева [3]. Чувствительность стандартной тест-системы к ЭПА-2 равнялась 0,5 мкг/мл. Опухоли получали во время операций в Онкологическом научном центре АМН СССР и в Институте нейрохирургии им. Н. Н. Бурденко АМН СССР. Нормальные ткани были получены от плодов 21—24 нед эмбриогенеза, а также от взрослых людей, погибших от случайных причин, во время вскрытия на кафедре судебной медицины II Московского медицинского института им. Н. И. Пирогова. Ткани гомогенизировали в трис-глицериновом буфере pH 8,3 с добавлением детергентов (0,1% тритона X-100 и твина-80), центрифугировали при 8000 об/мин, а затем тканевый экстракт лиофилизировали. Для исследования применяли растворы тканевых экстрактов, содержащих 50 мг/мл лиофилизата. Всего изучено 553 индивидуальных образца опухолей и 256 тканевых экстрактов нормальных органов плодов и взрослого человека. Полученные результаты подвергали обработке методами вариационной статистики [4].

Результаты и обсуждение

Иммунохимический анализ ЭПА-2 показал присутствие данного белка в некоторых образцах нормальных органов желудочно-кишечного тракта (желудок, печень, поджелудочная железа, тонкая и толстая кишки), а также в отдельных образцах ткани опорно-двигательного аппарата (сухожилие, хрящ, кость), селезенки и кожи (рис. 1, см. вклейку). Однако содержание ЭПА-2 в данных органах незначительно и не превышает, как правило, 2 мкг на 1 мл тканевого экстракта. ЭПА-2 не был обнаружен в тканевых экстрактах органов дыхания, мочеполовой, сердечно-сосудистой, центральной и периферической нервной систем.

Результаты обработки полученных данных по определению ЭПА-2 в тканях нормальных органов эмбрионов, взрослых людей и в опухолевых тканях методами вариационной статистики приведены на рис. 2.

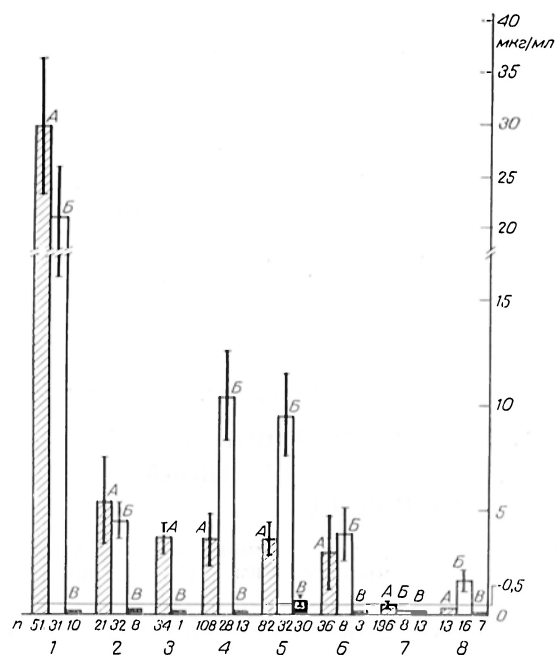


Рис. 2. Иммунохимический анализ ЭПА-2 в нормальных тканях эмбрионов, взрослых людей и в опухолевых тканях.

А — опухоли; Б — эмбриональные ткани; В — нормальные ткани взрослых людей. 1 — мягкие ткани; 2 — кости; 3 — молочная железа; 4 — мочеполовая система; 5 — желудочно-кишечный тракт; 6 — дыхательная система; 7 — центральная и периферическая нервная система; 8 — эндокринные органы. По оси абсцисс — число образцов; по оси ординат — содержание ЭПА-2.

В органах плода человека наиболее высокая концентрация ЭПА-2 обнаружена в тканевых экстрактах мягких тканей. Это коррелирует с результатами определения данного белка в опухолях мягких тканей взрослого человека, где наибольшая концентрация ЭПА-2 (64—128 мкг/мл) отмечалась в тканевых экстрактах десмоида и мезенхимомы. Частота обнаружения ЭПА-2 в тканевых экстрактах опухолей желудочно-кишечного тракта незначительно выше таковой в тканевых экстрактах соответствующих нормальных органов, однако уровень ЭПА-2 на порядок выше. Среди органов мочеполовой системы наибольшая частота и концентрация ЭПА-2 отмечается в опухолях яичников и матки, при этом особо выделяются опухоли, богатые соединительной тканью. Из опухолей центральной и периферической нервной системы чаще повышено содержание ЭПА-2 отмечается в краниофарингиомах, фибросаркомах и

хордомах, в то время как в других опухолях оно не превышает 30%.

Таким образом, проведенные исследования позволяют сделать заключение о том, что ЭПА-2 — белок, активно синтезирующийся у плода в период эмбриогенеза. Максимальное содержание ЭПА-2 в мягких тканях плода косвенно свидетельствует о том, что он синтезируется в органах мезодермального происхождения. К моменту родов концентрация ЭПА-2 у плода понижается [1], и в сыворотке крови взрослых людей этот белок методами иммунодиффузионного анализа не обнаруживается. Однако детальное исследование показало наличие низкой концентрации ЭПА-2 в некоторых образцах тканевых экстрактов органов желудочно-кишечного тракта, опорно-двигательного аппарата, селезенки и кожи. Синтез ЭПА-2 резко возрастает

в опухолях соединительнотканного происхождения, в то время как в эпителиальных опухолях уровень ЭПА-2 зависит от наличия в этой ткани соединительнотканых элементов. Детальное изучение места синтеза ЭПА-2 поможет в изучении функциональной значимости этого белка, а разработка высокочувствительного метода его определения позволит апробировать тест на ЭПА-2 для маркирования соединительнотканых опухолей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Калашиников В. В., Васильев М. Ю., Волощук С. Г. и др.— Онтогенез, 1979, № 4, с. 389—396.
2. Калашиников В. В., Борисенко С. А., Татаринов Ю. С.— Бюлл. экспер. биол., 1976 № 6, с. 725—726.
3. Храмова Н. И., Абелев Г. И.— Там же, 1961, № 10, с. 107—109.
4. Сепетлиев Д. А. Статистические методы в научно-медицинских исследованиях. М., 1968.

Поступила 30/VI 1980 г.

IMMUNOCHEMICAL STUDY OF THE EMBRYONAL PREALBUMIN-2 IN EMBRYONAL AND ADULT HUMAN TISSUES

V. V. Kalashnikov, S. G. Voloschuk, D. M. Falaleeva, Yu. S. Tatarinov

Problem Laboratory on Immunochimistry of Malignant Tumors and Embryonal Tissues, Chair of Biochemistry, N. I. Pirogov II Medical School, Moscow

Embryonal prealbumin-2 /EPA-2/ was shown to be a protein, which was actively synthesized in fetus during embryogenesis. The highest content of EPA-2 was found in soft fetal tissues; this suggesting that the protein synthesis occurred in organs of mesodermal origin. To the moment of delivery the content of EPA-2 in fetus was distinctly decreased and the protein was not detected using the immunodiffusion technique in blood serum of adult persons, i. e. the EPA-2 synthesis was markedly reduced. Low content of EPA-2 was observed in human gastroutestinal tract, locomotive system, spleen and skin tissues. The EPA-2 synthesis was increased distinctly in malignant tumors, especially, of connective tissue, whereas in tumors of epithelial tissue the content of EPA-2 often depended on presence of connective tissue elements.

УДК 612.82.015.11:577.152.143'164

Н. С. Камышанская, Т. А. Москвитина

МНОЖЕСТВЕННЫЕ ФОРМЫ МОНОАМИНОКСИДАЗЫ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Моноаминоксидаза (МАО) катализирует окислительное дезаминирование (основную реакцию катаболизма) биогенных аминов-нейромедиаторов: дофамина, норадреналина, β -фенилэтиламина, серотонина и др. По современным представлениям, МАО — мембраносвязанный митохондриальный фермент, содержащий ковалентно присоединенный ФАД [1]. В настоящее время общепризнано существование А и Б типов фермента, отличающихся по субстратной специфичности, чувствительности к ингибиторам и протеазам [2—4]. МАО типа А предпочтительно дезаминируют серотонин и ингибируются низкими концентрациями хлоргилина, но не депренила, а МАО типа Б действуют на β -фенилэтиламин и чувствительны к низким концентрациям депренила, но не хлоргилина. Препаративно А и Б типы МАО мозга быка разделены иммунопреципитацией [5]. Попытки их разделения другими методами окончились неудачей [6].

Методом смешанных субстратов [7], а также путем изучения кинетики действия ряда неалленовых ингибиторов на дезаминирование различных субстратов установлено, что существуют по крайней мере три различные формы (или центра связывания) фермента [8, 9].

Ранее нам удалось разработать метод солиubilизации митохондриальной МАО мозга быка, при котором не происходило инактивации какой-либо формы фермента [10]. При последующем хроматографическом разделении уда-

лось выделить 4 формы фермента [10]. Задачей настоящего исследования явилось изучение возможности применения такого метода к ткани мозга человека и изучение МАО мозга человека в норме.

В настоящее время МАО приписывают важную роль в патогенезе психических заболеваний, в частности шизофрении [11]. Однако фермент мозга человека изучен недостаточно.

Мы изучали МАО нормальной ткани мозга людей, умерших от сердечно-сосудистой недостаточности. Так как для мозга, особенно человека, характерна асимметрия, функциональная, анатомическая и биохимическая [12], то при изучении МАО нельзя игнорировать возможные различия ее из правой и левой половин мозга.

Методика

Материал. Ткань мозга получали из мозга I Московского медицинского института им. И. М. Сеченова через 4, 13 и 23 ч после смерти 3 мужчин, умерших от инфаркта миокарда в возрасте 62, 52 и 53 лет. Часть работы была проделана на мозге 66-летнего мужчины, взятом через 4 ч после смерти от той же причины. Мозг хранился при -20°C

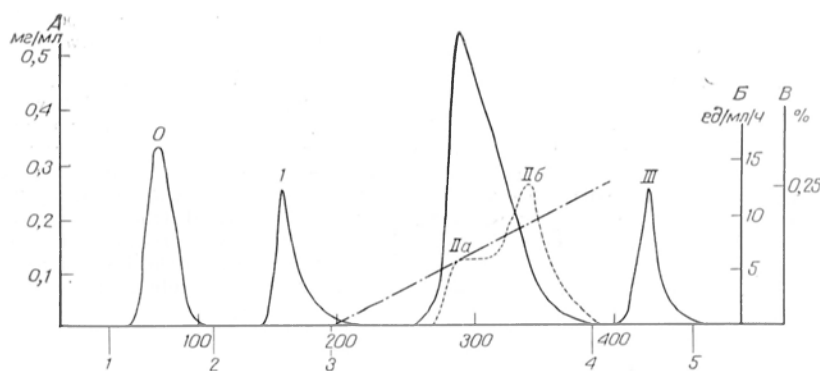


Рис. 1. Хроматографическое разделение солюбилизованного препарата МАО из подкорковой области правого полушария на АН-сефарозе 4В.

Колонка (K-16/40, «Farmacia Fine Chemicals», Sweden) содержала 60 мл АН-сефарозы 4В, уравновешенной 0,01 М К, Na-фосфатным буфером, pH 7,4. На колонку наносили 60 мг солюбилизованного белка (см. раздел «Методика»). Фракция по 5 мл. Сплошная линия — содержание белка (в мг/мл); пунктирная — активность МАО (субстрат — *p*-нитрофенилэтиламин; в ед/(ч·мл); штрих-пунктирная — содержание тритона X-100 (в %). 1—0,01 М фосфатный буфер, pH 7,4; 2—0,1 М фосфатный буфер, pH 7,4; 3—0,1 М фосфатный буфер, pH 7,4+градиент концентрации тритона X-100 (0—0,25%); 4—0,4 М фосфатный буфер, pH 7,4+0,25% тритона X-100; 5—1 М фосфатный буфер, pH 7,4+1% тритона X-100. Скорость элюции 50 мл/ч. A — содержание белка (в мг/мл); B — активность МАО (в ед/(мл·ч)); B — содержание тритона X-100 (в %).

Перед использованием его размораживали при комнатной температуре, очищали от мозговых оболочек и промывали 0,9% KCl. Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования [13] и хранили при -20°C . После оттаивания их промывали несколько раз 0,05 М трис-HCl-буфером, pH 8,0.

Солюбилизация и разделение МАО. Солюбилизацию митохондрий проводили при концентрации белка 10 мг/мл, тритона X-100 1,3%, мочевины 1,3 М в 0,05 М трис-HCl-буфере, pH 8,0 в течение 30 мин при 0°C . Смесь центрифугировали в течение 30 мин при 40 000 g и надосадочную жидкость пропускали через колонку с сефадексом Г-50, уравновешенную 0,01 М К, Na-фосфатным буфером, pH 7,4. Элюат, содержащий белок, концентрировали на фильтре «Amicon PM-30» в 6 раз и подвергали хроматографическому разделению, как указано в подписи под рис. 1. Ферментные препараты из форм МАО промывали 0,01 М К, Na-фосфатным буфером и концентрировали в 6 раз на фильтре «Amicon PM-30», хранили при -20°C .

Определение активности МАО. Активность фермента определяли калориметрически с *p*-нитрофенилэтиламином в качестве субстрата [14]. Деаминацию других субстратов определяли по количеству освобождаемого за 20 мин реакции аммиака, как описано ранее [14]. Насыщающие концентрации субстратов были: тирамина $3,2 \times 10^{-3}$ М, серотонина 5×10^{-3} М, β -фенилэтиламина $8 \cdot 10^{-4}$ М, дофамина $3,4 \cdot 10^{-3}$ М. Белок определяли по методу Лоури и соавт. [15] с бычьим сывороточным альбумином в качестве стандарта, вводя соответствующую поправку на содержание в пробах неионного детергента.

Результаты и обсуждение

Недавно при исследовании тираминдеаминазной активности МАО гомогенатов коры мозга человека было обнаружено различие на 25% между активностью в правом и левом полушариях. Данное различие характерно только для двигательной зоны, но не зрительной или слуховой [16]. Ранее была выявлена асимметрия содержания субстратов МАО в мозге [12]. Установлена также неидентичность одной из форм МАО в коре и подкорковых образованиях при изучении чувствительности этой формы к хлоргиллину и изокарбоксазиду [17].

Учитывая все эти факты, мы изучали МАО как коры, так и подкорковых образований левой и правой половин мозга отдельно. Последовательно изучались величины активности МАО митохондрий, солюбилизация МАО, состав изоформ и свойства различных изоформ отдельно в каждой области.

Определение активности фермента коры и подкорковых образований правой и левой половин мозга, результаты которого представлены в табл. 1,

Т а б л и ц а 1

Удельная активность митохондриальной МАО в различных участках мозга человека

Субстрат	Корковая область		Подкорковая область	
	правая	левая	правая	левая
Тирамин	9,1±2,3 (8)	9,6±0,4 (3)	8,3±0,8 (4)	9,5±1,1 (8)
Серотонин	1,9±0,5 (5)	1,8±0,3 (3)	2,7±0,2 (7)	3,2±0,6 (10)
β-фенилэтиламин	2,6±1,2 (7)	1,9±0,5 (3)	4,8±0,9 (7)	5,9±0,7 (10)
Дофамин	6,2±0,8 (6)	5,8±0,2 (3)	6,1±0,9 (7)	7,5±0,6 (8)

П р и м е ч а н и е. Величины удельной активности выражены в наномолях в 1 мин на 1 мг белка ± стандартное отклонение; в скобках — число опытов (каждый с двумя параллельными).

показывает, что различия между правой и левой половинами мозга не наблюдается даже при использовании 4 различных субстратов МАО: серотонина — субстрата МАО типа А, β-фенилэтиламина — субстрата МАО типа Б, тирамина — общего субстрата для обоих типов и дофамина — субстрата предполагаемой «дофаминоксидазы» [18]. Из табл. 1 видна также большая активность МАО (серотонин- и β-фенилэтиламиндеаминазная) подкорковых образований по сравнению с МАО коры.

Процесс солюбилизации митохондрий мозга человека протекает так же, как и при использовании ткани мозга быка. В табл. 2 представлены резуль-

Т а б л и ц а 2

Экстракция МАО из митохондрий мозга человека (подкорковая область правого полушария)

Фракции	Объем, мл	Белок		Активность МАО		Выход, (%)
		мг/мл	общий	ед на 1 мг белка	общий	
Митохондрии	36	15,3	550,8	9,6	5293	100
Солюбилизованная МАО	7,8	13,6	106,1	13,7	1451	27

П р и м е ч а н и е. Солюбилизацию проводили, как описано в разделе «Методика». Активность МАО определяли с *p*-нитрофенилэтиламином в качестве субстрата.

таты одного из опытов, характеризующих выход в солюбилизованное состояние МАО, о чем судили по *p*-нитрофенилэтилдеаминазной активности. Видно, что выход активности при однократной экстракции составляет 27%; аналогичная величина получена ранее при солюбилизации МАО ткани мозга быка. Данные табл. 2 получены при исследовании подкорковой области правого полушария. Аналогичные показатели получены и при использовании других областей мозга человека.

Солюбилизованный таким образом препарат, как было отмечено ранее [10] и как видно из табл. 3, содержал те же пропорции А (серотониндезаминазная активность) и Б (фенилэтиламиндезаминазная активность) форм МАО, что и исходный препарат митохондрий. В то же время известно, что большинство используемых в настоящее время методов очистки МАО приводят к инаktivации одной из форм фермента — как правило, А [19—21].

Т а б л и ц а 3

Очистка митохондриальных МАО мозга человека (левая подкорковая область)

Фракции	Содержание белка, мг/на весь объем	Активность МАО								Выход, %				Очистка			
		нмоль/мин на весь объем				нмоль/мин на 1 мг белка				Тир	Сер	ФЭА	ДА	Тир	Сер	ФЭА	ДА
		Тир	Сер	ФЭА	ДА	Тир	Сер	ФЭА	ДА								
Митохондрии	638,3	5870	1799	4340	3190	9,2	2,8	6,8	5,0								
Солюбилизованный ферментный препарат	70,5	1600	324	881	1060	22,8	4,6	12,5	15	27	18	20	33	2,5	1,6	1,8	3,0
После очистки и разделения на АН-сепарозе 4В (пик 11б)	10,8	764	81,0	163	488	70,7	7,5	15,1	45,2	13	4,5	3,8	15	7,7	2,7	2,2	9,0

П р и м е ч а н и е. Тир — тирамин; ФЭА — β-фенилэтиламин; Сер — серотонин; ДА — дофамин.

Солюбилизованный препарат МАО после обессоливания и концентрирования подвергали хроматографическому разделению на колонке АН-сепарозы 4В. Результаты, представленные на рис. 1, характеризуют МАО правой части подкорковой области. Аналогичные результаты получены при исследовании других областей мозга. На рис. 1 видно, что часть белков, элюирующихся с колонки (пик 0), не обладает активностью МАО. При повышении концентрации буфера элюируется белок, хотя и не обладающий *p*-нитрофенилэтиламиндезаминазной активностью, но дезаминирующий другие субстраты МАО (рис. 2). Сказанное относится и к фракции III, элюируемой с колонки при высокой концентрации буфера и тритона X-100. Белок фракции IIa и IIб дезаминирует и *p*-нитрофенилэтиламин (см. рис. 1), и другие исследованные субстраты МАО (см. рис. 2). Специфичность отдельных фракций (изоформ) МАО различных областей мозга представлена на рис. 2. Видно, что изоформы обладают различной субстратной специфичностью. Так, изоформы IIa и IIб, не полностью разделяющиеся при хроматографии (см. рис. 1), хотя и обладают примерно равной серотониндезаминазной активностью отличаются по тирамин- и дофаминдезаминазной активности, показатели которой составляют 160 и 120 % соответственно для изоформы IIa и 900 и 500 % для изоформы IIб, если за 100 % принять активность серотониндезаминазы. Ранее было установлено [10], что такие же изоформы мозга быка различаются при электрофоретическом исследовании в ПААГ и по величинам изотопов, а не только по субстратной специфичности.

На рис. 2 видно, что все изоформы присутствуют и в коре, и в подкорковых образованиях, но в последней области выше активность основной фракции IIб. Различий между правой и левой половинами мозга не обнаружено. Наибольшей активностью обладает фракция IIб. Ход очистки этой изоформы и ее субстратная специфичность представлены в табл. 3. Видно, что тирамин дезаминируется со скоростью 70 нмоль/мин на 1 мг белка, в то время как очищенная таким образом МАО мозга быка дезаминирует

227 нмоль тирамина в 1 мин на 1 мг белка [10]. Однако тираминдезаминазная активность МАО, очищенной из мозга человека по данным Нагатцу и соавт. [22], была равна 20 нмоль (мин на 1 мг), что значительно ниже активности препарата, описываемого здесь.

В настоящей работе не обнаружено различий активности МАО правой и левой половин мозга. Это касается активности митохондриальных пре-

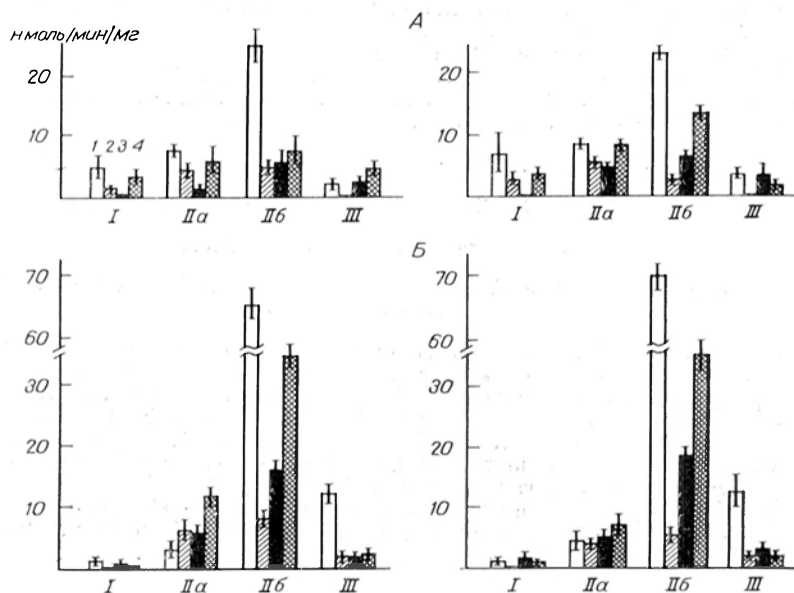


Рис. 2. Специфичность изоформ очищенной МАО мозга человека.

Приведены средние величины \pm стандартное отклонение удельных активностей (нмоль субстрата в 1 мин на 1 мг белка) фракций МАО I, IIa, IIb, III (см. рис. 1) при исследовании в качестве субстратов тирамина (1), серотонина (2), фенилэтиламина (3) и дофамина (4). Число опытов 2—7 (в каждом с 2 параллельными). А — кора; Б — подкорковые образования. Слева — левое полушарие, справа — правое.

паратов, процесса солиubilизации, очистки и свойств очищенного фермента. В нашей препаративной работе мы могли не заметить небольшого асимметричного изменения активности МАО ограниченной зоны [16] на фоне общей массы достаточно однородного материала. Данные о большей активности фермента в подкорковых образованиях согласуются с результатами, полученными недавно при исследовании фенилэтиламиндезаминазной активности гомогенатов мозга человека [23]. Однако по составу изоформ МАО коры и подкорковых образований не различаются. Изучение свойств различных изоформ МАО — задача наших будущих исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Youdim M. B. H. — J. Neural. Transmiss., 1978, v. 43, p. 199—204.
2. Neff N. H., Yang H. — Y. — Life Sci., 1974, v. 14, p. 2061—2074.
3. Knoll J., Magyar K. — Advanc. Biochem. Psychopharmacol., 1972, v. 5, p. 393—399.
4. Cowthorpe R. M., Breakefield X. O. — Nature, 1979, v. 281, p. 692—694.
5. McCauley R., Racker E. — Molec. Cell. Biochem., 1973, v. 1, p. 73—81.
6. White H. L., Glassman A. T. — J. Neurochem., 1977, v. 29, p. 987—997.
7. White H. L., Wu J. C. — Ibid., 1975, v. 25, p. 21—26.
8. Huang R. H., Eiduson S. — J. biol. Chem., 1977, v. 252, p. 284—290.
9. Бауманис Э. А., Калниня И. Э., Москвитина Т. А. и др. — Биохимия, 1978, т. 43, с. 1496—1503.
10. Moskvitina T. A., Kamyschanskaya N. S., Gorkin V. L. et al. — Prepar. Biochem., 1979, v. 9, p. 171—196.
11. Колпаков В. Г. — Ж. невропатол. и психиатр., 1974, № 8, с. 1254—1263.
12. Dimond S. J. — Ann. N. Y. Acad. Sci. U. S., 1977, v. 299, p. 1—3.
13. Brody T. M., Bain J. A. — J. biol. Chem., 1952, v. 195, p. 685—696.
14. Москвитина Т. А., Камышанская Н. С., Каверина Л. П. и др. — Вопр. мед. химии, 1977, т. 23, с. 352—358.

15. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. et al.— J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265—275.
16. Кононенко В. С.— Физиол. ж. СССР, 1979, т. 65, с. 357—361.
17. Youdim M. B. H., Collins G. G. S., Sandler M. et al.— Nature, 1972, v. 236, p. 225—228.
18. Collins G. G. S., Sandler M., Williams E. D. et al.— Ibid., 1970, v. 225, p. 817—820.
19. Dennick R. F., Mayer R. J.— Biochem. J., 1974, v. 161, p. 167—174.
20. Suzuki O., Yagi K.— In: Maturation of Neurotransmission. Biochemical Aspects. Ed. A. Vernadakis, Basel, 1978, p. 100—107.
21. McCauley R.— Arch. Biochem., 1978, v. 189, p. 8—13.
22. Nagatsu T., Yamamoto T., Harada M.— Enzymologia, 1970, v. 39, p. 16—25.
23. Glover V. G., Elsworth J. D., Sandler M.— In: Catecholamines: Basic and Clinical Frontiers. Ed. E. Usdin et al., 1979, v. 1, p. 201—203.

Поступила 2/VII 1980 г.

MULTIPLE FORMS OF HUMAN BRAIN MONOAMINE OXIDASE

N. S. Kamyshanskaya, T. A. Moskvilina

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

Treatment of normal human brain mitochondria with a mixture containing Triton X-100 and urea resulted in solubilization of monoamine oxidase (MAO) exhibiting tyramine-, serotonin-, phenylethylamine- and dopamine deaminase activities at ratios similar to those characteristic for the initial mitochondria. A purified preparation of the enzyme was obtained after AH-Sepharose chromatography; it was shown that in the brain there were present four isoenzymes of MAO possessing different substrate specificity. Investigation of some properties of MAO (activity, solubilization and isozyme composition) from brain regions showed absence of asymmetry and higher enzymatic activity in the subcortical brain region as compared with right and left brain cortex.

УДК 612.112.015.12:577.153.31-087.4

Г. А. Анненков, Е. Е. Сафронова

ДОКАЗАТЕЛЬСТВА НАЛИЧИЯ АКТИВНОЙ ФЕНИЛАЛАНИНГИДРОКСИЛАЗЫ В ЛЕЙКОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА

Институт медицинской генетики АМН СССР, Москва

В предварительных опытах нами была обнаружена фенилаланин-гидроксилазная (ФА-активность) в лейкоцитах и культивируемых фибробластах человека. Для этого был использован модифицированный метод Эйлинг и соавт. [1], основанный на определении накопления окисленной формы птеридинового кофактора (2-амино, 4-окси, 6,7-диметил, 7,8-дигидроптеридин) в реакции гидроксилирования фенилаланина. Сведения о выявлении ФАГ-активности в фибробластах человека публиковались и другими авторами [2—4], тогда как данных в пользу наличия этой активности в лейкоцитах мы не встретили. Суммарный процесс превращения фенилаланина в тирозин можно представить как состоящий из энзиматического гидроксилирования, катализируемого ферментом фенилаланин-гидроксилазой (ФГ), а также в некоторой степени и другими гидроксилазами [5]. Имеет место и неэнзиматическое гидроксилирование, которое в гомогенате печени может достигать 8% от общего объема гидроксилирования, если не принять меры по защите от перекисных соединений [6]. В условиях общепринятых методов определения ФАГ-активности все минорные пути гидроксилирования фенилаланина в печени достигают 5—14 % от общего пула превращения [7—9]. Поэтому накопление продуктов реакции (например, ¹⁴C-тирозина) не доказывает, что существует лишь энзиматический путь их образования.

С другой стороны, определяемый в наших анализах дигидроптеридин образуется не только в ходе реакции с участием ФГ или других гидроксилаз. По-видимому, этот кофактор участвует в ряде других энзиматических и неэнзиматических реакций, в том числе в неферментативном гидроксилиро-

вании фенилаланина. Предполагают, что в последнем процессе участвует перекисная форма кофактора [6].

Таким образом, процесс превращения фенилаланина в тирозин оказывается весьма сложным, многокомпонентным и недостаточно изученным. Между тем этот процесс является ключевым патогенетическим звеном тяжелого и широко распространенного наследственного заболевания — фенилкетонурии. Диагностика различных форм фенилкетонурии пока проводится путем определения активности ряда ферментов в биоптатах печени обследуемых. Трудности получения биоптатов, особенно у детей, резко ограничивают диагностические возможности клиницистов. Поиск новых методов диагностики с использованием более доступных материалов, например клеток крови, является актуальной задачей.

Целью данной работы было получение фактов, которые могли бы подтвердить или опровергнуть сделанное нами предположение о наличии специфической активности ФГ в лейкоцитах человека.

Методика

Для получения лейкоцитов использовали кровь здоровых доноров, больных с классической формой фенилкетонурии, а также их матерей — облигатных гетерозигот по гену фенилкетонурии (ген Ph⁻). Выражаем искреннюю благодарность заведующей отделением № 17 6-й Детской психиатрической больницы Москвы Н. А. Рыбаковой за помощь в сборе материала.

Лейкоциты отмывали из плазмы отстоявшейся гепаринизированной крови, ресуспендировали в 0,01 М трис-HCl-буфере pH 7,4, содержащем 0,15 М KCl, 10 мМ β-меркаптоэтанол и 0,25% тритона X-100, разрушали в системе тефлон — стекло, гомогенат центрифугировали при 15 000 g в течение 15 мин на холоду. Активность ФГ определяли по методу Эйлинг и соавт. [1]. Скорость реакции определяли с помощью автоматического анализатора скоростей ферментативных реакций ЛКВ-8600. Кинетику реакции измеряли в течение 1 мин при 25 °С. Для определения концентрации белка в гомогенатах использовали метод прямой спектрофотометрии пептидных связей при 210 нм [10], применяя спектрофотометр «Hitachi-139».

В работе применяли L-фенилаланин фирмы «Calbiochem», трис фирмы «Serva» и кофактор (6,7-диметил, 2-амино, 4-окси, 5, 6, 7, 8-тетрагидроптеридин), который был синтезирован нами совместно с проф. Кнаппом и доц. У.Гриммом в Институте медицинской генетики ГДР по методу [11]. Остальные реактивы были отечественного производства категории х. ч. и о. ч.

Результаты и обсуждение

Зависимость скорости реакции от количества белка в гомогенате. В последовательных разведениях гомогената донорских лейкоцитов (исходная концентрация белка 6,8 мг/мл) была определена ФАГ-активность. Результаты представлены на рис. 1, демонстрирующем четкую линейную зависимость активности от количества белка в пробе. Таким образом, определяемая нами ФАГ-активность оказалась связанной с гомогенатом [с содержащимися в нем ферментами и (или) другими компонентами].

Влияние специфических ингибиторов гидроксилаз. В двух сериях опытов были использованы образцы смешанной донорской крови. Перед определением ФАГ-активности в реакционную смесь добавляли одни из специфических ингибиторов гидроксилаз: для ФГ — п-хлорфенилаланин, для тирозингидроксилазы — 3-йодтирозин, для триптофангидроксилазы — 6-фтортриптофан (все препараты фирмы «Serva»). Использовали молярные соотношения субстрат/ингибитор, как в работе [7], специально посвященной доказательству наличия ФГ в гомогенатах печени.

Из табл. 1 видно, что п-хлорфенилаланин в высоких и низких молярных концентрациях полностью ингибировал ФАГ-активность. Это позволяет с большой вероятностью полагать, что ФАГ-активность в лейкоцитах связана с наличием в них ФГ. В то же время 3-йодтирозин ингибировал активность на 4—7%, а 6-фтортриптофан — только на 1,5%. Можно предполагать, что, в лейкоцитах наряду с ФГ присутствуют другие гидроксилазы, в небольшой мере участвующие в окислении птеридинового кофактора с использованием фенилаланина в качестве субстрата, и что п-хлорфе-

нилаланин способен ингибировать эту неспецифическую активность [12]. Возможно также, что тирозин- и триптофангидроксилазы отсутствуют, но 3-йодтирозин и 6-фтортриптофан способны в некоторой мере ингибировать ФГ. Наконец, возможно сочетание обеих возможностей. В любом случае полученные данные позволяют с большой уверенностью говорить о наличии ФГ в лейкоцитах.

Проверка субстратной специфичности используемого метода определения ФАГ-активности. Поскольку в рассматриваемом нами методе коли-

Т а б л и ц а 1

Влияние ингибиторов гидроксилаз на ФАГ-активность в гомогенатах лейкоцитов

№ п/п	Концентрация субстрата и ингибитора	Актив-ность, нМ/мин/мг	Ингибиро-вание, %
<i>I серия опытов</i>			
1	1 мМ фенилаланина	0,96	0
2	1 мМ фенилаланина + + 30 мМ п-Cl-фенилала- нина	0	100
3	1 мМ фенилаланина + + 1 мМ 3-1-тирозина	0,92	4,2
<i>II серия опытов</i>			
4	1 мМ фенилаланина	0,65	0
5	1 мМ фенилаланина + + 30 мМ п-Cl-фенилала- нина	0	100
6	1 мМ фенилаланина + + 1 мМ п-Cl-фенилала- нина	0	100
7	1 мМ фенилаланина + + 1 мМ 3-1-тирозина	0,602	7,3
8	1 мМ фенилаланина + + 1 мМ 6-Г-триптофана	0,64	1,5

чественно учитывается окисление кофактора, которое, как указывалось выше, может быть обусловлено различными птеридин/зависимыми процессами, было изучено влияние использования в реакционной смеси вместо

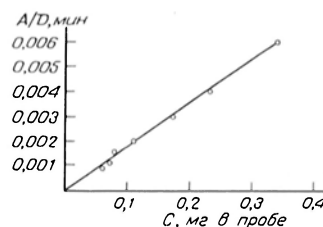


Рис. 1. Зависимость скорости реакции от концентрации белка в гомогенате лейкоцитов человека.

Состав реакционной смеси: 50 мкл гомогената, 1 мл 0,1 М трис-НСl-буфера pH 7,4, содержащего 5 мМ фенилаланина, 50,0 мкл 0,85, мМ раствора кофактора на 0,005 п. HCl.

фенилаланина других аминокислот. При этом была применена природная модель «выключения» активности только одного фермента ФГ, для чего были взяты клетки больных фенилкетонурией.

Результаты, приведенные в табл. 2, показывают, что окисление птеридинового кофактора происходит при добавлении не только фенилаланина, но и других аминокислот. Сравнительно высокий уровень активности позволяет предполагать ферментативный характер окисления, возможно, за счет других гидроксилаз аминокислот.

Проведенный опыт показал, что определяемая нами в лейкоцитах ФАГ-активность связана с наличием нормального гена Ph⁺, контролирующего уровень ФГ в печени человека, и не связана с утилизацией других аминокислот. Этот опыт позволяет полагать, что в используемом нами методе определяемое окисление кофактора связано только с гидроксилированием фенилаланина в присутствии ФГ и является индикатором активности именно этого фермента и что, возможно, печеночная и лейкоцитарная ФГ контролируется одним геном.

Определение K_M для ФГ лейкоцитов человека. Сходство K_M для ФГ лейкоцитов и печени могло бы указывать на их генетическую идентичность (контроль их синтеза одним и тем же геном). Анализ активности фермента для графического расчета K_M методом двойных обратных координат был выполнен в параллельных определениях на 3 образцах лейкоцитов и печени. Использовали концентрации субстрата от 0,1 до 10 мМ (при концентрации кофактора 0,17 мМ) и кофактора от 0,017 до 1,7 мМ (при кон-

центрации субстрата 1 мМ). Величины K_M для фенилаланина составили $1,08 \pm 0,44$ (лейкоциты) и $0,33 \pm 0,088$ (печень), K_M для кофактора — соответственно $0,17 \pm 0,05$ и $0,053 \pm 0,014$. Таким образом, значения K_M в печени и лейкоцитах отличаются примерно в 3 раза. Однако описаны 2—2 $\frac{1}{2}$ -кратные различия K_M для ФГ печени плодов и взрослых людей [13, 14], что предположительно отнесено за счет несходства посттрансляционного процессинга на разных стадиях онтогенеза. Учитывая корреляцию активности лейкоцитарной и печеночной ФГ с дозой гена Rh^+ при условии моногенного характера наследования фенилкетонурии, а также

Т а б л и ц а 2
Влияние замены субстрата на скорость окисления птеридинового кофактора в гомогенатах лейкоцитов

Объект исследования	Субстрат				
	фенилаланин (5 мМ)	тирозин (5 мМ)	триптофан (10 мМ)	глицин (5 мМ)	аланин (5 мМ)
Лейкоциты доноров	0,95	2,37	2,68	1,0	1,42
Лейкоциты больного фенилкетонурией	0	2,02	2,52	1,64	1,26

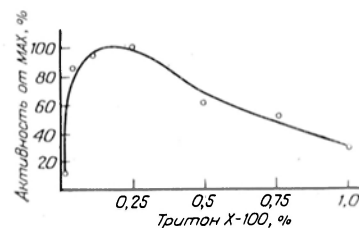


Рис. 2. Зависимость активности лейкоцитарной ФАГ от концентрации тритона X-100 в среде для гомогенизации. Состав реакционной смеси тот же, что на рис. 1.

определенное сходство их K_M , допустимо предположить, что обе ФГ генетически идентичны.

Эксперимент с проверкой дозы гена Rh^- . Поскольку специфичность действия ингибиторов в опыте № 2 (см. табл. 1) представлялась неполной, были изучены реакционные смеси, содержащие предположительно различ-

Т а б л и ц а 3
ФАГ-активность в лейкоцитах здоровых людей, гомо- и гетерозигот по гену Rh^-

Здоровые доноры				Гомозиготы (больные дети)		Гетерозиготы матери	
№ п/п	активность	№ п/п	активность	№ п/п	активность	№ п/п	активность
1	0,55	12	0,83	1	0	1	0,30
2	0,44	13	0,45	2	0 (0)	2	0,31
3	0,51	14	1,36	3	0	3	0,38
4	0,62	15	0,96	4	0 (0)	4	0,38 (0,41)
5	1,25	16	1,38	5	0	5	0,32
6	0,62	17	0,94	6	0,19, (0,20; 0,18)	6	0,47
7	1,36	18	0,80	7	0	7	0,32
8	1,45	19	1,57	8	0,21	8	0,48
9	0,49	20	0,91	9	0	9	0,38
10	1,14	21	1,19	10	0,18, (0,23)	10	0,42
11	1,03	M=0,95					

П р и м е ч а н и е. Среднее для матерей детей с нулевой активностью — 0,34, для матерей детей с остаточной активностью — 0,46. В скобках повторные определения.

ные количества ФАГ, пропорциональные дозе гена в исследуемых клетках. Для этого были использованы лейкоциты больных с классической формой фенилкетонурии, облигатных гетерозигот (матери этих больных) и здоровых доноров. Следует учесть, что в печени больных нередко обнаруживается остаточная ФАГ-активность, достигающая иногда величин нормы [8]. Такие случаи могут относиться к «атипичным» формам фенилкетонурии, обусловленным дефицитом дигидроптеридинредуктазы или ферментов цепи синтеза кофактора. Мы обследовали 21 донора и 10 пар больной ребенок — мать. Из табл. 3 видно, что в норме ФАГ-активность распределилась с

амплитудой 0,44—1,57. У 7 из 10 больных активности не обнаружено, у 3 больных она достигала примерно 20% нормы. У облигатных гетерозигот, у детей которых отмечается нулевая активность, ФАГ-активность в лейкоцитах составила около 30—40% нормы. Это совпадает с данными литературы относительно ФАГ-активности в печени гомо- и гетерозигот [8, 9, 15, 16]. У матерей детей с остаточной активностью в лейкоцитах также зарегистрирована более высокая активность, достигающая нижней границы нормы. Однако пока нельзя исключить, что доноры с низкой ФАГ-активностью не являются в действительности гетерозиготами по гену Rh^{-} , а также то, что в этих трех семьях существует «атипичная» форма фенилкетонурии. Различия в ФАГ-активности в пределах каждой из трех групп (гомо-, гетерозиготы, здоровые) наиболее вероятно пока объяснить разными молекулярными вариантами ФГ. Следует отметить удовлетворительную воспроизводимость данных при повторных определениях (см. табл. 3). В одном случае нам удалось сопоставить активность в лейкоцитах гетерозиготы Ф. с активностью в биоптате ее печени, полученном при операции по поводу холецистита (все анализы выполнены в один день). ФАГ-активность в лейкоцитах и печени была 0,32 и 0,41 нМ тирозина на 1 мг белка в минуту (в печени несколько выше).

Данные табл. 3 подтверждают наличие в лейкоцитах ФГ, активность которой коррелирует с дозой нормальных генов Rh^{+} , определяющих уровень активности ФГ в печени.

Изучение влияния тритона X-100 на активность ФГ. Поскольку гомогенизация лейкоцитов производилась при добавлении детергента тритона X-100, представлялось существенным выяснить, влияет ли он на активность ФГ, и выбрать оптимальную концентрацию. Результаты опыта представлены на рис. 2. Тритон добавляли до начала гомогенизации клеток, поэтому график отражает суммарное влияние детергента на полноту извлечения фермента из клеточного материала и на активность определяемого фермента. Из графика видно, что оптимальной является концентрация 0,25%.

Влияние детергента на солиubilизацию лейкоцитарной ФГ. Поскольку предшествующий опыт не позволял дифференцировать, действительно ли тритон X-100 повышает снятие ФГ с клеточных мембран или он только активирует реакцию гидроксилирования, был проведен эксперимент, в котором осадок после гомогенизации лейкоцитов без тритона был подвергнут вторичной гомогенизации, но уже с детергентом, что, как следует из рис. 3 (схема), позволило извлечь дополнительно большое количество активности. В надосадочной жидкости ФАГ-активность была измерена с добавкой и без добавки детергента (см. рис. 3).

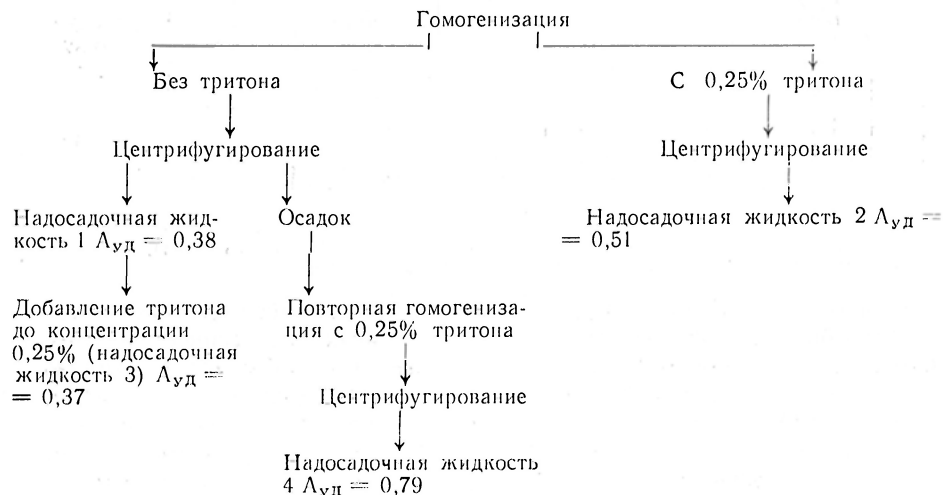


Схема опыта по проверке влияния тритона X-100 на солиubilизации ФАГ лейкоцитов.
 $L_{уд}$ — удельная активность (в мМ/мин на 1 мг белка гомогената)

Из сравнения активностей жидкостей 1 и 3 следует, что тритон X-100 не изменяет активность фермента. В то же время сравнение надосадочных жидкостей 1 и 4 ясно показывает высокий солюбилизирующий эффект тритона X-100 в отношении ФГ. Поскольку хорошо известно, что этот детергент эффективно переводит в раствор многие мембраносвязанные клеточные ферменты [17, 18], можно полагать, что вся или большая часть ФГ в лейкоцитах человека находится в мембраносвязанном состоянии. Этот вывод полностью совпадает с данными работы [19].

Проведенные исследования позволяют считать, что в лейкоцитах человека содержится мембраносвязанная ФГ, активная *in vitro* и, по-видимому, идентичная печеночной ФГ. Применение 0,25% тритона X-100 при гомогенизации клеток существенно повышает солюбилизацию фермента, не влияя на его активность. Модифицированный нами (за счет применения кинетического анализа начальной фазы ферментативной реакции) метод Эйлинг и соавт. действительно позволяет определять активность ФГ в лейкоцитах. Полученная достаточно четкая дискриминация между ФАГ-активностью в группах здоровых людей, гомо- и гетерозигот по гену Ph⁻ открывает новые подходы к диагностике фенилкетонурии и выявлению гетерозигот с использованием лейкоцитов вместо биоптатов печени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ayling J., Pirson R., Pirson W. et al. — *Analyt. Biochem.*, 1973, v. 51, p. 80.
2. Bartholome K., Ertel E. — *Lancet*, 1976, N 7990, p. 862.
3. Hoffbauer R., Schrempf C. — *Ibid.*, N 7978, p. 194.
4. Cassano V., Krooth R., Worthy T. — *Amer. J. Hum. Genet.*, 1978, v. 30, p. 90.
5. Bagchi S., Zarycki E. — *Life Sciences*, 1970, v. 9, p. 111.
6. Woolf L., Jakubovic A., Chan-Henry E. — *Biochem. J.*, 1971, v. 125, p. 596.
7. Kaufman S. — *Biochem. Med.*, 1976, v. 15, p. 42.
8. Bartholome K., Lutz P., Bickel H. — *Pediatr. Res.*, 1975, v. 9, p. 899.
9. Grimm U., Knapp A., Schlenzka K. et al. — *Acta Biol. and Med. Germ.*, 1977, Bd 36, S. 1179.
10. Toombs M., Souter F., McLaren N. — *Biochem. J.*, 1959, v. 73, p. 167.
11. Pohland E., Flynn E., Johnes R. et al. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1951, v. 73, p. 3247.
12. Gal E., Roggeveen A., Millard S. — *J. Neurochem.*, 1970, v. 17, p. 1221.
13. Friedman P., Kaufman S. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1971, v. 146, p. 321.
14. Jakubovic A. — *Bioch. Biophys. Acta*, 1971, v. 237, p. 469.
15. Kang E., Kaufman S., Gerald P. — *Pediatrics*, 1970, v. 45, p. 83.
16. Bartholome K. — *Hum. Genet.*, 1979, v. 51, p. 241.
17. Тумельян В. А. — *Вестн. АМН СССР*, 1978, № 3, с. 22.
18. Tucker-Pian Ch., Bakay B., Nyhan W. — *Biochem. Genet.*, 1979, v. 17, p. 995.
19. Connellan J., Danks D. — *Bioch. Biophys. Acta*, 1973, v. 203, p. 48.

Поступила 18/VII 1980 г.

PRESENCE OF ACTIVE PHENYLALANINE HYDROXYLASE IN HUMAN LEUKOCYTES

G. A. Annenkov, E. E. Safronova

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

In homogenates of human leukocytes phenylalanine hydroxylase activity was shown to depend on concentration of protein, presence of specific hydroxylase inhibitors as well as on a dose of Ph⁺ gene; K_m value was estimated for phenylalanine and cofactor. The data obtained suggest that human leukocytes contain membrane-bound phenylalanine hydroxylase, which is active *in vitro* and is similar apparently to the liver enzyme in its properties. Solubilization of the enzyme was achieved without alteration in its activity when 0.25% of Triton X-100 was added by cell homogenisation. Activity of phenylalanine hydroxylase in leukocytes was estimated by a modified procedure of tuling et al. The distinct discrimination between activity of phenylalanine hydroxylase obtained in groups of healthy persons as well as in homo- and heterozygotes by the Ph gene enabled to detect phenylketonuria and to reveal heterozygotes using leukocytes instead of liver tissue biopsy.

А. Д. Денисенко, М. С. Усатенко, В. Т. Лозовский, В. Ф. Трюфанов,
И. А. Олейник, Е. Я. Маграчева, А. Н. Климов

АПОЛИПОПРОТЕИНЫ А-I, А-II и Е и ЛИПОПРОТЕИДЫ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ В КРОВИ ЛЮДЕЙ ПРИ ДИС- α -ЛИПОПРОТЕИДЕМИЯХ

Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины, Ленинград

Изучению липопротеидов высокой плотности (ЛПВП), или α -липопротеидов, в последнее время уделяется большое внимание в связи с их предполагаемой ролью в предотвращении атеросклероза [1, 2]. Считают, что ЛПВП плазмы крови транспортируют холестерин из периферических тканей в печень, осуществляя таким образом функцию выведения холестерина из организма [1, 3]. Удаление холестерина из периферических тканей ЛПВП и транспорт его в печень тесно связаны с активностью лецитин: холестерин-ацилтрансферазы, катализирующей реакцию эстерификации свободного холестерина [4]. Кофактором лецитин: холестерин-ацилтрансферазы является аполипопротеин (апо) А-I, составляющий около 75% всех белков ЛПВП человека [5]. Второй главный аполипопротеид ЛПВП — апо А-II — составляет еще около 20% всех белков ЛПВП [5]. Имеются данные о тесной метаболической взаимосвязи ЛПВП липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП) [6, 1] одним из главных аполипопротеидов которых является апо Е. Последний, как установлено, обладает способностью связывать холестерин [7]. В связи с изложенным изучение содержания апо А-I, и апо А-II и апо Е наряду с содержанием липидов в крови представляло интерес для выяснения взаимосвязи обменных превращений важнейших аполипопротеинов и липидов ЛПВП и ЛПОНП у людей с нормальным, высоким и низким уровнем ЛПВП в крови. Кроме того, в настоящей работе проведено сопоставление содержания в крови ЛПВП и их субфракций, определенных с помощью аналитического ультрацентрифугирования, с концентрацией указанных аполипопротеинов.

Методика

Кровь брали у мужчин в возрасте 20—70 лет после 12-часового голодания. Концентрацию общего холестерина, триглицеридов и α -холестерина (после осаждения из плазмы крови пре- β - и β -липопротеидов с помощью $MgCl_2$ и гепарина) определяли на автоанализаторе АА-2 фирмы «Technicon» (США) [8]. Методы выделения чистых препаратов апо А-I, апо А-II и апо Е, получения моноспецифических иммунных сывороток и количественного иммуноэлектрофореза были подробно описаны нами ранее [9]. Апо А-I и апо А-II выделяли из ЛПВП, а апо Е — из ЛПОНП донорской крови с помощью гель-хроматографии на системе колонок с сефадексами G-100 и G-200 [10—12]. Антисыворотки к апо А-I, апо А-II и апо Е получали после троекратного внутрибрюшинного введения кроликам соответствующих аполипопротеинов в смеси с полным адъювантом Фрейнда. Ракетный иммуноэлектрофорез образцов плазмы проводили в агарозном геле, содержащем кроличью антисыворотку к человеческим апо А-I, А-II, и Е. Гель готовили из смеси 2% агарозы (Bio-Rad Laboratories), США и 5% декстрана 15 000—20 000 («Loba Chemie», Австрия) в 0,05 М вероналовом буфере, pH 8,6.

Выделение и концентрирование общей фракции липопротеидов проводили по модифицированному методу [13, 14] препаративным ультрацентрифугированием в течение 48 ч при 45 000 об/мин и температуре 4 °С в роторе 50.3 (фирма «Beckman», США). Точное измерение объема верхней фракции, отбираемой для дальнейшей работы и содержащей липопротеиды с d менее 1,210 г/мл, было необходимо для определения коэффициента концентрирования, используемого в количественном анализе. Липопротеиды плазмы крови пациентов при гипер- и нормо- α -липопротеидемиях подвергали двукратному концентрированию при препаративном ультрацентрифугировании, а при гипо- α -липопротеидемии проводили четырехкратное концентрирование липопротеидов по сравнению с их исходной концентрацией в плазме. Солевую плотность поддерживающего слоя измеряли после отбора каждого образца рефрактометрическим методом, и это служило качественным контролем препаративного ультрацентрифугирования. Диализ всех образцов перед аналитическим ультрацентрифугированием проводили в течение 24—40 ч при 4 °С против раствора, содержащего 2,762 М $NaBr$, 0,196 М $NaCl$, 0,01 % ЭДТА (26 °С, 1200 г/мл). Используя в работе общую фракцию липопротеидов при изучении молекулярно-весового распределения ЛПВП, мы исходили из допущения, что ЛПВП не изменяют своих гидратационных параметров в процессе выделения

и диализа в присутствии других классов липопротеидов и что присутствие в образце липопротеидов меньшей, чем ЛПВП, плотности незначительно влияет на условия флотирования ЛПВП в процессе аналитического ультрацентрифугирования.

Аналитическое ультрацентрифугирование осуществляли с учетом всех особенностей метода, оговоренных в работе [15], на аналитической ультрацентрифуге модель Е фирмы «Beckman» (США) со стандартной оптической системой при положении фазовращающей пластины 55°. Величину коэффициента увеличения и индекса рефракции на единицу площади ширен-профиля периодически калибровали на стандартной калибрационной ячейке. Трудности по точному определению радиального положения дна ячеек при одновременном центрифугировании двух образцов были основной причиной использования АН-Д аналитического ротора, укомплектованного контрбалансом и одной аналитической ячейкой с сапфировыми окошками и стандартной двухсекторной 12-миллиметровой вставкой 2,5°. Описание молекулярно-вещного распределения ЛПВП основывалось на анализе формы ширен-профиля, зарегистрированного через 64 мин после достижения скорости вращения 52 000 об/мин при температуре ротора 26 °С. Нормировку и коррекцию картины молекулярно-вещного распределения по результатам аналитического ультрацентрифугирования проводили на специализированном управляющем вычислительном устройстве 15 ВСМ-5 по программе коррекции, алгоритм которой не имеет принципиальных отличий от используемого в работе [15]. На основании данных работы [16] были использованы значения скоростей флотации на шкале $F_{1,20}^{\circ}$ для равновесных границ раздела подклассов в картине молекулярно-вещного распределения ЛПВП. Оценку концентрации подклассов проводили вычислением количества материала, заключенного между сечениями по этим условно-равновесным границам. Концентрацию подкласса ЛПВП₃ (d 1,125—1,200 г/мл) определяли по количеству материала в диапазоне между сечениями по границам скоростей флотации $F_{1,20}^{\circ}$ 0—2,25; концентрацию ЛПВП_{2a} — в диапазоне $F_{1,20}^{\circ}$ 2,25—4,20; концентрацию ЛПВП_{2b} рассчитывали как остаток после вычитания двух ранее вычисленных концентраций подклассов ЛПВП₃ и ЛПВП_{2a} из общей концентрации ЛПВП.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью настольной вычислительной системы «Hewlett—Packard» 9845S.

Результаты

Все обследованные были разделены на 3 группы по содержанию α -холестерина в соответствии с данными популяционного обследования [7]: ниже 37 мг/100 мл (гипо- α -липопротеидемия), 38—75 мг/100 мл (норма) и выше 75 мг/100 мл (гипер- α -липопротеидемия).

Как видно из табл. 1, содержание апо А-I, апо А-II и апо Е в плазме крови мужчин с нормальным уровнем α -холестерина в среднем составляет соответственно $136 \pm 3,6$, $63,9 \pm 1,7$ и $10,0 \pm 0,4$ мг/100 мл. У лиц с гипер- α -липопротеидемией отмечена более высокая концентрация апо А-I в плазме крови, а концентрация триглицеридов была ниже, чем у лиц с нормальным уровнем α -холестерина. Содержание апо А-II в плазме при гипер- α -липопротеидемии имело тенденцию к повышению, но разница с нормой была статистически недостоверна. Кроме того, в этой группе обследованных отмечено значительное повышение коэф-

Таблица 1
Содержание общего холестерина, триглицеридов, α -холестерина и апо А-I, апо А-II и апо Е (в мг/100 мл) в плазме крови мужчин с дис- α -липопротеидемией

Группа обследованных	Холестерин общий	Триглицериды	α -холестерин	Апо А-I	Апо А-II	Апо Е	α -холестерин/апо А-I	α -холестерин/апо А-II	Апо А-I/апо А-II	Апо А-I/апо Е	Апо А-II/апо Е
1. Нормальная ($n=42$)	$194 \pm 5,2$	$95,4 \pm 9,7$	$54,8 \pm 1,5$	$136 \pm 3,6$	$63,9 \pm 1,7$	$10,0 \pm 0,4$	$0,41 \pm 0,01$	$0,86 \pm 0,02$	$2,19 \pm 0,05$	$14,8 \pm 0,61$	$6,89 \pm 0,28$
2. Гипер- α -липопротеидемия ($n=21$)	$211 \pm 7,3$	$58,9 \pm 5,5$	$99,7 \pm 5,4$	$173 \pm 5,5$	$71,4 \pm 3,8$	$8,3 \pm 0,7$	$0,58 \pm 0,02$	$1,45 \pm 0,08$	$2,51 \pm 0,12$	$23,2 \pm 2,50$	$10,23 \pm 1,30$
3. Гипо- α -липопротеидемия ($n=17$)	$197 \pm 9,0$	$182 \pm 20,0$	$31,4 \pm 1,2$	$116 \pm 3,5$	$49,6 \pm 1,8$	$11,6 \pm 0,6$	$0,27 \pm 0,01$	$0,65 \pm 0,04$	$2,42 \pm 0,13$	$10,4 \pm 0,61$	$4,27 \pm 0,32$
	$\geq 0,05$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	$\geq 0,05$	$\leq 0,05$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	$\leq 0,02$	$\leq 0,01$	$\leq 0,02$
	$\geq 0,05$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	$\leq 0,05$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	$\leq 0,05$	$\leq 0,05$	$\leq 0,01$
	$\geq 0,05$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	$\leq 0,05$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$

фициентов α -холестерин/апо А-I, α -холестерин/апо А-II, апо А-I/апо А-II, апо А-I/апо Е и апо А-II/апо Е.

У лиц с гипо- α -липопротеидемией концентрация апо А-I и апо А-II в крови была ниже, а триглицеридов и апо Е — выше, чем у здоровых людей. Отношения α -холестерин/апо А-I, α -холестерин/апо А-II и апо А-II/апо Е при гипо- α -липопротеидемии были снижены, а отношения апо А-I/апо А-II и апо А-I/апо Е, хотя и были значительно ниже, чем при гипер- α -липопротеидемии, но не отличались от таковых в норме.

Данные о содержании ЛПВП и их субфракций — ЛПВП₃, ЛПВП₂, ЛПВП_{2a}, ЛПВП_{2b}, определенном с помощью аналитического ультрацентрифугирования, у лиц с нормальной концентрацией α -холестерина в крови представлены в табл. 2. При гипер- α -липопротеидемии концентрация как

Т а б л и ц а 2

Содержание ЛПВП и их подфракций (в мг/100 мл) в плазме крови мужчин с дис- α -липопротеидемиями

Группа обследованных	Общие ЛПВП	ЛПВП ₃	Общие ЛПВП ₂	ЛПВП _{2a}	ЛПВП _{2b}
1. Норма (n=16)	279±14,9	163±11,0	116±8,2	85,0±4,9	30,8±3,9
2. Гипер- α -липопротеидемия (n=4) P ₁	506±93,6 <0,05	197±16,8 >0,05	309±109,2 >0,05	171±38,0 <0,05	138±71,6 >0,05
3. Гипо- α -липопротеидемия (n=3) P ₁	182±6,4 <0,01	144±6,9 >0,05	38,1±12,2 <0,01	32,2±9,7 <0,01	5,8±2,6 <0,01

общих ЛПВП, так и их субфракций повышалась, а при гипо- α -липопротеидемии — понижалась. Особенно сильно изменялось при дис- α -липопротеидемии содержание в крови ЛПВП₂ и их подфракций — ЛПВП_{2a} и ЛПВП_{2b}. Так, при гипер- α -липопротеидемии концентрация этих фракций ЛПВП увеличивалась соответственно на 167, 100 и 348%, а при гипо- α -липопротеидемии уменьшалась соответственно на 67, 62 и 81%, тогда как уровень ЛПВП₃ при дис- α -липопротеидемии существенно не изменялся (см. табл. 2).

В табл. 3. представлены данные о корреляционных взаимоотношениях между отдельными показателями для всех обследованных лиц. Были обнаружены существенные положительные корреляции между концентрациями α -холестерина, с одной стороны, и ЛПВП, ЛПВП₂, ЛПВП_{2a}, ЛПВП_{2b}, апо А-I, апо А-II и коэффициентами α -холестерин/апо А-I α -холестерин/апо А-II, апо А-I/апо Е и апо А-II/апо Е, с другой. Концентрация ЛПВП положительно коррелировала с содержанием апо А-I, апо А-II, коэффициентами α -холестерин/апо А-I, α -холестерин/апо А-II, апо А-I/апо Е, апо А-II/апо Е и была связана отрицательной корреляцией с содержанием апо Е в крови и отношением апо А-I/апо А-II. Показаны также положительные существенные корреляции между концентрациями апо Е и триглицеридов, апо А-I и апо А-II, а также между концентрацией апо А-I и всеми приведенными коэффициентами. Следует отметить, что концентрация триглицеридов и апо Е в крови отрицательно коррелировала с уровнем α -холестерина, ЛПВП, ЛПВП₂, ЛПВП_{2a}, ЛПВП_{2b}, апо А-I и апо А-II. Обращает на себя внимание тот факт, что концентрация ЛПВП₃ очень слабо коррелировала с концентрацией α -холестерина, ЛПВП₂ и всеми рассчитанными коэффициентами и была связана более или менее существенной положительной корреляцией лишь с ЛПВП, апо А-I и апо А-II, но значительно менее выраженной, чем у ЛПВП₂. Кроме того, были связаны положительной корреляцией с уровнем триглицеридов и апо Е, тогда как остальные субфракции ЛПВП отрицательно коррелировали с этими показателями.

Приведенные в табл. 4—6 корреляционные матриксы для отдельных групп обследованных указывают на некоторые различия в корреляционных связях между измеренными параметрами в зависимости от концентрации α -

Т а б л и ц а 3

Корреляционная матрица анализируемых параметров у всех обследованных ($n=80$; $P<0,05$)

	ЛПВП ₃	ЛПВП ₂	ЛПВП _{2a}	ЛПВП _{2б}	ХС	ТГ	α -ХС	Апо А-I	Апо А-II	Апо Е	Апо А-I/апо А-II	α -ХС/апо А-I	α -ХС/апо А-II	Апо А-I/апо Е	Апо А-II/апо Е
ЛПВП	0,415	0,948	0,966	0,900	0,449	-0,114	0,921	0,770	0,834	-0,368	-0,466	0,804	0,669	0,814	0,870
ЛПВП ₃		0,105	0,241	0	0,245	0,321	0,134	0,521	0,456	0,172	-0,220	-0,055	-0,139	0,053	0,076
ЛПВП ₂			0,972	0,984	0,406	-0,236	0,960	0,661	0,753	-0,459	-0,433	0,898	0,779	0,867	0,920
ЛПВП _{2a}				0,915	0,419	-0,229	0,946	0,697	0,775	-0,425	-0,462	0,899	0,794	0,825	0,873
ЛПВП _{2б}					0,381	-0,233	0,935	0,609	0,708	-0,468	-0,396	0,865	0,740	0,866	0,921
ХС						0,329	0,253	0,259	0,214	0,352	0,122	0,149	0,209	0,025	0,029
ТГ							-0,484	-0,342	-0,174	0,515	-0,067	-0,492	-0,503	-0,481	-0,425
α -ХС								0,781	0,621	-0,463	0,152	0,857	0,846	0,784	0,812
Апо А-I									0,624	-0,305	0,374	0,385	0,606	0,696	0,619
Апо А-II										-0,202	-0,469	0,474	0,141	0,586	0,746
Апо Е											0,024	-0,507	-0,482	-0,816	-0,719
Апо А-I/апо А-II												-0,059	0,490	-0,019	-0,357
α -ХС/апо А-I													0,820	0,717	0,787
α -ХС/апо А-II														0,744	0,568
Апо А-I/апо Е															0,919

Примечание. Здесь и в табл. 4—6 ХС — холестерин, ТГ — триглицериды.

Корреляционная матрица анализируемых параметров у пациентов с нормальным уровнем α -холестерина в крови ($n=42$; $P<0,05$)

[illegible]

Т а б л и ц а 5

Корреляционная матрица анализируемых параметров у больных с гипер- α -липопротеидемией ($n=21$; $P<0,05$)

	ТГ	α -ХС	Апо А-I	Апо А-II	Апо Е	Апо А-I/ано А-II	α -ХС/ано А-I	α -ХС/ано А-II	Апо А-I/ано Е	Апо А-II/ано Е
ХС	0,250	0,384	0,468	0,297	0,324	0,074	0,156	0,132	0,006	0,181
ТГ		-0,307	-0,246	0,237	0,818	-0,389	-0,240	-0,509	-0,674	-0,364
α -ХС			0,731	0,514	-0,374	0,082	0,790	0,490	0,612	0,813
Апо А-I				0,352	-0,289	0,380	0,169	0,375	0,570	0,494
Апо А-II					-0,230	-0,714	0,352	-0,485	0,529	0,829
Апо Е						-0,200	-0,366	-0,563	-0,905	-0,727
Апо А-I/ано А-II							-0,152	0,801	0,234	-0,287
α -ХС/ано А-I								0,451	0,536	0,907
α -ХС/ано А-II									0,737	0,326
Апо А-I/ано Е										0,862

Т а б л и ц а 6

Корреляционная матрица анализируемых параметров у больных с гипо- α -липопротеидемией ($n=17$; $P<0,05$)

	ТГ	α -ХС	Апо А-I	Апо А-II	Апо Е	Апо А-I/ано А-II	α -ХС/ано А-I	α -ХС/ано А-II	Апо А-I/ано Е	Апо А-II/ано Е
ХС	0,705	0,048	-0,302	-0,017	0,541	-0,103	0,250	0,122	-0,514	-0,573
ТГ		-0,042	-0,206	0,113	0,237	-0,081	0,109	-0,015	-0,382	-0,510
α -ХС			-0,053	0,083	-0,206	-0,155	0,792	0,681	0,200	0,110
Апо А-I				-0,040	-0,379	0,628	-0,639	-0,104	0,672	0,259
Апо А-II					-0,129	-0,791	0,072	-0,659	0,053	0,660
Апо Е						-0,075	0,040	0,098	-0,927	-0,811
Апо А-I/ано А-II							-0,469	0,428	0,232	-0,494
α -ХС/ано А-I								0,567	-0,177	-0,084
α -ХС/ано А-II									-0,082	-0,459
Апо А-I/ано Е										0,727

холестерина в крови. Так, у лиц с нормальным уровнем α -холестерина в плазме концентрация апо А-I была связана положительной корреляцией с содержанием триглицеридов и апо Е, а у больных с дис- α -липопротеидемиями — отрицательной корреляцией. Кроме того, с увеличением концентрации α -холестерина в крови корреляционная связь между концентрацией α -холестерина и содержанием апо А-I резко усиливалась (от 0,053 при гипо- α -липопротеидемии до 0,731 при гипер- α -липопротеидемии), а между концентрациями общего холестерина и триглицеридов уменьшалась (от 0,705 при гипо- α -липопротеидемии до 0,250 при гипер- α -липопротеидемии). И наконец, корреляция между содержанием α -холестерина и апо А-II при гипо- α -липопротеидемии была значительно ниже, чем в остальных группах обследованных.

Обсуждение

Обнаруженные нами средние величины концентраций апо А-I, апо А-II и апо Е в плазме крови здоровых мужчин близки соответствующим величинам, установленным другими авторами при измерении концентраций аполипопротеинов методом ракетного иммуноэлектрофореза [17] и радиальной иммунодиффузии [18]. Также сходны с имеющимися в литературе данными [16] и выявленные нами с помощью аналитического ультрацентрифугирования концентрации ЛПВП и их субфракций в крови здоровых мужчин.

Установленные в настоящей работе тесные корреляционные взаимоотношения между концентрациями апо А-I и апо А-II, с одной стороны, и концентрациями α -холестерина, ЛПВП и их субфракций, с другой, позволяют высказать предположение о важной, возможно, определяющей роли скоростей синтеза и (или) деградации указанных аполипопротеинов в поддержании уровня ЛПВП в крови. Вместе с тем в группе больных с гипо- α -липопротеидемией корреляция содержания α -холестерина в крови с уровнем апо А-I и апо А-II практически отсутствует. Это может быть связано с увеличением доли апо А-I и апо А-II вне ЛПВП, возможно, в составе ЛПОНП а также в свободном виде (вне липопротеидов). В пользу предположения о том, что ЛПОНП могут вносить довольно существенный вклад в общую концентрацию апо А-I и апо А-II в плазме, свидетельствует обнаруженная нами отрицательная корреляция между содержанием триглицеридов, а также апо Е в крови, с одной стороны, и отношениями α -холестерин/апо А-I и α -холестерин/апо А-II, с другой (см. табл. 3—5), т. е. при увеличении концентрации ЛПОНП (в которых находится основная масса триглицеридов и апо Е плазмы крови) уменьшается количество α -холестерина, приходящееся на молекулу апо А-I или апо А-II плазмы. Уменьшение коэффициентов α -холестерин/апо А-I и α -холестерин/апо А-II при гипо- α -липопротеидемии и увеличение их при гипер- α -липопротеидемии могут быть связаны также и с изменением доли ЛПВП₂ в общем пуле ЛПВП (около 40% в норме, 60% при гипер- α -липопротеидемии и 20% при гипо- α -липопротеидемии), так как эти коэффициенты в ЛПВП₂ выше, чем в ЛПВП₃ [19]. Об этом свидетельствует и высокая положительная корреляция между концентрацией ЛПВП₂ и коэффициентами α -холестерин/апо А-I и α -холестерин/апо А-II, тогда как ЛПВП₂ связаны с этими отношениями отрицательной корреляцией, которая особенно выражена у лиц с нормальным уровнем α -холестерина в крови (см. табл. 3, 4).

Ранее нами было высказано предположение, что при гипер- α -липопротеидемии увеличивается преимущественно содержание ЛПВП₂ [2]. Полученные данные полностью подтвердили это предположение, причем при гипер- α -липопротеидемии увеличивалось содержание обеих субфракций ЛПВП₂; ЛПВП_{2а} и ЛПВП_{2б} (см. табл. 2). При гипо- α -липопротеидемии уменьшалась концентрация также преимущественно ЛПВП₂ и их субфракций. Содержание ЛПВП₃ мало изменялось при дис- α -липопротеидемиях.

Весьма интересно, что ЛПВП₃ были связаны довольно слабыми корреляционными связями с ЛПВП₂ и их субфракциями, α -холестерином и всеми коэффициентами. Корреляция ЛПВП₃ с концентрацией апо А-I и апо А-II

была более слабой, чем корреляция ЛПВП₂ с концентрацией этих аполипопротеинов. Вместе с тем ЛПВП₃ были связаны хотя и слабой, но положительной корреляцией с содержанием триглицеридов и апо Е в плазме, тогда как общая фракция ЛПВП и ЛПВП₂ имели выраженную отрицательную корреляцию с этими показателями (см. табл. 3). Все это свидетельствует о метаболической обособленности ЛПВП₃ от других ЛПВП, а также о том, что содержание ЛПВП₃ в крови довольно стабильно и мало зависит от состояния обмена других липопротеидов. Обнаруженная у лиц с нормальным уровнем α -холестерина в крови значительная положительная корреляция между ЛПВП₃ и содержанием апо А-I и апо А-II (см. табл. 4), по-видимому, связана с тем, что в норме ЛПВП₃ составляют большую часть общей фракции ЛПВП (см. табл. 2) и основная масса апо А-I и апо А-II находится в составе ЛПВП₃.

Выше уже упоминалось о том, что триглицериды и апо Е в плазме находятся преимущественно в составе ЛПОНП, поэтому вполне логичной выглядит обнаруженная нами положительная корреляция между концентрациями триглицеридов и апо Е, которая сохраняется у больных всех групп (см. табл. 3—6). В ряде исследований [6, 20] показана тесная связь между обменом ЛПВП и ЛПОНП и установлено, что содержание триглицеридов и холестерина в ЛПОНП обратно коррелирует с концентрацией α -холестерина. В настоящей работе обнаружена отрицательная корреляция не только между концентрациями триглицеридов и α -холестерина в плазме, но и между концентрацией триглицеридов и апо Е, с одной стороны, и концентрациями ЛПВП, ЛПВП₂ и их субфракций, апо А-I и апо А-II, с другой (см. табл. 3). Особенно хотелось бы выделить впервые обнаруженную отрицательную корреляцию между содержанием апо Е в плазме с ЛПВП и их компонентами: α -холестерином, апо А-I и апо А-II (см. табл. 3, 5, 6). Вместе с тем концентрация апо Е в плазме у лиц с нормальным уровнем α -холестерина в отличие от этого показателя у лиц с дис- α -липопротеидемиями и у обследованных общей группы положительно коррелировала с концентрацией апо А-I и апо А-II. Это может объясняться тем, что изменение концентрации апо А-I и апо А-II в крови в норме связано, скорее, не с изменением концентрации ЛПВП, а с изменением содержания ЛПОНП. В пользу такого предположения свидетельствует и положительная корреляция между уровнем триглицеридов и содержанием апо А-I и апо А-II в плазме у обследованных этой группы.

Таким образом, можно заключить, что при дис- α -липопротеидемиях происходит значительное изменение концентрации ЛПВП₂. Эти колебания связаны с первую очередь с изменением метаболизма апо А-I и апо А-II. Кроме того, метаболизм, а следовательно, и концентрация в крови ЛПВП₂ тесно связаны с метаболизмом ЛПОНП. Обмен ЛПВП₃, по-видимому, не столь тесно связан с обменом ЛПОНП, и, возможно, что механизмы образования и деградации ЛПВП₃ отличаются от таковых для ЛПВП₂. Однако это предположение требует тщательной экспериментальной проверки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Климов А. И. — В кн.: Превентивная кардиология. Под ред. Г. И. Косицкого. М., 1977, с. 260—321.
2. Miller N. E. — *Lipids*, 1978, v. 13, p. 914.
3. Stein Y., Stein O., Goren R. — In: *High Density Lipoproteins and Atherosclerosis*. Ed. A. M. Jr. Gotto et al. Amsterdam, 1978, p. 37—49.
4. Glomset J. A. — *J. Lipid. Res.*, 1968, v. 9, p. 155.
5. Scanu A. M. — *Biochim. biophys. Acta*, 1972, v. 265, p. 471.
6. Eisenberg S. — In: *High Density Lipoproteins and Atherosclerosis*. Ed. A. M. Jr. Gotto et al. Amsterdam, 1978, p. 87—99.
7. Титова Г. В., Клюева Н. Н., Коженикова К. А. и др. — *Биохимия*, 1980, № 1, с. 51.
8. Климов А. И., Герасимова Е. Н., Шестов Д. Б. и др. — *Кардиология*, 1979, № 4, с. 61.
9. Климов А. И., Усатенко М. С., Денисенко А. Д. и др. — *Биохимия*, 1981, т. 46.
10. McConathy W. J., Alaupovic P. — *FEBS Letters*, 1973, v. 37, p. 178.
11. Edelstein C., Lim C. T., Scanu A. M. — *J. biol. Chem.*, 1972, v. 247, p. 5842.

12. *Utermann G.* — Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 1975, Bd 356, S. 1113.
13. *Lindgren F. T., Jensen L. S., Hatch F. T.* — In: Blood Lipids and Lipoproteins: Quantitation, Composition and Metabolism Ed. G. Nelson, New York, 1972, p. 181—274.
14. *Lindgren F. T.* — In: Analysis of Lipids and Lipoproteins. Ed. E. G. Perkins. Chapman, 1975, p. 204—224.
15. *Ewing A. M., Freeman N. K., Lindgren F. T.* — Advanc. Lipid Res., 1965, v. 3, p. 25.
16. *Anderson D. W., Nichols A. V., Pan S. S. et al.* — Atherosclerosis, 1978, v. 29, p. 161.
17. *Alaupovic P., Curry M. D., McConathy W. J.* — In: International Conference on Atherosclerosis. Ed. L. A. Carlson et al. New York, 1978, p. 109—115.
18. *Cheung M. C., Albers J. J.* — J. clin. Invest., 1977, v. 60, p. 45.
19. *Schaefer E. J., Foster D. M., Jenkins L. L. et al.* — Lipids, 1979, v. 14, p. 511.
20. *Schaefer E. J., Anderson D. W., Brewer H. B. Jr. et al.* — Lancet, 1978, v. 2, p. 391.

Поступила 22/VII 1980 г.

APO LIPOPROTEINS A-I, A-II AND E AS WELL AS HIGH DENSITY LIPOPROTEINS IN BLOOD OF PERSONS WITH DIS- α -LIPOPROTEINEMIAS

A. D. Denisenko, M. S. Usatenko, V. T. Losovsky, V. F. Tryufanov, I. A. Oleynik, E. Ya. Magracheva, A. N. Klimov

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

Content of apo A-I constitute 136 mg/100 ml, of apo A-II — 64 mg/100 ml and of apo E — 10 mg/100 ml in blood plasma of 20—60 years old men with normal concentration of cholesterol / α -CS/ in blood. In the patients with hyper- α -lipoproteinemia / α -CS was above 76 mg per 100 ml/ concentrations of apo A-I and apo A-II were distinctly higher /173 and 71 mg per 100 ml, respectively/ and that of apo E — was lower /8 mg per 100 ml/ as compared with the healthy persons. Under the conditions of hypo- α -lipoproteinemia / α -CS was below 37 mg per 100 ml/ the contents of apo A-I and apo A-II were decreased down to 116 and 50 mg per 100 ml, respectively, and that of apo E — increased up to 12 mg per 100 ml. Concentration of the total fraction of high density lipoproteins /LPHD/, LPHD₂ and their subfractions LPHD_{2a} and LPHD_{2b} was also distinctly increased in hyper- α -lipoproteinemia; it was decreased in hypo- α -lipoproteinemia, while the LPHD₃ content was slightly altered in blood plasma. The capacity of LPHD to transfer of CS appears to increase in hyper- α -lipoproteinemia and to decrease in hypo- α -lipoproteinemia. As shown by correlation analysis, metabolism of LPHD₃ occurred independently from the other LPHD subfractions.

ХРОНИКА

УДК 577.113.3:061.3(47+57) «1980»

III ВСЕСОЮЗНЫЙ СИМПОЗИУМ ПО ЦИКЛИЧЕСКИМ НУКЛЕОТИДАМ

Симпозиум был проведен научным советом АН СССР по проблемам биохимии животных и человека, Киевским университетом и Институтом биохимии АН УССР в мае 1980 г. в Каневе Киевской области. В симпозиуме приняли участие сотрудники 71 учреждения 26 городов, представлено 170 докладов 409 авторов.

Во вводной лекции акад. С. Е. Северина была проанализирована проблема регуляции ферментативной активности в целом. Охарактеризовано значение как «старых» факторов регуляции (рН, субстраты, четвертичная структура ферментов), так и ограниченного протеолиза и обратимой химической модификации: ацетилирования, фосфорилирования, аденилирования, АДФ-рибозилирования.

Подчеркнута важность взаимосвязи этих механизмов. Подробно разобран каскад химических модификаций глутаминсинтетазы. Подчеркнуто, что два мощных токсина осуществляют свой эффект путем включения процессов химической модификации: холерный токсин активирует аденилатциклазу (АЦ), а дифтерийный АДФ-рибозилирует EF-2; в обоих случаях важное значение имеет ГТФ.

В отличие от двух предыдущих симпозиумов симпозиальные доклады на этот раз были обзорными. Это решение является спорным. Во всяком случае целесообразно чередование реферативных и оригинальных докладов. Обсуждались три основные проблемы: ферменты в системе циклических нуклеотидов, влияние цик-

лонуклеотидов на метаболизм и другие процессы и циклические нуклеотиды в патологии.

Первому направлению было посвящено самое большое количество лекций (5) и самое малое количество стендов (37). Интересную и яркую лекцию прочитал В. А. Ткачук (МГУ). Он обратил внимание на эффективность каскадного механизма усиления гормонального эффекта: в ряду кортиколиберин — АКГГ — кортизол — в 10^6 раз, в цепи гормон — цАМФ — эффект — в 10^3 раз. Гормональный эффект часто регулируется путем изменения концентрации рецепторов и реже — в результате изменения K_a . Разная чувствительность тканей к гормонам, ее изменения с возрастом и при диабете тучных являются следствием различий в концентрации рецепторов. Обнаружена группировка рецепторов в кластеры, которая может быть результатом влияния микротрубочек, «заякоряющих» рецепторы. Разобраны две основные современные модели комплекса рецептор — аденилатциклаза. В обеих важнейшее значение придается ГТФ и гуанилнуклеотид-связывающему белку (G-белку). По двухкомпонентной модели активированный гормоном рецептор комплексирован с G-белком, связанным с ГДФ; затем GДФ в этом комплексе переходит в GГДФ путем взаимодействия со свободным ГТФ; далее образуется активный комплекс АЦ — GГДФ (без участия рецептора), диссоциирующий после гидролиза ГТФ на неактивные компоненты. По трехкомпонентной модели гормон взаимодействует с рецептор-G-комплексом с образованием тройного комплекса, который затем связывает ГТФ и приобретает способность взаимодействовать с АЦ. В обеих моделях гормон играет только иницирующую роль, в основном он нужен для связывания ГТФ с G-белком. Активность АЦ регулируется и кальмодулином. Представляют интерес данные коллектива авторов, что Cl^- и другие анионы активируют АЦ и увеличивают эффект на нее гуанилилимидодифосфата в присутствии как ГДФ, так и ГТФ. В то же время ГДФ почти полностью подавляет активацию АЦ катехоламинами.

В содержательной лекции Т. С. Сатова (Институт биохимии, Ташкент) была подробно охарактеризована роль липидного компонента в рецепции гормонов и функции АЦ. Делипидизация мембран снижает связывание йодтиронинов плазматическими мембранами сердца и гормональную активацию АЦ, а последующее добавление индивидуальных фосфолипидов полностью восстанавливает этот процесс. Предполагается, что липидная фаза определяет конформацию рецепторов. Интересно, что тиреоидэктомия снижает количество β -адренорецепторов и рецепторов к глюкагону, а трийодтиронин их резко увеличивает.

В докладе М. Н. Перцевой (Институт эволюционной физиологии и биохимии, Ленинград) на примере адренореактивной системы скелетной мышцы выявлены закономерности развития гормональной чувствительности в онтогенезе, показан его этапный характер. В первую

очередь формируется каталитический компонент, а также фтор- и гуанилнуклеотид-зависимые компоненты, позднее и относительно независимо — гормонорецепторный и, наконец, как завершающий этап — сопрягающий элемент, который сам по себе представлен в мембране по крайней мере двумя компонентами: гуанилнуклеотид-связывающими белками и мембранными липидами.

Физиологические концентрации фруктозодифосфата, АМФ и F_n тормозят АЦ, что может вызвать периодические изменения уровня цАМФ в клетке (А. В. Лазарева, Ю. В. Евтодченко, Институт биофизики, Пущино). Подобраны условия для достаточно специфического гистохимического выявления АЦ, в том числе со специфическим субстратом аденилилимидодифосфатом (М. А. Ростомян, Институт биохимии, Ереван). Перекиси жирных кислот и продукты их деградации — карбонильные соединения активируют гуанилатциклазу, вероятно, в результате взаимодействия с SH-группами (А. С. Соболев и др., МГУ).

В содержательной и блестящей по форме лекции Р. Н. Эттингоф и И. Л. Думлер (Институт эволюционной физиологии и биохимии, Ленинград) была рассмотрена тканевая локализация фосфодиэстераз (ФДЭ), гидролизующих различные циклические нуклеотиды, включая цАМФ, цУМФ, цИМФ и 2',3'-АМФ. Рассмотрены вопросы множественности форм, очистки и молекулярного веса ФДЭ. Высказано предположение, что каталитическая субъединица ФДЭ большинства изученных объектов имеет молекулярный вес 60 000, может образовывать ди- и тримеры и быть, по-видимому, связанной с различными регуляторными белками. Проблема регуляции ФДЭ проанализирована на основании возможностей сдвига равновесия между белковыми субъединицами фермента: отмечена роль циклических нуклеотидов, а также трифосфонуклеотидов в процессе регуляции. На примере фоторецепторной клетки палочки сетчатки, в частности ее наружных сегментов, впервые четко продемонстрирована связь активности ФДЭ с состоянием рецептора (родопсина) и участие ГТФ, а также ранее обнаруженного авторами белкового ингибитора фермента в реализации этой связи. Таким образом, выявлено, что принцип регуляции ФДЭ в процессе получения сигнала внешней среды (света) подобен регуляции АЦ в ответ на гормональный стимул.

Интересно, что у фототрофных бактерий свет изменяет активность и АЦ, и ФДЭ (Е. П. Феденко и др., Институт биохимии им. Баха, Москва). В сердце быка чувствительность ФДЭ к Ca^{2+} полностью обусловлена кальмодулином; зависимость от этого белка форма ФДЭ является основной в сердце быка (М. Ю. Меньшиков, С. А. Булгадаева, Е. И. Королева, МГУ).

В лекции Т. В. Буларгиной, И. А. Гривенникова, Л. П. Сащенко (МГУ, Институт молекулярной биологии, Москва) была дана общая характеристика протеинкиназы, рассмотре-

ны ее два основных типа, их структура и механизм действия. Предложены модели строения регуляторного и каталитического центров протеинкиназы.

В лекции Е. С. Северина, В. Ю. Васильева, М. В. Нестеровой (Институт молекулярной биологии) была охарактеризована роль циклических нуклеотидов в регуляции клеточных процессов. Представлена хронокарта уровня цАМФ, цГМФ, активности ФДЭ и гистонкиназ в самосинхронизирующейся культуре фибробластов. Контроль цАМФ фосфорилирования ядерных белков может быть непосредственным механизмом регуляции генной экспрессии и клеточного деления. Наиболее интересная часть доклада была посвящена представлению о прямых регуляторных эффектах субъединиц протеинкиназы. Регуляторная субъединица существенно влияет на скорость транскрипции, увеличивая число мест посадки РНК-полимеразы на хроматине, т. е. действует по типу цАМФ-связывающего белка бактерий. С мечеными по ^3H -субъединицами получены данные, что они обе проникают из цитоплазмы в ядро и имеют специфические места посадки на хроматине. Различные виды злокачественной трансформации нарушают транспорт протеинкиназы в ядро (SV-40) или снижает ее связывание хромосомами (KB, HeLa). В прениях по докладу были отмечены как оригинальность и важность этих данных, так и необходимость подтверждения того, что субъединицы протеинкиназы проникают в ядро без предварительной деградации.

Аутофосфорилированию подвергаются регуляторные субъединицы протеинкиназы II и каталитические субъединицы обоих типов, но не регуляторные субъединицы протеинкиназы I и мембранной протеинкиназы мышц (М. Д. Курский, З. Д. Воробец, Институт биохимии, Киев). Неожиданным было сообщение, что в ядрах головного мозга крыс цАМФ и в меньшей степени цГМФ ингибируют фосфорилирование гистонов (В. И. Тюленев, О. Ю. Паливода, Я. В. Белик, Институт биохимии, Киев).

Впервые на наших симпозиумах в докладе Г. К. Парсаданяна, Л. П. Тер-Татевосяна и Г. Т. Адунца (Институт биохимии, Ереван) был представлен материал по фосфопротеинфосфатазам. Разделены отдельные формы этого фермента, выделены и охарактеризованы два его белковых ингибитора.

Второму большому разделу симпозиума — эффектам циклических нуклеотидов — было посвящено 2 лекции и 50 стендовых докладов. В содержательной лекции М. Д. Курского (Институт биохимии, Киев) детально разбирались многочисленные функции Ca^{2+} в организме и два основных канала Ca^{2+} -тока в клетку: 1) быстрый, менее специфичный, не зависящий от мембранного потенциала и не деполяризующий плазматическую мембрану; 2) медленный, специфический, потенциалзависимый. Первый регулируется различными биоактивными веществами, второй — нейромедиаторами. Снижение кон-

центрации Ca^{2+} в цитоплазме зависит от Са-АТФ-азы, Na-Са-обмена и компартиментализации Ca^{2+} в митохондриях, эндоплазматическом ретикулуме и, возможно, в ядрах. В последнее время показано, что цАМФ-зависимое фосфорилирование изменяет транспорт Ca^{2+} , активирует Mg, Са-АТФ-азу и увеличивает проницаемость мембран для Ca^{2+} ; важную роль играет фосфорилирование саркоплазматического белка с $M = 22\,000$. Растворимые протеинкиназы мышц нечувствительны к Ca^{2+} , а мембранная форма зависит от него.

Интересное представление Р. И. Салганика о многоклеточном функциональном ансамбле и роли в нем гистамина и цАМФ получило развитие в работе Т. Г. Панковой и др. (Институт цитологии и генетики, Новосибирск), показавших, что эстрадиол в матке крыс индуцирует гистидиндекарбоксилазу, гистамин активирует АЦ, цАМФ стимулирует протеинкиназу ядер, а последняя фосфорилирует гистоны и негистоновые белки хроматина, что, вероятно, в результате депрессии генов и приводит к известным эффектам эстрадиола.

При инкубации ^3H -цАМФ с митохондриями он проникает не только через внешнюю мембрану, но и в митопласты, где накапливается в основном в матриксной фракции. С помощью тонкослойной хроматографии основная часть метки во всех компартментах митохондрий идентифицирована как сам цАМФ (Н. В. Зобова, Красноярский медицинский институт). Проникновение цАМФ в митохондрии делает понятными накапливающиеся в последние годы данные о регуляции циклическими нуклеотидами ряда митохондриальных функций (В. И. Кулинский и др., 1975—1979; Н. А. Юдаев, С. А. Афиногенова, 1978, и др.).

цАМФ *in vitro* через протеинкиназу стимулирует фосфорилирование и активность урокиназы (А. Я. Николаев и др., I MMI) и лизил-тРНК-лигазы (Н. Е. Кучеренко и др., Киевский университет). цАМФ стимулирует образование NH_3 из аминокислот в почках (Ж. С. Геворкян, А. С. Оганесян, Институт биохимии, Ереван), а в тромбоцитах резко активирует неокислительные ферменты пентозного цикла, увеличивает связывание Ca^{2+} (Ю. А. Петрович и др., Московский стоматологический институт). цАМФ и цГМФ ингибируют гомологичное метилирование, ДНК в гомогенатах ядер костного мозга, а ионы Ca^{2+} усиливают этот процесс (Н. А. Федоров, Г. В. Ермайлеченко, Институт гематологии, Москва).

В лекции Н. А. Федорова были обобщены данные о том, что циклические нуклеотиды опосредуют все основные этапы иммуногенеза: пролиферацию стволовых клеток костного мозга, созревание Т- и В-лимфоцитов. Продемонстрировано регуляторное влияние экзо- и эндогенных циклонуклеотидов на реакции клеточного и гуморального иммунитета в эксперименте и клинике. Автор считает, что основой иммунофармакологии является система циклических нуклеотидов и Ca^{2+} лимфоци-

тов, а иммунофармакологические подходы могут корригировать нарушения гуморального и клеточного иммунитета при различных заболеваниях.

Самым популярным направлением на симпозиуме была тема «Циклические нуклеотиды в проблемах патологии» (1 лекция и 75 стендов). Лекция Г. И. Дорофеева и В. Т. Ивашкина (ВМА, Ленинград) была очень содержательной. Основными источниками цАМФ в плазме являются печень и мышцы, а в моче — плазма и почки. Концентрация цАМФ в биологических жидкостях (10^{-8} — 10^{-9} М) существенно ниже, чем в клетках. Уровень цАМФ в крови и моче повышают катехоламины, паратиреоидный гормон, АДГ, ангиотензин, глюкагон, физическая работа и стресс. β -Адренорецепторы блокируют эффект трех последних факторов. Концентрация цАМФ в плазме повышается при гипертонической болезни, феохромоцитоме, сахарном диабете, первичном гиперпаратиреозе, маниакально-депрессивном психозе, холере, снижается при токсикозе беременных. Концентрация цГМФ повышена при гипертонии, псориазе. При бронхиальной астме снижается реакция цАМФ плазмы на катехоламины, но не на глюкагон, при почечном диабете избирательно исчезает реакция на АДГ. Было рассмотрено значение циклических нуклеотидов в патогенезе ряда заболеваний (язвенная болезнь, ишемия миокарда, бронхиальная астма, холера, псориаз и др.) и в механизме действия ряда лекарств. Так, нитросоединения, в том числе нитроглицерин, и сигаретный дым активируют гуанилатциклазу.

Большой интерес представляют данные Л. А. Кожемякина (ВМА, Ленинград) о резком — в 20—30 раз — повышении концентрации цАМФ в крови в первые часы после инфаркта миокарда. Однако нельзя согласиться с автором, что определение этого показателя обеспечивает 100% диагностику, поскольку гиперцАМФемия — весьма неспецифическое явление.

При инсульте (Т. С. Коршунова, Институт неврологии, Москва), эпилепсии у детей (Ж. М. Минасян и др., НИИ педиатрии АМН СССР, Москва), реадaptации после длительных космических полетов (Л. Б. Буравкова, Е. А. Коваленко, Институт медико-биологических проблем, Москва) наблюдалось избирательное или преимущественное повышение концентрации цАМФ в биологических жидкостях. Наоборот, при бронхиальной астме (М. И. Баканов и др., НИИ педиатрии, Москва; С. А. Котов и др., Институт проблем онкологии, Киев), анафилактическом шоке (Ю. А. Юрков и др., НИИ педиатрии, Москва), герпетическом кератите (Б. С. Кравина и др., НИИ глазных болезней, Москва), псориазе (Б. А. Беренбейн и др., МОНИКИ) в жидкостях и тканях цАМФ снижался, а цГМФ существенно повышался. При активном гепатите в печени снижается содержание обоих нуклеотидов (А. С. Логинов и др., НИИ гастроэнтерологии, Москва).

Ранее совершенно недостаточное внимание в клинической биохимии циклических

нуклеотидов уделяли изменениям реактивности в клинике. Теперь это положение начинает исправляться. Так, было показано, что при ишемической болезни миокарда физическая нагрузка сильнее повышает уровень цАМФ (В. А. Максимов и др., ВМА). Наоборот, реакция АЦ на гормоны снижается: в злокачественных опухолях надпочечников — на АКТГ (Н. А. Юдаев и др., Институт эндокринологии, Москва), в тканях старых крыс — на адреналин (О. К. Кульчицкий, А. Я. Литовченко, Институт геронтологии, Киев), у больных раком молочной железы — при избытке массы и повышении холестерина на паратиреоидный гормон, инсулин и эуфиллин (Л. М. Бернштейн, В. М. Дильман, НИИ онкологии, Ленинград); на разные гормоны — при гипертрофии миокарда и аллергическом миокардите (А. М. Зубовская и др., лаборатория энзимологии АМН СССР, Москва) и хроническом лимфолейкозе; лечение последнего левамизолом восстанавливает реактивность полностью или частично (Л. С. Малыгина, Институт гематологии, Москва). Интересно сообщение, что при поражении печени реакция гистидазы и урокиназы сыворотки на введение теофиллина более полезна для диагностики, чем уровень активности этих ферментов (С. Н. Силуанова и др., ИММИ).

В общем виде проанализировал этот вопрос В. И. Кулинский (Красноярский медицинский институт). Было выделено 26 возможных вариантов соотношений изменения чувствительности адренорецепторов, аденилатциклазы и протеинкиназы, включающих гипер-, гипо- и дисреактивность. На примере регуляторной дисульфидредуктазы показано, что почти половина теоретически возможных вариантов действительно наблюдается в динамике нормальной и патологической беременности и при хирургических вмешательствах. Другой подход, предложенный в этом же докладе, — выявление плейорегляторных нарушений при помощи специальной диаграммы. Он показал, что в патологии по-разному изменяется чувствительность к регуляторам разных классов, что может быть использовано для исследования патогенеза и диагностики.

В отличие от более ранних данных (А. С. Соболев и др., 1975) сообщалось, что радиопротектор цистеамин стимулирует АЦ не только при введении в организм, но и при инкубации с плазматическими мембранами (А. В. Никольский и др., Институт биофизики, Москва). Подтверждено, что катехоламины через β -адренорецепторы защищают стволовые клетки костного мозга и при этом увеличивают уровень цАМФ (Ю. Б. Черков и др., МГУ, Институт биологии развития, Москва).

Кроме симпозиальных докладов и стендов, были проведены беседы за «круглым столом», посвященные следующим проблемам: 1) роль циклических нуклеотидов в функции нервной системы; 2) механизмы рецепции; 3) циклические нуклеотиды в синтезе биополимеров, росте и дифференцировке [клеток, 4) циклонуклеотиды в

РЕФЕРАТЫ СТАТЕЙ, НАПРАВЛЕННЫХ НА ДЕПОНИРОВАНИЕ В ВИНИТИ

УДК 547.962

Характеристика модифицированного сывороточного альбумина крови при патологии. Багдасарьян С. П., Троицкий Г. В., Касымова Г. А.

Ранее авторами были выявлены изменения физико-химических свойств сывороточного альбумина в условиях патологии. Эти изменения давали возможность применить к такому измененному белку термин «модифицированный альбумин». В настоящей работе изучены сывороточные альбумины здоровых лиц, больных заболеваниями щитовидной железы и злокачественными опухолями в сравнительном аспекте. Кроме указанных белков, параллельно проводили изучение модифицированных форм, отделенных из альбуминов больных указанными заболеваниями. Наличие модифицированной формы в сывороточных альбуминах, выделенных из крови больных, было обнаружено методом дисперсии оптического вращения (ДОВ) и ранее описанным методом пересадки трихлоруксусной кислотой (ТХУ) с последующим растворением в этаноле и диализом. Проведено изучение количественного состава липидных и углеводных компонентов в электрофоретических фракциях альбумина здоровых лиц и больных указанными выше заболеваниями, а также в выделенных из них модифицированных формах. Показано, что в условиях патологии электрофоретическая фракция альбумина значительно перегружена этими веществами по сравнению с электрофоретической фракцией альбумина, выделенной от здоровых лиц. При этом после выделения из электрофоретической фракции альбумина — модифицированной части, практически все углеводы и липиды, связанные с белком, оказываются в этой модифицированной форме. Сравнительный анализ по молекулярным весам и концевым аминокислотам не выявил отличий между альбуминами здоровых лиц, больных указанными заболеваниями и их модифицированными формами; иммунологически они также были идентичны.

Таким образом, модифицированный альбумин, появляющийся в условиях патологии, не является продуктом собственного катаболизма или каким-либо другим белком, а скорее всего представляет собой продукт постсинтетической модификации этого белка.

УДК 612.123 «32» (573.63)

Влияние сезонных факторов на фосфолипидный состав крови доноров Владивостока. Костецкий Э. Я., Кушнерова Н. Ф., Ильенко Л. А.

Представлены результаты изучения сезонных изменений (весна, лето, осень, зима) содержания и состава фосфолипидов плазмы и эритроцитов разных групп крови доноров с положительным и отрицательным резус-фактором. Липиды извлекали по методу [1], пластинки для микротонкослойной хроматографии готовили по методу [2], хроматографические системы — по методу [3]. Липидный фосфор определяли по методу [4]. Обнаружены следующие фосфолипиды: фосфатидилхолин (ФХ), лизофосфатидилхолин (ЛФХ), сфингомиелин (СМ), фосфатидилэтаноламин (ФЭ), лизофосфатидилэтаноламин (ЛФЭ), фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилинозит (ФИ), дифосфатидилглицерин (ДФГ). В эритроцитах дополнительно найдена фосфатидная кислота (ФК). В плазме крови всех групп доноров общим признаком является значительное изменение фосфолипидного состава в зимний период, в частности увеличение отношения этаноламиновых к холинсодержащим липидам, а также снижение содержания кислых липидов — ДФГ, ФИ и ФС, связанных с энергетическим обменом. В эритроцитах происходят изменения структурных компонентов мембраны (СМ, ЛФХ и ЛФЭ), ответственных за ее проницаемость. Накопление лизофосфатидов, возможно, связано с увеличением активности фосфолипаз и, по-видимому, необходимо для изменения проницаемости плазматической мембраны эритроцитов, чтобы увеличить отдачу кислорода, необходимого в окислительных процессах. Фосфолипидный состав резус-отрицательной крови существенно отличается от резус-положительной содержанием холиновых липидов и особенно сфингомиелина. Анализ всех данных показал, что процессы изменения фосфолипидного состава в эритроцитах и плазме крови взаимосвязаны. Уменьшение определенных фосфолипидов в плазме приводит к обратному результату в эритроцитах. Причем, несмотря на эти общие черты, каждая группа крови имеет свои особенности в содержании фосфолипидных классов, связанные с сезонными изменениями. Полученные результаты могут быть использованы как нормограммы для жителей Дальнего Востока, а также как показатели реактивных возможностей организма в разные сезоны года.

медицинской техники Министерства здравоохранения СССР, являлся членом редколлегии ряда научных медицинских журналов — «Вопросы медицинской химии», «Лабораторное дело» и др. Георгий Валерианович был награжден орденом Ленина и медалями.

Увлеченный ученый, прекрасный мето-

дист, внимательный и добрый человек, профессор Г. В. Дербиз отдал свою жизнь служению науке — медицинской химии — и заслужил всеобщее признание и уважение.

Светлая память о Георгии Валериановиче навсегда останется в сердцах всех знавших его.

СОДЕРЖАНИЕ

Кендыш И. П. Значение глюкагона в патогенезе диабета (Обзор) . . .	147
Мертвецов Н. П. Множественные формы тирозинаминотрансферазы в клетках печени крыс и их роль в гомеостазе клетки . . .	154
Троицкий Г. В., Ахмед Мухтар, Ажицкий Г. Ю., Багдасарян С. П., Гаевская В. А., Клишевич И. Р., Шевцов В. Д. Выделение и очистка неспецифического компонента сывороточного альбумина человека, характерного для патологии . . .	166
Михалкина Н. И., Сверхкова В. С. Активность лактатдегидрогеназы в сердце крыс при гипоксически-гиперкапнических воздействиях . . .	172
Хурсин Н. Е. Повышение ДНК-азной активности мочи крыс после внутрибрюшинного введения ДНК-аз . . .	175
Вартанян Г. С., Карагезян К. Г. Нормализующее действие экстракта переступия белого Bryonia Alba L. на фосфолипиды крови при аллоксановом диабете . . .	179
Ляпина Л. А., Ульянов А. М., Базазьян Г. Г., Бонева Ж. С. Проникновение комплекса гепарин — тромбопластин в ткани мозга при его введении в организм здоровых животных и животных, находящихся в предтромботическом состоянии, вызванном атерогенной диетой . . .	181
Григорян В. Г., Шинкарева Т. И., Кирошка В. С., Цымбаларь Г. Г., Вангели Л. В. Изменение активности НАД-гликогидролазы, кислот и щелочной фосфатаз в ферментных элементах крови при туберкулезе . . .	185
Суринов Б. П., Комарова А. Б. Множественные формы некоторых ферментов ткани рака прямой кишки при лучевой терапии . . .	189
Филановская Л. И., Ушакова Е. А., Блинов М. П., Филиппова В. Н. Влияние аденозина на синтез пиримидиновых нуклеотидов и РНК в нормальных лимфоцитах и при хроническом лимфолейкозе . . .	193
Туракулов Я. Х., Саатов Т. С., Рахимджанова М. Т., Исмаил-ходжаева Г. Окисление пальмитилкарнитина митохондриями сердца и печени крыс при тиреоидной патологии . . .	197

CONTENTS

<i>Kemdysh, I. N.</i> Significance of glucagon in the diabetes pathogenesis (review)	
<i>Mertvetsov, N. P.</i> Multiple forms of tyrosine aminotransferase in rat liver cells and their role in cell homeostasis	
<i>Troitsky, G. V., Muchtar Akhmed, Azhitsky, G. Yu., Bagdasaryan, S. N., Gaevskaya, V. A., Klishevich, I. R., Shevtsov V. D.</i> Isolation and purification of an unspecific component from human serum albumin, typical for pathology	
<i>Mikhalkina, N. I., Sverchkova, V. S.</i> Hypoxia-hypercapnic effects on the lactate dehydrogenase activity in rat heart tissue	
<i>Khursin N. E.</i> Increase in DNAase activity in rat urine after intraperitoneal administration of DNAases	
<i>Vartanyan, G. S., Karagezyan, K. G.</i> The normalizing effect of Bryonia alba L. on blood phospholipids in alloxane diabetes	
<i>Lyapina, L. A., Uljanov, A. M., Bazaz'yan G. G., Boneva Z. S.</i> Penetration of the heparin-thromboplastin complex into brain tissues after administration of the complex into healthy animals and into animals with the prethrombotic state caused by atherogenic diet	
<i>Grigoryan, V. G., Shinkareva, T. I., Kiroshka, V. S., Tsybalar, G. G., Vangeli L. V.</i> Alteration in activities of NAD-glycohydrolase, acid and alkaline phosphatases in blood cells under conditions of tuberculosis	
<i>Surinov, B. P., Komarova, A. B.</i> Multiple forms of some enzymes in tissue of rectum carcinoma after X-ray treatment	
<i>Filanovskaya, L. I., Ushakova, E. A., Blinov, M. N., Filippova, V. N.</i> Effect of adenosine on synthesis of pyrimidine nucleotides and RNA in normal lymphocytes and under conditions of chronic lymphoid leukosis	
<i>Turakulov, Ya. Kh., Saatov, T. S., Rakhimdzhanova, M. T., Ismail-khodzhaeva, G.</i> Oxidation of palmityl carnitine in mitochondria of rat heart and liver tissues under conditions of thyroid pathology	

эффективности и механизмах про- тивогипоксического действия АТФ на организм новорожденных кры- сят	254	mechanisms of antihypoxic effect of ATP in newborn rats
Калашников В. В., Волощук С. Г., Фалалеева Д. М., Татаринов Ю. С. Иммунохимическое изучение эм- брионального преальбумина-2 (ЭПА-2) в тканях плода и взрос- лого человека	259	Kalashnikov, V. V., Voloschuk, S. G., Falaleeva, D. M., Tatarinov, Yu. S. Immunochemical study of the embry- onal prealbumin-2 in embryonal and adult human tissues
Камышанская Н. С., Москвити- на Т. А. Множественные формы моноаминоксидазы мозга челове- ка	261	Kamyshanskaya, N. S., Moskviti- na, T. A. Multiple forms of human brain monoamine oxidase
Анненков Г. А., Сафронова Е. Е. Доказательства наличия активной фенилаланингидроксилазы в лей- коцитах человека	266	Annenkov, G. A., Safronova, E. E. Presence of active phenylalanine hyd- roxylase in human leukocytes
Денисенко А. Д., Усатенко М. С., Лозовский В. Т., Трюфанов В. Ф., Олейник И. А., Маграчева Е. Я., Климов А. Н. Аполипопротеины А-I, А-II и Е и липопротеиды вы- сокой плотности в крови людей при дис- α -липопротеидемиях	272	Denisenko, A. D., Usatenko, M. S., Losovsky, V. T., Tryufanov, V. F., Oleynik, I. A., Magracheva, E. Ya., Klimov, A. N. Apolipoproteins A-I, A-II and E as well as high density lipoproteins in blood of persons with dia- α -lipoproteinemias
Хроника		Current Events
Кулинский В. И. III Всесоюзный симпозиум по циклическим нуклео- тидам	280	Kulinsky, V. I. The III All-Union Symposium on Cyclic Nucleotides
Некролог		Obituary
Георгий Валерианович Дервиз (1897—1980)	284	Georgiy Valerianovich Derviz (1897— 1980)

Техн. редактор Э. А. Шешнёва

Корректор Т. И. Антонова

Сдано в набор 22.01.81.	Подписано в печать 24.02.81.	Формат 70×108 ¹ / ₁₆	Бумага тип. № 1
Гарнитура литературная	Печать высокая	Печ. л. 9,00 + печ. л. вкл. 0,13	усл. печ. л. 12,78
усл.-кр.-отг. 13,13	Уч.-изд. л. 13,82	Тираж 1853	Цена 1 р. 30 к. Заказ 164

Издательство «Медицина». Москва 101838, Петроверигский пер., 6/8.

Чеховский полиграфический комбинат Союзполиграфпрома
Государственного комитета СССР по делам издательств,
полиграфии и книжной торговли
г. Чехов Московской области