

*В. М. Родионов, Н. А. Кузьмичева, А. В. Поспелова*

## **ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ, РЕГУЛИРУЮЩИЕ ДЕЛЕНИЕ КЛЕТОК В ОРГАНИЗМЕ (Обзор)**

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Поддержание определенного соотношения масс органов и тканей в период развития и на протяжении жизни высших организмов свидетельствует о существовании тонкой и быстродействующей системы регуляции деления клеток. Недостаточность или расстройство механизмов, ответственных за поддержание клеточного гомеостаза, лежит в основе многих патологических состояний, включая злокачественный рост. В настоящее время в медицинской практике применяются разнообразные средства, стимулирующие или подавляющие размножение клеток. Однако в большинстве случаев они влияют не только на ткань, подлежащую воздействию, но и на другие органы. Очевидно, наибольший практический интерес представляют факторы, обладающие тканевой специфичностью. Их использование позволило бы значительно расширить ограничения, которые необходимо соблюдать при применении средств, оказывающих общее цитостатическое или стимулирующее действие. Этим объясняется интерес к изучению тканеспецифических факторов, регулирующих деление клеток в организме.

Одним из наиболее наглядных и хорошо изученных примеров контролируемого размножения клеток является регенерирующая печень млекопитающих. У крыс через 1 сут после удаления 70—80% массы органа гепатоциты в его оставшейся части начинают активно делиться. В течение нескольких последующих дней масса печени восстанавливается, а митотическая активность постепенно затухает. Изучены динамика пролиферации печеночной ткани и параметры митотического цикла гепатоцитов, влияние возраста и гормонального статуса организма на регенерацию печени. Известна в общих чертах последовательность процессов, протекающих в готовящихся к делению клетках [1—4]. Однако единого мнения о природе сигналов, заставляющих гепатоциты перейти из состояния покоя в митотический цикл, а после восстановления массы органа вновь вернуться в это состояние, пока нет.

Большинство ранних работ посвящено поискам стимуляторов деления гепатоцитов, появляющихся в организме после резекции печени [5]. Представление о роли стимуляторов в регуляции деления клеток в организме вытекает из самого простого объяснения явления репаративной регенерации: резкое увеличение митотической активности органа в ответ на его повреждение легче всего объяснить стимулирующим действием продуктов распада поврежденных клеток. Важным доводом в пользу существования веществ, стимулирующих размножение гепатоцитов, служат результаты опытов на парабриотически-соединенных крысах. Стимуляция деления клеток в интактной печени одного из партнеров парабриотической пары через 48 ч после того, как у другого была произведена частичная гепатэктомия, описана 30 лет назад [6]. Особенно сильно эта стимуляция выражена у одного из членов парабриотического триплета, если у 2 других удаляли по 80% печени [7]. Следует отметить, что воспроизводимость этих результатов невысока. Одни авторы их подтверждали [8], другим этого сделать не удалось [9, 10]. По-видимому, для успеха опыта необходимо не только наличие ана-

стомоза между парабрионтами, но и обеспечение определенной минимальной скорости кровообмена между ними. Во всяком случае, в более поздних работах, когда обычный кожно-мышечный шов, соединяющий партнеров парабриотической пары, дополняли перекрестным соединением крупных сосудов, стимуляция митотической активности в интактной печени одного из животных после частичной гепатэктомии другого была подтверждена [11—13]. Некоторые авторы считают, что это указывает на высокую скорость распада поступающего в кровь стимулятора.

Другим доказательством появления в организме гепатэктомированных крыс стимуляторов размножения гепатоцитов является увеличение скорости синтеза ДНК и митотической активности в кусочке печеночной ткани, предварительно имплантированном подопытному животному подкожно или в брюшную полость, после частичной гепатэктомии реципиента [15—19].

К третьей группе работ, подтверждающих регуляторную роль стимуляторов деления клеток, относятся исследования, в которых увеличение пролиферативной активности гепатоцитов было вызвано введенным сыворотки крови гепатэктомированных животных или экстракта регенерирующей печени. Теир и соавт. [20—22] наблюдали увеличение частоты деления клеток в регенерирующей печени крыс через 4—48 ч после введения им гомогенатов печени новорожденных крысят, регенерирующей печени взрослых крыс или аутолизата интактной печени.

Увеличение митотической активности в печени взрослых крыс после введения им сыворотки крови частично гепатэктомированных животных отмечено Фридрих-Фреска и Заки [23]. Сыворотка крови интактных животных таким свойством не обладала. Эти результаты подтверждены и другими авторами [24—25].

Есть данные, указывающие на присутствие в водных экстрактах печени новорожденных крысят и регенерирующей печени взрослых животных фактора, стимулирующего синтез ДНК в гепатоцитах: скорость включения <sup>3</sup>H-тимидина в ДНК в клетках печени гепатэктомированных крыс (34% гепатэктомия) увеличивается через 10 ч после введения им экстракта в опытах *in vivo* или после 2-часового инкубирования срезов печени в присутствии экстракта в опытах *in vitro* [26]. Логинов и соавт. [27, 28] вводили частично гепатэктомированным мышам экстракт печени или сыворотку крови людей, больных активным циррозом печени. Поскольку при циррозе в печени присутствуют очаги регенерации, можно было предположить, что препараты цирротически измененной печени и кровь больных будут действовать как экстракты регенерирующей печени или кровь гепатэктомированных животных. Действительно, через 18 ч после введения экстракта печени или сыворотки крови больных митотический индекс в регенерирующей печени мышей существенно возрастал. Экстракт неизменной печени и сыворотка крови здоровых людей подавляли митотическую активность регенерирующей печени мышей.

Были определены некоторые физико-химические свойства стимуляторов, присутствующих в крови и регенерирующей печени. Морлеи и Кингдон [29], Морлеи [30] с помощью ионообменной хроматографии и гель-фильтрации сыворотки крови частично гепатэктомированных крыс достигли 400-кратной очистки фактора, стимулирующего синтез ДНК в мышечных гепатоцитах *in vivo* и *in vitro*. Этот фактор термостабилен. Его активность почти полностью исчезает после обработки полученного препарата трипсином. Авторы считают, что это белок с молекулярной массой около 26 000 Д. В крови гепатэктомированных животных он появляется через 12—15 ч после операции. Подобный фактор обнаружен авторами в сыворотке крови эмбриона коровы.

Недавно Руэнстрос-Бауэр и соавт. [31], тоже используя гель-фильтрацию, очистили в 100 раз фактор из регенерирующей печени крыс. Его молекулярная масса определена в пределах 30 000 — 50 000 Д. Нейраминидаза не влияет на его активность, а трипсин и химотрипсин полностью ее инактивируют. Фактор выдерживает 20-минутное нагревание до 95 °С. Он стимулирует синтез ДНК и деление клеток в печени интактных крыс и мы-

шей. На пролиферацию клеток почек и селезенки он не влияет. Не исключено, что этот фактор идентичен сывороточному стимулятору, описанному Морлен и Кингдоном [29, 30].

В приведенном выше перечислении указаны далеко не все работы, относящиеся к теме (особенно ранние, ссылки на которые можно найти в цитированных обзорах), тем не менее это дает возможность судить о современном уровне изучения стимуляторов (стимулятора) размножения гепатоцитов. Прежде всего эти вещества (или вещество), по-видимому, действительно существуют, хотя не являются производными поврежденных клеток, поскольку обнаруживаются в крови и регенерирующей печени лишь через 12—15 ч после операции. Из других органов, как и из интактной печени взрослого животного, стимулятор не экстрагируется. Это позволяет думать, что стимулятор продуцируется готовящимися к делению гепатоцитами в конце  $G_1$ -периода клеточного цикла и из регенерирующей печени поступает в кровь. Данное предположение подтверждается сходством характеристик стимуляторов, присутствующих в экстракте регенерирующей печени и в крови гепатэктомизированных крыс. В обоих случаях авторы имели дело с полипептидом или белком с небольшой молекулярной массой.

Пролиферативные процессы в печени можно стимулировать, не прибегая к гепатэктомии. Есть данные, указывающие на значение состава сыворотки крови в возникновении пролиферативной реакции в печени. Некоторые авторы считают, что размножение гепатоцитов может быть вызвано понижением концентрации сывороточного альбумина в крови [30, 32]. По мнению других, главную роль играет повышение концентрации в сыворотке крови липопротеидов  $\beta$ -глобулиновой фракции [33, 34].

Шорт и соавт. [14], стараясь воспроизвести изменения состава сыворотки крови, происходящие после частичной гепатэктомии, разработали смесь, включающую трийодтиронин, аминокислоты, глюкозагон и гепарин (ТАГГ), введение которой крысам стимулировало синтез ДНК в клетках интактной печени. Как и частичная гепатэктомия, ТАГГ вызывает в гепатоцитах усиленное образование рибосом, накопление глицеридов и изменения в составе жирных кислот. Синтез ДНК становится максимальным через 22 ч после введения смеси. Появление меченых митозов после введения животным  $^3H$ -тимидина свидетельствует, что под влиянием ТАГГ происходит репликация всего генома. Усиленный синтез ДНК сохраняется и в изолированных ядрах, выделенных из клеток печени крыс, получивших ТАГГ. В отличие от частичной гепатэктомии смесь не повышает скорость синтеза ни сывороточного альбумина, ни суммарных белков печени. Самым активным компонентом смеси является трийодтиронин. Тиронин, дийодтирозин, инсулин, гормон роста, кортизон и адренокортикотропный гормон не могут его заменить. Напротив, замена глюкозагона бутирил-цАМФ или тесфиллином не снижает активность смеси [35].

Тодоров и соавт. [36] вызывали пролиферативную реакцию в печени интактных крыс введением циклогексимида. Введение антибиотика вызывало глубокое торможение синтеза белков и ДНК в гепатоцитах. Однако через 15 ч скорость включения меченой аминокислоты в белки восстанавливалась, а через 25 ч становилась вдвое выше, чем в контроле. Синтез ДНК восстанавливался через 40 ч и через 60 ч после введения становился максимальным, превышая в 5—10 раз контрольный уровень. Ядра, изолированные из клеток печени через 48 ч после введения животным циклогексимида, сохраняли более высокую, чем в контроле, способность к синтезу ДНК *in vitro*. Интересно, что включение радиоактивного тимидина в ДНК ядер из клеток печени контрольных крыс может быть увеличено вдвое добавлением в инкубационную среду цитозоля тех же клеток и втрое — при применении цитозоля клеток печени крыс, получивших циклогексимид. В отличие от этого синтез ДНК в ядрах, выделенных из клеток печени крыс, получивших антибиотик, не увеличивался при добавлении в среду цитозолей. Видимо, эти ядра насыщены факторами, стимулирующими синтез ДНК.

Авторы полагают, что наблюдаемая ими стимуляция пролиферативных процессов связана с нарушением белкового гомеостаза клеток, вызванным

временным подавлением синтеза белка. Если это так, то стимуляция синтеза ДНК должна происходить не только в печени, поскольку циклогексимид не обладает тканевой специфичностью.

Каким образом ТАГГ и циклогексимид стимулируют пролиферативную реакцию в печени, пока неизвестно. Ни тот, ни другой, по данным авторов, негтоксичен и не вызывает гибель гепатоцитов. Возможно, введение ТАГГ или циклогексимиды каким-то образом способствует освобождению фактора (или факторов), стимулирующего деление клеток печени. О возможности такого объяснения свидетельствуют данные [37], согласно которым сыворотка крови крыс, взятая через 48 ч после введения животным небольших доз канцерогена тиацетамида, приобретает свойство стимулировать синтез ДНК и деление клеток в печени интактных мышей, не влияя на размножение клеток в почках. Стимулирующий фактор не теряет активность после диализа или кипячения сыворотки. Это напоминает свойства стимулирующего фактора, найденного теми же авторами в крови частично гепатэктомированных крыс [29].

Наряду с поисками стимуляторов размножения клеток печени предпринимаются упорные попытки выделить тканеспецифические ингибиторы деления гепатоцитов [38]. Гипотеза о саморегуляции деления клеток в организме с помощью механизма, функционирующего по принципу отрицательной обратной связи, разработана Вейсом [39], Вейсом и Каванау [40]. Первые экспериментальное доказательство существования тканеспецифических ингибиторов деления клеток печени и почек получены Ситреном [41]. Однако изучение подобных веществ, впоследствии получивших название халонов<sup>1</sup>, началось после работ Бэллоу и Лаурэнс [42], Иверсена [43] на эпидермисе. В настоящее время имеются доказательства существования халонов не менее чем для 15 видов ткани [45]. Это вещества белковой природы. Они негтоксичны и лишены видовой специфичности. Некоторые из них получены в высокоочищенном виде [46—48]. Для эпидермиса [49] и тонкой кишки [50] показано существование халонов двух типов: 1) препятствующего переходу готовящихся к делению клеток из G<sub>1</sub>-периода клеточного цикла в S-период; 2) блокирующего переход из G<sub>2</sub>-периода в митоз. Аналогичные активности обнаружены в асцитической жидкости плазмоцитомы В-1 [51].

Указания на присутствие в ткани интактной печени ингибитора деления гепатоцитов получены, как отмечалось выше, еще до того, как подобные ингибиторы получили название халонов. Ситрен [41] обнаружил снижение митотической активности в регенерирующих печени и почках крыс через 18 ч после введения им мацератов соответствующих органов. При этом мацерат печени не действовал на частоту деления клеток в почках, а мацерат почек не влиял на деление гепатоцитов. Ингибиторы теряли активность после 10-минутного нагревания при 60 °С и не диализовались через полупроницаемую мембрану. Автор пришел к выводу, что размножение клеток в печени и почках регулируется тканеспецифическими ингибиторами белковой природы и что концентрация каждого из них в крови поддерживается на определенном уровне тем органом, на который этот ингибитор действует.

Данные Ситрена были подтверждены Стих и Флориан [52], установившими, что через 15—16 ч после введения частично гепатэктомированным крысам сыворотки крови или гомогената печени взрослых интактных крыс резко снижается митотическая активность регенерирующей печени. Гомогенаты мозга и семенников, как и гомогенат регенерирующей печени, или сыворотка крови частично гепатэктомированных животных этим свойством не обладали.

<sup>1</sup> Термин «chalones» предложен Бэллоу для обозначения тканеспецифических ингибиторов деления клеток [44]. По-русски этот термин пишется и произносится пока не всегда одинаково. В реферативном журнале «Биохимия» употребляется разное написание: «челоны», «келоны», «кейланы» и «халоны». Поскольку термин является производным от древнегреческого *χαλαω* («ослаблять»), правильное его произношение «халоны», подобно тому как произносится «химия» от *χημεία*, «хирургия» от *χειρ* или «хаос» от *χάος*.

Аналогичные результаты получены Логиновым и соавт. [28]. Эти авторы наблюдали торможение митотической активности в регенерирующей печени мышей через 16—18 ч после введения им сыворотки крови или экстракта печени интактных мышей или здоровых людей.

Эти опыты свидетельствовали о присутствии в печени одного или нескольких факторов, подавляющих деление гепатоцитов. Поскольку уменьшение митотического индекса в регенерирующей печени через 15—18 ч после введения экстракта могло быть связано с действием ингибитора в любой момент клеточного цикла, начиная с конца G<sub>1</sub>-периода, решить вопрос о количестве халонов печени и точке приложения их действия на основании этих данных не представлялось возможным.

Указания на присутствие в экстракте печени G<sub>1</sub>-халоновой активности получены на культуре тканей. Куо и Иоо [53] нашли, что экстракт печени подавляет синтез ДНК в культуре клеток гепатомы Морриса, но не действует на культуру клеток карциномы или лимфоцитов человека. Экстракты почки, селезенки, сердца, легких и мышц не влияют на подготовку к делению гепатоцитов. Аналогичные данные получены для гепатомы Н-35 [54]. Экстракт печени взрослой крысы, добавленный в среду при культивировании гепатоцитов и фибробластов куриного эмбриона, прекращает размножение гепатоцитов, блокируя их переход в S-фазу митотического цикла, но не влияет на деление фибробластов [55].

Однако результаты опытов, проведенных *in vitro*, достаточно противоречивы. Либерман и Ове [56] в отличие от указанных выше авторов обнаружили, что экстракт печени кролика тормозит рост клеток не только в культуре гепатоцитов, но и в культурах клеток почек и фибробластов. Экстракты других органов такое действие не оказывают. Торможение снимается после нагревания экстракта до 100 °С или при добавлении в культуру L-аргинина. Авторы пришли к выводу, что ингибитором размножения клеток, присутствующим в экстракте печени, является фермент аргиназа. Это подтверждалось определением молекулярной массы ингибитора, оказавшейся близкой к 100 000 Д, и тем, что инкубация аргинина с частично очищенным ингибитором приводила к образованию орнитина [57].

Аргиназа, разрушая одну из незаменимых аминокислот, может оставаться синтез белка и препятствовать этим переходу готовящихся к делению клеток из G<sub>1</sub>- в S-период митотического цикла. Некоторые авторы действительно наблюдали угнетение синтеза белка в регенерирующей печени под действием экстракта интактной печени [58]. Такой механизм действия хорошо подтверждают наблюдения, согласно которым подавление синтеза ДНК в культуре клеток гепатомы или в регенерирующей печени высокомолекулярным печеночным ингибитором связано не с нарушением репликации ДНК, а с задержкой перехода клеток в S-период [59, 60].

Постепенно накапливались данные, свидетельствующие, что аргиназа не единственный ингибитор деления клеток, содержащийся в экстракте печени. Отцука и Тераяма [61], обнаружившие торможение включения радиоактивного тимидина в ДНК клеток асцитной гепатомы при 3-часовой инкубации культуры с экстрактом интактной печени взрослых крыс, установили, что ответственный за это действие ингибитор не диализуется, разрушается при кипячении, но выдерживает 15-минутное нагревание при 50 °С. Это вполне соответствовало свойствам аргиназы. Однако, по данным тех же авторов, ингибитор синтеза ДНК присутствует не только в экстрактах печени взрослых животных, но и в печени 18-дневных эмбрионов и поворожденных крыс и даже в печени цыплят, где аргиназы быть не должно [62, 63]. Оказалось также, что при кратковременной инкубации (1—3 ч) аргиназа не подавляет синтез ДНК в культуре клеток асцитной гепатомы [64]. Сасада и Тераяма [65] показали, что в экстракте печени взрослых крыс наряду с термостабильным присутствует термолабильный ингибитор деления клеток. В экстракте регенерирующей печени его относительное содержание возрастает, а в экстракте печени эмбрионов и поворожденных крысят термолабильный ингибитор является основным. Поскольку добавление тимина снижает активность термолабильного ингибитора, было высказано предположе-

ние о его идентичности с одним из ферментов, участвующих в обмене тимидина, — тимидингидролазой или тимидинфосфорилазой, активность которых тимин подавляет [66]. По другим данным, механизм действия отличного от аргиназы печеночного ингибитора деления клеток связан с угнетением активности ДНК-полимеразы [67]. Показано также, что на скорость включения радиоактивного тимидина в ДНК готовящихся к делению клеток в опытах *in vitro* влияет эндогенный тимидин, присутствующий в экстракте печени. Добавление экстракта в культуральную среду приводит к разбавлению метки и кажущемуся снижению скорости синтеза ДНК [68].

Приведенные выше данные и другие материалы [69—72] свидетельствуют, что в экстракте печени содержится несколько факторов, действием которых можно объяснить многочисленные данные о торможении роста некоторых клеток *in vitro* при добавлении в культуральную среду экстракта печени [73—76]. Есть сообщения, согласно которым торможение регенерации печени *in vivo* и включения  $^3\text{H}$ -тимидина в ДНК гепатоцитов *in vitro* можно получить под действием экстрактов почек и легких [72, 77]. Однако эти данные противоречат результатам, полученным другими авторами [41, 53, 56].

Вольт и соавт. [70] исследовали действие экстракта печени взрослых крыс на синтез ДНК в срезах почек и печени новорожденных крысят. Экстракт печени интактных животных существенно подавлял включение  $^3\text{H}$ -тимидина в ДНК срезов. Однако если животным-донорам за 4—6 ч до извлечения печени вводили канцероген (диэтилнитрозамины), экстракт терял способность подавлять синтез ДНК в гепатоцитах, сохраняя ингибиторную активность по отношению ко всем другим исследованным клеткам. Авторы объяснили это присутствием в экстракте печени ингибиторов деления клеток двоякого рода: действующего специфически только на гепатоциты и неспецифического, подавляющего деление клеток и в других тканях. Канцероген, по их мнению, инактивирует первый и не влияет на второй. Почему на синтез ДНК в гепатоцитах не действует неспецифический ингибитор, подавляющий его в других клетках, не совсем ясно. Тем не менее было подтверждено присутствие в экстракте печени фактора, специфически подавляющего синтез ДНК в гепатоцитах.

Группе канадских авторов [78] с помощью всего двух процедур — осаждения спиртом и ультрафильтрации — удалось достичь 450-кратной очистки из экстракта печени взрослых кроликов вещества, тормозящего включение  $^3\text{H}$ -тимидина в ДНК регенерирующей печени крыс как в опытах *in vivo*, так и в срезах этого органа, инкубируемых *in vitro*. Молекулярная масса этого вещества оказалась менее 2000 Д, поэтому оно не могло быть ни аргиназой, ни ферментом тимидинового обмена. Авторам удалось также отделить его от присутствующего в экстракте печени тимидина [68]. Поскольку исследуемый фактор не обладал видовой специфичностью, был нетоксичен и не действовал на синтез ДНК в других тканях, авторы заключили, что имеют дело с печеночным халоном [79, 80]. Так как этот халон препятствует переходу гепатоцитов из предсинтетического периода в S-период митотического цикла, не влияя на процесс репликации ДНК [81], его можно считать печеночным халоном- $G_1$ . Этот халон выдерживает нагревание до  $75^\circ\text{C}$  в течение 5 мин, но теряет активность при кипячении. Инкубация его с ДНК-азой, РНК-азой и нейраминидазой не влияет на его активность, тогда как трипсин и пропаза полностью его инактивируют. Авторы пришли к заключению, что это полипептид [82].

Торможение синтеза ДНК в готовящихся к делению гепатоцитах под действием халона- $G_1$  проявляется через 4 ч в опытах на регенерирующей печени *in vivo* и через 30—45 мин при инкубации срезов. В те же сроки можно отметить и угнетение синтеза РНК. Непосредственным же результатом действия халона является подавление синтеза белка в гепатоцитах. Дэшамп и Верли [80] считают, что существует определенное сходство между действием печеночного халона- $G_1$  и циклогексимида, хотя в отличие от последнего действие халона обратимо и тканеспецифично.

Данные, подтверждающие присутствие в экстракте печени специфического для гепатоцитов ингибитора синтеза ДНК, были получены и другими авторами. Секас и Кук [83] выделили печеночный халон- $G_1$  из бычьей и крысиной печени и из крови быка. Они достигли 100-кратной очистки халона. В отличие от канадских исследователей эти авторы концентрировали активную фракцию над диафломембраной УМ-2, и, следовательно, молекулярная масса исследуемого ими халона должна быть выше 2000 Д. Возможно, это различие объясняется агрегацией молекул халона на одной из стадий очистки. Окулов и Чекулаева [84] нашли, что материал, осаждаемый из экстракта интактной печени крыс спиртом в интервале концентраций 70—81%, подавляет синтез ДНК и деление клеток в регенерирующей печени частично гепатэктомированных крыс через 8 ч после его введения животным.

Печеночный халон, препятствующий вступлению готовящихся к делению гепатоцитов из  $G_2$ -периода клеточного цикла в митоз, изучен значительно хуже, несмотря на использование многими авторами митотического индекса в качестве показателя активности испытуемых препаратов.

О присутствии в исследуемом материале фактора, действующего на клетку в  $G_2$ -периоде клеточного цикла, можно говорить лишь в том случае, если время, прошедшее между временем применения препарата и проявлением его действия на частоту митозов, не превышает длительности  $G_2$ -периода. Для гепатоцитов регенерирующей печени взрослой крысы этот срок равен примерно 4 ч. Работ, в которых соблюдалось бы такое условие, довольно мало. Эхаве-Леанос [85] обнаружил угнетение митотической активности регенерирующей печени мышей через 4 ч после введения им печеночного экстракта, если последний вводили в вечерние часы. Автор пришел к выводу, что в экстрактах печени присутствует ингибитор деления гепатоцитов, чувствительность к которому меняется в зависимости от времени суток. Чопра и Симнет [86] наблюдали снижение митотического индекса в печени лягушки через 4 ч после введения ей экстракта интактной печени крысы. На частоту деления клеток в почках экстракт печени не влиял. Найдено, что экстракт печени иглистого тритона тормозит митотическую активность в печени, но не влияет на деление клеток в кишечнике эмбриона того же вида [87]. Мензис и Кэрриган [88] определяли активность печеночного  $G_2$ -халона на эмбрионах кур. Через 4 ч после введения экстракта печени крысы в воздушную камеру яйца митотический индекс в печени 15-дневного эмбриона значительно снижался. Эта модель была использована для изучения суточных колебаний активности  $G_2$ -халона. Оказалось, что экстракт, приготовленный из печени крыс, убитых вечером, активнее экстракта, приготовленного из печени, полученной от крыс, убитых в утренние часы [89].

Как видно из сказанного, в большинстве работ при определении активности печеночного  $G_2$ -халона млекопитающих использовали печень амфибий или птиц. Тем большим интерес представляет работа Чекулаевой и соавт. [90], предпринявших попытку очистки  $G_2$ -халона печени с использованием в качестве тест-объекта печени млекопитающего. По данным этих авторов, материал, осаждаемый из экстракта печени взрослых крыс при концентрации спирта в пределах 70—81%, уже через  $1\frac{1}{2}$  ч после введения гепатэктомированной крысе снижает митотический индекс регенерирующей печени в 4 раза. На пролиферацию эпидермиса языка и уха подошвотных животных эта фракция не влияет.

Результаты рассмотренных выше работ позволяют говорить о присутствии в печени млекопитающих и амфибий фактора, препятствующего переходу гепатоцитов от  $G_2$ -периода клеточного цикла к митозу. По-видимому, этот фактор обладает тканевой специфичностью и лишен видовой. Пока ничего нельзя сказать о механизме его действия. Неизвестно даже, происходит торможение перехода гепатоцитов из  $G_2$ -периода в митоз и из  $G_1$ -периода в период синтеза ДНК под действием одного и того же вещества или существуют два печеночных халона, как это показано для эпидермиса [49] и эпителия тонкой кишки [50]. Для решения этих вопросов необходима дальнейшая работа по выделению и очистке печеночных халонов.

Использованный в обзоре материал заставляет думать, что в регуляции размножения гепатоцитов в организме принимают участие и тканеспецифические стимуляторы, и тканеспецифические ингибиторы деления клеток. Есть указания на их раздельную локализацию в клетке. Туманишвили и соавт. [91, 92] обнаружили, что отмые ядра клеток печени взрослой курицы тормозят, а цитоплазматическая фракция стимулирует рост печени у эмбрионов кур. Правда, в более поздней работе [93] установлено, что ядерная фракция гомогената печени, подавляя пролиферацию гепатоцитов, вызывает в них частичное разрушение ДНК и одновременно ее усиленный синтез. Эти результаты трудно пока согласовать с данными других исследователей, поэтому, видимо, еще нельзя судить, какое отношение имеют эти факторы к стимуляторам и ингибиторам размножения гепатоцитов, изучаемым авторами указанных выше работ.

Некоторые исследователи, изучавшие гранулоцитарный и эпидермальный халоны [94—99], считают, что регуляция размножения клеток в организме не может быть сведена к простому механизму отрицательной обратной связи. Поэтому они предполагают существование «антихалонов» — веществ, способных инактивировать халоны и тем стимулировать деление соответствующих клеток. Следовательно, и сторонники халоновой гипотезы допускают участие стимуляторов в регуляции размножения клеток в организме.

Таким образом, результаты многочисленных опытов, выполненных в разных лабораториях, свидетельствуют о существовании факторов, специфически регулирующих деление гепатоцитов. Эти факторы присутствуют в экстракте печени и сыворотке крови. Факторы, присутствующие в регенерирующей печени и сыворотке крови гепатэктомированных животных, стимулируют процессы подготовки клетки к делению. Факторы интактной печени, или печеночные халоны, тормозят размножение гепатоцитов. Одной из самых важных задач при дальнейшем изучении этих факторов являются их выделение и очистка.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Сидорова В. Ф., Рябина З. А., Лейкина Е. М. Регенерация печени у млекопитающих. Л., 1966.
2. Bucher N. L. R., Mall R.— In: Regeneration of Liver and Kidney. Boston, 1971.
3. Bucher N. L. R., Swaffield M. N., Moolten F. L. et al.— In: Biochemistry of Cell Division. Ed. R. Baserga. Springfield, 1969, p. 139.
4. Liberman I.— Ibid., p. 119.
5. Paschkis K. E.— Cancer Res., 1958, v. 18, p. 981.
6. Christensen B. G., Jackobsen E.— Acta med. scand., 1949, v. 234, p. 103.
7. Bucher N. L. R., Scott J. F., Aub J. C.— Cancer Res., 1951, v. 11, p. 457.
8. Wenneker A. S., Sussman N.— Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1951, v. 76, p. 683.
9. Rogers A. E., Shaka J. A. et al.— Am. J. Path., 1961, v. 234, p. 561.
10. Alston W. C., Thomson R. I.— Cancer Res., 1963, v. 23, p. 901.
11. Moolten F. L., Bucher N. L. R.— Science, 1967, v. 158, p. 272.
12. Sakai A.— Nature, 1970, v. 228, p. 1186.
13. Fischer B., Szuch P. et al.— Science, 1971, v. 171, p. 575.
14. Short J., Brown R. F. et al.— J. biol. Chem., 1972, v. 247, p. 1757.
15. Leong G. F., Grissham J. W. et al.— Cancer Res., 1964, v. 24, p. 1496.
16. Virolainen M.— Exp. Cell Res., 1964, v. 33, p. 588.
17. Virolainen M.— In: Control of Cellular Growth in Adult Organisms. Ed. H. Teir, T. Rytömaa. New York, 1967, p. 232.
18. Fischer B., Sauch P., Fischer E. R.— Cancer Res., 1971, v. 31, p. 322.
19. Sigel B., Baldia L. B. et al.— Surg. Gynec. Obstet., 1967, v. 124, p. 1023.
20. Teir H., Lahtiharju A. et al.— In: Control of Cellular Growth in Adult Organisms. Ed. H. Teir, T. Rytömaa. New York, 1967, p. 65.
21. Teir H., Ravanti K.— Exp. Cell Res., 1953, v. 5, p. 500.
22. Blomqvist K.— Acta path. microbiol. scand., 1957, Suppl. 121.
23. Friedrich-Freksa H., Zaki F. G.— Z. Naturforsch., 1954, Bd 9b, S. 394.
24. Adibi S., Paschkis K. E., Cantarow A.— Exp. Cell. Res., 1959, v. 18, p. 396.
25. Zimmerman N., Celozzi E.— Fed. Proc., 1960, v. 19, p. 139.
26. La Bresque D. R., Pesch L. A.— J. Physiol. (Lond.), 1975, v. 248, p. 273.
27. Логинов А. С., Сперанский М. Д., Арцин Л. И. и др.— Бюлл. eksper. биол., 1976, № 12, с. 1482.
28. Логинов А. С., Сперанский М. Д., Матюшина Е. Д. и др.— Тер. арх., 1978, № 8, с. 51.
29. Morley C. G. D., Kingdon H. S.— Biochim. biophys. Acta, 1973, v. 308, p. 260.
30. Morley C. G. D.— Biochem. exp. Biol., 1976, v. 12, p. 207.

31. *Ruhenstroth-Bauer G., Goldberg M. et al.*—Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 1978, Bd 359, S. 543.
32. *Sudweeks A. D., Hill R. B.*—J. Cell. Biol., 1967, v. 34, p. 404.
33. *Short J., Zemel R. et al.*—Nature, 1969, v. 223, p. 956.
34. *Oncley J. L.*—Ann. N. Y. Acad. Sci., 1961, v. 46, p. 899.
35. *Shori J., Tsukada K. et al.*—J. biol. Chem., 1975, v. 250, p. 3602.
36. *Тодоров Н. Н., Бойков П. Я., Сидоренко Г. П. и др.*—Докл. АН СССР, 1978, т. 239, с. 1255.
37. *Morley C. G. D., Boyer J.*—Biochim. biophys. Acta, 1977, v. 477, p. 165.
38. *Stack-Dunne M. P.*—Nat. Cancer Inst. Monogr. (Wash.), 1973, v. 38, p. 185.
39. *Weiss P.*—Science, 1952, v. 115, p. 487.
40. *Weiss P., Kavanau J. L.*—J. gen. Physiol., 1957, v. 41, p. 1.
41. *Saetren H.*—Exp. Cell Res., 1956, v. 11, p. 229.
42. *Bullough W. S., Laurence E. B.*—Proc. roy. Soc., B, 1960, v. 151, p. 517.
43. *Iversen O. H.*—Acta path. microbiol. scand., 1961, v. 50, p. 17.
44. *Bullough W. S.*—Nat. Cancer Inst. Monogr. (Wash.), 1973, v. 38, p. 5.
45. *Bullough W. S.*—Biol. Rev., 1975, v. 50, p. 99.
46. *Thornley A. L., Laurence E. B.*—Int. J. Biochem., 1975, v. 6, p. 313.
47. *Lenfant M., Garsia-Giralt E.*—Cell Tissue Kinet., 1978, v. 11, p. 455.
48. *Isaksson-Forsen G., Burton D. R. et al.*—Virchows Arch. Abt B. Zellpath., 1977, Bd 26, S. 97.
49. *Elgio K.*—Nat. Cancer Inst. Monogr. (Wash.), 1973, v. 38, p. 71.
50. *Brugal G., Pelmont J.*—Cell Tissue Kinet., 1975, v. 8, p. 171.
51. *Barfod N. M.*—Exp. Cell Res., 1977, v. 110, p. 225.
52. *Stich H. F., Florian M. L.*—Canad. J. Biochem. Physiol., 1958, v. 36, p. 855.
53. *Kuo C. J., Yoo T. I.*—J. nat. Cancer Inst. (Wash.), 1977, v. 59, p. 1691.
54. *De Paermentier F., Barbason H., Bassleer R.*—Biol. Cell, 1979, v. 34, p. 205.
55. *De Paermentier F.*—C. R. Soc. Biol. (Paris), 1978, v. 172, p. 1242.
56. *Lieberman I., Ove P.*—Biochim. biophys. Acta, 1960, v. 38, p. 153.
57. *Holley R. W.*—Ibid., 1967, v. 145, p. 525.
58. *Henderson I. W. D.*—Fed. Proc., 1971, v. 30, p. 1253.
59. *Anjard C., Chany E., Frayssinet C.*—Exp. Cell Res., 1973, v. 78, p. 476.
60. *Hiqueret P., Chany E. et al.*—C. R. Acad. Sci. (Paris), 1975, v. D281, p. 49.
61. *Otsuka H., Terayama H.*—Biochim. biophys. Acta, 1966, v. 123, p. 274.
62. *Otsuka H.*—Wistar Inst. Symp. Monogr., 1967, v. 7, p. 3.
63. *Terayama H., Sasada M.*—Gann, 1968, v. 59, p. 51.
64. *Otsuka H.*—Cancer Res., 1969, v. 29, p. 265.
65. *Sasada M., Terayama H.*—Biochim. biophys. Acta, 1969, v. 190, p. 73.
66. *Miyamoto M., Terayama H.*—Ibid., 1971, v. 228, p. 324.
67. *Nilsson G.*—Exp. Cell Res., 1970, v. 59, p. 207.
68. *Lenfant M., Kren-Proschek L. et al.*—Canad. J. Biochem. Physiol., 1973, v. 51, p. 654.
69. *Offebro R., Laland P. et al.*—Brit. J. Cancer, 1963, v. 17, p. 183.
70. *Volm M., Kinzel V. et al.*—Experientia (Basel), 1969, v. 25, p. 68.
71. *Volm M., Mattern J., Wayss K.*—Exp. Path., 1972, v. 7, p. 84.
72. *Volm M., Ho A. D. et al.*—Ibid., 1973, v. 8, p. 341.
73. *Holland J. F., Block R. et al.*—Proc. Am. Ass. Cancer Res., 1959, v. 3, p. 120.
74. *Herbut P. A., Kraemer W. H.*—Am. J. Path., 1960, v. 36, p. 105.
75. *Hory M., Ukita T.*—J. Biochem. (Tokyo), 1962, v. 51, p. 322.
76. *Chany E., Frayssinet C.*—C. R. Acad. Sci. (Paris), 1971, v. 272-D, p. 2644.
77. *Wayss K., Mattern J., Volm M.*—Naturwissenschaften, 1973, Bd 60, S. 354.
78. *Verly W. G., Deschamps Y. J. et al.*—Canad. J. Biochem. Physiol., 1971, v. 49, p. 1376.
79. *Simard A., Corneille L. et al.*—Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1974, v. 71, p. 1763.
80. *Deschamps Y. J., Verly W. G.*—Biomedicine, 1975, v. 22, p. 195.
81. *Simard A., Corneille L. et al.*—J. Cell Biol., 1973, v. 59, p. 317.
82. *Verly W. G.*—Nat. Cancer Inst. Monogr., 1973, v. 38, p. 175.
83. *Sekas G., Cook R. T.*—Exp. Cell Res., 1976, v. 102, p. 422.
84. *Окулов В. Б., Чекулаева Л. И.*—Арх. анат., 1976, № 1, с. 106.
85. *Echave-Leanos J. M.*—In: Control of Cellular Growth in Adult Organisms. Ed. H. Teir, T. Rytömaa. New York, 1967, p. 209.
86. *Chopra D. P., Simnett J. D.*—J. Embryol. exp. Morph., 1971, v. 25, p. 321.
87. *Brugal G.*—Cell Tissue Kinet., 1973, v. 6, p. 519.
88. *Menzies R. A., Kerrigan J. M.*—Exp. Cell Res., 1974, v. 86, p. 430.
89. *Cannella N. K.*—Life Sci., 1977, v. 20, p. 155.
90. *Чекулаева Л. И., Кетлинский С. А., Окулов В. Б.*—Цитология, 1978, т. 20, с. 436.
91. *Туманишвили Г. Д.*—In: Control of Cellular Growth in Adult Organisms. Ed. H. Teir, T. Rytömaa. New York, 1967, p. 59.
92. *Туманишвили Г. Д., Козлова Н. В., Саламатина Н. В.*—Ж. общ. биол., 1958, т. 29, с. 711.
93. *Туманишвили Г. Д., Кахидзе И. Г., Челидзе П. В.*—Арх. анат., 1975, № 11, с. 19.
94. *Rytömaa T., Kiviniemi K.*—Cell Tissue Kinet., 1968, v. 1, p. 329.

95. Rytömaa T., Kiviniemi K.— Ibid., p. 341.  
96. Argyris T. S.— Am. Zool., 1972, v. 12, p. 137.  
97. Elgjo K., Edgehill W.— Virchows Arch. Abt. B. Zellpath., 1973, Bd 13, S. 14.  
98. Bjerkues R., Iversen O. H.— Acta path. microbiol. scand., 1974, S. 248, p. 33.  
99. Willis P., Berry M., Riches A. C.— Neuropath. appl. Neurobiol., 1976, v. 2, p. 377.

Поступила 7/II 1980 г.

## CHEMICAL FACTORS REGULATING CELL DIVISION IN THE BODY

[V. M. Rodionov], N. A. Kuz'micheva, A. V. Pospelova

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

Experimental data are considered, suggesting existence of factors specifically regulating division of hepatocytes. The factors, found in regenerating liver tissue and in blood serum of hepatectomized animals, stimulated the cell division. The substances from intact liver cells or liver chalones inhibited the division of hepatocytes.

УДК 612.398.192:547.466.23

Т. Ш. Шарманов, Э. К. Мухамеджанов

## СИНТЕЗ, ТРАНСПОРТ И УТИЛИЗАЦИЯ АЛАНИНА (АЛАНИН-ГЛЮКОЗНЫЙ ЦИКЛ)

(Обзор)

Казахский филиал института питания АМН СССР, Алма-Ата

В настоящее время не вызывает сомнения важная роль аминокислот в регуляции обменных процессов в организме. Так, заменимая аминокислота аланин участвует в межклеточном обмене углеводов, липидов и аминокислот [1—4]. В последние годы аланин был объектом интенсивного изучения, и многие стороны его метаболизма хорошо известны. В предлагаемом обзоре предпринята попытка осветить современное состояние исследований, касающихся обмена и биологической роли аланина.

### Синтез аланина в мышцах

Аланин относится к заменимым аминокислотам, так как в организме может синтезироваться из пировиноградной кислоты путем переаминирования, из аспарагиновой кислоты при  $\beta$ -декарбоксилировании и из кинуренина под действием кинурениназы [5]. Из этих путей главную роль играет его взаимопревращение в пировиноградную кислоту. Основным местом образования аланина за счет переаминирования пировиноградной кислоты являются мышцы [4, 6, 7]. В скелетных мышцах крыс [8, 9] и людей [10—12] свободного аланина образуется намного больше, чем других аминокислот. Несмотря на высокую скорость образования свободного аланина (около 20—30% от общего его содержания), количество свободной аминокислоты в мышечных белках животных и людей не превышает 5—7% и составляет 3,56 мкмоль/г [13], т. е. значительно не отличается от количества других аминокислот [14].

В препаратах мышечной ткани крыс [15] в течение 120 мин инкубации не выявлялось уменьшения содержания аланина в мышце, тогда как значительное количество аланина выделялось в среду. Количество выделяемого аланина и глутамина составляет 60% от общего уровня освобождаемых аминокислот. При добавлении в инкубационный раствор глюкозы происходило увеличение освобождения в среду аланина и уменьшение выделения других аминокислот.

Протеолиз мышечных белков при инкубации диафрагмы крыс или миокарда кроликов приводил к значительному выделению аланина (превышающему расчетное), а количество лейцина, изолейцина и валина, освобождает-

мого при распаде мышечного белка, было намного ниже того, которое ожидалось бы исходя из аминокислотного анализа [16]. Это указывает на то, что освобождение аланина идет не за счет протеолиза, а в результате синтеза *de novo*.

При перфузии задней конечности крыс около 33% аланина образуется из глюкозы [9]. Выделение аланина стимулируется добавлением в перфузат глюкозы, лактата, пирувата, глутамата и разветвленных аминокислот [16—18]. Синтез аланина в препаратах мышечной ткани крыс происходил при добавлении в инкубационный раствор пальмитиновой, пропионовой и фумаровой кислот. Это указывает на то, что источником углерода при синтезе аланина могут служить также аминокислоты, жирные кислоты и метаболиты цикла трикарбоновых кислот [7].

Исследования с ингибиторами ферментов также свидетельствуют о том, что выход аланина из мышц обусловлен его синтезом, а не протеолизом белков. Ингибитор аланиновой трансминазы (глутамат: пируват-трансминаза, ГПТ) — L-циклосерин уменьшал освобождение аланина [18, 19], а ингибитор аланиновой и аспарагиновой трансминаз — аминоуксусная кислота угнетала выделение аланина из препаратов скелетных мышц крысы, из сосочковой мышцы правого желудочка сердца кроликов [15, 20] и у гепатэктомированных крыс [21]. Эти данные указывают, что при протеолизе белков максимальное количество образующегося аланина не превышает 18% от общего количества выделяемой из мышц аминокислоты.

Общий выход аминокислот из перфузируемой задней конечности крыс уменьшается под влиянием инсулина, однако количество освобождаемого аланина не изменяется [12, 18, 22], а при добавлении в перфузионный раствор глюкозы инсулин значительно увеличивает общий выход аланина [23]. Если без инсулина 33% углеродного скелета аланина образуется из глюкозы, то при добавлении инсулина из перфузируемой задней конечности крыс 51,5% аланина образуется из глюкозы [24]. Хотя общий выход аланина при повышении концентрации глюкозы в перфузате не изменяется, однако увеличивается количество аланина, синтезированного из глюкозы, что способствует уменьшению протеолиза мышечных белков [23]. При недостатке инсулина и при голодании в результате усиления катаболизма белков увеличивается общий выход аминокислот и аланина [25] и уменьшается поглощение глутамата [26] и разветвленных аминокислот [27].

Усиленное образование аланина в мышцах и выход его в циркуляцию наблюдаются при мышечной деятельности и гипоксии [28—31]. Особенно высокое содержание аланина в мышцах и в плазме отмечается у плавающих и ныряющих млекопитающих [32]. У ряда организмов L-аланин является конечным продуктом гликолиза. Так, у факультативных анаэробных моллюсков [33, 34] глюкоза в основном метаболизирует до сукцината и L-аланина. Недавние исследования показали, что аланин и сукцинат при анаэробных условиях накапливаются в красной мышце карпа [35]. Более того, гипераланинемия наблюдается у анестезированных кроликов при острой гипоксии [36]. Несмотря на репрессирование дыхательной способности дрожжей в анаэробных условиях отмечается утилизация глюкозы [37], а образующийся аланин способствует снятию потенциала с восстановленного НАД·Ф [38] и тем самым протеканию пентозного цикла.

Синтез аланина *de novo* наблюдается в изолированном миокарде кроликов при нехватке кислорода [20]. Добавление пирувата увеличивает выделение аланина в среду, тогда как ингибиторы гликолиза (NaF, йодацетат) снижают синтез аланина приблизительно на 50%. Синтез аланина гипоксическим миокардом уменьшается при добавлении в среду циклосерина и прекращается полностью при ингибировании аланиновой трансминазы аминоуксусной кислотой. На основании этих данных авторы приходят к заключению, что перевод пирувата в аланин является защитным механизмом для нормального протекания гликолиза, который может ингибироваться избытком пирувата и лактата [39]. Концентрация аланина в скелетной мышце при физической нагрузке увеличивается от 0,32 до 1,62 мкмоль/г [40]. Напротив, выдерживание мышцей при давлении кислорода 1—4 атм приводило

к увеличению скорости превращения аланина в аспарагиновую кислоту и к снижению выделения аланина [41].

Освобождение аланина возрастает, когда повышается концентрация пирувата, например при физической нагрузке [28, 42] или инфузии пирувата [43, 44]. Усиление окисления пирувата посредством активации пируватдегидрогеназы дихлорацетоном приводило к уменьшению освобождения аланина мышцей и снижению его концентрации в крови [18, 21, 45].

С другой стороны, при снижении пирувата в мышцах при голодании также отмечается увеличенный выход аланина [12]. Однако при голодании наблюдается уменьшение активности пируватдегидрогеназы, что препятствует утилизации пирувата в цикле Кребса.

Исследования взаимоотношения между уровнем поглощенной глюкозы и количеством освобожденного аланина дали противоречивые результаты. В опытах *in vivo* около 50—60% углеродного скелета аланина, освобождаемого скелетной мышцей, образуется из глюкозы [16]. При перфузии задней конечности [17] или препарата диафрагмальной мышцы крыс [9] выход аланина коррелировал с количеством поглощаемой глюкозы. Напротив, на препарате скелетной мышцы крыс освобождение аланина не изменялось как при добавлении в среду глюкозы, так и при введении ингибиторов и активаторов гликолиза [15]. У людей меченая глюкоза быстро метаболизирует до аланина, а скорость включения углерода глюкозы в аланин составляет 2,37 ммоль/час [46].

Оценка по артериовенозной разнице выявила, что у людей 13 и 18% глюкозы, поглощаемой мышцами голени и предплечья, превращаются в аланин [28]. В сердце устрицы 55% метки из глюкозы выявлялось в аланине [47], тогда как только 2,7% углерода глюкозы, поглощаемой перфузируемой задней конечностью крыс, высвобождается в виде аланина [24].

Пируват в мышцах, необходимый для синтеза аланина, образуется не только за счет гликолитического катаболизма глюкозы. Так, в случае голодания потенциальными источниками пирувата могут служить аминокислоты, которые образуют метаболиты цикла трикарбоновых кислот [48, 49]. Синтез пирувата из метаболитов цикла трикарбоновых кислот может идти за счет декарбоксилирования оксалацетата в фосфоенолпируват, который затем превращается в пируват при участии пируваткиназы. Однако фосфоенолпируваткарбоксикиназа (ФЭПК) в мышцах имеет очень низкую активность [50], и генерация пирувата из аминокислот наблюдается только после активации фермента голоданием [18, 51]. Поэтому более вероятно, что идет декарбоксилирование малата, так как НАД и НАДФ-зависимые малатдегидрогеназы были выявлены в мышечной ткани [52, 53]. Поэтому участие аминокислот в образовании углеродного скелета аланина можно представить по следующей схеме: аминокислоты → метаболиты цикла трикарбоновых кислот → малат → пируват → аланин [7].

О том, что часть пирувата может образовываться из углеродного скелета некоторых аминокислот, свидетельствуют также эксперименты с 3-меркаптопиколином — ингибитором цитоплазматической и митохондриальной форм ФЭПК [54]. Добавление к инкубационной среде 3-меркаптопиколина в концентрации 1 мМ блокировало перевод оксалацетата в фосфоенолпируват и снимало стимулированное валином освобождение аланина диафрагмальной мышцей голодающих крыс на 61%. Ингибитор не оказывал никакого влияния у сытых животных, у которых активность ФЭПК минимальна. Зависимость образования аланина от окислительного потенциала клетки [15] также указывает на важную роль митохондрий в процессах его образования.

Исследование скорости окисления аминокислот показало, что в мышцах не расщепляется углеродный скелет ряда аминокислот, таких, как лизин, серин, пролин, треонин, метионин, цистеин, фенилаланин, гистидин, тирозин и триптофан [55], но хорошо метаболизируют разветвленные аминокислоты (лейцин, валин, изолейцин) [55—57]. Распад разветвленных аминокислот в мышце генерирует аминокислоты, которые при переаминировании используются для синтеза аланина [11, 51]. Процесс переаминирования лейцина, валина и изолейцина идет преимущественно внутри митохондрий, так

как 72% активности аминотрансфераз разветвленных аминокислот локализуется в митохондриях мышц [58]. Продукция аланина мышцей идет параллельно с деградацией разветвленных аминокислот [16, 59]. Поэтому в образовании аланина участвуют как аминокислоты разветвленных аминокислот, так и пируват, генерируемый гликолизом. Общая продукция аланина эквивалентна «постоянной» массе тела [60].

Выход аланина из мышц происходит не в результате диффузии, а зависит от активности специфических транспортных систем [61]. Предполагают, что в мышечной ткани существует тесная связь между процессами образования аланина и переноса его через мембраны. Специфические транспортные системы играют важную роль в выводе аланина из скелетной мышцы, так как аланин выходит из мышц задней конечности крыс против градиента концентрации [61, 62]. На основании исследования с изолированной тонкой кишкой крысы сделан вывод, что в слизистой оболочке существует две системы активного транспорта нейтральных аминокислот: общая (чувствительная к аланину) и специфическая (нечувствительная) [63].

В перфузируемой задней конечности крыс аланин выделяется со скоростью 0,9 мкмоль/г/ч [4], а в гомогенате мышц — со скоростью 1,06 мкмоль/г/ч [64].

Кроме того, обнаружено, что аланин поступает в русло крови не только из мышечной ткани, но и из кишечника и почек, где аминирование пирувата происходит за счет амино- или амидогруппы глутамина [8, 35].

### Т р а н с п о р т   а л а н и н а

С кровью аланин транспортируется в печень, поэтому содержание аланина в крови будет зависеть как от скорости его поступления из мышечной ткани, так и от способности печени экстрагировать аминокислоту из крови. Увеличение количества аланина наблюдается при физических нагрузках [65], когда содержание его в крови составляет более половины общего количества аминокислот. При физической нагрузке средней интенсивности количество аланина в крови увеличивается на 20—25%, а при интенсивной — на 60—96% [28].

Повышение уровня аланина в крови на 40% наблюдается при гиперсекреции глюкокортикоидов при болезни Иценко — Кушинга или введении дексаметазона [25]. Различные виды стресса [31, 66, 67] приводят к повышению уровня аланина в крови. Увеличение количества аланина в крови на 30% отмечалось у собак при введении эндотоксина [68] и у крыс, зараженных бруцеллой трипаносомы [69].

Если непродолжительное голодание приводит к увеличению содержания аланина в крови [70, 71], то при длительном (4—8 нед) голодании наблюдается уменьшение его концентрации [10, 72]. Снижение количества аланина в крови наблюдается также при беременности [73, 74], диабете [75—77], болезни Менкеса [78].

Удаление печени [19] уже через 30 мин приводит к значительному повышению содержания аланина в крови (со 135 до 506 мкМ). Предварительное введение циклосерина предотвращало накопление аланина в крови. Снижение захвата аланина печенью и увеличение его содержания в крови наблюдается при введении инсулина [25], при врожденной недостаточности пируваткарбоксилазы в печени [79]. Напротив, при стимуляции глюконеогенеза [18, 80] голоданием или введением глюкагона уровень аланина в крови снижается.

Концентрация аланина в крови уменьшается при диабете после прекращения дачи инсулина [81]. При введении этанола из-за обратного перехода аланина в лактат [82, 83] его концентрация в крови уменьшается с 330 до 248 мкмоль, тогда как количество лактата увеличивалось с 0,98 до 1,58 ммоль [84]. Снижение содержания аланина в крови отмечается у детей с кетонной гипогликемией [85, 86], а также с увеличением возраста [87, 88].

При увеличении скорости выделения аланина и повышении его концентрации в крови обычно наблюдается уменьшение количества разветвлен-

ных аминокислот [89], что связано с усилением их использования в процессах синтеза аланина. Пероральная нагрузка глюкозой у людей вызывает снижение концентрации разветвленных аминокислот и увеличение содержания аланина в крови [90]. Время кругооборота аланина у людей составляет 23—29 мин и не меняется при голодании [91] или введении этианола [84].

Около 30% аланина из мышечной ткани и 22% из кишечника переносится форменными элементами крови [25, 42]. Однако диффузия аланина через мембраны эритроцитов происходит медленно, поэтому при быстром изменении выделения или поглощения аланина сначала изменяется его концентрация в плазме и только впоследствии в форменных элементах крови [81]. Транспорт аланина через мембрану эритроцитов человека зависит от натрия и происходит в соответствии с кинетикой Михаэлиса [92].

### У т и л и з а ц и я   а л а н и н а

Величина скорости поступления аминокислот в печень значительно больше, чем для других тканей, в частности для мозга и мышц [25]. Оценка артериовенозной разницы и включения метки в глюкозу указывает, что с наибольшей скоростью из аминокислот идет поглощение аланина [25, 93].

В свежeweделенных гепатоцитах крыс выявлены 3 системы активного транспорта аланина — система транспорта аланина, система транспорта аланина совместно с серином и цистеином и система транспорта аланина с лейцином. Относительная активность этих систем и системы пассивного транспорта аланина составляет 60, 20, 5 и 15% соответственно [94]. Скорость поглощения аланина изолированными гепатоцитами крыс зависит от концентрации ионов Na и  $\text{HCO}_3^-$ . Нарушение синтеза АТФ приводит к блокированию транспорта аланина [95].

Интaктные митохондрии печени крыс интенсивно утилизируют аланин в присутствии 2-оксaлглутарата, АТФ и  $\text{F}_n$  [96]. Фракция из пузырьков плазматических мембран печени крыс активно поглощала аланин. Добавление цианистого натрия увеличивало транспорт аланина в 11 раз, тогда как калий не оказывал влияния [97]. При добавлении аланина в среду инкубации препаратов почечных канальцев крыс выявлено, что в транспорте аланина участвует вне- и внутриклеточный натрий [98]. Удаление натрия ингибирует процесс переноса аланина через мукозную мембрану подвздошной кишки кролика [89]. Введение NaF, NaCN и йодацетата приводило к нарушению нормального соотношения  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  и к потере способности слизистой оболочки кишечника черепахи накапливать аланин [100].

Скорость поступления аланина в печень усиливается при физических нагрузках [101], введении глюкагона [102, 103] и голодании [104], тогда как инсулин снижает способность печени к экстрагированию аланина [25]. Введение дихлорацетона уменьшает поглощение аланина печенью крыс на 63% [21], а глюкоза в дозе 25 мг/кг снижает поглощение аланина в печени людей на 30—60% [105]. Аланин, экстрагируемый печенью из кровотока, идет на синтез глюкозы. Образование глюкозы печенью увеличивается пропорционально повышению в плазме аланина [106]. Мощность ферментов печени, способных синтезировать глюкозу из аланина, намного превосходит мощность ферментов, синтезирующих глюкозу из других аминокислот [107]. Аланин составляет 50% аминокислот, используемых печенью для синтеза глюкозы [84]. В то же время L-аланин не переходил в глюкозу в перфузируемой почке крыс и не было выявлено его поглощения [108].

Из аланина глюкоза в перфузируемой печени крыс образовывалась со скоростью 26—40 мкмоль/г/ч [109, 110], что хорошо согласуется со скоростью синтеза аланина срезами печени [111, 112] или свежeweделенными гепатоцитами крыс [94]. При физиологических концентрациях аланина биогтаты печени человека образуют глюкозу со скоростью 147 нмоль/г/ч [113]. Скорость образования глюкозы была линейной в диапазоне концентраций аланина 0,45—4,0 мМ [106, 114]. Наибольшее количество глюкозы образовывалось только через 40—50 мин, что соответствует максимальному переходу  $^{14}\text{C}$ -аланина в глюкозу [115].

В печени аланин подвергается переаминированию в пировиноградную кислоту при участии 2-кетоглутарата. В печени крыс и мышей аланин перед его трансаминированием поглощается митохондриями [116, 117]. В митохондриях активность ГПТ коррелирует с активностью ФЭПК и участвует в переводе аланина в пируват, тогда как цитоплазматическая ГПТ участвует в переводе пирувата в аланин [118]. Превращение аланина в пируват может осуществляться также при участии аланиндегидрогеназы, когда не требуется участия 2-кетоглутарата [119].

Контроль глюконеогенеза в печени идет через регуляцию активности 4 его основных ферментов [120, 121]. Имеется прямая взаимосвязь между активностью первого (ключевого) фермента глюконеогенеза ФЭПК и скоростью глюконеогенеза. Активность ФЭПК очень низкая в печени новорожденных животных [122—124] и быстро увеличивается уже в первые дни жизни, поэтому после рождения глюконеогенез становится основным механизмом образования энергии. У щенков в возрасте до 5 дней примерно 19 % атомов углерода из аланина появляется в системе метаболизма глюкозы, тогда как у 2-месячных животных эта величина составляет 62 % [125]. Содержание аланина в крови крыс снижается после рождения, а глюконеогенез из аланина увеличивается [88]. При врожденной недостаточности активности ФЭПК скорость включения метки из  $^{14}\text{C}$ -аланина в глюкозу была снижена с 10 до 1,3—5 % [126]. Общая активность может быть в пределах нормы, но фермент в цитоплазме отсутствует [127].

На активность ФЭПК и соответственно скорость синтеза глюкозы из аланина влияют глюкагон и инсулин [128, 129]. Их влияние опосредовано через циклический АМФ, количество которого увеличивается под влиянием глюкагона [130, 131] и снижается под действием инсулина [131, 132].

При ингибировании ФЭПК наблюдается накопление аланина в печени. Так, 3-меркаптопиколинат ингибирует цитоплазматическую и митохондриальную формы ФЭПК, и при его введении содержание аланина в печени крыс увеличивается с 0,56 до 5,94 мкмоль/г [133]. 3-меркаптопиколинат не ингибирует синтез глюкозы из триоз, поэтому образование глюкозы из фруктозы не изменяется [134]. Активация ФЭПК и усиление включения метки аланина в глюкозу наблюдаются при голодании [135, 136].

Из дальнейших этапов глюконеогенеза (отличающихся от прямой гликолитической реакции) следует выделить превращение фруктозо-1,6-дифосфата во фруктозо-6-фосфат при участии фруктозодифосфатазы [137]. Активность этого фермента также увеличивается под влиянием глюкагона и уменьшается под действием инсулина. У детей, у которых выявлялась врожденная недостаточность фруктозодифосфатазы [138], аланин не включался в синтез глюкозы. У крыс, получавших в течение 29 дней производные сульфонилмочевины, отмечалась гипогликемия в результате нарушения глюконеогенной функции печени. После введения аланина концентрация глюкозы в крови значительно повышалась [139].

Аланин не только сам включается в этап образования углеводов, но и активирует скорость синтеза глюкозы из других источников [140, 141]. Его влияние на глюконеогенез может быть обусловлено тем фактом, что аланин оказывает действие на ФЭПК за счет снятия ингибирующего влияния ИТФ и некоторой активации фермента при низких концентрациях ФЭП вследствие уменьшения значения  $K_M$  для ФЭП [142]. Однако скорость образования ФЭП в 10 раз ниже, чем величина его превращения в пируват [61], поэтому синтез глюкозы возможен только в случае ингибирования пируваткиназной реакции. Аланин в физиологических концентрациях вызывает ингибирование активности пируваткиназы в печени [140, 143, 144], что приводит к накоплению ФЭП и активации глюконеогенеза.

В почках аланин не используется в качестве субстрата для глюконеогенеза, что может быть связано с отсутствием в митохондриях почек крыс ГПТ [118], однако при введении в перфузат аланина в концентрации 0,5—10 мМ отмечалась стимуляция глюконеогенеза в изолированных почечных канальцах крыс с различными субстратами (пируват, лактат, фруктоза, малат, фумарат, кетоглутарат, глицерин). Стимулирующее влияние аланина было

аддитивным по отношению к эффекту гормонов и циклическому АМФ [145]. В опытах *in vitro* глюкокортикоиды увеличивают образование глюкозы из аланина, лактата и малата в печени [146], а из пирувата, метаболитов цикла трикарбоновых кислот, аспартата, глутамата и сукцината [147] в коре почек крыс. Глюкокортикоиды существенно увеличивают скорость глюконеогенеза за счет индукции синтеза его ключевых ферментов [128]. Вместе с тем глюкокортикоиды в результате катаболического или антианаболического действия на периферические ткани поставляют огромное количество субстратов, которые насыщают ферменты, характеризующиеся высокой  $K_m$ , в частности трансаминазы, и усиливают тем самым глюконеогенез [148]. При ишемии печени при участии глутаматдегидрогеназы и ГПТ происходит увеличение содержания аланина в результате аминирования пирувата аммиаком, освобождающимся из адениловых нуклеотидов и глутамина [149].

Так как глюкокортикоиды вызывают специфическое увеличение в крови аланина [150], то было высказано предположение [25], что действие глюкокортикоидов на глюконеогенез опосредовано через мобилизацию аланина.

#### А л а н и н - г л ю к о з н ы й    ц и к л

Распад аминокислот в мышце генерирует образование аминокрупп, накопление которых приведет к отравлению организма, так как в скелетной мышце нет ферментов, переводящих аммиак в мочевины. Первый ключ к разгадке судьбы этих аминокрупп дали работы, показавшие, что из мышц при ночном или длительном голодании освобождаются аминокислоты, не присутствующие в простом гидролизате мышечного белка [10, 11]. В печени аланин отдает аминокруппу на синтез мочевины, а углеродный скелет служит источником для образования глюкозы. После превращения в глюкозу в печени процесс повторяется в мышце обратным образованием аланина [10, 102]. Перенос аланина между мышцей и печенью, по-видимому, аналогичен переносу лактата в цикле Кори.

Эти данные позволили постулировать существование аланин-глюкозного цикла [10, 102, 151]. Общая схема функционирования цикла представляется в такой последовательности: глюкоза мышц → пируват мышц + аммиак → аланин крови → аланин печени → аммиак + пируват печени → мочевины + глюкоза печени → глюкоза крови.

Продукция аланина мышцами происходит при одновременной деградации разветвленных аминокислот [59, 152], так как ни одна другая аминокислота в физиологических концентрациях не стимулирует синтез аланина при инкубации мышц [16]. Поэтому в схеме аланинового цикла было дополнено звено, указывающее на то, что аммиак для синтеза аланина образуется за счет деградации разветвленных аминокислот [51]. Трансаминирование разветвленных аминокислот происходит исключительно с участием 2-кетоглутарата и дает глутамат, который может служить донатором аминокруппы для пирувата с образованием аланина. Может также происходить передача свободного аммиака на глутаминовую кислоту с образованием глутамина.

Так как образование аланина в мышце идет из экзогенной глюкозы, то глюконеогенез из аланина не представляет собой нового источника глюкозы, а сохраняет имеющиеся запасы углеводов. Метаболизм глюкозы до пирувата или аланина поставляют мало энергии [16]. Однако образование аланина при переносе аминокруппы от лейцина может способствовать полному окислению лейцина, что дает выход дополнительно 42 молекул АТФ на молекулу аминокислоты или во много раз больше энергии, чем освобождается при гликолизе глюкозы до лактата (2 молекулы АТФ). Окисление лейцина способствует сохранению углеродного скелета глюкозы [153]. Чистый распад белка при голодании поставляют около 5% окисляемых ацетильных групп, из которых лейцин составляет 4%, а оставшийся 1% дают аспаргат, аспарагин, глутамат, изолейцин и валин, вместе взятые [51]. Эти данные указывают на важность аланин-глюкозного цикла в энергетическом обеспечении мышц.

Синтез глюкозы из аланина является энергозависимым этапом метаболизма. При образовании 1 молекулы глюкозы из аланина затрачивается 10 молекул АТФ, из которых 4 молекулы АТФ расходуются на удаление амми-

ака для синтеза мочевины. Энергетически процесс глюконеогенеза и урогонеоза обеспечивается окислением жирных кислот [154]. Поэтому соединения, препятствующие мобилизации [155, 156] или окислению липидов [157, 158], ингибируют глюконеогенез в печени. При глюконеогенезе из лактата [154] для образования 125 мкмоль глюкозы поглощается 250 мкат  $O_2$ , а при глюконеогенезе из аланина на синтез 125 мкмоль глюкозы потребляется уже 368 мкат  $O_2$ . Следовательно, эндогенная мобилизация и окисление топлива являются интегральной частью процесса синтеза глюкозы, поэтому контроль различных этапов мобилизации и окисления липидов регулирует и скорость глюконеогенеза.

Глюконеогенез из аланина не только зависит от поставки энергии при окислении липидов, но и является одним из регуляторов скорости мобилизации и окисления липидов. Аланин вызывает активацию  $\alpha$ -клеток поджелудочной железы, поэтому при повышении его концентрации увеличивается уровень глюкагона [129, 159]. Глюкагон, как известно, усиливает липолиз [160, 161] и окисление липидов в печени [162, 163]. Высокая скорость окисления НЭЖК в печени приводит к усилению кетогенеза, а повышение концентрации кетоновых тел в крови будет блокировать липолиз в жировой ткани [164]. Аланин является важным акцептором энергии, образующейся при окислении НЭЖК в печени, поэтому между уровнем кетоновых тел и концентрацией в крови аланина выявляется обратная корреляция [76]. Введение аланина вызывает быстрее снижение концентрации кетоновых тел в крови [3, 165], и наоборот, введение кетоновых тел приводит к понижению уровня аланина в крови [166, 167]. Способность аланина влиять на процессы липолиза и окисления НЭЖК указывает на важность аланин-глюкозного цикла в обмене липидов.

Таким образом, аланин-глюкозный цикл непосредственно связан с межтоточным обменом белков, жиров и углеводов. Зависимость процессов синтеза и усвоения аланина от гормонального статуса указывает на важность аланин-глюкозного цикла при физиологических и патологических состояниях организма.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Donnelly P. E., Turtle J. R.— *Med. J. Aust.*, 1974, v. 1, p. 573.
2. Orlicky J., Ruscak M.— *Csl. Fysiol.*, 1976, v. 25, p. 401.
3. Ozand P. T., Reed W. D., Girard J. et al.— *Biochem. J.*, 1977, v. 164, p. 557.
4. Ruderman N. B.— *Ann. Rev. Med.*, 1975, v. 26, p. 245.
5. Майстер А. Биохимия аминокислот. М., 1961.
6. Ballard F. J., Filsell O. H., Jarrett I. G.— *Metabolism*, 1976, v. 25, p. 415.
7. Spydevold O.— *Acta physiol. scand.*, 1976, v. 97, p. 273.
8. Ishikawa T., Aikawa E., Malsutaka H.— *J. Biochem.*, 1972, v. 71, p. 1097.
9. Ruderman N. B., Berger M. *J. biol. Chem.*, 1974, v. 249, p. 5500.
10. Felig P., Pozefsky T., Marliss E. et al.— *Science*, 1970, v. 167, p. 1003.
11. London D. R., Foley T. H., Webb C. G.— *Nature*, 1965, v. 208, p. 588.
12. Pozefsky T., Felig P., Tobin J. D. et al.— *J. clin. Invest.*, 1969, v. 48, p. 2273.
13. Millward D. J., Nnanyelugo D. O., James W. P. T. et al.— *Brit. J. Nutr.*, 1974, v. 32, p. 127.
14. Kominz D. R., Hough A., Symond P. et al.— *Arch. Biochem.*, 1954, v. 50, p. 148.
15. Garber A. J., Karl I. E., Kipnis D. M.— *J. biol. Chem.*, 1976, v. 251, p. 826.
16. Odessey R., Khairallah E. A., Goldberg A. L.— *Ibid.*, 1974, v. 249, p. 7623.
17. Garber A. J., Karl I. E., Kipnis D. M.— *Ibid.*, 1976, v. 251, p. 836.
18. Snell K., Duff D. A.— *Biochem. J.*, 1977, v. 162, p. 399.
19. Blackshear P. J., Holloway P. A. II., Alberti K. G.— *Biochem. J.*, 1975, v. 150, p. 379.
20. Taegtmeier H., Peterson M. B., Ragavan V. V. et al.— *J. biol. Chem.*, 1977, v. 252, p. 5010.
21. Blackshear P. J., Holloway P. A. II., Alberti G. M. M.— *Biochem. J.*, 1975, v. 146, p. 447.
22. Gerich J. E., Tsafikian E., Lorenzi M. et al.— *J. clin. Endocr.*, 1975, v. 40, p. 526.
23. Fulks R. M., Li J., Goldberg A.— *J. biol. Chem.*, 1975, v. 250, p. 290.
24. Grubb B.— *Am. J. Physiol.*, 1976, v. 230, p. 1379.
25. Felig P., Wahren J.— *In: Diabetes*. Amsterdam, 1974, p. 217.
26. Aoki T. T., Brennan M. F., Müller W. A. et al.— *J. clin. Invest.*, 1972, v. 51, p. 2889.
27. Jefferson L. D., Rannels D., Munger B. et al.— *Fed. Proc.*, 1974, v. 33, p. 1098.
28. Felig P., Wahren J.— *J. clin. Invest.*, 1971, v. 50, p. 2703.

29. *Mole P. A., Baldwin K. M., Terjung R. L. et al.*— Am. J. Physiol., 1973, v. 224, p. 50.
30. *Mundge G. H., Mills R. M., Taegtmeier H. et al.*— J. clin. Invest., 1976, v. 58, p. 1185.
31. *Stave U., Armstrong M. D.*— Biol. Neonate, 1976, v. 28, p. 347.
32. *Hochachka P. W., Owen T. G., Allen J. F. et al.*— Comp. Biochem. Physiol., 1975, v. 50-B, p. 17.
33. *de Zwaan A., Zandee D. J.*— Ibid., 1972, v. 43-B, p. 47.
34. *Stokes T. M., Awapara J.*— Ibid., 1968, v. 25, p. 883.
35. *Johnston I. A.*— Ibid., 1975, v. 51-B, p. 235.
36. *Leclerc L., Freminet A., Bursaux E. et al.*— Bull. Europ. Physiopath. Resp., 1976, v. 12, p. 781.
37. *Nunez de Castro J., Arias de Saavedra J. M., Machado A. et al.*— Molec. Cell Biochem., 1976, v. 12, p. 161.
38. *Chico E., Olavarria J. S., Nunez de Castro I.*— Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol., 1978, v. 44, p. 193.
39. *Rovetto M. J., Lamberto W. F., Neely J. R.*— Circulat. Res., 1975, v. 37, p. 742.
40. *Edington D. W.*— Am. J. Physiol., 1973, v. 224, p. 1375.
41. *Evans G., Nelson D. R., Huggons A. K.*— Biochem. Soc. Trans., 1978, v. 6, p. 1022.
42. *Felig P., Wahren J.*— New Engl. J. Med., 1975, v. 293, p. 1078.
43. *Gailis L., Benmouyal E.*— Canad. J. Biochem., 1973, v. 51, p. 11.
44. *Posefsky T., Tancredi R. G.*— J. clin. Invest., 1972, v. 51, p. 2359.
45. *Blackshear P. J., Holloway P. A. H., Alberti K. G.*— Biochem. J., 1974, v. 142, p. 279.
46. *Waterhouse C., Keilson J.*— J. Lab. clin. Med., 1978, v. 92, p. 803.
47. *Collicutt L. M., Hochachka P. W.*— J. comp. Physiol., 1977, v. 115, p. 147.
48. *Cahill G. F., Owen O. E.*— In: Carbohydrate Metabolism and its Disorders. Ed. F. Dickens. New York, 1968, v. 1, p. 497.
49. *Cahill G. F.*— New Engl. J. Med., 1970, v. 282, p. 668.
50. *Nolte J. D., Brdiczka J., Pette D.*— Biochim. biophys. Acta, 1972, v. 284, p. 497.
51. *Goldberg A. L., Chang T. W.*— Fed. Proc., 1978, v. 37, p. 2301.
52. *Frenkel R.*— J. biol. Chem., 1971, v. 246, p. 3069.
53. *Renée C. L., Davis E. J.*— Ibid., 1974, v. 249, p. 3867.
54. *Kostos V., Di Tullio N. W., Rush J. et al.*— Arch. Biochem., 1975, v. 171, p. 459.
55. *Goldberg A. L., Odessey R.*— Am. J. Physiol., 1972, v. 223, p. 1384.
56. *Cederbaum A. I., Lieber C. S., Rubin E.*— Arch. Biochem., 1976, v. 176, p. 525.
57. *Odessey R., Goldberg A. L.*— Am. J. Physiol., 1972, v. 223, p. 1376.
58. *Ichihara A., Yamasaki Y., Masuji H. et al.*— In: Isozymes. Ed. C. L. Markert. New York, 1975, p. 875.
59. *Goldberg A. L., Odessey R.*— In: Exploratory Concepts in Muscular Dystrophy. Ed. A. T. Milhorat. Amsterdam, 1973, v. 2, p. 187.
60. *Chochinov R. H., Bowen H. F., Moorhouse J. A.*— Diabetes, 1978, v. 27, p. 420.
61. *Ruderman N. B., Schmahl F. W., Goodman M. N.*— Am. J. Physiol., 1977, v. 233, p. E109.
62. *Cuendel G.*— Rev. franç. Endocr. clin., 1973, v. 14, p. 332.
63. *Wapnir R. A., Lifshitz F.*— Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1976, v. 152, p. 307.
64. *Ozand P. T., Tildon J. T., Wapnir R. A. et al.*— Biochem. biophys. Res. Commun., 1973, v. 53, p. 251.
65. *Poortmans J. R.*— In: Metabolic Adaptation to Prolonged Physical Exercise. Ed. H. Howald, J. R. Poortmans. Basel, 1975, p. 212.
66. *Hartman B. O., Ellis J. P., Garcia J. B. et al.*— Aviat. Space Environm. Med., 1977, v. 48, p. 395.
67. *Williamson D. H., Lipes-Vieira O., Walker B.*— Biochem. J., 1967, v. 104, p. 497.
68. *Kuttner R. E., Spitzer J. J.*— J. surg. Res., 1978, v. 25, p. 166.
69. *Isoun T. T., Isoun M. J.*— Acta trop. (Basel), 1978, v. 35, p. 287.
70. *Belo P. S., Romsos D. R., Leveille G. A.*— J. Nutr., 1976, v. 106, p. 1135.
71. *Owen O. E., Felig P., Morgan A. P. et al.*— J. clin. Invest., 1969, v. 48, p. 574.
72. *Wapnir R. A.*— Brain Res., 1973, v. 57, p. 187.
73. *Melzer B. E., Agnoli F. S., Hare J. W. et al.*— Diabetes, 1973, v. 22, p. 601.
74. *Reddi A. S., Oppermann W., Strugatz L. H. et al.*— Hormone Metab. Res., 1976, v. 8, p. 478.
75. *Felig P., Marliss E., Ohman J. L. et al.*— Diabetes, 1970, v. 19, p. 727.
76. *Hall S. E. H., Braaten J. T., Mckendry J. B. R. et al.*— Ibid., 1979, v. 28, p. 737.
77. *Wahren J., Felig P., Cerasi E. et al.*— J. clin. Invest., 1972, v. 51, p. 1870.
78. *Haymond M. W., Ben-Galim E., Strobel K. E.*— Ibid., 1978, v. 62, p. 398.
79. *Halae M., Kazuhiko K., Kazuaki M. et al.*— Z. Kinderheilk., 1976, Bd 122, S. 159.
80. *Mac Donald M., Neufeldt N., Park B. N. et al.*— Am. J. Physiol., 1976, v. 231, p. 619.
81. *Blackshear P. J., Alberti K. G. M. M.*— Ibid., 1975, v. 288, p. 205.
82. *Freinkel N., Cohen A. K., Arky R. A. et al.*— J. clin. Endocr., 1965, v. 25, p. 76.
83. *Krebs H. A.*— Advancanc. Enzymol. Regulat., 1968, v. 6, p. 167.

84. Kreisberg R. A., Siegal A. M., Owen W. C.— J. clin. Endocr., 1972, v. 34, p. 876.
85. Haymond M. W., Karl I., Pagliara A. S.— Ibid., 1974, v. 38, p. 521.
86. Pagliara A. S., Karl I. E., Devivo D. C. et al.— J. clin. Invest., 1972, v. 51, p. 1440.
87. Foster K. J., Alberti M. M., Hinks L. et al.— Clin. Chem., 1978, v. 24, p. 1568.
88. Snell K., Walker D. G.— Enzyme, 1973, v. 15, p. 40.
89. Ballard F. J., Filbell O. H., Jarrett J. G.— Metabolism, 1976, v. 25, p. 415.
90. Holm G., Sullivan L., Jagenburg R. et al.— J. appl. Physiol., 1978, v. 45, p. 177.
91. Marliss E. B., Aoki T. T., Morgan A. P. et al.— Clin. Res., 1970, v. 18, p. 539.
92. Ellory J. C., Young J. D.— J. Physiol. (Lond.), 1978, v. 285, p. 51.
93. Wolff J. E., Bergman E. N.— Am. J. Physiol., 1972, v. 223, p. 455.
94. Edmondson J. W., Lumeng L., Li T.-K.— Biochem. biophys. Res. Commun., 1977, v. 76, p. 751.
95. Joseph S. K., Bradford N. M., McGivan J. D.— Biochem. J., 1978, v. 176, p. 827.
96. Dieterle P., Brawand F., Moser K. et al.— Europ. J. Biochem., 1978, v. 88, p. 467.
97. Van Amelsvoort J. M. M., Sips H. J., Van Dam K.— Biochem. J., 1978, v. 174, p. 1083.
98. Endou H., Reuter E., Weber H.— Biochim. biophys. Acta, 1975, v. 389, p. 516.
99. Danisi G., Tai Y.-H., Curran P. F.— Ibid., 1976, v. 455, p. 200.
100. Hajjar J. J.— Life Sci., 1973, v. 13, p. 1011.
101. Ahlborg G., Felig P., Hagenfeldt L. et al.— J. clin. Invest., 1974, v. 53, p. 1080.
102. Mallette L. E., Exton J. H., Park C. R.— J. biol. Chem., 1969, v. 244, p. 5713.
103. Sestoft L., Trap-Jensen J., Lyngsoe J. et al.— Clin. Sci., 1977, v. 53, p. 411.
104. Felig P., Owen O. E., Wahren J. et al.— J. clin. Invest., 1969, v. 48, p. 584.
105. Felig P., Wahren J.— Ibid., 1971, v. 50, p. 1702.
106. Aikawa T., Matsutaka H., Takezawa K. et al.— Biochim. biophys. Acta, 1972, v. 279, p. 234.
107. Felig P., Wahren J., Hendler R. et al.— J. clin. Invest., 1974, v. 53, p. 582.
108. Bowman R. H.— J. biol. Chem., 1970, v. 245, p. 1604.
109. Exton J. H., Park C. R.— Ibid., 1967, v. 242, p. 2622.
110. Ross B. D., Hems R., Krebs H. A.— Biochem. J., 1967, v. 102, p. 942.
111. Schimmel R. J., Knobil E.— Am. J. Physiol., 1969, v. 217, p. 1803.
112. Williamson J. R., Browning E. T., Olson M. S.— Advanc. Enzyme Regulat., 1968, v. 6, p. 67.
113. Lundholm K., Schersten T.— Scand. J. clin. Lab. Invest., 1976, v. 36, p. 339.
114. Sladek C. D., Snarr J. F.— Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1974, v. 146, p. 194.
115. Felig P.— Israel. J. med. Sci., 1972, v. 8, p. 262.
116. Mendes-Mourao J., Halestrap A. P., Crisp C. I.— FEBS Letters, 1975, v. 53, p. 29.
117. Schoolwerth A. C., Blonolin J., Klahr S.— Biochim. biophys. Acta, 1974, v. 372, p. 274.
118. DeRosa G., Swick R. W.— J. biol. Chem., 1975, v. 250, p. 7961.
119. Fahien L. A., Hsu L., Kmitek E.— Ibid., 1977, v. 252, p. 1250.
120. Шанов В. С., Блюнов В. А.— Успехи биол. химии, 1975, т. 16, с. 196.
121. Pontremoli S., Grazi E.— In: Carbohydrate Metabolism and its Disorders. Ed. F. Dickens. New York, 1968, v. 1, p. 259.
122. Raghunathan R., Arinze I. J.— Int. J. Biochem., 1977, v. 8, p. 737.
123. Greenberg R., Howell W., Woodside W.— Pediat. Res., 1977, v. 11, p. 514.
124. Warnes D. M., Seamark R. F., Ballard F. J.— Biochem. J., 1977, v. 162, p. 627.
125. Hall S. E. H., Goebel R., Barnes I. et al.— Fed. Proc., 1977, v. 36, p. 239.
126. Vidnes J., Sovik O.— Acta paediat. scand., 1976, v. 65, p. 297.
127. Mobley P. W., Machler R. J., Dibic P. U.— J. molec. Med., 1977, v. 2, p. 163.
128. Eisenstein A. B., Strack I.— Endocrinology, 1968, v. 83, p. 1337.
129. Matsuura N., Cheng J. S., Kalant N.— Canad. J. Biochem., 1975, v. 53, p. 28.
130. Clark M. G., Jarrett I. G.— Biochem. J., 1978, v. 176, p. 805.
131. Exton J. H., Mallette L. E., Jafferson L. S. et al. Am. J. clin. Nutr., 1970, v. 23, p. 993.
132. Exton J. H., Harper S. C., Tucker A. L. et al.— Biochim. biophys. Acta, 1973, v. 329, p. 23.
133. Balckshear P. J., Holloway P. A. H., Alberti R. G.— Biochem. J., 1975, v. 148, p. 353.
134. DiTullio N. W., Berkoff C. E., Blank B. et al.— Ibid., 1974, v. 138, p. 387.
135. Elliott K. R. F., Pogson C.— Ibid., 1977, v. 164, p. 357.
136. Friedmann B., Doodman E. H., Weinhouse S.— J. biol. Chem., 1965, v. 240, p. 3729.
137. Ballard F. J., Oliver I. T.— Nature, 1962, v. 195, p. 498.
138. Hetenyi G.— Canad. Physiol., 1977, v. 8, p. 35.
139. Alemnany M., Palou A., Codina J. et al.— Diabete et Metabolism, 1978, v. 4, p. 181.
140. Hasselblatt A., Panten U., Poser W.— In: Regulation of Gluconeogenesis, Stuttgart 1971, p. 276.

141. *Ishikawa E., Aikawa T., Matsutaka H.*— J. Biochem. (Tokyo), 1972, v. 71, p. 1093.
142. *Walker P. R., Potter V. R.*— J. biol. Chem., 1973, v. 248, p. 4610.
143. *Llorente P., Marco R., Sols A.*— Europ. J. Biochem., 1970, v. 13, p. 45.
144. *Vijayvargiya R., Schwark W. S., Singhal R. L.*— Canad. J. Biochem., 1969, v. 47, p. 895.
145. *Friedrichs D., Schoner W.*— Biochim. biophys. Acta, 1974, v. 343, p. 341.
146. *Wood W. A.* Ann. Rev. Biochem., 1966, v. 35, p. 521.
147. *Henning H. V., Huth N., Seubert W.*— Biochim. biophys. Acta, 1964, v. 17, p. 496.
148. *Wagle S. R.*— Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1966, v. 121, p. 1297.
149. *Brosnan J. T., Krebs H. A., Williamson D. H.*— Biochem. J., 1970, v. 117, p. 91.
150. *Wise J. K., Hendler R., Felig P.*— J. clin. Invest., 1973, v. 52, p. 2774.
151. *Exton J. H., Mallette L. E., Jefferson L. S. et al.*— Recent Progr. Hormon. Res., 1970, v. 26, p. 411.
152. *Chang T. W., Goldberg A. L.*— J. biol. Chem., 1978, v. 253, p. 3677.
153. *Chang T. W., Goldberg A. L.*— Ibid., p. 3696.
154. *Parrilla R., Ayuso-Parrilla M. S., Williamson J. R.*— Pflügers Arch., 1976, Bd 366, S. 211.
155. *Hasselblat A.*— Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmakol. exp. Path., 1967, Bd 257, S. 281.
156. *Menahan A., Wieland O.*— Europ. J. Biochem., 1969, v. 9, p. 182.
157. *Toews C. J., Lowy C., Ruderman N. B.*— J. biol. Chem., 1970, v. 245, p. 818.
158. *Williamson J. R., Browning E. T., Thurman R. G. et al.*— Ibid., 1969, v. 244, p. 5055.
159. *Wise J. K., Hendler R., Felig P.*— Clin. Res., 1972, v. 20, p. 561.
160. *Смирнова Г. И.* — Вopr. oxp. mat., 1978, № 7, с. 33.
161. *Biedzinski T. M.* — Przegl. lek., 1978, v. 35, p. 729.
162. *Exton J. H., Ui M., Lewis S. B. et al.* — In: Regulation of Gluconeogenesis, Stuttgart, 1971, p. 160.
163. *Halestrap A. P.* — Biochem. J., 1978, v. 172, p. 399.
164. *Lefebvre P. J.* — In: Glucagon. Eds. P. J. Lefebvre, R. H. Unger. Oxford, 1972, p. 109.
165. *Ozand P. T., Tildon J. T., Stevenson J. H. et al.* — Am. J. Physiol., 1976, v. 230, p. 1385.
166. *Balasse E. O.* — Diabetologia, 1977, v. 13, p. 4.
167. *Sherwin R. S., Hendler R. G., Felig P.* — J. clin. Invest., 1975, v. 22, p. 1382.

Поступила 19/IV 1980 г.

УДК 576.8.097.3+575.173

*Е. П. Трохименко, А. Г. Середа, Л. Н. Павленко, Г. Д. Бердышев*

### МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК ЛИМФОЦИДНЫХ ОРГАНОВ КРЫС ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ИММУННОГО ОТВЕТА

Государственный институт усовершенствования врачей, Киев

В изучении регуляторных систем клетки в настоящее время большое внимание уделяется исследованиям модификаций нуклеиновых кислот и, в частности, метилирования ДНК. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что биологические функции нуклеиновых кислот тесно связаны с их метилированием. Так, например, это показано в отношении репликации, транскрипции, трансляции, рестрикции ДНК, причем изменение метилирования ДНК, возможно, является механизмом регуляции этих функций [1, 2]. Так, при опухолевой трансформации клеток в ДНК резко возрастает количество минорных оснований и, в частности, 5-метилцитозина (5-МЦ) [3]. Последнее, как предполагают [4], в конечном итоге приводит к ошибкам транскрипции и трансляции, к синтезу аномальных белков или к полному выпадению синтеза жизненно важных белков. С другой стороны, аномальное метилирование ДНК может привести к опухолевой трансформации [5]. Злокачественный рост сопровождается неконтрольной патологической пролиферацией клеток, несущих аномалии генетического материала. При этом иммунная система организма не способна элиминировать эти клетки, так как не в состоянии реагировать на появление чужеродного белка, правильно отвечать на антигенный стимул.

В последние годы изучению механизмов иммунного ответа уделяется много внимания [6, 7]. Имеются работы, посвященные исследованию дина-

мики синтеза ДНК при формировании иммунного ответа [8]. Однако в доступной нам литературе мы не обнаружили сведений об изучении модификаций нуклеиновых кислот при формировании иммунного ответа. Поэтому представляет большой интерес исследование метилирования ДНК в процессе формирования иммунного ответа, что в конечном итоге поможет выяснить механизм данного явления.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния иммунизации на метилирование ДНК, выделенной из тимуса, селезенки и лимфатических узлов крыс при введении взвеси эритроцитов барана в различных концентрациях.

### М а т е р и а л и м е т о д ы

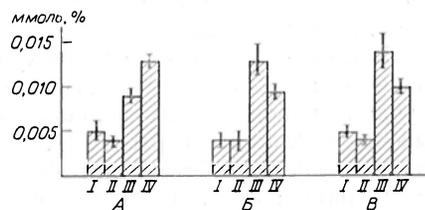
Исследования проводили на самцах крыс линии Вистар массой 100—150 г. В качестве факторов иммунизации использовали 50% (по 36 мг белка), 5% (по 3,6 мг белка) и 0,005% (по  $3,6 \cdot 10^{-3}$  мг белка) взвеси эритроцитов барана на каждое животное при двукратном внутривенном введении антигена. Контрольной группе вводили физиологический раствор тем же способом. Иммунизацию проводили по методу, описанному О. Е. Вязовым [9]. Материал брали для исследования на 4-е сутки после первого введения антигена. Животных предварительно наркотизировали хлороформом, декапитировали и забирали лимфоидные органы. Из последних выделяли ДНК по методу Мармура [10]. Время взятия материала было выбрано исходя из того, что, по полученным ранее данным, именно в этот период происходит усиление пролиферативных процессов в лимфоидной ткани, сопровождающееся максимальным возрастанием в ней активности ферментов гликолиза (фосфофруктокиназы) и протеолиза (кислых и щелочных протеиназ) [11—12]. Использовали додецилсульфат натрия (ПНР), протеиназу, выделенную по методу [13], РНК-азу фирмы «Reanal» (ВНР), целлюлозу марки «Филтрак» (ГДР), хлороформ Химико-фармацевтического завода им. М. В. Ломоносова (Киев). Для приготовления солевых растворов и растворителей использовали химически чистые реактивы отечественного производства.

Нуклеотиды на тонкослойных хроматограммах идентифицировали по спектрам поглощения каждого из пятен. При хроматографическом разделении гидролизата ДНК в бутанол-аммиачном растворителе [14] оказалось, что нуклеотиды локализовались в порядке Г—Ц—5-МЦ—А—Т, начиная от старта, что согласуется с данными литературы [14].

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

Результаты исследования нуклеотидного синтеза ДНК, выделенной из тимуса, селезенки и лимфатических узлов крыс всех 3 групп, представлены на рисунке. Как видно, в норме количество 5-МЦ в ДНК тимуса составляет  $0,005 \pm 0,001$  ммоль%, селезенки  $0,005 \pm 0,0006$  ммоль%, лимфатических

Изменение содержания 5-МЦ в ДНК лимфоидных органов крыс при введении различных количеств эритроцитов барана. I — норма; II — 0,005% взвесь; III — 5% взвесь; IV — 50% взвесь; А — тимус; Б — лимфатические узлы; В — селезенка



узлов  $0,004 \pm 0,0007$  ммоль%. Эти данные свидетельствуют о выраженной органной специфичности метилирования ДНК и хорошо согласуются с данными литературы [15—17].

В ДНК тимуса крыс линии Вистар при иммунизации 50% взвесью эритроцитов барана по выбранной нами схеме происходило увеличение количества 5-МЦ в 2,6 раза по сравнению с нормой за счет уменьшения количества Ц. При этом отношение А+Т/Г+Ц+5-МЦ, характеризующее нуклеотидный состав данной ДНК, оставалось неизменным. При иммунизации 5% взвесью при тех же условиях происходило увеличение количества 5-МЦ в 1,8 раза за счет уменьшения количества Ц при неизменном нуклеотидном составе ДНК тимуса. При введении 0,005% взвеси эритроцитов мы не обнаружили изменений ни количества 5-МЦ, ни нуклеотидного состава данной ДНК по сравнению с нормой.

В ДНК лимфатических узлов введение 50% взвеси эритроцитов барана приводило к увеличению количества 5-МЦ в 2,4 раза. При этом количество

Г и Ц уменьшалось, а Т увеличивалось. Нуклеотидный состав ДНК при этом отличался от такового в норме и характеризовался увеличением общего количества пар А—Т. Эти результаты полностью согласуются с результатами работы [18], в которой исследовались культуры лимфоцитов периферической крови больных лимфолейкозом. В ней показано, что содержание 5-МЦ в ДНК лимфоцитов в этом случае в 7 раз выше, чем в ДНК лимфоцитов здоровых людей. При этом также происходит уменьшение содержания Ц и Г и увеличение количества Т. Как известно, 5-МЦ при репликации ДНК может комплементарно взаимодействовать не только с Г, но и с Т или А. Такого рода ДНК может нести информацию для синтеза белков с измененной первичной структурой. Воздействие 5% взвеси эритроцитов вызывало увеличение количества Ц без изменения нуклеотидного состава ДНК лимфатических узлов. При введении 0,005% взвеси эритроцитов не наблюдалось ни изменения количества 5-МЦ, ни изменения нуклеотидного состава ДНК лимфатических узлов по сравнению с нормой.

В ДНК селезенки происходило увеличение количества 5-МЦ в 2 раза под воздействием 50% взвеси отмытых эритроцитов барана и в 2,5 раза под воздействием 5% взвеси. При этом нуклеотидный состав ДНК селезенки не изменялся. При введении 0,005% взвеси эритроцитов мы не обнаружили изменений количества 5-МЦ и нуклеотидного состава ДНК селезенки по сравнению с нормой.

Таким образом, полученные нами данные коррелируют с известным в иммунологии фактом о зависимости силы иммунного ответа от дозы антигена. Результаты эксперимента показали, что иммунизация взвесью эритроцитов барана в минимальной концентрации не оказывает влияния на генетический аппарат лимфоидных органов линейных крыс. Введение данного антигена в оптимальной для организма концентрации приводило к увеличению количества 5-МЦ в ДНК лимфоидных органов крыс без изменения ее нуклеотидного состава. Введение взвеси эритроцитов максимальной концентрации вызывало увеличение количества 5-МЦ в ДНК селезенки и лимфатических узлов по сравнению с таковым при введении данного антигена в оптимальной концентрации. При этом в ДНК лимфатических узлов наблюдалось изменение нуклеотидного состава за счет увеличения количества пар А—Т по сравнению с нормой.

Результаты настоящих исследований указывают на то, что процессы метилирования ДНК играют важную роль в формировании иммунного ответа и, очевидно, регулируют транскрипцию генов, несущих информацию для биосинтеза антител.

Введение определенных доз эритроцитов барана существенно влияет на процессы метилирования ДНК лимфоидных органов крыс, а в некоторых случаях приводит к изменению ее нуклеотидного состава. Это подтверждает выводы, сделанные в работе [22] о том, что введение чужеродных веществ является сильнодействующим фактором, изменяющим процессы транскрипции и трансляции. Это следует учитывать при трансплантации органов, планировании иммунопрофилактики и вакцинотерапии с тем, чтобы выработать соответствующие мероприятия, снижающие поражающий эффект антигенных воздействий.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *McFarlane S. et al.* — *Canad. J. Microbiol.*, 1969, v. 15, p. 189—192.
2. *Федоров Н. А.* — Пробл. гематол., 1973, № 6, с. 50—57.
3. *Strinivassan P. R., Borek E.* — *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, 1963, v. 19, p. 529—535.
4. *Magee P. N.* — *J. Path. Bact.*, 1962, v. 84, p. 19—23.
5. *Петров Р. В.* Иммунология и иммуногенетика. М., 1976.
6. *Петров Р. В., Хатнов Р. М.* — Ж. микробиол., 1976, № 9, с. 51—54.
7. *Перевозникова М. Ф.* — Там же, с. 54—58.
8. *Вязов О. Е.* — В кн.: Лабораторные методы исследования в неинфекционной иммунологии. М., 1967, с. 63.
9. *Martur J. A.* — *Molec. Biol.*, 1961, v. 3, p. 206—211.
10. *Серета А. Г., Кириченко С. Г.* Ростов-н/Д, 1976, с. 108—110.
11. *Серета А. Г., Кириченко С. Г.* — В кн.: Патологическая физиология тканевой несовместимости. М., 1976, с. 32—34.

13. Циперович А. С., Лосева А. Л. — Укр. біохім. ж., 1967, т. 39, № 3, с. 331—335.
14. Васильев В. К. Науч. докл. высш. школы. Биол. науки. М., 1971, № 9, с. 118—123.
15. Бердышева Г. Д. — Биохимия, 1967, т. 32, № 5, с. 988—993.
16. Ванюшин Б. Ф. — Докл. АН СССР, 1959, т. 129, № 6, с. 945—952.
17. Антонов А. С. — Там же, 1962, т. 147, № 5, с. 1480—1492.
18. Desai L. S. et al. — Exp. Cell Res., 1971, v. 65, p. 260—263.
19. Pardue M. L. — Genetics, 1975, v. 79, Suppl., p. 159—170.
20. Harbers K., Harbers R. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1975, v. 66, p. 738.
21. Гауровиц Ф. Иммунохимия и биосинтез антител. М., 1969.
22. Шалимов А. А., Кейсевич Л. В., Кабан А. П. — Клин. хир., 1978, № 5, с. 50—56.

Поступила 23/VII 1980 г.

## METHYLATION OF DNA FROM RAT LYMPHOID TISSUES IN DEVELOPMENT OF IMMUNE RESPONSE

*E. P. Trokhimenko, A. G. Sereda, L. N. Pavlenko, G. D. Berdyshev*

Institute for Postgraduate Training of Physicians, Kiev

Within 4 days after immunization of rats by means of sheep erythrocyte suspension (of various concentration) analysis of nucleotide composition of DNA, isolated from the animal lymphoid tissue, was carried out using cellulose thin-layer chromatography. The immunization was shown to affect distinctly the DNA methylation in rat lymphoid tissue; sometimes, it altered the DNA nucleotide composition. The data obtained correspond with the well-recognized phenomenon on dependence of the immune response on the antigen concentration.

УДК 577.153

*А. Т. Иващенко, С. В. Кожанова*

## ДЕЙСТВИЕ АНИОНОВ НА ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ И АТФ-АЗНУЮ АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ

Институт зоологии АН Казахской ССР, Алма-Ата

После пребывания животных в различных экстремальных условиях наблюдаются нарушения энергетических процессов в ряде тканей. Например, митохондрии печени и сердца голодавших или находившихся в условиях гипоксии, гипотермии животных имеют пониженную эффективность окислительного фосфорилирования [1, 2]. При аналогичных воздействиях на животных наблюдается и уменьшение  $\text{HCO}_3^-$ -АТФ-азной активности митохондрий [3]. Отметим, что бикарбонат и другие анионы значительно изменяют активность АТФ-синтетазы митохондрий, которая непосредственно участвует в процессах окислительного фосфорилирования [4]. В связи с этим было высказано предположение, что степень стимуляции бикарбонатом АТФ-азы митохондрий может служить показателем эффективности работы системы окислительного фосфорилирования [5].

В настоящей работе изучено влияние анионов на показатели функционального состояния митохондрий и исследована связь между фосфорилирующей функцией митохондрий и чувствительностью их АТФ-азы к ионам бикарбоната.

### Методика

Опыты проводили на белых беспородных крысах массой 200—250 г. Митохондрии печени получали по описанной методике [6] с некоторыми модификациями. Средой гомогенизации служил 10 мМ трис-НСI-буфер рН 7,4, содержащий 0,25 М сахарозы, 1 мМ ЭДТА, 0,1% бычьего сывороточного альбумина (БСА). Митохондрии сердца выделяли в 10 мМ трис-НСI-буфере рН 7,4 с 0,15 М КСI, 0,02 М сахарозы, 1 мМ ЭДТА, 0,1% БСА. Среда инкубации митохондрий сердца состояла из 50 мМ трис-НСI-буфера рН 7,4, содержащего 0,14 М сахарозы, 50 мМ КСI, 10 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (среда А), 0,5 мМ ЭДТА. Эту среду с добавлением в нее 1 мМ  $\text{MgCl}_2$  использовали для инкубации митохондрий печени.

Потребление кислорода регистрировали полярографически закрытым платиновым электродом Кларка. Субстратом дыхания были 10 мМ сукцинат или  $\alpha$ -кетоглутарат. Функциональное состояние прочно сопряженных митохондрий определяли по Чансу. Коэффициент дыхательного контроля оценивали, как и в работе [6], при до-

бавлении 150—300 мкМ АДФ. Отметим, что в среде инкубации без митохондрий или с недышащими митохондриями (в присутствии 2 мМ KCN) окисление сульфита [5 мМ] вызывает поглощение кислорода со скоростью 8 нмоль  $O_2$  в 1 мин. На этот эффект сульфита делалась поправка. Mg-АТФ-азную активность определяли в среде А без  $KH_2PO_4$ , но с добавлением 20 мМ NaCl, 2 мМ  $MgCl_2$ , 2 мМ АТФ. АТФ-азную активность в присутствии бикарбоната, сульфита и тиоцианата находили, заменяя в среде NaCl на соответствующую соль в эквимоллярных количествах. Измерение скорости потребления кислорода и АТФ-азной активности проводили при 30 °С. Белок определяли по Лоури [7], фосфор — по Дениже [8]. В таблицах приведены средние арифметические измеряемых величин и стандартная ошибка ( $\bar{X} \pm S_x$ ). Значимость разности величин оценивали с помощью критерия Стьюдента [9].

## Результаты и обсуждение

Данные опытов по влиянию бикарбоната, сульфита и тиоцианата на показатели функционального состояния митохондрий печени приведены в табл. 1 При окислении  $\alpha$ -кетоглутарата в присутствии этих анионов наблюдается уменьшение скорости поглощения кислорода митохондриями в состоянии 3 и не отмечено изменений ее в контролируемом состоянии. Сульфит

Таблица 1

Влияние анионов на показатели функционального состояния митохондрий печени крыс

Субстрат	Анион	Число опытов	Скорость потребления кислорода, нмоль $O_2$ в 1 мин на 1 мг белка		Дыхательный контроль	АДФ/О
			состояние 4	состояние 3		
$\alpha$ -Кетоглутарат	Без аниона	8	$20,7 \pm 1,4$	$75,7 \pm 6,8$	$3,64 \pm 0,37$	$2,61 \pm 0,13$
	$HCO_3^-$ 20 мМ	5	$18,6 \pm 1,1$	$41,8 \pm 5,9^*$	$2,21 \pm 0,24^*$	$2,72 \pm 0,09$
	$SO_3^{2-}$ 5 мМ	4	$23,0 \pm 4,1$	$54,5 \pm 4,2^*$	$2,35 \pm 0,12^*$	$1,53 \pm 0,03^*$
	$SCN^-$ 20 мМ	4	$22,1 \pm 2,6$	$56,3 \pm 4,9^*$	$2,56 \pm 0,22^*$	$2,25 \pm 0,05^*$
	Без аниона	6	$18,5 \pm 2,7$	$78,2 \pm 5,7$	$4,28 \pm 0,23$	$1,77 \pm 0,10$
Сукцинат	$HCO_3^-$ 20 мМ	4	$21,3 \pm 1,5$	$56,4 \pm 3,5^*$	$2,65 \pm 0,18^*$	$2,04 \pm 0,06^*$
	$SO_3^{2-}$ 5 мМ	4	$19,7 \pm 3,8$	$65,5 \pm 6,1$	$3,28 \pm 0,14^*$	$1,61 \pm 0,05$
	$SCN^-$ 20 мМ	4	$18,1 \pm 2,3$	$66,6 \pm 2,7$	$3,70 \pm 0,43$	$1,79 \pm 0,06$

\* Результаты достоверно отличаются от контроля ( $P < 0,05$ ).

и тиоцианат снижали величину АДФ/О. Такое влияние сульфита на отношение АДФ/О можно объяснить его ингибирующим действием на процесс субстратного фосфорилирования [10], вклад которого в величину АДФ/О при окислении  $\alpha$ -кетоглутарата составляет 1. Понижение АДФ/О ионами тиоцианата тоже, вероятнее всего, связано с ингибирующим влиянием его на субстратное фосфорилирование, поскольку известно, что  $SCN^-$  угнетает декарбоксилазную активность [11]. Подтверждением сказанному могут служить результаты опытов с митохондриями, окисляющими сукцинат (см. табл. 1). В данном случае отсутствует субстратное фосфорилирование, поэтому тиоцианат с сульфитом не влияли на величину АДФ/О.

Интересны результаты опытов с бикарбонатом. Этот анион вызывал значительное снижение дыхательного контроля и скорости потребления кислорода митохондриями в состоянии 3 при сохранении (с  $\alpha$ -кетоглутаратом) или увеличении (с сукцинатом) отношения АДФ/О. Такой результат является еще одним подтверждением известного факта неадекватности оценки сопряженности фосфорилирующего окисления по величине коэффициента дыхательного контроля [12]. Отметим, что в присутствии бикарбоната и сульфита наблюдалась меньшая стимуляция потребления кислорода митохондриями при добавлении 2,4-динитрофенола в разбавляющих концентрациях, чем без этих анионов.

АТФ-азная активность митохондрий печени контрольных крыс при добавлении 20 мМ бикарбоната или 5 мМ сульфита увеличивалась на 38 и 62% соответственно. Тиоцианат (20 мМ) ингибировал АТФ-азную активность на 38%.

Таблица 2

Влияние различных воздействий на показатели функционального состояния митохондрий печени крыс

Субстрат	Воздействие	Число опытов	20 мМ NaHCO <sub>3</sub>	Скорость потребления кислорода, нмоль O <sub>2</sub> в 1 мин на 1 мг белка		Дыхательный контроль	АДФ/О
				состояние 4	состояние 3		
α-Кетоглутарат	Голодание	6	—	27,8 ± 5,6	92,2 ± 13,1	2,93 ± 0,18	1,68 ± 0,04
	Гипоксия с гиперкапнией	6	+	26,7 ± 3,5	57,1 ± 5,4*	2,06 ± 0,15*	2,18 ± 0,06*
		7	+	20,3 ± 2,1	64,7 ± 1,4	3,23 ± 0,23	1,43 ± 0,02
Сукцинат	Голодание	6	—	31,7 ± 9,2	99,6 ± 8,4	3,17 ± 0,06	1,37 ± 0,03
		6	+	30,1 ± 2,0	72,1 ± 9,6*	2,41 ± 0,11*	1,51 ± 0,03*
	Гипоксия с гиперкапнией	6	—	21,6 ± 0,5	86,4 ± 5,8	4,08 ± 0,19	1,13 ± 0,01
		6	+	23,0 ± 1,5	54,2 ± 1,4*	2,37 ± 0,16*	1,39 ± 0,03*

\* Достоверные изменения величин при добавлении бикарбоната (P < 0,05).

Результаты опытов по изучению действия бикарбоната на функциональное состояние митохондрий печени животных, которые голодали 40—45 ч или находились в условиях гипоксии с гиперкапнией (18 ч при 10% O<sub>2</sub> и 30% CO<sub>2</sub>), приведены в табл. 2, из которой следует, что применяемые воздействия достоверно не изменяли скорость потребления кислорода митохондриями в состоянии 3 по отношению к контролю (см. табл. 1), но существенно уменьшали отношение АДФ/О. Так, после голодания животных величина АДФ/О снижалась на 36%, а после действия гипоксии с гиперкапнией — на 45% (табл. 3). Проведенные параллельно измерения АТФ-азной активности митохондрий показали, что чувствительность АТФ-азы к бикарбонату в опыте заметно ниже, чем в контроле. АТФ-аза митохондрий печени голодавших животных стимулировалась бикарбонатом на 34% слабее, чем АТФ-аза контрольных митохондрий. После воздействия гипоксии с гиперкапнией прирост HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> АТФ-азной активности составлял 50% от контроля (см. табл. 3). При использовании сукцината в качестве субстрата отмечались те же закономерности в изменении показателей функционального состояния митохондрий подопытных животных, что и с α-кетоглутаратом (см. табл. 2).

Интересные результаты были получены при внесении бикарбоната в среду инкубации митохондрий печени животных, подвергавшихся перечисленным выше воздействиям. Ионы HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> существенно уменьшали скорость потребления кислорода митохондриями в состоянии 3. Отношение АДФ/О под влиянием бикарбоната значительно возрастало, особенно при окислении α-кетоглутарата (см. табл. 2).

Таблица 3

Влияние различных воздействий на величину АДФ/О и HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-АТФ-азную активность митохондрий печени крысы

Субстрат	Воздействие	АДФ/О, % к контролю	Увеличение бикарбонатом АТФ-азной активности, % к контролю
α-Кетоглутарат	Контроль	100	100
	Голодание	64	66
	Гипоксия с гиперкапнией	55	50
Сукцинат	Контроль	100	—
	Голодание	77	—
	Гипоксия с гиперкапнией	64	—

Данные опытов с митохондриями сердца крыс, находившихся в условиях гипоксии с гиперкапнией, приведены в табл. 4. После такого воздействия митохондрии подопытных животных практически не отличались от таковых контрольных по скорости потребления кислорода в состояниях 3 и 4. Отношение АДФ/О было снижено на 12%. Бикарбонат сильно угнетал скорость потребления кислорода митохондриями контрольных и подопытных животных в состоянии 3 и увеличивал АДФ/О. Стимулирующее действие бикарбоната на АТФ-азную активность митохондрий сердца подопытных животных было на 21% меньше, чем в контроле.

Рассматривая результаты опытов по влиянию бикарбоната на функциональное состояние митохондрий печени и сердца, можно заметить, что ионы  $\text{HCO}_3^-$  во всех случаях значительно снижают скорость потребления кислорода

Таблица 4

Некоторые показатели функционального состояния митохондрий сердца крыс

Воздействие (гипоксия с гиперкапнией)	20 мМ $\text{NaHCO}_3$	Число опытов	Скорость потребления кислорода, нмоль $\text{O}_2$ в 1 мин на 1 мг белка		Дыхательный контроль	АДФ/О
			состояние 4	состояние 3		
—	—	7	26,6±2,1	86,7±2,4	3,27±0,19	3,66±0,06
—	+	6	26,4±1,5	46,9±2,2	1,79±0,13	3,86±0,08
+	—	6	27,8±2,3	92,7±3,1	3,38±0,23	3,23±0,03
+	+	6	28,9±1,3	59,8±2,5	2,03±0,17	3,43±0,15

в состоянии 3 как в норме, так и после различных воздействий. Другой особенностью бикарбоната является его сопрягающее действие на процесс окислительного фосфорилирования, выражающееся в повышении АДФ/О. Наиболее выражено это влияние бикарбоната на митохондриях, выделенных из тканей животных, находившихся в экстремальных условиях. Эти данные помогают понять механизм следующего известного явления. Установлено, что небольшая добавка  $\text{CO}_2$  в газовую смесь, вдыхаемую животным, находящимся в экстремальных условиях, например при гипоксии, существенно способствует улучшению его состояния [13]. При этом отмечается уменьшение потребления кислорода. Наблюдаемые в наших опытах изменения функционального состояния митохондрий печени и сердца в присутствии бикарбоната отражают повышение эффективности утилизации кислорода в тканях и дают удовлетворительное объяснение описанному выше явлению.

Результаты настоящей работы подтверждают предположение [5] о наличии взаимосвязи между степенью активации бикарбонатом АТФ-азы митохондрий и отношением АДФ/О. Так, из табл. 3 видно, что после голодания животных или пребывания их в условиях гипоксии с гиперкапнией эффективность фосфорилирования митохондрий с  $\alpha$ -кетоглутаратом уменьшалась на 36 и 45%, а степень стимуляции бикарбонатом АТФ-азной активности снижалась на 34 и 50% соответственно. При использовании в качестве субстрата сукцината тоже имеется удовлетворительное соответствие между отношением АДФ/О и чувствительностью АТФ-азы митохондрий к бикарбонату. Следовательно, степень чувствительности АТФ-азы митохондрий к ионам  $\text{HCO}_3^-$  может служить показателем эффективности процесса окислительного фосфорилирования в тканях животных, находившихся в экстремальных условиях.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Скулачев В. П. Аккумуляция энергии в клетке. М., 1969.
2. Ильин В. С. — В кн.: Фосфорилирование и функция. Л., 1960, с. 181.
3. Lopes-Moratalla N., Franch V., Paniagua R. et al. — FEBS Letters, 1977, v. 79, p. 113—116.
4. Скулачев В. П., Козлов И. А. Протонные аденозинтрифосфатазы. М., 1977.
5. Иващенко А. Т., Балмуханов С. Б., Бушинева И. А. — Радиобиология, 1979, № 2, с. 103—106.

6. Романова И. Н., Лебедева М. В., Филипова И. А. — Биохимия, 1978, № 12, с. 2249—2259.
7. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. et al. — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265—269.
8. Deniges G. — C. R. Soc. Biol. (Paris), 1921, v. 84, p. 875—879.
9. Терентьев П. В., Ростова Н. С. Практикум по биометрии. Л., 1977.
10. Ziegler J. — Biochim. biophys. Acta, 1974, v. 364, p. 28—37.
11. Fridovich I. — J. biol. Chem., 1963, v. 238, p. 592—598.
12. Кондрашова М. И. — В кн.: Митохондрии. Структура и функции в норме и патологии. М., 1971, с. 24—40.
13. Маршак М. Е. Физиологическое значение углекислоты. М., 1969.

Поступила 24/VI 1980 г.

## EFFECT OF ANIONS ON THE OXIDATIVE PHOSPHORYLATION AND ATPASE ACTIVITY IN MITOCHONDRIA

A. T. Ivaschenko, S. V. Kozhanova

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

Bicarbonate, sulfate and thiocyanate affected distinctly the ADP/O ratio and the rate of oxygen consumption in liver mitochondria. Alterations in the ADP/O coefficient and the ATPase activity were studied in liver and heart mitochondria of control and fasted rats as well as of animals maintained under hypoxo-hypercapnic conditions. Satisfactory correlation was shown between a decrease both in the ADP/O ratio and in sensitivity of ATPase to bicarbonate in liver mitochondria of the animals subjected to these treatments.

УДК 616.98:579.852.13+616.98:579.871.11-092.9-07:616.316.1-008.94:577.175.823/824

В. В. Михайлов, Н. А. Чикина, З. Г. Позднякова

## СОДЕРЖАНИЕ ГИСТАМИНА И СЕРОТОНИНА В ПОДЧЕЛЮСТНОЙ СЛЮННОЙ ЖЕЛЕЗЕ ПРИ БОТУЛИЗМЕ И ТОКСИЧЕСКОЙ ДИФТЕРИИ У КРЫС

Кафедра патологической физиологии Московского медицинского стоматологического института

Гипосаливация при ботулизме и усиление выделения слюны при дифтерии заметно отягощают течение заболевания. В первом случае предпринимаются попытки корригировать дефицит слюноотделения орошением слизистой полости рта питательными жидкостями, во втором — облегчить истечение слюны из ротовой полости.

Поскольку нейротоксины ботулизма и дифтерии обладают ярко выраженным тропизмом к холинергическим (яд ботулизма) и адренергическим (дифтерийный токсин) нейронам, то нарушения слюноотделения можно рассматривать как результат повреждения вегетативных нервов слюнных желез. Так как секреторная деятельность слюнных желез зависит от содержания в них биогенных аминов [1], то представляло интерес уточнить, насколько изменяется содержание гистамина и серотонина в ткани железы у животных, пораженных токсинами ботулизма и дифтерии.

### М е т о д и к а

Опыты поставлены на 141 беспородной белой крысе обоего пола массой 110—120 г. Часть животных была затравлена токсином ботулизма. При этом для воспроизведения генерализованной формы заболевания использовали ботулинический токсин типа А (1 D<sub>100</sub> для белой мыши — 0,0005 мг), который вводили в количестве 0,2 мг на 100 г массы в область подчелюстной слюнной железы в одну из сторон. Общая форма ботулизма обычно развивалась спустя 8 ч после затравки. Клинические признаки ботулинической интоксикации проявлялись в парезах и атонии скелетной мускулатуры, выраженной одышке, тахикардии.

Другая группа крыс была затравлена дифтерийным токсином (1 D<sub>100</sub> для морской свинки — 0,003 мл жидкого токсина) в дозе 0,2—0,3 мл на 100 г массы. Дифтерийная интоксикация развивалась спустя 16—18 ч после введения токсина; появлялись рвота, диарея, адинамия, брадикардия.

Для синхронизации активности секреторных клеток слюнных желез эксперименты проводили на животных, которые предварительно голодали в течение суток. Крыс наркотизировали нембуталом (40 мг/кг внутривенно), отпрепаровывали подчелюстные слюнные железы и определяли содержание в них гистамина и серотонина флюориметрическим методом [2] на спектрофлюориметре с двумя монохроматорами. В случае введения пилокарпина острые опыты при общей форме ботулизма ставили спустя 30 мин, а при местной — через 24 ч после инъекций, т. е. на фоне полного исчезновения фармакологического действия препарата. Цифровые данные обрабатывали методом вариационной статистики.

## Результаты

Как видно из таблицы, при общей форме ботулизма содержание гистамина заметно увеличилось в подчелюстных слюнных железах как на стороне введения яда, так и на противоположной. Количество серотонина изменялось значительно меньше. Эти нарушения могли быть связаны с развитием недостаточности внешнего дыхания, при которой содержание биогенных аминов в тканях претерпевает существенные изменения [3]. Поэтому мы провели аналогичные исследования при местной форме ботулизма, характеризующейся отсутствием каких-либо нарушений внешнего дыхания.

Из таблицы видно, что при местном ботулизме уже на 7—8-е сутки после введения яда содержание гистамина в отравленной слюнной железе возрастает и приближается к тому, что мы наблюдали при общей форме заболевания, в то время как содержание серотонина в эти сроки снижалось. Аналогичные изменения в содержании биогенных аминов отмечались и на интактной стороне. Эти данные свидетельствуют о том, что изменения обмена биогенных аминов в зоне инокуляции токсина ботулизма могут происходить вне связи с нарушением внешнего дыхания. Двусторонний характер изменений содержания биогенных аминов показал, что яд, возможно, распространялся из одной группы желез в другие.

Основываясь на том, что яд ботулизма вызывает прекращение секреции слюны благодаря нарушению функции парасимпатического иннервационного прибора слюнных желез [4, 5], мы сделали попытку установить, способны ли отравленные слюнные железы отвечать возникновением слюноотделения на введение пилокарпина и как при этом изменяется содержание биогенных аминов в железистых тканях. Введение пилокарпина крысам с общей и местной формами ботулизма вызывает секрецию слюны и нормализацию уровня гистамина в тканях слюнной железы. Влияние пилокарпина на концентрацию серотонина было неярко выражено, потому что содержание этого медиатора в подчелюстной слюнной железе не претерпевало значительных изменений (см. таблицу). Последнее можно рассматривать как результат либо усиленного выделения гистамина из ткани железы с секретом, либо возбуждения холинорецепторов, расположенных на поверхности мембран клеток этого органа. Для решения этого вопроса мы воспользовались тем фактом, что при местной форме ботулизма возникает денервация слюнных желез, характеризующаяся появлением паралитической секреции и сенсибилизацией ткани железы к действию медиаторов. Опыты были поставлены спустя 10—15 дней после введения токсина, т. е. в те сроки, когда в случае децентрализации слюнных желез перерезкой преганглионарных парасимпатических волокон отмечались максимально выраженные дистрофические изменения [3]. Из таблицы видно, что в эти сроки инъекция пилокарпина нормализует уровень гистамина в железистой ткани даже спустя много часов после осуществления секреторного эффекта, в то время как уровень серотонина при стимуляции пилокарпином остается несколько повышенным.

Эти данные подтверждают тот факт, что нормализация содержания биогенных аминов в ткани слюнной железы является, по-видимому, следствием возбуждения холинорецепторных приборов, сохраняющих свою функцию в течение длительного времени на фоне повреждения парасимпатического прибора ядами ботулизма. Таким образом, при ботулизме увеличение содержания гистамина в подчелюстной слюнной железе носит неярко выраженный обратимый характер.

Поскольку при ботулизме избирательно повреждается парасимпатический отдел вегетативной нервной системы и сохраняется деятельность симпатического отдела, то описанный выше восстановительный эффект пилокарпина мог осуществляться при участии симпатикуса, на который препарат оказывает возбуждающее действие [6—8]. Для проверки такой возможности следующая серия экспериментов была проведена на крысах, отравленных токсином дифтерии, т. е. в условиях избирательного повреждения лишь адренергических отделов нервной системы. Результаты показали, что повреждение симпатической нервной системы при экспериментальной токсической дифтерии существенно не отражалось на содержании гистамина и серотонина в тканях подчелюстной слюнной железы. Последнее свидетельствует, что в условиях сохранения влияния парасимпатической нервной системы при дифтерии и выключения симпатической нервной системы содержание биогенных аминов в тканях слюнной железы не изменяется.

Подытоживая полученные данные в целом, можно прийти к заключению, что гипосаливация при ботулизме связана не только с нарушением функции парасимпатического иннервационного прибора, но, вероятно, и с изменением в ткани слюнных желез обмена гистамина и в меньшей степени серотонина. В то же время при гиперсаливации, возникающей при дифтерии, обмен указанных биогенных аминов не претерпевает значительных изменений.

Однако при сравнении данных о содержании гистамина и серотонина при ботулизме в слюнных железах крыс с результатами опытов других авторов [5], определявших количество биогенных аминов в мышцах, слизистой кишечника и спинном мозге, возникают трудности: во-первых, потому что эти данные получены в опытах на кошках, у которых благодаря высокой резистентности к яду клиническая картина интоксикации развивается замедленно, в течение нескольких дней; во-вторых, из-за неоднородности результатов при введении близких доз токсина этому виду животных. Об этом свидетельствует тот факт, что отдельные авторы [9] обнаружили снижение концентрации гистамина и возрастание содержания серотонина уже через 30 мин после введения яда, т. е. задолго до развития паралича. Другие авторы [10] на стадии появления общего паралитического синдрома констатировали снижение содержания гистамина в одних органах (диафрагма) и повышение его в других (межреберные мышцы, спинной мозг), а также возрастание содержания серотонина во всех исследуемых тканях. Третьи [11] показали, что в начале развития ботулинической интоксикации в диафрагме, легких, продолговатом мозге концентрация гистамина не из-

Содержание биогенных аминов (в мкг на 100 г массы влажной ткани) у крыс в подчелюстной слюнной железе при ботулизме и токсической дифтерии

Биогенные амины	Контроль	Стимуляция пилокарпином	Общая форма ботулизма	Местная форма ботулизма		Общая форма ботулизма + пилокарпин	Местная форма ботулизма + пилокарпин	Дифтерия
				в зоне инокуляции яда	вне зоны инокуляции			
Гистамин	0,13 ± 0,09 (n = 9)	0,25 ± 0,02* (n = 13)	0,34 ± 0,05** (n = 9)	0,28 ± 0,02** (n = 9)	0,30 ± 0,02** (n = 9)	0,15 ± 0,02 (n = 10)	0,14 ± 0,02 (n = 5)	0,17 ± 0,02 (n = 7)
Серотонин	0,23 ± 0,02 (n = 20)	0,30 ± 0,03 (n = 10)	0,30 ± 0,03 (n = 12)	0,14 ± 0,02*** (n = 7)	0,15 ± 0,05*** (n = 7)	—	0,33 ± 0,01** (n = 7)	0,22 ± 0,02 (n = 7)

Примечание. n—число опытов; P по сравнению с контролем: одна звездочка P < 0,001, две—P < 0,01, три—P < 0,05.

менялась, а содержание серотонина увеличивалось. В то же время при развитии общего паралитического синдрома отмечалось снижение содержания гистамина и дальнейшее увеличение концентрации серотонина. Все это показывает, что вопросы о функциональном значении изменения обмена биогенных аминов в тканях при ботулизме требуют дополнительных исследований.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Barton S., Sandeer E. J., Schachter M. et al. — J. Physiol. (Lond.), 1975, v. 251, p. 363.
2. Меньшиков В. В. Методы клинической биохимии гормонов и медиаторов. М., 1974, ч. 2, с. 116.
3. Михайлова С. Д. Патофизиологические механизмы расстройств дыхания при экспериментальном ботулизме. Дис. докт. Саратов, 1972.
4. Адо А. Д., Михайлов В. В. — Успехи совр. биол., 1960, № 3, с. 373—387.
5. Чеснокова Н. П. — Пат. физиол., 1978, № 5, с. 60—65.
6. Emmelin N., Engström J. — J. Physiol. (Lond), 1960, v. 153, p. 9—16.
7. Patterson J. — Ibid., 1977, v. 272, p. 57P—59P.
8. Schneyer C. A., Hall H. D. — Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1966, v. 121, p. 96—100.
9. Чеснокова Н. П., Архангельский А. В. — Бюлл. exper. биол., 1979, № 7, с. 26—28.
10. Моррисон В. В. — Вопр. мед. химии, 1978, № 2, с. 224—226.
11. Михайлова С. Д., Ачкасова Т. М. — Пат. физиол., 1980, № 1, с. 57—60.

Поступила 25/VІ 1980 г.

#### CONTENT OF SEROTONIN AND HISTAMINE IN RAT SUBMANDIBULAR GLAND UNDER CONDITIONS OF BOTULISM AND TOXIC DIPHTHERIA

V. V. Mikhailov, N. A. Chikina, Z. G. Pozdnyakova

Chair of Pathophysiology, Stomatological Medical School, Moscow

Content of histamine and serotonin was estimated spectrofluorimetrically in rat submandibular salivary glands under conditions of experimental botulinic and diphtheric intoxication. Decrease in secretion of saliva in botulism was due not only to parasympathetic denervation of the salivary glands but also to alterations in serotonin and, especially, histamine metabolism in the gland tissue. Content of these biogenic amines was almost unaltered after increase in secretion of saliva caused by blocking of the sympathetic nervous impulsion by diphtheria toxin.

УДК 616.13-004.6-092.9-06:616.12-008.331.1-07[616.153.915+616.13-008.939.15]-074

П. П. Чайло, И. М. Кожура, Л. П. Черкасский, В. И. Полинская

#### ЛИПИДЫ КРОВИ И СОСУДИСТОЙ СТЕНКИ ПРИ ВОСПРОИЗВЕДЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АТЕРОСКЛЕРОЗА У КРОЛИКОВ РАЗНОГО ВОЗРАСТА С ПОЧЕЧНОЙ ФОРМОЙ ГИПЕРТОНИИ

Лаборатория патофизиологии Института геронтологии АМН СССР, Киев

Атеросклероз и гипертоническая болезнь являются в настоящее время основными причинами стойкой нетрудоспособности и смерти людей старших возрастных групп [1, 2]. При этом гиперлипотеидемия и повышенное кровяное давление — ведущие симптомы указанных заболеваний — рассматриваются как главные факторы риска в отношении развития коронарной и цереброваскулярной недостаточности. Особенно опасным признается сочетание указанных двух факторов [3].

Эпидемиологические, клинические и экспериментальные данные свидетельствуют о том, что гипертензивные состояния ведут к прогрессированию атеросклеротических поражений сосудов [4—6]. Ряд исследователей связывают такой факт с изменениями в гемодинамике [7, 8], с нарушением проницаемости сосудистой стенки для липопротеидов, в составе которых находятся в крови липиды [9, 10]. Показано также, что нередко повышенное кровяное давление сопровождается значительными атерогенными расстройствами метаболизма в условиях клиники и при экспериментальном моделировании гипертонии [11, 12]. Однако в проблеме взаимоотношения атеросклероза и артериальной гипертонии многие важные вопросы остаются не-

решенными. Мало, в частности, исследовано значение возрастного фактора во влиянии повышенного кровяного давления на состояние липидного и липопротеидного обмена, на развитие и проявления атеросклероза. Между тем в исследованиях, проведенных в лаборатории ранее [13, 14], были отмечены некоторые характерные возрастные черты патогенеза как экспериментального атеросклероза, так и экспериментальной гипертензии (почечная форма). Можно ожидать, что и во влиянии гипертензии на развитие атеросклероза могут быть выявлены особенности, связанные с возрастом.

С учетом вышесказанного было предпринято исследование характера гиперлипидемии и содержания основных классов липидов в сосудистой стенке кроликов разного возраста при воспроизведении экспериментального атеросклероза на фоне нормального или повышенного кровяного давления. При этих условиях определяли также общую липолитическую активность постгепариновой плазмы крови, обусловленную почти полностью у кроликов липопротеидлипазой [15] — ферментом, играющим ключевую роль в обмене липопротеидов [16].

### М е т о д и к а

Опыты проведены на 35 молодых (6—10 мес) и 37 старых (4—4½ года) кроликах-самках. Экспериментальный атеросклероз получали при 60-дневном пероральном введении взвеси холестерина в подсолнечном масле из расчета 0,1 г на 1 кг массы. Экспериментальную гипертензию (почечная форма) вызывали по методике Н. Н. Горева [17] путем наложения на почечные артерии разрезных серебряных колец, суживающих просвет сосуда на 1/4—1/3 его первоначального диаметра. Операции на сосудах правой и левой почек проводили с интервалом 2—3 нед. При сочетании экспериментального атеросклероза с гипертензией введение холестерина начинали через 1 мес после 2-й операции. Артериальное давление измеряли посредством пункции бедренной артерии и регистрировали с помощью электроманометра ЭМ-2-01 (Венгрия) на аппарате 6 НК-1 (ГДР) или на аппарате «Мингограф-34» (Швеция) в динамике: до операции, спустя 1 мес, 2½ и 4 мес после операции. В эти же сроки (при воспроизведении экспериментального атеросклероза через 30 и 60 дней введения холестерина) определяли в сыворотке крови содержание общего холестерина, холестерина липопротеидов высокой плотности (ХС-ЛВП), триглицеридов, суммарной фракции липопротеидов низкой и очень низкой плотности [18]. Вычисляли величину отношения холестерина липопротеидов высокой плотности к общему холестерину и общего холестерина к триглицеридам. Общую липолитическую активность крови оценивали по приросту количества неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК), измеряемых методом [19], в инкубационной среде за 1 ч инкубации при 37 °С. Определение липолитической активности проводили до и через 20 мин после введения гепарина в дозе 500 ЕД на 1 кг массы животного в соответствии с рекомендациями [20] с некоторыми модификациями. Вместо трис-буфера при приготовлении инкубационной смеси использовали Krebs-Рингер-фосфатный буфер (рН 7,4), на котором готовили 2% эмульсию подсолнечного масла, в качестве субстрата [21]. После окончания опытов и забивки животных в аорте определяли количество общего холестерина, триглицеридов и фосфолипидов [22]. Полученные цифровые данные обработаны статистически с использованием критерия Стьюдента.

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

После операций стенозирования почечных артерий кровяное давление закономерно повышалось (табл. 1). Систолическое, диастолическое, среднее, а также пульсовое давление было значительно выше исходного во все исследованные сроки. При этом введение холестерина животным на фоне гипертензии не приводило к дальнейшему повышению артериального давления. Диастолическое и среднее давление у молодых животных, которым холестерин вводили в течение 60 дней, даже несколько снизилось. У старых животных давление было более устойчивым. Введение холестерина нормальным животным разного возраста мало отражается на уровне артериального давления [13].

Воспроизведение почечной формы экспериментальной гипертензии оказывает заметное влияние на уровень липидов крови (табл. 2). Спустя 1 мес после операции наблюдается увеличение содержания липопротеидов, общего холестерина и триглицеридов как у молодых, так и у старых кроликов. Но если у 6—10-месячных животных увеличение оказалось статистически значимым, то у 4—4,5-годичных кроликов относительно большие индивиду-

Таблица 1

Уровень артериального давления (в мм рт. ст.) у молодых и старых кроликов при гипертонии и атеросклерозе

Показатель	Возраст животных	Группа животных и срок исследования							
		контроль (I)		1 мес гипертонии (II)		1 мес гипертонии+30 дней введения холестерина (III)		1 мес гипертонии+60 дней введения холестерина (IV)	
		n	M±m	n	M±m	n	M±m	n	M±m
Систолическое давление	6—10 мес	29	116±3,1	18	173±5,46	11	175±8,16	12	172±9,26
	4—4,5 года	27	124±2,6	21	169±5,86	11	165±9,56	11	166±9,36
Диастолическое давление	6—10 мес	29	91±1,7	18	133±4,0 <sup>а, б</sup>	10	123±4,96	12	118±6,06 <sup>в</sup>
	4—4,5 года	27	88±1,9	21	110±3,26	11	110±4,96	11	108±4,06
Среднее давление	6—10 мес	31	101±1,7	19	148±3,5 <sup>а, б</sup>	14	140±4,66	13	135±6,76
	4—4,5 года	29	102±1,7	22	131±3,56	11	129±5,66	11	127±4,96

Примечание. Статистически значимые ( $P < 0,05$ ) различия: а—между молодыми и старыми животными; б—по сравнению с величинами до операции; в—между группами II—III и II—IV.

Таблица 2

Показатели обмена липидов у молодых и старых кроликов при почечной гипертонии, экспериментальном атеросклерозе и их сочетании ( $M \pm m$ )

Показатель	Возраст животных	Группы животных и сроки исследования					
		контроль (I)	1 мес гипертонии (II)	1 мес гипертонии+30 дней введения холестерина (III)	30 дней введения холестерина (IV)	1 мес гипертонии+60 дней введения холестерина (V)	60 дней введения холестерина (VI)
Липопротеиды низкой и очень низкой плотности (г/л)	6—10 мес	2,42±0,17	3,38±0,36 <sup>б</sup>	12,54±1,886 <sup>в</sup>	9,93±1,006 <sup>в</sup>	15,94±2,886 <sup>в</sup>	14,35±1,856
	4—4,5 года	2,56±0,18	2,79±0,20	16,74±1,436 <sup>в</sup>	15,22±1,83 <sup>а, б, в</sup>	23,20±1,53 <sup>а, б, в</sup>	22,02±2,14 <sup>а, б, в</sup>
Общий холестерин (г/л)	6—10 мес	0,84±0,06	1,31±0,13 <sup>б</sup>	4,31±0,596 <sup>в</sup>	3,10±0,656	6,12±0,956 <sup>в</sup>	5,31±0,696 <sup>д</sup>
	4—4,5 года	0,86±0,05	0,99±0,08	6,12±0,42 <sup>а, б, в</sup>	6,44±0,58 <sup>а, б, в</sup>	8,99±0,71 <sup>а, б, в</sup>	9,06±0,82 <sup>а, б, д</sup>
Холестерин липопротеидов высокой плотности (г/л)	6—10 мес	0,28±0,03	0,33±0,03	0,42±0,03	0,45±0,04 <sup>б</sup>	0,75±0,09 <sup>а, б, в</sup>	0,82±0,12 <sup>а, б, д</sup>
	4—4,5 года	0,26±0,03	0,25±0,03	0,36±0,06	0,35±0,04	0,42±0,04 <sup>б, в</sup>	0,44±0,05 <sup>б</sup>
Холестерин липопротеидов высокой плотности/общий холестерин (в %)	6—10 мес	33,3±1,52	25,2±1,42 <sup>б</sup>	9,68±1,906 <sup>в</sup>	14,65±4,24 <sup>б</sup>	12,28±2,836 <sup>в</sup>	15,35±2,18 <sup>а, б</sup>
	4—4,5 года	30,2±1,24	25,3±1,01 <sup>б</sup>	5,88±0,506 <sup>в</sup>	5,49±0,82 <sup>б, в</sup>	4,67±0,596 <sup>в</sup>	4,86±0,596
Триглицериды (г/л)	6—10 мес	0,47±0,04	0,69±0,06 <sup>б</sup>	0,97±0,14 <sup>б</sup>	0,97±0,15 <sup>б</sup>	1,00±0,19 <sup>б</sup>	1,07±0,20 <sup>б</sup>
	4—4,5 года	0,47±0,06	0,64±0,07	1,19±0,26 <sup>б</sup>	0,75±0,14	0,96±0,25	1,05±0,26

№	Общий холестерин / триглицериды Общая липолигандная актив- ность (мкэв НЭЖК/мл/час) До введения гепарина После введения гепарина	6—10 мес		4—4,5 года		1,89±0,14 1,55±0,09		4,44±0,32 <sup>б</sup> , в 5,14±0,41 <sup>б</sup> , в		3,19±0,27 <sup>б</sup> , в 8,59±0,79 <sup>а, б, в, г</sup>		6,12±0,46 <sup>б</sup> , в 9,36±0,87 <sup>а, б, в, г</sup>		4,96±0,32 <sup>б</sup> , д 8,63±0,77 <sup>а, б</sup>	
		6—10 мес	4—4,5 года	6—10 мес	4—4,5 года	6—10 мес	4—4,5 года	6—10 мес	4—4,5 года	6—10 мес	4—4,5 года	6—10 мес	4—4,5 года	6—10 мес	4—4,5 года
		1,79±0,11	1,83±0,13	0,38±0,07	3,76±0,19 <sup>б</sup>	—	—	—	—	—	—	0,33±0,08 <sup>б</sup>	4,15±0,20 <sup>б</sup>	0,69±0,10 <sup>а</sup>	4,79±0,42
		0,64±0,10	5,13±0,31	3,76±0,19 <sup>б</sup>	4,20±0,19 <sup>б</sup>	—	—	—	—	—	—	3,56±0,38 <sup>б</sup>	3,81±0,17 <sup>б</sup>	—	—

Примечание. Статистически значимые ( $P < 0,05$ ) различия: а—между молодыми и старыми животными; б—по сравнению с нормальными животными; в—между группами II—III, II—IV, II—V; г—между группами III—IV, III—V; д—между группами IV—VI. Каждая группа включала не менее 9 животных.

альные колебания не позволили выявить различий в среднем по группам. Однако и в данном случае у половины животных старшего возраста уровни липидов были повышены. Электрофоретическое изучение спектра липопротеидов крови кроликов с гипертонией показало, что у них несколько увеличиваются фракции липопротеидов низкой и особенно очень низкой плотности при уменьшении зоны липопротеидов высокой плотности. Изменения в липолитической системе крови тесно коррелировали с нарушениями в обмене липидов и липопротеидов в условиях экспериментальной гипертонии. Отмечалось снижение общей липолитической активности постгепариновой плазмы крови (статистически достоверное у молодых кроликов).

При объяснении выявленных особенностей в липидном обмене у кроликов с почечной формой гипертонии следует учитывать данные, свидетельствующие о существенных изменениях функционального состояния различных отделов нервной системы и нейрогуморальной регуляции в условиях повышенного кровяного давления в эксперименте, которые, по-видимому, отражаются и на обмене веществ [17]. Могут иметь значение изменения в ренин-ангиотензинной системе. Ангиотензин, усиливая продукцию кортикостероидов [23] и стимулируя секрецию катехоламинов [24], способствует активации биосинтеза липидов и липопротеидов в печени [25]. Одновременно снижается катаболизм липопротеидов низкой и очень низкой плотности, на что указывает отмеченное нами угнетение общей липолитической активности постгепариновой плазмы крови.

Введение холестерина кроликам разного возраста с нормальным или повышенным кровяным давлением вызывало развитие стойкой гиперлипидемии и гиперлипидемии. Увеличение общего холестерина и суммарной фракции липопротеидов низкой и очень низкой плотности в крови было более выраженным у старых животных в обеих опытных группах. Статистически значимое нарастание количества триглицеридов при введении животным холестерина наблюдалось, как правило, у молодых животных. У них же меньше увеличивалась величина отношения холестерина/триглицериды, дающая представление о соотношении в крови липопротеидов низкой плотности, богатых холестерином, и очень низкой плотности, богатых триглицеридами, что свидетельствовало о накоплении в крови старых животных более атерогенных липопротеидных частиц.

Моделирование экспериментальных гипертонии и атеросклероза сопровождалось существенными изменениями в распределении холестерина между фракциями липопротеидов. В норме у молодых и старых кроликов липопротеиды высокой плотности содержали около 30% общего сыровоточного холестерина. Воспроизведение почечной гипертонии приводило к статистически достоверному снижению содержания холестерина липопротеи-

дов высокой плотности как у 6—10-месячных, так и у 4—4,5-годовалых кроликов. Присоединение к экспериментальной гипертонии введения холестерина или одно воспроизведение атеросклероза еще больше уменьшало величину отношения холестерина липопротеидов высокой плотности к общему количеству холестерина в крови. Такие изменения были особенно наглядными у старых животных, у которых доля холестерина сыворотки в липопротеидах высокой плотности составляла около 5% по сравнению с 15% у молодых животных, что согласуется с ранее полученными в нашей лаборатории данными на кроликах разного возраста с экспериментальным атеросклерозом [26].

Изучение общей липолитической активности постгепариновой плазмы крови при экспериментальном атеросклерозе, вызванном на фоне нормаль-

Таблица 3

Липиды в аорте молодых и старых кроликов при почечной гипертонии, экспериментальном атеросклерозе и их сочетании ( $M \pm m$ )

Показатели тканей, мг/г	Возраст животных	Группа животных и характер воздействия			
		контроль (I)	гипертония (II)	введение холестерина (III)	гипертония+введение холестерина (IV)
Общий холестерин	6—10 мес	2,09±0,11	2,46±0,34	4,92±0,99 <sup>б</sup>	5,53±0,88 <sup>б</sup>
	4—4,5 года	2,16±0,13	2,71±0,26	6,23±1,68 <sup>б</sup>	11,65±1,86 <sup>а, б, в, г</sup>
Триглицериды	6—10 мес	4,41±0,26	5,16±0,28	7,44±0,49 <sup>б</sup>	8,07±0,67 <sup>б</sup>
	4—4,5 года	4,07±0,26	5,64±0,47 <sup>б</sup>	8,13±0,44 <sup>б</sup>	9,25±0,90 <sup>б</sup>
Фосфолипиды	6—10 мес	7,18±0,37	7,95±0,24	20,39±1,08 <sup>б</sup>	21,79±1,79 <sup>б</sup>
	4—4,5 года	8,35±0,56	8,95±0,51	25,91±2,71 <sup>б</sup>	27,98±2,83 <sup>б</sup>

Примечание. Статистически значимые ( $P < 0,05$ ) различия: а—между молодыми и старыми животными; б—по сравнению с нормальными животными; в—между группами II—III и II—IV; г—между группами III и IV. Каждая группа включала не менее 8 животных.

ного или повышенного артериального давления, показало ее угнетение, несколько более выраженное у старых кроликов при сопоставлении с молодыми животными, находившимися в аналогичных условиях эксперимента. Следует подчеркнуть, что не только введение холестерина, но и одно воспроизведение гипертонии у кроликов ведет к снижению общей липолитической активности крови. Можно было ожидать значительные нарушения липолитических процессов у животных при сочетании этих двух воздействий. Однако данное предположение не подтвердилось, что связано, вероятно, с тем, что подавление общей липолитической активности, наступающее под влиянием экзогенного холестерина, значительно перекрывает изменения в системе липолитических ферментов крови эндогенной природы, свойственные почечной гипертонии, так же как это происходит с другими показателями липидного и липопротеидного обмена.

Обобщая данные изучения состояния липидного и липопротеидного обмена в крови молодых и старых кроликов при экспериментальном атеросклерозе и при сочетании почечной формы экспериментальной гипертонии с введением холестерина, следует отметить, что степень нарушений, характер гиперлипидемии и возрастные закономерности их проявлений были близкими при этих формах патологических состояний. Изменения в метаболизме липидов при одной гипертонии были во многом сходными с теми, которые развиваются при введении холестерина, хотя и значительно менее выраженными.

Гиперлипидемия вызывала отложение липидов в сосудистой стенке кроликов разного возраста в неодинаковой степени в зависимости от условий эксперимента (табл. 3). Само по себе воспроизведение почечной формы экспериментальной гипертонии приводило к накоплению общего холестерина и особенно триглицеридов в аорте, более заметному у старых животных. Это обстоятельство свидетельствует о том, что для большего накопления выше-

указанных классов липидов в стенке аорты у старых животных в условиях гипертензии существенное значение приобретают, вероятно, изменения в аортальной ткани, связанные с хроническим действием повышенного артериального давления, повышением сосудистой проницаемости [27] и другими факторами, присущими гипертензии. Тем более что прирост уровня холестерина и триглицеридов у них в сосудистой ткани наблюдался на фоне менее выраженной гиперлипотеидемии по сравнению с молодыми животными. Что касается содержания фосфолипидов, то оно умеренно увеличивалось в равной степени у кроликов обеих возрастных групп.

При воспроизведении экспериментального атеросклероза нарастали в аорте все липидные показатели у 6—10-месячных и у 4—4,5-годичных кроликов. Наибольшие изменения в уровне холестерина в сосудистой стенке отмечены у старых кроликов при сочетании почечной формы экспериментальной гипертензии с введением холестерина. У них также оказались большими собственно атеросклеротические поражения аорты [27]. Изменения в количестве фосфолипидов и триглицеридов, характеризуясь их постоянным нарастанием в ряду воздействий (введение холестерина, гипертензия + введение холестерина), не имели четких возрастных особенностей. Некоторое отставание прироста содержания фосфолипидов от соответствующих изменений общего холестерина в группе старых кроликов с гипертензией при введении холестерина (по сравнению с аналогичной группой молодых животных), возможно, связано с недостаточным их биосинтезом, так как именно такой путь образования фосфолипидов является основным в атеросклеротически измененной сосудистой стенке [28]. Ранее нами было отмечено большее увеличение биосинтеза фосфолипидов в аорте молодых кроликов по сравнению со старыми животными, содержащимися на атерогенном рационе в течение 30 дней [29].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что условия почечной формы гипертензии характеризуются изменениями липидного обмена, а в сочетании с дополнительным введением холестерина способствуют значительному увеличению содержания холестерина в стенке аорты, в особенности у старых животных. Результаты исследования имеют значение для выяснения возрастных особенностей влияния гипертензии на развитие атеросклероза.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Чеботарев Д. Ф. Гериатрия в клинике внутренних болезней. Киев, 1977.
2. Шмидт Е. В., Лунев Д. К., Верецагин Н. В. Сосудистые заболевания головного и спинного мозга. М., 1976.
3. Атеросклероз. М., 1975.
4. Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний. Под ред. И. К. Шхвацабая и др. М., 1977.
5. Мясников А. Л. Гипертоническая болезнь и атеросклероз. М., 1965.
6. Анничков Н. Н. — Вести. АМН СССР, 1961, № 11, с. 29.
7. Texon M. — In: Atherosclerosis and Its Origin. New York, 1963, p. 167.
8. Stehbens W. E. — Progr. cardiovasc. Dis., 1975, v. 18, p. 89.
9. Мясников А. А., Касаткина Л. В., Николаева Е. П. — Кардиология, 1971, № 3, с. 31.
10. Bretherton K., Day A. J., Skinner S. L. — Atherosclerosis, 1977, v. 27, p. 79.
11. Богацкая Л. Н., Полюхов А. М., Путный П. А. — В кн.: Артериальная гипертензия, коронарная недостаточность в пожилом и старческом возрасте. Киев, 1969, с. 128.
12. Орбецова В., Кипров Д., Цухлев А. — Cor. et Vasa, 1976, № 3, с. 209.
13. Экспериментальный атеросклероз и возраст/ Горев Н. Н., Кожура И. М., Костюк Л. В. и др. М., 1972.
14. Горев Н. Н., Строганова Н. П. — В кн.: Артериальная гипертензия, коронарная недостаточность в пожилом и старческом возрасте. Киев, 1969, с. 25.
15. Солитернова И. Б., Никольцева Н. Г. — Вопр. мед. химии, 1979, № 2, с. 204.
16. Брокерхоф Х., Дженсен Р. Липолитические ферменты. М., 1978.
17. Горев Н. Н. Очерки изучения гипертензии. Киев, 1959.
18. Климов А. Н., Ганелина И. Е. Фенотипирование гиперлипотеидемий (Метод. рекомендации). М., 1975.
19. Dipcombe W. G. — Clin. chim. Acta, 1964, v. 8, p. 122.
20. Никитин В. П. и др. — Вопр. мед. химии, 1973, № 3, с. 275.
21. Лемперт Б. Л. и др. — Бюлл. экпер. биол., 1971, № 11, с. 27.

22. *Folch J., Lees M., Sloan-Stanley G.* — J. biol. Chem., 1957, v. 226, p. 497.
23. *Герасимова Е. Н.* — В кн.: Гормоны и ферменты в кардиологии. М., 1967, с. 5.
24. *White F., Ross G.* — Am. J. Physiol., 1966, v. 210, p. 1118.
25. *Wiss J., Wiss V.* — Helv. chim. Acta, 1976, v. 59, p. 2179.
26. *Кожура И. П.* — Укр. биохим. ж., 1978, № 5, с. 582.
27. *Горев Н. Н., Черкасский Л. П.* и др. — В кн.: Нервные и гуморальные механизмы возникновения основных заболеваний сердечно-сосудистой системы. Полтава, 1979, с. 40.
28. *Zilversmit D. B., McCandless E. L.* — J. Lipid Res., 1959, v. 1, p. 118.
29. *Чаяло П. П.* — Пат. физиол., 1978, № 6, с. 36.

Поступила 25/VI 1980 г.

## LIPIDS OF BLOOD AND BLOOD VESSEL WALL IN RABBITS OF VARIOUS AGE WITH RENAL FORM OF HYPERTENSION UNDER CONDITIONS OF EXPERIMENTAL ATHEROSCLEROSIS

*P. P. Chayalo, I. M. Kozhura, L. P. Cherkassky, V. I. Polinskaya*

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

Patterns of lipid and lipoprotein turnover were examined in blood and aorta of 6-10 months old and 4-4.5 years old rabbits with the renal form of experimental hypertension, experimental atherosclerosis and combination of both pathological states. In experimental hypertension contents of the total fraction of low and very low density lipoproteins, total cholesterol and triglycerides were increased but the total lipolytic activity of postheparin blood plasma as well as a fraction of  $\alpha$ -lipoprotein cholesterol in the total cholesterol were decreased both in young and old animals. Experimental atherosclerosis in rabbits of various age with normal and elevated blood pressure was accompanied by the highest level of hyperlipidemia in old animals without distinct differences between rabbits with various initial arterial blood pressure. Deposition of Lipids in aorta, which was observed in the animals with elevated arterial blood pressure after additional administration of cholesterol, was especially characteristic for old animals with experimental renal hypertension.

УДК 612.438.015.348.014.46:577.175.76

*И. А. Лавриненко, С. М. Шергин, В. П. Лозовой*

## ХАРАКТЕРИСТИКА СУБПОПУЛЯЦИИ ТИМОЦИТОВ КРЫС ПО ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ДЕЙСТВИЮ ТИМОЗИНА НА СИНТЕЗ БЕЛКА И РЕЦЕПЦИЮ ДЕКСАМЕТАЗОНА

Институт клинической и экспериментальной медицины Сибирского филиала АМН СССР, Новосибирск

В последние годы было установлено, что тимозин и другие полипептидные гормоны тимуса оказывают существенное влияние на дифференцировку Т-лимфоцитов [1, 2]. Так, тимозин вызывает исчезновение прежних (TL) и появление новых (RMТA) антигенных детерминант на мембране тимоцитов крыс при их созревании [3, 4]. Установлено, что тимозин опосредует свое действие на лимфоциты через систему адеплатциклазы [5]. Данные о влиянии глюкокортикоидов на синтез цАМФ в лимфоцитах противоречивы [6, 7]. Ряд эффектов тимозина, вероятно, определяется влиянием этого гормона на синтез белков, который увеличивается вслед за возрастанием уровня цАМФ [8]. Напротив, глюкокортикоиды подавляют синтез белков в лимфоцитах [9]. Тимические гормоны увеличивают устойчивость тимоцитов к литическому действию глюкокортикоидов, что может быть связано с понижением количества рецепторов для стероидов в этих клетках [10]. Известны функциональная гетерогенность тимоцитов, наличие нескольких популяций этих клеток [11]. Не исключено, что влияние тимозина и глюкокортикоидов на субпопуляции тимоцитов может быть противоположным. Поэтому мы изучили влияние тимозина, циклического 3',5'-аденозинмонофосфата и кофеина на синтез белка и рецепцию 1,2-(N)H<sup>3</sup>-дексаметазона в субпопуляциях тимоцитов крыс.

## М е т о д и к а

Были использованы крысы-самцы Вистар массой 120—130 г. Животных деканировали, тимусы протирали через сито и полученные клетки фильтровали через капрон. После 3-кратных промывок средой 199 клетки центрифугировали при 1000 g и 4 °С 10 мин, ресуспендировали в 10% растворе человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) и наслаивали от  $5 \cdot 10^7$  до  $3 \cdot 10^8$  тимоцитов на вершину градиента ЧСА (10—35%). Клетки центрифугировали 25 мин при 800 g и 4 °С. Выход клеток с градиента составлял 60—70%; в осадке клетки отсутствовали.

Содержание клеток в интерфазе А составляло 4—7% всех собранных с градиента клеток, в интерфазе В—9%, в интерфазе С—44% и в интерфазе D—40—50%. Клетки собирали из интерфаз, начиная с вершины градиента, и использовали в опытах.

Для изучения влияния тимозина на рецепцию глюкокортикоидов различными субпопуляциями тимоцитов клетки инкубировали 1 ч при 37 °С в присутствии IV фракции тимозина (100 мкг) и  $H^3$ -дексаметазона ( $10^{-8}$  М). Специфическое связывание дексаметазона оценивали как разность величин общего связывания стероида и неспецифического связывания в присутствии избытка дексаметазон 21-фосфата натрия ( $10^{-5}$  М).

В другой серии опытов исследовали действие тимозина в присутствии цАМФ ( $10^{-8}$  М) и кофеина ( $10^{-2}$  М) на синтез белка, оцениваемого по включению 4,5- $H^3$ -лейцина (100 мкКи) в различные субпопуляции тимоцитов крыс. Специфическое связывание 8- $H^3$ -аденозин-3',5'-цикломонофосфата определяли как разность величин общей рецепции и связывания  $H^3$ -цАМФ в присутствии  $10^{-8}$  М немеченого цАМФ.

После инкубации тимоцитов с 1,2- $H^3$  (N)-дексаметазоном или 4,5- $H^3$ -лейцином клетки собирали центрифугированием при 1000 g 10 мин, добавляли 10% ТХУ, осадок фильтровали на фильтрах с диаметром пор 0,23 мкм, трижды промывали 5% ТХУ; фильтры сушили при 37 °С в течение ночи и радиоактивность измеряли на счетчике «Intertechnik» с эффективностью 60%. Статистическую обработку материалов проводили по методу [13].

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

В табл. 1 представлены результаты опытов по изучению влияния тимозина на рецепцию 1,2- $H^3$ -дексаметазона различными фракциями тимоцитов, полученными на градиенте 10—35% сывороточного альбумина. Общая вели-

Т а б л и ц а 1

Влияние тимозина на рецепцию 1,2- $H^3$ -(N)-дексаметазона тимоцитами крыс

Интерфаза, %	Тотальная рецепция $H^3$ -дексаметазона	Рецепция $H^3$ -дексаметазона в присутствии немеченого дексаметазона	Рецепция $H^3$ -дексаметазона в присутствии тимозина	Специфическая рецепция $H^3$ -дексаметазона	Разность между общей рецепцией $H^3$ -дексаметазона и рецепцией дексаметазона в присутствии тимозина	Ингибирование рецепции $H^3$ -дексаметазона в присутствии тимозина, %
А (10—23)	23 785±154	22 848±151	17 123±30	936±30	6661±81	28±5 $P < 0,05$
В (23—26)	8 787±94	5 842±76	5 930±77	2945±54	2857±53	33±6 $P < 0,05$
С (26—29)	4 115±64	1 943±44	2 443±49	2172±46	1672±41	40±6 $P < 0,05$
Д (29—35)	3 073±55	2 796±53	2 863±53	276±16	210±14	7±3 $P > 0,10$

Примечание. Здесь и в табл. 2 приведены средние данные 4 опытов (8 животных) в имп/мин/ $10^6$  клеток.

чина связывания была максимальной во фракции А и минимальной во фракции D. Однако если сравнить между собой величины специфического связывания, очевидно, что связывание тимоцитами фракции А дексаметазона меньше, чем связывание этого стероида фракциями В и С, а по сравнению с общим связыванием оно составляет лишь 4%, в то время как специфическое связывание во фракции В составляет 67% общего связывания, во фракции

<sup>1</sup> Тимозин (VI фракция) получали из тимуса крупного рогатого скота по ранее описанному методу [1]. Молекулярная масса препарата 12 000 Д, содержание нуклеотидов 2—3%, цАМФ тимозин не содержал.

С — 50%, а в D — 9%. Таким образом, несмотря на значительную величину связывания  $H^3$ -дексаметазона фракцией тимоцитов А, это связывание в основном неспецифично.

Большая величина специфического связывания во фракциях В, С свидетельствует, возможно, о том, что эти фракции наиболее гормоночувствительны. Однако в работе других авторов было показано, что, вероятно, не существует прямой корреляции между рецепцией  $H^3$ -дексаметазона и устойчивостью к действию глюкокортикоидов [14]. Так, эти авторы установили, что, хотя фракция А является кортизолостойчивой, а С, D — кортизолочувствительными, не существует больших различий в специфическом связывании  $H^3$ -дексаметазона этими субпопуляциями тимоцитов мышей, полученными на градиенте бычьего сывороточного альбумина. Эти результаты показывают, что связывание во фракции D-минимально, а в В максимально, как и в наших экспериментах (см. табл. 1).

Из данных, приведенных в табл. 1, видно, что тимозин существенно снижает рецепцию  $H^3$ -дексаметазона тимоцитами крыс по сравнению со связыванием в контроле. Так, снижение связывания дексаметазона во фракции А было 28%, во фракции В — 33%, во фракции С — 40%, во фракции D изменилось недостоверно, лишь на 7%.

Таким образом, максимальное подавление тимозином связывания  $H^3$ -дексаметазона было в тимоцитах интерфаз В и С, где специфическое связывание дексаметазона составляет наибольшую величину. Это дает основание предположить, что тимозин влияет на специфическое связывание и в то же время не влияет на неспецифическое. Действительно, во фракциях тимоцитов В, С и D величина рецепции 1,2- $H^3$ -(N)-дексаметазона в присутствии тимозина выше, чем величина неспецифического связывания, а разность между величинами рецепции 1,2- $H^3$ -дексаметазона в контроле и в присутствии тимозина меньше, чем величины специфического связывания. Это, по-видимому, подтверждает предположение о том, что тимозин снижает специфическую рецепцию  $H^3$ -дексаметазона. Что же касается фракции А, то тимозин повышает рецепцию  $H^3$ -дексаметазона по сравнению с величиной специфической рецепции. По литературным данным, в этой фракции содержатся наиболее зрелые тимоциты. Не исключено, что эти лимфоциты обладают большим количеством рецепторов для глюкокортикоидов, возникающих в результате их дифференцировки. Возможно, однако, что возрастание рецепции  $H^3$ -дексаметазона тимоцитов этой фракции происходит за счет увеличения неспецифического связывания. Механизм подавления рецепции дексаметазона тимозином неизвестен. Можно предположить, что тимозин блокирует рецепторы на мембране зрелых форм тимоцитов, принимающих участие в переносе стероидов в клетки, что может быть одним из механизмов защиты этих клеток от лизиса. Не исключено также, что снижение рецепции  $H^3$ -дексаметазона может быть связано со снижением рецепторов для глюкокортикоидов под влиянием тимозина. Поэтому во второй серии экспериментов было изучено влияние тимозина на синтез белка в различных субпопуляциях тимоцитов. Был также изучен эффект экзогенного цАМФ и кофеина, повышающего уровень эндогенного цАМФ на синтез белка в этих клетках. Имеются литературные данные, показывающие, что экзогенный цАМФ увеличивает содержание цАМФ в клетках, не проникая через мембрану [15, 17].

Таким образом, действие экзогенного цАМФ и кофеина опосредуется, вероятно, через эндогенный цАМФ. Подавление синтеза белков происходило во всех фракциях тимоцитов, но максимально проявлялось во фракции С (табл. 2). Тимозин стимулирует синтез белков во фракциях А и В на 34%. Во фракциях С и D тимозин снижал синтез белков *de novo*. Увеличение уровня эндогенного цАМФ после введения в среду кофеина снижает синтез белка по сравнению с присутствием в среде тимозина на 16% во фракции А, но и при таком подавлении этот уровень остается еще выше, чем в контроле; во фракции В кофеин подавляет синтез белков на 47%, во фракциях С и D — примерно на 80%. Введение в систему экзогенного цАМФ снижает синтез белков незначительно, за исключением фракции В (12%). Можно предположить, что в первой фракции тимоцитов (А) содержатся клетки, для диф-

ференцировки которых необходим синтез белков, обуславливающих физиологические функции этих клеток. Мы провели эксперименты с целью установить, специфически ли связывается экзогенный цАМФ в условиях наших опытов с различными фракциями тимоцитов. Оказалось, что немеченый цАМФ, добавленный через 1 ч после добавления  $0,1 \text{ мКи}$   $\text{H}^3$ -цАМФ и в концентрации  $10^{-8} \text{ М}$ , снижает количество меченого цАМФ, адсорбированного на тимоците.

Таблица 2

Влияние тимозина, кофеина и цАМФ на синтез белков в тимоцитах крыс

Интер-фаза, %	Включение $4,5\text{-H}^3$ -лейцина	Включение $4,5\text{-H}^3$ -лейцина в присутствии тимозина	Включение лейцина в присутствии тимозина и кофеина	Включение лейцина в присутствии тимозина, кофеина, цАМФ	Включение	
					специфическое	неспецифическое
А (10—23)	$7\,713 \pm 88$	$10\,323 \pm 101$ $P < 0,05$	$8708 \pm 93$ $P < 0,05$	$8603 \pm 93$ $P < 0,1$	$140 \pm 11$	$268 \pm 16$
Б (23—26)	$6\,106 \pm 78$	$8\,193 \pm 90$ $P < 0,05$	$4370 \pm 66$ $P < 0,05$	$3858 \pm 62$ $P < 0,05$	$160 \pm 12$	$308 \pm 17$
С (26—29)	$3\,637 \pm 60$	$3\,533 \pm 59$ $P < 0,1$	$778 \pm 28$ $P < 0,05$	$762 \pm 28$ $P > 0,1$	$430 \pm 21$	$486 \pm 22$
Д (29—35)	$26\,508 \pm 162$	$23\,017 \pm 152$ $P < 0,05$	$1937 \pm 44$ $P < 0,01$	$1971 \pm 44$ $P > 0,1$	$160 \pm 22$	$820 \pm 29$

Примечание. Достоверность в каждой графе относится к предыдущему столбцу как контролю.

Наибольшее специфическое связывание  $\text{H}^3$ -цАМФ происходило во фракции С — 88%, наименьшее во фракции Д — 19%. Необходимо сопоставить полученные нами данные с литературными. Известно, что клетки тимуса состоят из малых митотически инертных лимфоцитов, лишь 20% которых активно пролиферируют под влиянием гормонов и экзогенного цАМФ. Установлено, что лимфоциты коры, составляющие около 90% всех клеток тимуса, отличаются от медуллярных тимоцитов. Так, лимфоциты коры быстро пролиферируют и разрушаются под влиянием кортизола. Превращаясь в медуллярные тимоциты, тимоциты коры приобретают устойчивость к глюкокортикоидам и большие размеры, что приводит к более низкой плавучей плотности в градиенте сывороточного альбумина. Это позволяет отделять друг от друга корковые и медуллярные тимоциты. Однако это разделение не является абсолютным, и можно, по-видимому, говорить лишь об обогащении слоев интерфейса корковыми и медуллярными тимоцитами. По нашим данным, клетки фракции Д наиболее интенсивно синтезируют белок, что можно сопоставить с тем, что в этом слое присутствуют корковые, активно пролиферирующие клетки. Кроме того, во фракции Д включение дексаметазона минимально, что, вероятно, свидетельствует о небольшом количестве рецепторов для глюкокортикоидов в этих клетках. Однако, по литературным сведениям, эти клетки наиболее гормоночувствительны. Можно думать, что устойчивость к глюкокортикоидам не имеет отношения к величине рецепции этих гормонов. Отметим, что в слое Д тимозин наиболее значительно подавляет синтез белков, что следует сопоставить с тем, что дифференцирующее действие этого гормона сосредоточено в основном на молодых корковых клетках.

Таким образом, результаты наших экспериментов свидетельствуют о значительных различиях в чувствительности субпопуляций тимоцитов к экзогенным регуляторным влияниям (тимозину, глюкокортикоидам, цАМФ, кофеину). Так, ингибирование рецепции  $\text{H}^3$ -дексаметазона было значительным в субпопуляциях тимоцитов А, В, С (40%) и небольшим во фракции Д (7%). Наибольшее активирующее синтез белков влияние тимозина было во фракциях А и В, в то время как в субпопуляции Д гормон ингибировал синтез белков на 14%. Рецепция  $\text{H}^3$ -цАМФ достигала наибольшей величины во фракциях А, В, С (50—80%) и наименьшей во фракции Д (16%). Напротив, кофеин, ингибируя фосфодиэстеразу и повышая уровень эндогенного цАМФ, понижает синтез белков в основном во фракциях С и Д.

Следовательно, можно думать о том, что действие тимозина и эндогенного цАМФ сосредоточено в основном на более зрелых субпопуляциях тимоцитов, а действие эндогенного цАМФ более всего проявляется в молодых, менее дифференцированных субпопуляциях тимоцитов.

Поэтому остается актуальным дальнейшее изучение молекулярных механизмов влияния полипептидных гормонов тимуса и глюкокортикоидов на Т-лимфоциты с целью оценки особенностей взаимодействия этих влияний на определенных этапах дифференцировки тимоцитов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Hooper J. A., McDaniel M. C., Thurman G. et al. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1975, v. 249, p. 125.
2. Komuro K., Boise E. A. — Lancet, 1973, v. 1, p. 740.
3. Goldschneider J. — J. Immunol., 1975, v. 16, p. 269.
4. Bach F. H., Bach M. L., Sondel P. M. — Nature, 1976, v. 259, p. 273.
5. Schneid M. P., Hoffman M., Cohen G. et al. — J. exp. Med., 1973, v. 13, p. 1027.
6. Lee I., Reed C. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1977, v. 78, p. 298.
7. Schring U., Caffino P. — Nature, 1977, v. 268, p. 167.
8. Kook U., Trainin N. — J. Immunol., 1975, v. 115, p. 8.
9. Lippman M., Barr R. — Ibid., 1977, v. 118, p. 1977.
10. Bourgeois C., Newby R. — Cell, 1977, v. 11, p. 423.
11. Брондз Б. Д., Рохлин О. В. Молекулярные и клеточные основы иммунологического распознавания. М., 1978, с. 41.
12. Lippman M., Hartelman R., Perry S. et al. — Nature. New Biol., 1973, v. 242, p. 157.
13. Ашмарин И. П., Васильев Н. Н., Амбросов В. А. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов. Л., 1975, с. 19.
14. Duval D., Dausse J. P. et al. — Biochim. biophys. Acta, 1976, v. 451, p. 82—91.
15. MacManus J. P., Whitfield J. F. — Life Sci., 1972, v. 11, p. 837.
16. Schlesinger M. — Progr. Allergy, 1972, v. 16, p. 214.
17. Webb D., Stites D., Perlman J. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1973, v. 53, p. 1002.

Поступила 18/11 1980 г.

#### SUSCEPTIBILITY OF RAT THYMOCYTE SUBPOPULATIONS TO THYMOSINE AFFECTING THEIR PROTEIN SYNTHESIS AND DEXAMETHASONE RECEPTION

I. A. Lavrinenko, S. M. Shergin, V. P. Lozovoj

Institute of Experimental and Clinical Medicine, Siberian Branch of the Academy of Medical Sciences of the USSR, Novosibirsk

Protein synthesis and reception for 1,2-<sup>3</sup>H-(N)-dexamethasone were studied in A, B, C and D subpopulations of rat thymocytes after treatment with thymosine, cyclic adenosine-3,5'-monophosphate (cAMP) and caffeine. Thymosine inhibited the 1,2-<sup>3</sup>H-(N)-dexamethasone reception in rat thymocyte subpopulations A, B and C by 30-40%, stimulated the protein synthesis in A and B fractions by 30% as well as inhibited the synthesis in D fraction by 14%. Caffeine, administered together with thymosine, inhibited the protein synthesis by 80% in C and D thymocyte subpopulations and — by 47% in B subpopulation. After simultaneous treatment with exogenous cAMP, thymosine and caffeine the protein synthesis was inhibited by 14% in all the thymocyte subpopulations. The data obtained suggest that thymosine and caffeine affect the various lymphocyte T subpopulations, dissimilar in their differentiation.

УДК 612.744.14

А. А. Давыдов, Г. Ф. Сычева, А. Б. Зборовский

#### ИЗУЧЕНИЕ ТРОПОМИОЗИНОВ МЫШЕЧНЫХ И НЕМЫШЕЧНЫХ ОРГАНОВ ЧЕЛОВЕКА

Кафедра госпитальной терапии и Проблемная научно-исследовательская ревматологическая лаборатория Министерства здравоохранения СССР Волгоградского медицинского института

Одним из наиболее актуальных вопросов современной ревматологии является поиск антигенов, на которые формируются аутоантитела у больных с аутоиммунными заболеваниями, в частности ревматизмом. О миофибрилл-

лярной локализации некоторых аутоантигенов при ревматизме свидетельствуют данные литературы [11]. Именно поэтому объектом для поиска аутоантигенов при ревматизме прежде всего явились некоторые мышечные белки [2—4].

Среди мышечных белков тропомиозин является одним из важнейших компонентов, обеспечивающих регуляцию мышечного сокращения. На его долю приходится около 2,5—3% всего белкового азота скелетных мышц [5]. Наиболее подробно изучены структура и физико-химические свойства тропомиозина из скелетных мышц кролика, цыпленка, трески, приморского гребешка [6—9]. В то же время изучению скелетного и сердечного тропомиозина человека посвящены единичные работы, касающиеся в основном изучения его функций [10].

Молекула тропомиозина представлена двумя полипептидными цепями, закрученными в суперспираль. Имеется всего два вида полипептидных цепей:  $\alpha$  — с относительной молекулярной массой 31 000—32 000 и  $\beta$  — 34 000—36 000 Д [11]. Возможны лишь три варианта комбинации полипептидных цепей в молекуле тропомиозина:  $\alpha$ - $\alpha$ ;  $\alpha$ - $\beta$ ;  $\beta$ - $\beta$  [12]. Количественное соотношение субъединиц взаимосвязано с функцией мышц, так как  $\alpha$ -субъединицы для быстрых, а  $\beta$  — для медленных мышечных волокон. Сердечный тропомиозин млекопитающих представлен только  $\alpha$ -цепями. Эти цепи имеют значительные биохимические и иммунологические различия. Антитела против  $\alpha$ -цепей не проявляют, а против  $\beta$ -цепей проявляют выраженную видовую специфичность [13].

Известно, что тропомиозин скелетных мышц фракционируется в интервале 40—60% насыщения сульфатом аммония. Тропомиозин кролика, как и тропомиозин приморского гребешка и цыплят, полимеризуется в растворах с низкой ионной силой, образуя вязкий гель, и деполимеризуется при добавлении нейтральных солей. Подвижность субъединиц тропомиозина гребешка и кролика при электрофорезе в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН), по Веберу и Осборну, совпадает, что свидетельствует о близости их относительных молекулярных масс. В условиях диск-электрофореза тропомиозин кролика образует две зоны, соответствующие двум различным полипептидным цепям —  $\alpha$  и  $\beta$  [6]. Относительная молекулярная масса тропомиозина, выделенных из сердечной мышцы телят, скелетных мышц кролика, телят, цыпленка, равна приблизительно 35 000 Д. Тропомиозин мозга, тромбоцитов и поджелудочной железы телят имеет относительную молекулярную массу около 30 000 Д, что говорит о гетерогенности тропомиозина в пределах организма [10]. С-концевой аминокислотой мышечных и неммышечных тропомиозина является изолейцин [10]. Тропомиозин из взрослых и эмбриональных мышц цыпленка содержит  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы, причем в эмбриональной стадии преобладает  $\beta$ -форма, а во взрослой —  $\alpha$ . Вместе с тем они не имеют различий в биологической активности [7].

Целью настоящей работы было выделение тропомиозина из различных тканей человека, в том числе сердечной и скелетной мышц, печени, почек, легких, и исследование некоторых физико-химических и иммунологических свойств этих белков.

## М е т о д и к а

Материал для выделения тропомиозина получали от погибших в результате несчастного случая людей не позднее 6—8 ч после смерти, тщательно очищали от жира и соединительной ткани, дважды пропуская через мясорубку. Тропомиозин выделяли по методу Бейли [14]. Полученные белки исследовали методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии ДСН по методике Вебера и Осборна [15]. В качестве маркера использовали раствор тиазинового красителя, который при электрофорезе мигрирует более компактно, чем бромфеноловый синий, полосой и позволяет точнее определить расстояние миграции красителя. Электрофорез проводили в 10% ПААГ. Гель окрашивали 1% раствором амидо черного 10Б в 7% уксусной кислоте. Фоновую окраску отмывали 7% уксусной кислотой. Содержание белка в препаратах определяли по поглощению при 280 нм. Антисыворотку против сердечного тропомиозина получали путем многократных иммунизаций кроликов массой не менее 3,0—3,5 кг. Иммунизацию проводили в течение 4 нед. Первые 2 нед белок вводили дважды в неделю внутримышечно в полном адьюванте Фрейнда, поочередно в передние

и задние лапы. В последующие 2 нед антиген вводили внутримышечно без адьюванта. Реиммунизацию проводили внутримышечно ежемесячно в течение 1 года. На курс иммунизации каждому животному вводили 40—60 мг белка. Кровь забирали на 8—10-й день после иммунизации. Иммунодиффузию в агаровом геле выполняли по Оухтерлони в модификации Гусева, иммуноэлектрофорез — с использованием электрофореза по Веберу и Осборну с последующей иммунодиффузией в агаровом геле.

## Результаты и обсуждение

При выделении тропомиозина по методу Бейли из сердечной мышцы было получено 30—40 мг белка из 100 г сырой ткани, что согласуется с данными литературы (4—7 % от всех белков миофибрилл). Несколько больше было получено тропомиозина из скелетной мышцы (табл. 1). В немышечных органах содержание тропомиозина было почти в 30 раз меньше. После диализа препаратов против дистиллированной воды с рН 4,5 образовывался гелеобразный осадок, хорошо растворявшийся при повышении рН до 7,0.

Таблица 1  
Содержание тропомиозина на 100 г сырой ткани

Вид ткани	Содержание тропомиозина, мг
Сердечная мышца	30,0
Скелетная »	37,0
Печень	1,0
Почки	0,7
Легкие	1,3

При электрофоретическом разделении в 10 % ПААГ препараты сердечного тропомиозина оказались гетерогенными, так как были представлены 6—8 зонами миграции (рис. 1 на стр. 426). Наиболее интенсивной была зона миграции с подвижностью 0,538. Эта фракция имела относительную молекулярную массу 34 000 Д и была идентифицирована как субъединица тропомиозина. Основную массу загрязняющих белков составляли фракции с подвижностью 0,196 и 0,282, что соответствует относительной молекулярной массе 90 000—100 000 и 65 000—67 000 Д. Мипорные белки имели относительные молекулярные массы 37 000, 24 000 и 18 000 Д.

После введения трехкратной отмывки мышечной кашицы дистиллированной водой (дополнительно к методике Бейли) удалось избавиться от примесей альбуминов и других загрязняющих белков (см. рис. 1). Контроль за эффективностью очистки производили методом электрофореза по Веберу и Осборну. В некоторых случаях очистку производили высаливанием сульфатом аммония. Образцы, содержащие по 120 мкг белка, высаливали различными насыщениями сульфатом аммония. Осадок растворяли, диализировали до полного удаления соли. Гомогенность полученных образцов определяли электрофоретически (концентрацию белка после осаждения не определяли (рис. 2 на стр. 426). С повышением концентрации сульфата аммония уменьшался объем загрязняющих низкомолекулярных белков, однако высокомолекулярный компонент оставался примерно в первоначальном количестве. При насыщении сульфатом аммония до 77 % резко уменьшалось общее количество белка.

Диализ препаратов против дистиллированной воды с различными значениями рН также не привел к очистке от высокомолекулярного белка (рис. 3 на стр. 426).

Попытка очистить препараты от высокомолекулярного компонента при помощи гель-фильтрации на сефадексе G-100 оказалась также безуспешной. При обработке тропомиозинов, содержащих 0,1 % ДСН, 0,1 М β-меркаптоэтанол и 10—15 % глицерина, в течение 3—4 мин на кипящей водяной бане в закрытом сосуде и последующем их электрофорезе удалось избавиться от высокомолекулярного белкового компонента; в то же время фракция с подвижностью 0,538 увеличивалась (рис. 4 на стр. 426). Таким образом, высокомолекулярный компонент, выявляемый при электрофорезе по Веберу и Осборну без предварительной тепловой обработки, является агрегатом субъединиц тропомиозина.

На основании исследований сердечного, скелетного, почечного, печеночного и легочного тропомиозинов методом электрофореза и ПААГ по Ве-

беру и Осборну выведены средние величины электрофоретической подвижности и молекулярных масс, определенные по номограмме (табл. 2).

Сердечный тропомиозин мигрировал гомогенной зоной, имеющей среднюю электрофоретическую подвижность, соответствующую относительной молекулярной массе 34 000 Д (рис. 5 на стр. 426). Скелетный тропомиозин

Таблица 2

Относительная молекулярная масса тропомиозинов из мышечных и немышечных органов человека по данным электрофореза в ПААГ ( $M \pm m$ )

Сердечная мышца		Скелетная мышца		Печень
подвижность	относительная молекулярная масса	подвижность	относительная молекулярная масса	подвижность
$0,556 \pm 0,006$ — $n = 123$	$33\,900 \pm 504$ —	$0,495 \pm 0,019$ $0,546 \pm 0,002$ $n = 14$	$47\,200 \pm 172$ $35\,000 \pm 1025$	$0,534 \pm 0,012$ $0,639 \pm 0,009$ $n = 4$

Продолжение

Печень	Почки		Легкие	
относительная молекулярная масса	подвижность	относительная молекулярная масса	подвижность	относительная молекулярная масса
$35\,800 \pm 1350$ $28\,400 \pm 255$ $n = 4$	$0,537 \pm 0,023$ $0,625 \pm 0,018$ $n = 3$	$35\,500 \pm 6400$ $29\,000 \pm 1080$	$0,524 \pm 0,001$ $0,614 \pm 0,048$ $n = 4$	$36\,200 \pm 1909$ $29\,500 \pm 289$

мигрировал двумя зонами. Фракция с большей относительной молекулярной массой (47 200 Д) была представлена большим количеством белка и соответствовала, вероятно,  $\beta$ -цепи, меньшая (с относительной молекулярной массой 35 000 Д) —  $\alpha$ -цепи. Белки немышечных тканей были представлены двумя фракциями с относительной молекулярной массой около 35 500 и 29 000 Д.

Высокомолекулярный белок, загрязняющий сердечный тропомиозин, присутствовал также во всех препаратах и имел аналогичную подвижность и, следовательно, относительную молекулярную массу.

В иммунодиффузионных тестах антисыворотки против сердечного тропомиозина давали по две дуги преципитации — с сердечным и несердечным тропомиозинами. Они соответствовали взаимодействию антител с  $\alpha$ -цепями тропомиозина и другим белком, загрязняющим препараты тропомиозинов, при этом была получена полная идентичность обеих дуг в реакции идентичности.

Таким образом, методом Бейли из сердечной и скелетной мышц, а также печени, почек, легких человека можно выделить тропомиозин. Содержание его в мышечных и немышечных тканях резко различается. Препараты тропомиозинов различного происхождения имеют сходные физико-химические свойства, что объясняется, очевидно, присутствием в них  $\alpha$ -цепей, существенно не отличающихся биохимически и иммунологически.  $\alpha$ -Цепь, по данным электрофореза в ПААГ, в присутствии ДСН имеет относительную молекулярную массу около 35 000 Д.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бережная Н. М. Аутоиммунные процессы и патогенез ревматического поражения сердца. Автореф. дис. докт. М., 1972.
2. Зборовский А. Б., Давыдов А. А. — Вопр. ревмат., 1974, № 2, с. 13—18.
3. Бондаренко А. В., Давыдов А. А. — Там же, 1977, № 4, с. 23—26.
4. Зборовский А. Б. — Там же, с. 26—28.
5. Иванов И. И., Коровкин Б. Ф., Пинаев Г. П. Биохимия мышц. М., 1977, с. 142.
6. Погорная О. И. и др. — В кн.: Биофизика и биохимия мышечного сокращения. М., 1976, с. 151—154.

7. Roy R. K., Potter J. D., Sarkar S. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1976, v. 70, p. 28—36.
8. Odense P. H., Leung T. C., Green W. A. et al. — Biochim. biophys. Acta, 1969, v. 188, p. 121—131.
9. Cummins P., Perry S. V. — Biochem. J., 1974, v. 141, p. 43—49.
10. Bailin G. — Biochim. biophys. Acta, 1976, v. 449, p. 310—326.
11. Leger J. L. et al. — Biochimie, 1975, v. 57, p. 1249—1273.
12. Ookubo Norio. — J. Biochem. (Tokyo), 1977, v. 81, p. 923—931.
13. Hirabayashi J., Hayashi J. — Dev. Growth. Differ., 1970, v. 12, p. 151—178.
14. Baily. — Biochem. J., 1948, v. 43, p. 271—284.
15. Weber K., Osborn M. — J. biol. Chem., 1969, v. 244, p. 4406—4412.

Поступила 26/11 1980 г.

## TROPOMYOSINS IN HUMAN MUSCULAR AND NON-MUSCULAR TISSUES

A. A. Davydov, G. F. Sycheva, A. B. Zborovskiy

Chair of Hospital Therapy and Problem Research Laboratory of Rheumatology, Ministry of Public Health of the USSR, Medical School, Volgograd

Tropomyosin was isolated from human heart and skeletal muscles, liver, kidney and lung tissues. The subunit composition and relative molecular mass of tropomyosins were studied using polyacrylamide gel electrophoresis in presence of sodium dodecyl-sulfate. The tropomyosin from heart muscle migrated as a homogenous zone and had a relative molecular mass of 34,000 daltons. The tropomyosin from skeletal muscles was separated into two zones containing polypeptides of 47,200 and 35,000 daltons. Proteins from nonmuscular tissues constituted two fractions with relative molecular mass of 35,000 and 29,000 daltons.  $\alpha$ -Chains of tropomyosins in various human tissues were similar to each other as shown using immunodiffusion procedure.

УДК 616.85-092.9-07:[616.831.41+616.127]-008.931:577.152.261

В. В. Давыдов, В. А. Крауз, В. С. Якушев

## ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ Ca, Mg-ЗАВИСИМОЙ АТФ-АЗЫ В ГИПОТАЛАМУСЕ И МИОКАРДЕ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ НЕВРОТИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ У КРЫС

Кафедры фармакологии и биологической химии Оренбургского медицинского института

Гипоталамус, являясь основной «релейной станцией» восходящих и нисходящих влияний цепи лимбической система — средний мозг, в условиях формирования эмоциональных состояний принимает важное участие в фильтрации и интеграции сигналов, поступающих в образования переднего мозга и к исполнительным органам, в частности к сердцу.

Исследованиями последних лет установлено, что развитие экспериментальных невротических состояний сопровождается изменением биоэлектрической активности [1—4] и возбудимости [1] различных гипоталамических образований и миокарда. Эти изменения определяются, очевидно, нарушением активного транспорта ионов через клеточные мембраны. Однако активность транспортной системы, контролирующей трансмембранный перенос ионов в условиях патологии высшей нервной деятельности, практически не изучена.

В настоящей работе проведено параллельное исследование активности Ca, Mg-зависимой АТФ-азы в гипоталамусе и миокарде крыс в процессе формирования невротического состояния, а также на различных этапах «следовой» реакции.

### Методика

Опыты проводили на 70 белых крысах массой 200—220 г. В работе использовали экспериментальную модель нейрогенного стресса «конфликт афферентных возбуждений», которая предусматривает сведение до минимума действия альтернирующих факторов на организм, в том числе болевого раздражителя, и приводит к возникновению «ситуации неопределенности» [5]. Экстероцептивные раздражители (звук электрического звонка, свет электрической лампы и электрический ток пороговой силы, подаваемый на металлический пол клетки) применяли в соответствии с программой, составленной Ведяевым [5]. Исследования проводили в течение 4 нед, причем в первые 2 нед

по 2 ч ежедневно животные находились в условиях невротической ситуации, а затем после окончания воздействия стрессоров изучали «следовую» реакцию. Крыс декапировали. На холоду извлекали гипоталамус и левый желудочек сердца. Из гомогенатов этих тканей, приготовленных на 0,32 М сахарозе, при помощи метода дифференциального центрифугирования выделяли фракцию среднетяжелых микросом при 40 000 g и в конце каждой недели хронического опыта определяли активность Са, Mg-зависимой АТФ-азы путем внесения суспензии микросом в инкубационную среду, содержащую 10 мМ гистидина, 100 мМ хлористого калия, 5 мМ хлористого магния, 0,05 мМ хлористого кальция рН 6,6 из расчета 100 мкг белка микросом на 1 мл среды. Реакцию начинали путем добавления 3 мМ АТФ. Активность фермента определяли по скорости расщепления АТФ с образованием неорганического фосфора, содержание которого определяли спектрофотометрически [6]. Полученные данные подвергали обработке методом вариационной статистики.

## Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что в процессе формирования экспериментального невротического состояния у крыс наблюдается снижение активности Са, Mg-зависимой АТФ-азы как в гипоталамусе, так и в миокарде (см. таблицу). Из таблицы видно, что в миокарде на 7-е и 14-е

**Активность Са, Mg-зависимой АТФ-азы (в мкмоль  $\Phi_{1c}$  на 1 мг белка в 1 мин) микросомальной фракции миокарда и гипоталамуса при формировании невротического состояния у крыс**

Ткань	Интактные крысы	Подопытные крысы			
		длительность раздражения		«следовая» реакция	
		7 сут	14 сут	1 нед	2 нед
Гипоталамус	$0,131 \pm 0,010$ (16)	$0,105 \pm 0,008^*$ (10)	$0,080 \pm 0,015^*$ (6)	$0,091 \pm 0,010^*$ (9)	$0,136 \pm 0,021$ (12)
Миокард	$0,33 \pm 0,02$ (18)	$0,25 \pm 0,02^*$ (11)	$0,24 \pm 0,04^*$ (6)	$0,31 \pm 0,03$ (11)	$0,33 \pm 0,06$ (8)

Примечание. В скобках—число животных. Звездочка—значение достоверно отличается от контроля ( $P < 0,05$ ).

сутки раздражения активность АТФ-азы уменьшалась на 25 % по сравнению с таковой интактных животных. В гипоталамусе через 7 сут воздействия стрессоров активность Са, Mg-зависимой АТФ-азы уменьшалась только на 20 %, а на 14-е сутки — уже на 39 % по сравнению с таковой интактных животных.

Через 2 нед после начала эксперимента у животных наряду с уменьшением активности в гипоталамусе и миокарде наблюдалось достоверное увеличение массы надпочечников в среднем на 70 %, у 38 % крыс появлялись характерные изменения со стороны слизистой оболочки желудка в виде кровоточащих язв, а у 54 % животных — петехиальные кровоизлияния.

Дальнейшие исследования показали, что после окончания применения стрессоров в процессе «следовой» реакции активность Са, Mg-зависимой АТФ-азы в гипоталамусе и миокарде нормализуется через различные сроки. Так, в миокарде активность фермента восстанавливалась уже к концу 1-й недели «следовой» реакции, а в гипоталамусе — через 2 нед. При этом через 1 нед после окончания применения стрессоров масса надпочечников была близка к таковой в норме. Однако у 80 % животных в желудке обнаруживались язвы, а у 20 % — петехиальные кровоизлияния. В конце 2-й недели «следовой» реакции язвенные поражения желудка отсутствовали и только у 10 % крыс отмечались петехиальные кровоизлияния.

Таким образом, в процессе формирования экспериментального невроза происходит параллельное, но выраженное в различной степени снижение активности Са, Mg-зависимой АТФ-азы в гипоталамусе и миокарде. При этом уменьшение ферментативной активности в гипоталамусе является более постепенным и на последнем этапе опыта более значимым, чем в миокарде. Однако в процессе «следовой» реакции низкий уровень Са, Mg-зависимой АТФ-азы в гипоталамусе сохраняется более длительно, чем в миокарде.

Можно полагать, что подобное изменение активности Са, Mg-зависимой АТФ-азы будет способствовать снижению ионного транспорта кальция между цитозолем и эндоплазматическим ретикуломом. При этом изменение соотношения кальция может способствовать нарушению метаболизма и функциональной активности гипоталамуса и миокарда. Подобное предположение тем более вероятно, что в наших исследованиях [1] в условиях формирования экспериментальных невротических состояний обнаружены динамичные, усугубляющиеся в процессе хронического эксперимента изменения биоэлектрической активности и возбудимости гипоталамуса. Изменение сократительной способности сердца при формировании невротических расстройств является общепризнанным фактом [7].

Полученные нами данные позволяют полагать, что между изменением функционального состояния гипоталамуса, сократительной способностью миокарда и активностью их транспортных АТФ-аз при воспроизведении в модельных опытах невротических расстройств существует определенная связь. При этом механизм ингибирования Са, Mg-зависимой АТФ-азы в гипоталамусе и миокарде в процессе формирования невротических состояний неясен. Оценивая возможные причины ингибирования, можно допустить что при формировании невроза изменяется структура эндоплазматического и саркоплазматического ретикулула под влиянием активации процесса перекисного окисления липидов, либо из-за нарушения в мембранах взаимодействия фосфолипидов с белками, либо за счет изменения жирнокислотного состава фосфолипидов ретикулула.

Выяснение конкретного механизма снижения активности Са, Mg-зависимой АТФ-азы в гипоталамусе и миокарде при формировании экспериментальных неврозов будет предметом наших дальнейших исследований.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Крауз В. А., Чайковская Е. В., Саньков А. П. — В кн.: Всесоюзное физиологическое о-во им. И. П. Павлова. Съезд. 13-й. Тезисы научных сообщений. Л., 1979, т. 2, с. 166.
2. Лукьянова С. П. — Журн. высш. нервн. деят., 1977, № 2, с. 345—347.
3. Меерсон Ф. З., Радзиевский С. А., Гиббер Л. М. — Докл. АН СССР, 1977, т. 237, с. 977—980.
4. Судаков К. В. — Там же, с. 318—321.
5. Урманчеева Т. П., Хасабова В. А., Бауман Х. и др. — Там же, с. 338—341.
6. Ведяев Ф. П. — Там же, с. 325—327.
7. Fiske S., Subbarow G. — J. biol. Chem., 1925, v. 66, p. 375.

Поступила 18/11 1980 г.

#### ALTERATION OF $Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$ -ATPASE ACTIVITY FROM RAT HYPOTHALAMUS AND MYOCARDIUM IN DEVELOPMENT OF THE NEUROTIC STATE

V. V. Davydov, V. A. Krauz, V. S. Yakushev

Chair of Pharmacology, Chair of Biochemistry, Medical School, Orenburg

Simultaneous decrease of  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -ATPase activity occurred in rat hypothalamus and myocardium during experimental neurosis. The decrease of the enzymatic activity was more distinct in hypothalamus than in myocardium. In hypothalamus the decreased enzymatic activity maintained within a week after completion of the excitation of the animals.

Г. Г. Гарибян, П. А. Казарян, П. С. Симаворян

## НАРУШЕНИЕ ОБМЕНА ГЛИЦЕРОФОСФАТА И ГЛИЦЕРИНА В МИОКАРДЕ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПАНКРЕАТИТЕ

Центральная научно-исследовательская лаборатория Ереванского института усовершенствования врачей Министерства здравоохранения СССР

В настоящее время накоплено значительное количество данных, свидетельствующих о том, что у больных острым панкреатитом довольно часто отмечается нарушение функции сердечно-сосудистой системы [1—4]. Однако механизмы кардиоваскулярных осложнений остаются невыясненными.

Ранее нами было показано значительное повышение активности фруктозодифосфатаальдозазы в миокарде в остром периоде экспериментального панкреатита [5]. При этом было установлено, что возрастание активности фермента сопровождается заметным изменением содержания фосфотриоз. Так как часть представителей фосфотриоз включается в биосинтез фосфолипидов (ФЛ) и триглицеридов, что обеспечивается функционированием глицерофосфатной системы, представляло интерес провести углубленное изучение обмена глицерофосфата (ГФ) и глицерина в миокарде.

Функционирование глицерофосфатной системы обеспечивает взаимопревращение глицеролипидов и глюкозы, а также транспорт экстрамитохондриального водорода в митохондрию, тем самым обуславливая значительную степень энергообеспечения сердечной мышцы.

Важность метаболической роли ГФ послужила основанием изучения ферментов, ответственных за обеспечение уровня как ГФ, так и глицерина — ключевого метаболита липогенеза.

Определяли активность глицеринкиназы (ГК; КФ 2.7.1.30), глицерофосфатдегидрогеназы (ГФД; КФ 1.1.1.8), глицериндегидрогеназы (ГД; КФ 1.1.1.6), а также концентрацию свободного глицерина, ГФ и диоксиацетонфосфата (ДОАФ) в миокарде крыс на различных этапах (1, 3, 7, 14 и 30-е сутки) развития экспериментального панкреатита.

### М е т о д и к а

Исследование проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 160—200 г. Острый панкреатит вызывали по методу Симаворяна [6], охлаждая поджелудочную железу хлорэтилом.

Активность ГК, ГФД (в реакции окисления ГФ в ДОАФ) и концентрацию ГФ определяли по известным микроспектрофотометрическим методам Кеннеди [7]: 1) ГК — в реакционной среде следующего состава: 0,94 мл дистиллированной воды, 1,8 мл  $MgCl_2$ -гидразин-глицинового буфера (рН 9,8), 0,05 мл 0,02 М НАД, 0,014 мл ГФД (140 мкг кристаллического белка), 0,05 мл 0,075 М АТФ, 0,05 мл 0,1 М глицерина. Общий объем пробы 3 мл; 2) ГФД — в таком же объеме инкубационной среды, состоящей из 0,94 мл дистиллированной воды, 1,8 мл  $MgCl_2$ -гидразин-глицинового буфера (рН 9,8), 0,05 мл 0,02 М НАД, 0,2 мл 0,1 М L- $\alpha$ -ГФ. Содержание ГФ измеряли также в 3 мл инкубационной среды, состоящей из 0,94 мл дистиллированной воды, 1,8 мл  $MgCl_2$ -гидразин-глицинового буфера (рН 9,8), 0,05 мл 0,02 М НАД, 0,014 мл ГФД и 0,2 мл безбелкового нейтрализованного экстракта исследуемой ткани. Активность ГД определяли по методике Геслера и Иселбахера [8] в инкубационной среде, состоящей из 2,75 мл  $4 \cdot 10^{-4}$  М гидразин-сульфатного буфера (рН 9,2), 0,1 мл  $3 \cdot 10^{-3}$  М глицерина и 0,1 мл  $6 \cdot 10^{-4}$  М НАД. Содержание свободного глицерина выявляли по методике Бейля [9] в модификации Гильмьяровой [10], основанной на превращении глицерина в формальдегид путем окисления его периодатом натрия. Диоксиацетонфосфат определяли по Хогорсту и соавт. [11]. Ферментативную активность и содержание метаболитов определяли в постмитохондриальной надосадочной жидкости, полученной при 17 000 g, так как ранее в наших исследованиях [12] была показана преимущественная локализация указанных выше ферментных систем в смеси микросомальной и растворимой фракций гомогенатов некоторых тканей белых крыс. Оптическую плотность регистрировали при 340 нм, содержание метаболитов (ГФ и ДОАФ) определяли с учетом коэффициента микромолярной экстинкции для НАД·Н, равного  $6,22 \text{ см}^2/\text{мкМ}$ .

Изменение некоторых ферментных систем и метаболитов липогенеза в миокарде крыс в динамике развития экспериментального панкреатита (в мкмоль НАД·Н на 1 г свежей ткани)

Фермент, метаболит	Контроль (n=10)	День наблюдения						P
		1-й (n=9)	3-й (n=8)	7-й (n=8)	14-й (n=9)	30-й (n=8)		
ГК	1,75±0,031	1,69±0,04	2,18±0,031	1,74±0,042	1,22±0,02	0,9±0,030	<0,001	<0,001
ГФД	1,7±0,062	1,56±0,064	2,12±0,077	2,91±0,120	2,33±0,15	1,04±0,0760	<0,002	<0,002
ГФД	4,06±0,11	3,22±0,096	4,63±0,100	4,47±0,180	4,16±0,074	3,97±0,200	>0,25	>0,5
Г глицерин, мг/г	4,77±0,14	5,13±0,14	5,88±0,079	5,48±0,21	6,04±0,21	4,05±0,098	<0,001	<0,002
ГФ	0,20±0,0062	0,24±0,012	0,42±0,0012	0,162±0,009	0,36±0,019	0,20±0,007	<0,05	>0,5
ДАОФ	1,28±0,13	1,70±0,077	1,36±0,066	1,14±0,1	1,09±0,063	1,34±0,032	<0,1	>0,5

Примечание. n—число определений.

## Результаты и обсуждение

Результаты исследований, обобщенные в таблице, свидетельствуют о том, что у подопытных крыс изменения содержания ГФ и ДАОФ в миокарде отмечались уже в 1-е сутки после воспроизведения заболевания. При этом активность ГД значительно подавлялась. Активность ГК и ГФД, количество свободного глицерина не претерпевали заметных изменений.

Дальнейшее развитие экспериментального панкреатита приводит к накоплению ГФ. Можно допустить, что резкое (более чем в 2 раза) возрастание концентрации ГФ в миокарде на 3-й день заболевания связано с усилением глицерокиназного и гликолитического путей биосинтеза этого соединения. Однако при анализе полученных фактов становится очевидной одинаковая степень активирования процессов как образования ГФ, так и его окисления, т. е. активность ГК и ГФД в реакции окисления ГФ на 3-й день заболевания повышается равноценно, приблизительно на 24%. Следовательно, можно допустить, что факт накопления ГФ в острой фазе заболевания связан с замедлением реакции биосинтеза фосфатидной кислоты из ГФ, т. е. с подавлением активности глицерофосфатацилтрансферазы — одного из лимитирующих ферментов фосфатидогенеза.

В указанный срок уровень ДАОФ заметно снижается по сравнению с 1-м днем. Наблюдается определенная связь между изменением активности альдолазы [5] и содержанием ДАОФ в миокарде. При этом концентрация свободного глицерина заметно возрастает и усиливается скорость его окисления в глицериновый альдегид. Последний под действием глицеральдегидкиназы может превращаться в фосфоглицериновый альдегид — промежуточный продукт гликолиза.

На 7-е сутки развития панкреатита резко изменяется функция ГФД — узлового фермента на «перекрестке» обмена углеводов и глицеролипидов. В результате ускорения реакции окисления ГФ концентрация последнего в миокарде значительно снижается. В дальнейшем (на 14-й день) наблюдается подавление активности ГК (на 30%) и возрастание (на 27%) содержания свободного глицерина. Одновременно поддерживается высокий уровень

активности ГФД (37 %) в реакции окисления ГФ в ДОАФ по сравнению с контролем. Казалось, заметное торможение глицерокиназного пути образования ГФ и его интенсивное окисление в ДОАФ должно было повлечь за собой резкое снижение его содержания в миокарде на 14-е сутки развития панкреатита. Однако, как показали результаты исследований, при этом концентрация ГФ, наоборот, возрастает на 80 %. В данном случае высокий уровень ГФ, возможно, обусловлен ограниченным вовлечением его в биосинтез глицеролипидов, в частности ФЛ. Такое предположение подкрепляется данными по количественному снижению липидного фосфора в миокарде крыс с острым экспериментальным панкреатитом [13]. Повышение уровня свободного глицерина (на 3—14-е сутки), по-видимому, обусловлено активированием липопротеиновой липазы. Кроме того, как показали наши ранее проведенные исследования, в острой фазе заболевания в крови резко возрастает активность как панкреатической липазы [14], так и фосфолипазы А [15]. При этом не исключается также частичное активирование фосфолипаз в миокарде, о чем свидетельствует повышение содержания лизофосфатидилхолинов и неэстерифицированных жирных кислот в этом органе при изучаемой патологии [13, 16]. Таким образом, полученные нами данные указывают на значительную перестройку процессов обмена ГФ в сердце при остром экспериментальном панкреатите.

Описанные явления, несомненно, можно рассматривать как патогенетические факторы, ведущие к нарушению начальных этапов биосинтеза глицеролипидов в миокарде при указанной патологии. Можно предположить, что нарушение обмена ГФ наряду с другими метаболическими изменениями, отмеченными в наших исследованиях [5, 14—16], является важнейшим патогенетическим фактором в механизме нарушения сократительной функции сердечной мышцы при изучаемой патологии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Стручков В. И., Сидорина Ф. И. — Сов. мед., 1963, № 4, с. 59—63.
2. Mättig A., Clauss D. — Zbl. Chir., 1967, Bd 45, S. 2811—2818.
3. Фоменко Л. И. — Врач. дело, 1969, № 3, с. 31.
4. Филин В. И., Спасская М. Г., Селезнев С. А. и др. — В кн.: Острый панкреатит. Л., 1973, с. 18—20.
5. Казарян П. А., Гарибян Г. Г. — Ж. экспер. и клин. мед., 1979, № 4, с. 33—36.
6. Симаворян П. С. — Пат. физиол., 1973, № 2, с. 59—62.
7. Kennedy E. P. — Meth. Enzymol., 1962, № 5, p. 476.
8. Haessler H. A., Isselbacher K. J. — Biochim. biophys. Acta, 1963, v. 73, p. 427—436.
9. Bailey M. — J. Lab. clin. Med., 1959, v. 54, p. 158.
10. Гильмирова Ф. П. Роль свободного глицерина крови и тканей в механизме возникновения экспериментального атеросклероза. Дис. канд. Куйбышев, 1964.
11. Hohorst H. J., Kreuzt T. H., Bucher Th. — Biochem. Z., 1959, Bd 332, S. 18.
12. Казарян П. А., Карагезян К. Г. — В кн.: Вопросы биохимии мозга. Ереван, 1974, т. 9, с. 75—86.
13. Захарченко П. В. Некоторые показатели обмена липидов при остром экспериментальном панкреатите у крыс. Автореф. дис. канд. Ростов-н/Д., 1975.
14. Симаворян П. С. Некоторые аспекты патофизиологии панкреатитов. Дис. докт. Ереван, 1973.
15. Казарян П. А., Гарибян Г. Г., Паповян А. Л. и др. Сб. рефератов НИР и ОКР, Б. 758 611. 1979.
16. Симаворян П. С., Головлева Г. М. — В кн.: Закавказская науч. конф. патофизиологов. 4-я. Материалы. Баку, 1975, с. 287—288.

Поступила 23/VII 1980 г.

#### IMPAIRMENT OF GLYCEROPHOSPHATE AND GLYCEROL TURNOVER IN MYOCARDIUM UNDER CONDITIONS OF EXPERIMENTAL PANCREATITIS

G. G. Garibyan, P. A. Kazaryan, P. S. Simavoryan

Central Research Laboratory, Institute for Postgraduate Training of Physicians, Ministry of Public Health of the USSR, Yerevan

Initial steps of the experimental pancreatitis were characterized by an increase in glycerophosphate accumulation as well as in activity of glycerokinase, glycerophosphate dehydrogenase and glycerol dehydrogenase; content of free glycerol and dihydroacetone phosphate was also increased. Within the subsequent periods the patterns studied exhibited normalization except of glycerokinase and glycerophosphate dehydrogenase, activity of which was distinctly decreased as compared with the controls.

В. В. Чистяков, А. З. Приходько

## ВЛИЯНИЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ВВЕДЕНИЯ ТЕСТОСТЕРОНА НА ИНДУКЦИЮ ЦИТОХРОМА P-450 В ПЕЧЕНИ САМОК КРЫС ФЕНОБАРБИТАЛОМ

И Московский медицинский институт им. Н. И. Пирогова и Научно-исследовательский институт по биологическим испытаниям химических соединений, Кунава, Московская область

Одним из возможных подходов к решению проблемы механизма фенобарбиталовой индукции цитохрома P-450 в печени может быть изучение роли гормональных факторов. Данный аспект проблемы исследован недостаточно, а имеющиеся в литературе данные противоречивы. Оррениус и соавт. на основании опытов с адреналэктомированными и кастрированными животными пришли к заключению о существовании корреляции между стероидным статусом организма и степенью фенобарбиталовой индукции микросомальных оксигеназ и цитохрома P-450 [1]. Этот вывод, однако, оспаривается в работах других авторов [2, 3]. Ранее нами было показано, что введение самкам крыс тестостерона заметно усиливает вызываемую фенобарбиталом индукцию цитохрома P-450 и активность зависимых от него монооксигеназ печени [4]. На самцах подобного эффекта тестостерона не наблюдалось. В настоящей работе проводится дальнейшее исследование обнаруженного эффекта с целью установления зависимости его величины от длительности обработки животных гормоном.

### М е т о д и к а

В опытах использовали самок крыс массой 150—180 г. Животным ежедневно в течение указанного времени вводили внутривенно 5% масляный раствор тестостерона-пропионата в дозе 50 мг/кг в объеме 0,1 мл на 100 г массы тела, а за 1 или 2 сут до декантации крыс вводили фенобарбитал натрия в дозе 80 мг/кг. Контрольным животным вводили оливковое масло или 0,9% NaCl в соответствующем объеме. Готовили гомогенаты и выделяли микросомную фракцию из печени крыс дифференциальным центрифугированием по методике, описанной ранее [4]. Содержание цитохрома P-450 в 20% гомогенатах печени определяли по методу, описанному в работе [5], а во фракции микросом — по методу Омуре и Сато [6] на двухлучевом дифференциальном спектрофотометре «Amipco DW-2». Концентрацию белка в препаратах определяли с реактивом Фолина по прописи, рекомендованной для работы с микросомной фракцией [7]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

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

Введение тестостерона самкам крыс в течение 8 сут не вызывает заметного изменения в содержании цитохрома P-450 в печени, но у крыс, которым вводили тестостерон, однократная инъекция фенобарбитала вызывает через 24 ч значительно большую индукцию цитохрома P-450 по сравнению с таковой у животных, не подвергавшихся гормональной обработке (см. таблицу). Различие в уровне цитохрома P-450 между двумя группами животных достигало в микросомной фракции 64%, а в гомогенатах печени — 73% (различие статистически достоверно с уровнем значимости  $P < 0,05$ ). Воздействие тестостерона на величину фенобарбиталовой индукции не усиливается, а даже несколько понижается при введении фенобарбитала в течение 2 сут (см. таблицу).

В дальнейших экспериментах содержание цитохрома P-450 определяли в гомогенатах печени только через 24 ч после введения фенобарбитала. Были поставлены опыты по изучению зависимости величины фенобарбиталовой индукции от длительности предварительной обработки крыс тестостероном. Результаты приведены на рисунке. Как следует из рисунка, исследуемая зависимость имеет двухфазный характер. Статистически значимое ( $P < 0,05$ ) увеличение степени фенобарбиталовой индукции, составляю-

щее 24 %, наблюдается уже после однократного введения тестостерона. Затем эффект ослабляется и после 3-кратной инъекции гормона различие в индукции фенобарбиталом цитохрома Р-450 у крыс, которым вводили тестостерон, и у животных без гормональной обработки не выявляется. Однако, начиная с 4-х суток введения гормона, вновь отмечается значитель-

**Влияние тестостерона (Т) на индукцию цитохрома Р-450 в печени фенобарбиталом (Ф)**

Схема введения	Препарат	Концентрация цитохрома Р-450, нмоль/мг белка			
		контроль	Т	Ф	ТФ
Т—8 дней, Ф—1 день	Микросомы	0,86	0,76	1,03	1,70 (+ 64)
Т—8 дней, Ф—1 день	Гомогенат	0,198±0,008	0,207±0,013	0,310±0,041	0,540±0,017 (+ 73)
Т—8 дней, Ф—2 дня	»	0,183±0,076	—	0,320±0,065	0,470±0,062 (+ 48)

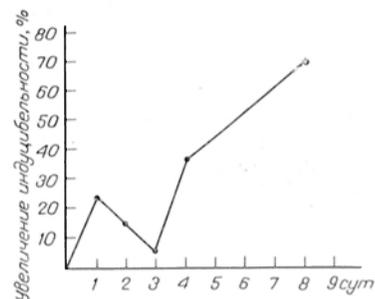
Примечание. В скобках—изменения в процентах по отношению к группе Ф.

ное увеличение степени индукции, вызываемой фенобарбиталом, прогрессивно нарастающее к 8-м суткам.

Полученная закономерность свидетельствует о сложном характере гормонального воздействия на процесс индукции цитохрома Р-450. Причина двухфазности эффекта тестостерона во времени пока неясна. Можно лишь предположить, что увеличение индуцирующего действия фенобарбитала через 1 сут после начала введения гормона (первая фаза) отражает первичную реакцию организма на стероид, затем в результате развивающегося противодействия системы адаптации, стремящейся вернуть организм к исходному состоянию (например, в результате активации системы окисления и выведения тестостерона), величина эффекта снижается почти до нуля, а вторичное увеличение индуктивности, наступающее через 4 сут гормональной обработки, связано, по-видимому, со стойкой перестройкой механизма индукции, обусловленной изменением гормонального статуса.

Таким образом, для максимального проявления эффекта тестостерона на фенобарбиталовую индукцию цитохрома Р-450 требуется не менее 8 сут предварительной обработки крыс гормоном. Следует отметить, что в работах других авторов показано, что для развития максимального собственного индуцирующего действия тестостерона на активность N-деметилазы этилморфина в микросомах печени самок крыс (в отсутствие фенобарбитала) требуется достаточно продолжительное время — от одной до нескольких недель [8, 9]. По-видимому, тестостерон может быть одним из регуляторов системы индукции микросомальных монооксигеназ.

Регулирующее влияние тестостерона может быть направлено либо на увеличение степени максимальной индукции фенобарбиталом уровня цитохрома Р-450, либо на увеличение темпов индукции, т. е. скорости нарастания уровня цитохрома при обработке животных фенобарбиталом. Оказалось, что при увеличении времени введения фенобарбитала до 8 сут (при



Зависимость воздействия тестостерона (Т) на индукцию цитохрома Р-450 фенобарбиталом (Ф) от длительности гормональной обработки.

По оси абсцисс — продолжительность введения тестостерона, по оси ординат отложена величина:

$$\left( \frac{\text{цитохром Р-450 в группе ТФ}}{\text{цитохром Р-450 в группе Ф}} - 1 \right) \times$$

$\times 100\%$ . Средние величины содержания цитохрома Р-450: в контрольной группе —  $0,208 \pm 0,016$  нмоль/мг белка, в группе Ф —  $0,380 \pm 0,040$  нмоль/мг белка.

одновременном введении и тестостерона) усиливающий эффект гормона составляет всего около 20 %, в то время как при одно- и двухдневном введении фенобарбитала этот эффект выражался величинами 73 и 48 % соответственно (см. таблицу). Следовательно, можно предполагать, что тестостерон влияет главным образом на скорость нарастания уровня цитохрома P-450 при индукции фенобарбиталом, а не на изменение максимально возможной степени индукции.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Orrenius S., Das M., Gnosspelius Y.* — In: *Microsomes and Drug Oxidations*. Ed. J. R. Gillette. New York, 1969, p. 251—270.
2. *Marshall W. J., McLean A. E. M.* — *Biochem. J.*, 1969, v. 115, p. 27—28.
3. *Marshall W. J.* — *Biochem. Pharmacol.*, 1971, v. 20, p. 1723—1725.
4. *Чистяков В. В., Приходько А. З.* — *Биохимия*, 1979, т. 44, с. 1630—1634.
5. *Matsubara T., Koike M., Touchi A. et al.* — *Analyt. Biochem.*, 1976, v. 75, p. 596—603.
6. *Omura T., Sato R.* — *J. biol. Chem.*, 1964, v. 239, p. 2370—2378.
7. *Albro P. W.* — *Analyt. Biochem.*, 1975, v. 64, p. 485—493.
8. *Kramer R. E., Greiner J. W., Canady W. R. et al.* — *Biochem. Pharmacol.*, 1975, v. 24, p. 2097—2099.
9. *Hanrick M. E., Zampaglione N. G., Stripp B. et al.* — *Ibid.*, 1973, v. 22, p. 293—310.

Поступила 18/II 1980 г.

#### EFFECT OF THE LONG-TERM ADMINISTRATION OF TESTOSTERONE ON INDUCTION OF CYTOCHROME P-450 IN RAT FEMALE LIVER TISSUE USING PHENOBARBITAL

V. V. Chistyakov, A. Z. Prikhod'ko

N. I. Pirogov II Medical School, Moscow

Research Institute for Biological Testing of Chemical Compounds, Moscow Region, Kupavna

A preadministration of testosterone propionate into rat females within 8 days caused an increase in the inducing effect of phenobarbital (after its single injection) on the content of cytochrome P-450 in liver tissue. The administration of testosterone did not affect the content of the enzyme in liver tissue. As shown in the experiments on phenobarbital induction of the enzyme as a function of duration of testosterone administration, two maximal peaks, within 1 and 8 days, were observed after preadministration of the hormone. The hormone influenced mainly on the rate of the increase in cytochrome P-450 content but not on the degree of its induction.

УДК 616.153.915-008.61-092.9-07:612.74.014.21.015.32

М. Н. Калинин, С. А. Голованов, Д. И. Бельченко

#### ВЛИЯНИЕ ГИПЕРЛИПОПРОТЕИДЕМИИ НА ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА МИОКАРДА КРОЛИКОВ

Кафедра патологической физиологии Калининского медицинского института

Исследование, проведенное нами ранее, показало, что развитие у кроликов экспериментальной гиперлипопротеидемии вызывает развитие атеросклероза, сопровождается существенным увеличением содержания свободных жирных кислот (СЖК) и других липидов в миокарде желудочков и предсердий животных II I. Согласно современным представлениям, подобные расстройства липидного метаболизма миокарда, особенно обмена СЖК, возникающие в условиях развития атеросклероза и усугубляющиеся при коронарной недостаточности, являются важным биохимическим механизмом развития нарушений сердечной деятельности. Избыток СЖК в сердечной мышце на фоне обменных и гормональных нарушений, наблюдающихся при атеросклерозе коронарных артерий и ишемии миокарда [2], обладает выраженным кардиотоксическим свойством, проявляющимся в увеличении потребности сердца в кислороде [3, 4], разобщении окислительного фосфорилирования [5], ухудшении энергетического обеспечения функ-

ционирования мышцы сердца [3, 6], снижении ее сократительной способности [3, 5, 7] и возникновении аритмий [4, 6, 8].

Однако результаты проведенного нами исследования показателей липидного обмена в цельном миокарде нуждаются в дальнейшей детализации с целью понимания более интимных механизмов развития функциональных изменений в сердце в условиях атерогенеза. Безусловно, значительно более ценным в этом плане представляется исследование липидного состава субклеточных структур миокардиоцитов, ответственных за обеспечение ритмичной сократительной деятельности сердечной мышцы.

По мнению Опи, одним из механизмов, обуславливающих появление эктопических очагов электрической активности в миокарде и возникновение аритмий, является способность СЖК связывать ионы  $Ca^{2+}$  и изменять проницаемость клеточных мембран для катионов, что приводит к возникновению электрической нестабильности сердца и развитию аритмий. В то же время известно, что главным депо  $Ca^{2+}$  в кардиомиоцитах является саркоплазматический ретикулум (СПР), регулирующий путем изменения скорости высвобождения ионов  $Ca^{2+}$  процессы сокращения и расслабления сердечной мышцы [9]. В связи с этим можно предположить, что связывание накапливающимися при атерогенезе СЖК ионов  $Ca^{2+}$  в месте их депонирования, т. е. в СПР, может вызвать нарушение внутриклеточного транспорта  $Ca^{2+}$  в миокарде со всеми вытекающими отсюда последствиями. Поэтому нами было предпринято исследование содержания СЖК и других липидов в СПР миокарда кроликов с экспериментальной гиперлиппротеидемией, являющейся важнейшим метаболическим фактором развития атеросклероза.

#### Методика

Для воспроизведения гиперлиппротеидемии 16 кроликам в течение 2—2½ мес внутривенно вводили гомологичную суммарную фракцию пре-β- и β-липопротеидов (ЛП), выделенную из сыворотки крови интактных животных-доноров. 13 интактных кроликов использовали для контрольных исследований. Атерогенные ЛП выделяли из сыворотки крови животных гепарин-кальциевым методом [10]. Введение растворенных в физиологическом растворе хлорида натрия ЛП осуществляли 2—3 раза в неделю. До начала и после завершения курса введения ЛП в сыворотке крови животных определяли концентрацию суммарной фракции пре-β- и β-ЛП [11], холестерина и СЖК.

В качестве объекта исследования был выбран левый желудочек миокарда, поскольку этот отдел сердца наиболее часто поражается атеросклерозом, а также именно в левом желудочке чаще всего возникают аритмии, заканчивающиеся летально. Фракции СПР выделяли из мышцы левого желудочка по методу Д. О. Левицкого и соавт. [12].

Из сыворотки крови и СПР миокарда получали отмытый от нелипидных примесей общий липидный экстракт [13], далее проводили фракционирование липидов методом проточной горизонтальной тонкослойной хроматографии [14] с использованием системы растворителей нейтральный гексан — диэтиловый эфир — ледяная уксусная кислота (75 : 15 : 1,25 по объему). Количественное определение липидных фракций осуществляли спектрофотометрически [15]. В суспензии СПР определяли количество белка [16].

#### Результаты и обсуждение

Длительное введение кроликам атерогенных ЛП вызывало развитие у животных-реципиентов выраженной стабильной гиперлиппротеидемии: концентрация суммарной фракции пре-β- и β-ЛП и общего холестерина в сыворотке крови кроликов после завершения введения им ЛП составляла соответственно  $573,9 \pm 72,47$  и  $153,6 \pm 15,25$  мг % и значительно превосходила исходное содержание этих веществ, которое равнялось соответственно  $180,9 \pm 15,79$  мкг % ( $P < 0,001$ ) и  $67,6 \pm 6,07$  мг % ( $P < 0,001$ ). Количество сывороточных СЖК возросло с  $863,5 \pm 163,43$  до  $1892,6 \pm 348,04$  мкэкв/л ( $P = 0,012$ ).

Как уже указывалось [11], развитие гиперлиппротеидемии у кроликов приводит к статистически достоверному нарастанию количества общих липидов в миокарде левого желудочка (со  $129,4 \pm 12,35$  до  $179,5 \pm 13,33$  мг/г белка;  $P < 0,05$ ). Повышение содержания общих липидов в сердечной мышце животных обусловлено статистически достоверным увеличением концентрации всех липидных компонентов. В наибольшей степе-

ни возрастало количество СЖК (в 2,5 раза), в наименьшей — количество фосфолипидов (в 1,2 раза). Содержание свободного холестерина, его эфиров и триглицеридов увеличивалось соответственно в 2,2, 2,0 и 1,6 раза.

Результаты исследования липидного состава СПР миокарда подопытных и интактных кроликов представлены в таблице.

Содержание липидов и липидных фракций в СПР миокарда кроликов после введения им атерогенных ЛП

Объект исследования	Общие липиды, мкг/мкг белка	Фосфолипиды	Общий холестерин	Свободный холестерин	Эфиры холестерина	СЖК	Триглицериды
Контроль	0,469 ± 0,043 (13)	382,6 ± 30,0 (14)	45,5 ± 3,60 (14)	35,2 ± 3,10 (14)	10,2 ± 1,58 (14)	26,2 ± 2,38 (13)	21,3 ± 2,69 (14)
Опыт	0,501 ± 0,039 (16)	395,8 ± 42,0 (16)	49,4 ± 5,07 (14)	38,5 ± 3,85 (16)	11,0 ± 1,63 (14)	35,8 ± 3,86 (15)	28,2 ± 3,13 (16)
P	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,04	>0,05

Примечание. В скобках — число животных.

Качественный состав липидов СПР левого желудочка в норме и при гиперлиппротеидемии был одинаковым. В СПР миокарда кроликов обнаружены все основные классы липидов: фосфолипиды, свободный и эстерифицированный холестерин, триглицериды и СЖК. Подавляющая часть липидов СПР интактных животных и кроликов с гиперлиппротеидемией представлена фосфолипидами.

Повышение концентрации атерогенных ЛП в крови не сопровождается статистически достоверным изменением содержания общих липидов в СПР миокарда левого желудочка кроликов. Не обнаружено в СПР при гиперлиппротеидемии и статистически достоверных изменений количества фосфолипидов, триглицеридов, свободного и эстерифицированного холестерина по сравнению с контрольными показателями (см. таблицу). В то же время содержание СЖК в СПР миокарда подопытных кроликов значительно превосходило их количество у интактных животных ( $26,2 \pm 2,38$  мкг/мг белка;  $P=0,04$ ) и составляло  $35,8 \pm 3,86$  мкг/мг белка.

Таким образом, можно заключить, что в то время, как развитие экспериментальной гиперлиппротеидемии сопровождается увеличением концентрации общих липидов, фосфолипидов, холестерина, триглицеридов и СЖК в цельном миокарде левого желудочка у кроликов, изменения липидного состава СПР мышцы сердца характеризуются лишь существенным накоплением СЖК. Можно полагать, что повышение содержания фосфолипидов, холестерина и триглицеридов в миокарде при атерогенезе обусловлено изменением липидограммы различных субклеточных структур миокардиоцитов, но не СПР. Действительно, при гиперлиппротеидемии и гиперхолестеринемии показано увеличение содержания этих липидных фракций в цитоплазме [17], митохондриях [18, 19] и ядре [17] клеток мышцы сердца кроликов. Нарушения липидного метаболизма миокарда, возникающие в условиях, способствующих атерогенезу, проявляются в СПР миокардиоцитов избирательным накоплением СЖК.

Возможными причинами накопления СЖК в СПР миокарда при гиперлиппротеидемии являются следующие. Во-первых, это увеличение содержания СЖК в крови, так как величина миокардиальной экстракции этих веществ прямо пропорциональна их количеству в сыворотке крови [20]. Во-вторых, принимая во внимание имеющиеся в литературе сведения о подавлении активности окислительно-восстановительных ферментов в сердечной мышце и уменьшении поглощения сердцем кислорода при гиперлиппротеидемии [21—23], можно полагать, что нарастание СЖК в СПР кроликов-реципиентов связано и с торможением их окисления. В-третьих, что наиболее вероятно, в накоплении СЖК именно в СПР имеет значение и способность этих липидов образовывать плохо метаболизирующие нерастворимые соли с ионами  $Ca^{2+}$ , концентрация которых в СПР очень значительная.

Способность СЖК связывать ионы  $\text{Ca}^{2+}$  и нарушать проницаемость клеточных мембран [4, 6] может приводить к нарушению функционирования кальциевого насоса миокардиоцитов и изменению проницаемости саркоплазматических мембран для катионов. Это может быть одной из причин возникновения аритмий и понижения контрактильной способности мышцы сердца, наблюдающихся при нарастании миокардиальных СЖК в условиях развития атеросклероза и его осложнений [3—6].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Калинин М. И. — Кардиология, 1978, № 4, с. 127—129.
2. Бельченко Д. И., Капустин А. В., Калинин М. И. и др. — Там же, 1979, № 5, с. 49—54.
3. Challoner D. R., Steinberg D. — Am. J. Physiol., 1966, v. 210, p. 280—286.
4. Kurien V. A., Oliver M. F. — Lancet, 1970, v. 1, p. 813—815.
5. Зайдлер Я. И., Дулицкая Р. А. — Кардиология, 1967, № 12, с. 50—54.
6. Opie L. H. — Am. J. Cardiol., 1975, v. 36, p. 938—953.
7. Challoner D. R. — Lancet, 1966, v. 2, p. 681—683.
8. Oliver M. F., Kurien V. A., Greenwood T. W. — Ibid., 1968, v. 1, p. 710—714.
9. Чазов Е. И. — Тер. арх., 1974, № 11, с. 3—8.
10. Климов А. И., Ловягина Т. И., Баньковская Э. Б. — Лабор. дело, 1966, № 5, с. 276—280.
11. Burstein M., Samaille J. — Presse méd., 1958, v. 66, p. 974—975.
12. Левцкий Д. О., Алиев М. К., Левченко Д. С. и др. — Биохимия, 1976, т. 41, № 5, с. 854—863.
13. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. H. — J. biol. Chem., 1957, v. 226, p. 497—509.
14. Покровский Е. А., Карганолов А. В. — Лабор. дело, 1972, № 6, с. 337—341.
15. Marsh J., Weinstein D. — J. Lipid Res., 1966, v. 7, p. 574—576.
16. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. et al. — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265—275.
17. Белиженко В. Д., Одушко Н. П., Гуревич Е. Н. — Кардиология, 1969, № 10, с. 138—139.
18. Чернышева Г. В., Лебедева Л. Н., Стойда А. В. и др. — Там же, 1973, № 12, с. 53—59.
19. Чернышева Г. В., Марцевич М. С., Лебедева Л. Н. и др. — Пат. физиол., 1976, № 5, с. 35—40.
20. Evans J. R., Opie L. H., Shipp J. C. — Am. J. Physiol., 1963, v. 205, p. 776—770.
21. Креслов В. В. Состояние окислительных процессов в тканях аорты и миокарда кроликов при старении и атеросклерозе. (Экспериментальные исследования). Автореф. дис. канд. М., 1969.
22. Иванов В. И. К вопросу о патогенезе атеросклероза. Автореф. дис. докт. М., 1974.
23. Креслов В. В., Мушкачева Г. С. — Вопр. питания, 1965, № 5, с. 51—56.

Поступила 26/11 1980 г.

#### EFFECT OF HYPERLIPOPROTEINEMIA ON LIPID COMPOSITION OF SARCOPLASMIC RETICULUM OF RABBIT MYOCARDIUM

M. N. Kalinkin, S. A. Golovanov, D. I. Bel'chenko

Chair of Pathophysiology, Medical School, Kalinin

Free fatty acids accumulated in sarcoplasmic reticulum of rabbit myocardium during experimental hyperlipoproteinemia. Content of other lipid fractions (phospholipids, cholesterol, triglycerides) was unaltered in heart sarcoplasmic reticulum under conditions of hyperlipoproteinemia.

УДК 616.153.922-008.61-092.9-085.355:577.152.11

А. В. Титов, В. В. Слободская, Е. В. Тарасова, И. М. Терешин

#### ВЛИЯНИЕ ХОЛЕСТЕРИНОКСИДАЗЫ НА ОБРАТНОЕ РАЗВИТИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИИ У КРОЛИКОВ

Всесоюзный научно-исследовательский технологический институт антибиотиков и ферментов, Ленинград

Холестериноксидаза ( $\beta$ -гидростероид оксидаза), выделенная из мицелия *Actinomyces lavendulae*, окисляет холестерин в сыворотке крови в отсутствие детергентов. Период полунинактивации фермента в сыворотке

крови при 37 °С равен 90 мин. Внутривенное введение фермента (0,5—2,0 ед/кг) кроликам с высоким уровнем холестерина в крови вызывает уменьшение содержания холестерина. Степень этого понижения находится в прямой зависимости от дозы препарата. Острая токсичность препаратов холестериноксидазы для мышей понижается по мере их очистки. Холестериноксидаза, продуцируемая *Act. lavendulae*, может рассматриваться в качестве потенциального гипохолестеринемического средства.

В настоящее время нет достаточно эффективных средств для понижения содержания холестерина в крови [1, 2]. Было высказано предположение о возможности регулирования уровня холестерина посредством введения в организм ферментов микробного происхождения, разрушающих холестерин [3]. Холестериноксидазы, выделенные из некоторых микроорганизмов, в присутствии детергентов окисляют холестерин в водных растворах, сыворотке крови [4], а также в  $\alpha$ - и  $\beta$ -липопротеидах выделенных из крови [5]. В настоящее время ряд зарубежных фирм выпускают коммерческие препараты холестериноксидаз, которые широко используются для определения уровня холестерина в крови. Некоторые микроорганизмы продуцируют холестериноксидазы, которые окисляют холестерин в отсутствие детергентов. К их числу относится *Act. lavendulae*. Фермент данного продуцента окисляет холестерин в водных растворах, сыворотке крови и гомогенатах атеросклеротически измененной аорты человека в отсутствие детергентов [6]. Введение такого фермента морским свинок с высоким содержанием холестерина в крови вызывает понижение уровня холестерина [7]. Задачей настоящей работы явилось изучение влияния холестериноксидазы, выделенной из *Act. lavendulae*, на процессы обратного развития экспериментальной гиперхолестеринемии у кроликов.

#### М е т о д и к а

В работе использовали препараты холестериноксидазы, выделенной во Всесоюзном научно-исследовательском технологическом институте антибиотиков и ферментов из мицелия *Act. lavendulae* [8]. Они представляли собой растворы с удельной активностью 1—5 ед. на 1 кг белка. Активность препарата определяли спектрофотометрически [9] при 20 °С, принимая за единицу такое количество фермента, которое окисляет 1 мкмоль холестерина за 1 мин. В опытах *in vitro* оценивали устойчивость фермента в сыворотке крови и его способность окислять холестерин. При этом использовали сыворотки от кроликов с гиперхолестеринемией. К сывороткам крови добавляли измеренное количество фермента (0,02—0,10 ед/мл) и инкубировали при 37 °С. В разные сроки (0,5—6 ч) после начала инкубации брали пробы и измеряли холестериноксидазную активность спектрофотометрически [9] и содержание неэстерифицированного холестерина ферментативным методом [10]. Для изучения влияния холестериноксидазы на гиперхолестеринемию поставлены опыты на 32 кроликах. Повышение уровня холестерина в крови животных вызывали путем скармливания с овощами холестерина в количестве 0,5 г на животное в сутки в течение 60—120 дней. Кроликов, относительно резистентных к сдвигам холестерина в крови при скармливании холестерина, в опытах не использовали. В период введения фермента животных содержали на обычном виварном рационе и делили на 2 группы, равноценные по уровню холестерина. Животным одной из них внутривенно вводили 0,5 мл раствора холестериноксидазы в дозах 0,5—2,0 ед/кг (опыт), а второй — равный объем 0,85% раствора хлористого натрия. Перед введением фермента и после 5—6 инъекций препарата брали пробы крови и определяли содержание холестерина в крови калориметрически [11]. Результаты подвергали математической обработке, рассчитывая среднее арифметическое ( $M$ ), стандартную ошибку ( $m$ ) и величины  $t$  и  $P$  [12]. Различия между сравниваемыми величинами считали значимыми, если  $P \leq 0,05$ . Токсическое действие препаратов оценивали в экспериментах на мышах, которым внутривенно вводили 0,3 мл раствора фермента. Выживаемость их регистрировали в течение 3 сут. На основании данных о гибели животных рассчитывали величину ЛД<sub>50</sub>.

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

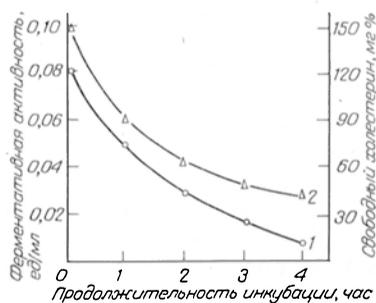
Результаты изучения устойчивости фермента *in vitro* показали, что добавление холестериноксидазы к сыворотке крови в концентрации 0,08 ед/мл и инкубация проб при 37 °С приводят к снижению активности фермента (см. рисунок). В течение 1 ч активность уменьшилась на 35%

2 ч — на 65 % и 4 ч — на 81 % по отношению к исходной величине. Расчеты показали, что период полуинактивации фермента в сыворотке крови кролика при 37 °С равен 90 мин.

Результаты оценки инактивации фермента в сыворотке крови согласуются с изменениями концентрации неэстерифицированного (свободного) холестерина в крови. Через 1 ч после добавления фермента в концентрации 0,1 ед/мл свободный холестерин в сыворотке не обнаруживался, а концентрация эфиров холестерина существенно не изменялась. Понижение концентрации фермента до 0,06 ед/мл приводило к уменьшению уровня свободного холестерина в течение 1 ч на 40 % (со 150 до 90 мг %), 2 ч — на 87 % и 4 ч — на 72 %. Увеличение сроков инкубации до 5 и 6 ч вызвало незначительное уменьшение концентрации холестерина, что находит объяснение в инактивации фермента к этим срокам наблюдения.

Таким образом, холестериноксидаза в отсутствие детергентов за ограниченный срок способна окислить значительные количества холестерина. Эти данные позволяют предположить наличие гиполипидемических свойств у изученных препаратов холестериноксидазы.

В опытах на кроликах изучали действие препаратов холестериноксидазы разной степени очистки. В I серии использовали препарат с удельной активностью 1 ед. на 1 мг белка в дозе 0,5 ед/кг. Пятикратное введение фермента в такой дозе вызвало уменьшение содержания холестерина в среднем на  $43 \pm 5$  %, а у животных контрольной группы за тот же срок уровень холестерина понизился на  $33 \pm 8$  % (см. таблицу). Различия меж-



Изменение содержания холестерина в сыворотке крови кролика и активности холестериноксидазы после добавления фермента в концентрации 0,06—0,08 ед/мл.

1 — ферментативная активность; 2 — свободный холестерин.

#### Влияние холестериноксидазы на содержание холестерина в крови при обратном развитии экспериментальной гиперхолестеринемии

Группа животных	Доза фермента, ед/кг	Число животных	Концентрация холестерина, мг%			
			до введения фермента	число инъекций		уменьшение по сравнению с исходным уровнем, %
				5	6	
Контроль	0	4	544 ± 170	374 ± 125	—	33 ± 8
Опыт	0,5	4	471 ± 49	270 ± 39	—	43 ± 5
Контроль	0	6	425 ± 60	—	288 ± 32	32 ± 3
Опыт	1,0	6	500 ± 64	—	243 ± 25	52 ± 4*
Контроль	0	6	807 ± 132	—	515 ± 65	36 ± 4
Опыт	2,0	6	811 ± 60	—	202 ± 26*	75 ± 3*

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

ду опытной и контрольной группам оказались недостоверны ( $P > 0,05$ ). Иные результаты были получены при использовании более очищенных препаратов с удельной активностью 5—6 ед/мг белка (II серия). При применении таких препаратов увеличение дозы не вызывало гибели животных как при однократном их введении в дозе 3 ед/кг, так и при многократном в дозе 2 ед/кг.

Шестикратное введение фермента в дозе 1,0 ед/кг вызвало понижение содержания холестерина на  $52 \pm 4$  % по отношению к исходной величине (см. таблицу). За этот срок у животных, не получавших фермента, аналогичная величина составила  $32 \pm 3$  %. Различия в изменении уровня холесте-

рина у животных опытной и контрольной групп оказались статистически значимы ( $P < 0,01$ ). Увеличение дозы препарата до 2 ед/кг вызвало более резкое понижение уровня холестерина (с 811 до 202 мг %). У животных контрольной группы содержание холестерина было в 2,5 раза выше, чем у подопытных (см. таблицу). Последующее содержание животных на обычном виварном рационе в течение 10 сут после окончания опыта привело к постепенному падению уровня холестерина, однако различия в содержании его между опытной и контрольной группой сохранились ( $P < 0,01$ ). У животных опытной группы концентрация холестерина в крови была в 2,6 раза ниже (147 мг %), чем у контрольных (390 %).

При изучении острой токсичности использованных нами препаратов холестериноксидазы выявлены значительные различия между ними. Величина  $LD_{50}$  для мышей у препаратов с удельной активностью 1 ед/мг колебалась от 10 до 11 ед/кг, а у более очищенных препаратов с удельной активностью 5—6 ед. на 1 мг белка она возросла до 38—41 ед/кг.

Представленные материалы показывают, что холестериноксидаза из *Act. lavendulae* в условиях *in vitro* способна окислять холестерин в сыворотке крови в отсутствие детергентов. Такая способность была отмечена японскими авторами у холестериноксидазы, выделенной из *Streptomyces* [5]. Используемая нами холестериноксидаза быстро инактивируется в сыворотке крови. Срок ее действия ограничен 2—3 ч, но и за это время она способна окислить значительное количество холестерина. При добавлении фермента в концентрации 0,06 ед/мл содержание холестерина в сыворотке за 3 ч инкубации снижалось на 102 мг %.

Результаты экспериментов на кроликах показывают, что холестериноксидаза из *Act. lavendulae* вызывает понижение уровня холестерина в крови животных с экспериментальной гиперхолестеринемией. Как известно, коммерческие препараты зарубежных фирм, выделенные из других микроорганизмов, не окисляют холестерин в отсутствие детергентов [5]. Можно предположить, что они не обладают гипохолестеринемическими свойствами. Степень понижения уровня холестерина в крови находится в прямой зависимости от дозы препарата. Посредством относительно небольшого числа инъекций удастся значительно понизить содержание холестерина в крови животных с высоким уровнем его. Механизм действия холестериноксидазы заключается в окислении холестерина в холестерон, что отличает ее от известных гипохолестеринемических средств [1]. Можно предположить, что сочетанное применение холестериноксидазы с известными гипохолестеринемическими средствами приведет к суммированию их эффектов.

Используемые нами препараты холестериноксидазы не представляли индивидуального белка и по степени чистоты значительно различались. Эксперименты на мышах показали неодинаковое их токсическое действие. Повышение чистоты препаратов в 5 раз (с 1 до 5 ед. на 1 мг белка) привело к возрастанию величины  $LD_{50}$  в 4 раза (с 10 до 40 ед/кг). Это дает основание надеяться, что дальнейшая очистка препаратов холестериноксидазы приведет к ослаблению их токсического действия.

Представленные результаты опытов на кроликах находятся в согласии с данными, полученными ранее на морских свинках [7]. Они свидетельствуют о том, что холестериноксидаза, продуцируемая *Actinomyces lavendulae*, вызывает высокий гипохолестеринемический эффект в экспериментах на животных двух видов и может рассматриваться в качестве потенциального гипохолестеринемического средства.

Особенности механизма действия холестериноксидазы создают предпосылку возможности комбинированного ее использования с известными гипохолестеринемическими средствами.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Машковский М. Д. Лекарственные средства. М., 1977, т. 2.
2. Чазов Е. И., Метелица В. И. — Хим.-фарм. ж., 1979, № 10, с. 3—12.
3. Имишенецкий А. А., Ефимочкина Е. Ф., Никитина Л. Е. и др. — Докл. АН СССР, 1966, т. 170, с. 960—964.

пературе 2–4 °С сопровождается достоверным снижением в них процессов гидроксилирования АН на 5-й день, а ДМА и АП — на 6-й день хранения. Гидроксилирование ЭМ достоверно повышается в 1-й же день хранения, хотя к 6-му дню приближается к контрольному уровню. При этих условиях хранения функциональное состояние митохондрий в гепатоцитах  $\frac{V_{\text{днФ}}}{V_{\text{сухн}}}$

достоверно снижалось уже через 20 ч хранения ( $1,6 \pm 0,1$  по сравнению с контролем —  $2,2 \pm 0,1$ ;  $P < 0,002$ ). Результаты этих исследований показывают, что гипотермическое хранение изолированных гепатоцитов сопровождается довольно быстрым снижением сопряжения окисления и фосфорилирования в митохондриях, в то время как процессы гидроксилирования субстратов мембранами эндоплазматического ретикулума гораздо более устойчивы.

Ранее нами показано, что изолированные микросомы обладают высокой устойчивостью при их быстром замораживании до  $-196$  °С [12, 13]. Вместе с тем оставалось неясным, сохраняет ли система микросомального окисления свои свойства в составе изолированных клеток при использовании аналогичных скоростей замораживания.

В табл. 2 представлены данные по гидроксилированию субстратов в изолированных клетках печени, быстро замороженных до  $-196$  °С. При использовании в качестве субстрата реакции ДМА скорость реакции, выраженная в нмоль  $\cdot$  мин $^{-1} \cdot$  мг $^{-1}$  белка, составляла 50,6 % от уровня контроля, при использовании АП — 75,1 %, АН — 50 %. Вместе с тем видно, что гидроксилирование ЭМ в клетках после их замораживания, наоборот, интенсифицировалось и скорость реакции увеличилась на 45,3 %. Одновременно с этим мы выявили, что в гепатоцитах, быстро замороженных до  $-196$  °С,

Таблица 1  
Скорость гидроксилирования в гепатоцитах (в нмоль ФА  $\cdot$  мин $^{-1} \cdot$  мг $^{-1}$  белка) после хранения при 2–4 °С ( $n = 4$ )

Субстрат	Контроль	6-й день хранения	$P$
ДМА	$3,50 \pm 0,25$	$2,60 \pm 0,20$	$< 0,05$
АП	$2,95 \pm 0,20$	$2,11 \pm 0,15$	$< 0,05$
ЭМ	$1,20 \pm 0,10$	$1,60 \pm 0,12$	$< 0,05$
АН*	$1,16 \pm 0,10$	$1,20 \pm 0,10$	$> 0,1$
	$0,17 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,01$	$< 0,5$

\* В нмолях  $n = \text{АФ} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$  белка.

В табл. 2 представлены данные по гидроксилированию субстратов в изолированных клетках печени, быстро замороженных до  $-196$  °С. При использовании в качестве субстрата реакции ДМА скорость реакции, выраженная в нмоль  $\cdot$  мин $^{-1} \cdot$  мг $^{-1}$  белка, составляла 50,6 % от уровня контроля, при использовании АП — 75,1 %, АН — 50 %. Вместе с тем видно, что гидроксилирование ЭМ в клетках после их замораживания, наоборот, интенсифицировалось и скорость реакции увеличилась на 45,3 %. Одновременно с этим мы выявили, что в гепатоцитах, быстро замороженных до  $-196$  °С,

Таблица 2  
Скорость гидроксилирования субстратов (в нмоль ФА  $\cdot$  мин $^{-1} \cdot$  мг $^{-1}$  белка) в изолированных гепатоцитах после различных режимов замораживания без криопротекторов и в присутствии их ( $n = 4$ )

Субстрат	Режим замораживания					
	одноэтапное до $-196$ °С		многоэтапное до $-196$ °С			
	контроль	замораживание	под защитой ЭГ		под защитой ДМСО	
контроль			замораживание	контроль	замораживание	
ДМА	$3,40 \pm 0,16$	$1,72 \pm 0,12$	$3,43 \pm 0,21$	$2,45 \pm 0,11$	$3,38 \pm 0,21$	$2,71 \pm 0,15$
$P$		$< 0,001$		$< 0,01$		$< 0,05$
АП	$2,69 \pm 0,12$	$2,02 \pm 0,09$	$2,97 \pm 0,16$	$2,39 \pm 0,12$	$3,05 \pm 0,11$	$2,61 \pm 0,10$
$P$		$< 0,01$		$< 0,05$		$< 0,05$
ЭМ	$1,70 \pm 0,10$	$2,47 \pm 0,16$	$1,50 \pm 0,12$	$1,95 \pm 0,11$	$1,95 \pm 0,05$	$2,25 \pm 0,15$
$P$		$< 0,01$		$< 0,05$		$> 0,1$
АН*	$0,22 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,02$	$0,15 \pm 0,01$
$P$		$< 0,01$		$< 0,01$		$< 0,02$

\* В пиколях  $n = \text{АФ} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$  белка.

использовании в качестве субстрата реакции ДМА скорость реакции, выраженная в нмоль  $\cdot$  мин $^{-1} \cdot$  мг $^{-1}$  белка, составляла 50,6 % от уровня контроля, при использовании АП — 75,1 %, АН — 50 %. Вместе с тем видно, что гидроксилирование ЭМ в клетках после их замораживания, наоборот, интенсифицировалось и скорость реакции увеличилась на 45,3 %. Одновременно с этим мы выявили, что в гепатоцитах, быстро замороженных до  $-196$  °С,

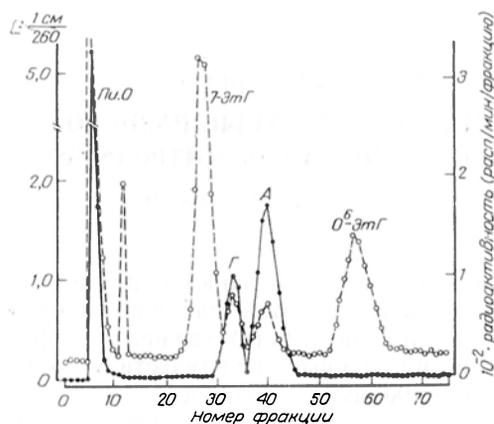
ке [8]. Для инъекции  $^{14}\text{C}$ -ДЭНА растворяли в дистиллированной воде. Добавлением немеченого ДЭНА, приготовленного на кафедре органической химии Ленинградского университета им. А. А. Жданова, его концентрацию доводили до 28 мг/мл и удельную радиоактивность — до 0,784 мКи/ммоль. Раствор канцерогена вводили крысам однократно по 0,5 в дозе 280 мг/кг, которая достаточна для индукции новообразований печени у большинства животных [8]. Крыс забивали декапитацией через 24 и 72 ч после введения ДЭНА. Печень крыс замораживали в жидком азоте и хранили при  $-20^\circ\text{C}$ . ДНК из тканей экстрагировали фенольным методом. Экстракцию ДНК, хроматографию пуриновых оснований и подсчет радиоактивности производили по ранее описанной методике [9]. Пуриновые основания разделяли в колонке сефадекса G-10 и их радиоактивность определяли в сцинтилляционном счетчике «Delta-300» («Searle Analytic, Inc.», США). Положения этилпуринов на хроматограмме определяли в соответствии с описанным для них хроматографическим профилем [10].

В отдельном опыте  $^3\text{H}$ -тимидин (Всесоюзное объединение «Изотоп», Ленинград) вводили внутривенно в дозе 1 мКи/кг крысам тех же возрастных групп через 50 ч после однократного введения немеченого ДЭНА в дозе 280 мг/кг. Животные были забиты через 90 мин после введения тимидина. Количество включившегося в ДНК  $^3\text{H}$ -тимидина выражали в распадах в 1 мин на 1 мг ДНК, концентрацию которой определяли спектрофотометрически [11].

### Результаты и их обсуждение

На рисунке представлена радиохроматограмма ДНК, экстрагированной из печени старых крыс, забитых через 24 ч после введения  $^{14}\text{C}$ -ДЭНА. Можно видеть, что уровни 7-этилгуанина и  $\text{O}^6$ -этилгуанина достаточно высоки. Радиоактивность аденина и гуанина была невысокой.

Через 24 ч после введения канцерогена уровень 7-этилгуанина в ДНК печени был практически одинаковым у молодых и старых крыс, тогда как уровень  $\text{O}^6$ -этилгуанина у старых крыс был почти в 2 раза выше,



Радиохроматограмма на колонке сефадекса G-10 гидролизата ДНК печени старых крыс через 24 ч после введения  $^{14}\text{C}$ -ДЭНА. Пунктирная линия — радиоактивность (в распадах за 1 мин на фракцию); сплошная линия — оптическая плотность  $E_{260}^{1\text{см}}$ . — пиримидиновые олигонуклеотиды; 7 — ЭтГ — 7-этилгуанин; Г — гуанин; А — аденин;  $\text{O}^6$ -ЭтГ —  $\text{O}^6$ -этилгуанин.

чем у молодых (табл. 1). Поэтому и отношение  $\text{O}^6$ -этилгуанин/7-этилгуанин у старых крыс было существенно большим. Через 72 ч после введения  $^{14}\text{C}$ -ДЭНА уровень 7-этилгуанина был ниже, чем через 24 ч у крыс обеих возрастных групп. Однако у молодых животных скорость его снижения была больше, чем у старых. Так, если у молодых крыс он снизился в 2,2 раза, то у старых — в 1,7 раза. Через 72 ч после введения канцерогена  $\text{O}^6$ -этилгуанин радиохроматографически в ДНК печени уже не определялся. По данным литературы [6], через 24 ч после введения ДЭНА отношение  $\text{O}^6$ -этилгуанин/7-этилгуанин в ДНК печени молодых крыс составляло 0,48, что соответствует значению этого показателя в наших опытах. Через 48 ч после введения ДЭНА значение отношения алкилпуринов снизилось на 40% [6].

Наши данные свидетельствуют о том, что через 72 ч происходит полная элиминация  $\text{O}^6$ -этилгуанина, определяемого радиохроматографически, из ДНК печени крыс. Известно, что в то время как снижение уровня 7-алкилгуанина в ДНК происходит в основном спонтанно,  $\text{O}^6$ -алкилгуанин элиминируется энзиматически [7]. Наши данные свидетельствуют, с одной стороны, о замедлении с возрастом темпа спонтанной элиминации 7-этилгуанина из ДНК печени, а с другой — о существенном возрастном снижении темпа репаративного уменьшения уровня  $\text{O}^6$ -этилгуанина. На это указывает существенно более высокое значение отношения этилпуринов у старых крыс че-

7. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al. — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265.
8. Арчаков А. И., Девиченский В. М., Карузина И. И. и др. — Биохимия, 1968, т. 33, № 3, с. 479.
9. Nash T. — Biochem. J., 1953, v. 55, p. 416.
10. Карузина И. И., Арчаков А. И. — В кн.: Современные методы в биохимии. М., 1977, с. 56.
11. Hilton J., Sartorelli A. C. — J. biol. Chem., 1970, v. 245, p. 4187.
12. Лемешко В. В., Кудokoцева Е. В., Белоус А. М. — Биохимия, 1978, т. 43, № 1, с. 72.
13. Макевнина М. Г., Кудokoцева Е. В., Добрецов Г. Е. и др. — Вопр. мед. химии, 1978, № 5, с. 605.
14. Лемешко В. В., Бондаренко В. А., Суббота Н. П. — В кн.: Кробиология и кробиомедицина. Киев, 1976, вып. 2, с. 33.
15. Белоус А. М., Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П. — В кн.: Физико-химические механизмы криоповреждений биологических структур. М., 1978, с. 80.

Поступила 19/V111 1980 г.

## EFFECT OF FREEZING ON HYDROXYLATION IN ISOLATED HEPATOCYTES

*E. V. Kudokotseva, A. D. Gordienko, A. M. Belous*

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kharkov

Rapid freezing of hepatocytes down to  $-196^{\circ}$  was accompanied by a distinct impairment in microsomal oxidation and by complete uncoupling of respiration and oxidative phosphorylation in mitochondria. In the course of multistep freezing activity of the microsomal oxidation system constituted 70.3% with ethylene glycol (EG) and 78% — with dimethyl sulfoxide (DMSO), while the functional activity of mitochondria was maintained by 30% and 40% if EG DMSO were used, respectively.

УДК 612.82.015.1-06:[612.592+612.451

*Т. Н. Даудова, И. С. Мейланов, Э. Э. Эмирбеков*

## ТЕМПЕРАТУРНАЯ ЗАВИСИМОСТЬ АКТИВНОСТИ АЛАНИН-И АСПАРАТ-АМИНОТРАНСФЕРАЗ В МОЗГЕ КРЫС ПРИ ГИПОТЕРМИИ РАЗНОЙ ДЛИТЕЛЬНОСТИ И ПРИ АДРЕНАЛЭКТОМИИ

Дагестанский университет им. В. И. Ленина, Махачкала

Применение глубокой гипотермии, а также пролонгирование этого состояния в практике хирургического вмешательства ограничены из-за развития патологических процессов в головном мозге [1]. Аминотрансферазы играют важную роль в интегративных механизмах метаболизма клеток мозга [2], поэтому исследование изменений активности этих ферментов важно не только для решения ряда практических задач медицины, но и для понимания обмена веществ в мозге при гипотермии. В настоящей работе изложены результаты исследования активности аланин-аминотрансферазы (АЛТ) и аспарат-аминотрансферазы (АСТ) в мозге крыс при длительной гипотермии ( $20^{\circ}\text{C}$ ). В отдельной серии опытов гипотермии подвергались адrenaлэктомированные и ложнопериованные животные.

### Методика

Опыты проведены на белых крысах обоего пола массой 150—200 г. Адrenaлэктомию производили через задний паравертебральный разрез при легком эфирном наркозе. Ложную операцию производили в тех же условиях, но без удаления надпочечников. Исследования начинали через 7 сут после операции. Все оперированные крысы получали 1% раствор NaCl вместо воды. Животных в течение 55—60 мин охлаждали до ректальной температуры  $20-19^{\circ}\text{C}$  в специальной камере, через «рубашку» которой пропускали холодную воду. Ферментативную активность в ткани мозга интактных, ложнопериованных и адrenaлэктомированных животных определяли непосредственно после охлаждения до  $20-19^{\circ}\text{C}$  после пролонгирования гипотермического состояния в течение 1 и 2 ч. Животных быстро декапитировали, извлекали большие полушария и гомогенизировали в охлажденном 0,1 М фосфатном буфере pH 7,4. Активность

9. *Montesano R., Bresil H., Margison G. P.* — *Cancer Res.*, 1979, v. 39, p. 1798—1802.
10. *Goth R., Rajewsky M.* — *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, 1974, v. 71, p. 639—643.
11. *Спириин А. С.* — *Биохимия*, 1958, т. 23, с. 656—662.
12. *Kanagalingam K., Balis M. E.* — *Cancer (Philad.)*, 1975, v. 36, p. 2364—2372.
13. *Lambert B., Ringbord U., Skoog L.* — *Cancer Res.*, 1979, v. 39, p. 2792—2795.
14. *Ванюшин Б. Ф., Бердышев Г. Д.* Молекулярно-генетические механизмы старения. М., 1977.
15. *Craddock V. M., Frei J. V.* — *Brit. J. Cancer*, 1974, v. 30, p. 503—511.
16. *Davies D. L., Bryant G. M., Arcos J. C. et al.* — *J. nat. Cancer Inst.*, 1976, v. 56, p. 1057—1058.

Поступила 17/IV 1980 г.

## ALKYLATION OF LIVER DNA PURINES IN RATS OF DIFFERENT AGE TREATED WITH DIETHYLNITROSAMINE

*A. Ya. Likhachev, V. N. Anisimov, A. I. Ovsyannikov, N. N. Petrov*

Research Institute of Oncology, Leningrad

24 hrs after oral administration of  $^{14}\text{C}$ -diethylnitrosamine (DNA) at a dose of 280 mg/kg into male rats the level of 7-ethyl guanine was similar in both young and old (3 and 14 months, respectively) animals whereas the level of  $\text{O}^6$ -ethylguanine was increased 2-fold higher in old animals. The rate of 7-ethylguanine and  $\text{O}^6$ -ethylguanine elimination from liver DNA was higher in the young rats. The rate of incorporation of  $^3\text{H}$ -thymidine into liver DNA was decreased in the old animals. Administration of DNA (280 mg per kg) 50 hrs before the injection of the labelled thymidine inhibited its incorporation into the liver DNA in the young rats and did not alter the process in the old rats. The data obtained suggest an important role of age-dependent decrease in proliferative processes in liver tissue of the old rats in the response to carcinogenic effect of DNA.

УДК 612.352.3.014.46:615.357.453

*М. И. Савина, С. М. Спивак*

## ВЛИЯНИЕ ГИДРОКОРТИЗОНА ПРИ ЕГО ОДНОКРАТНОМ ВВЕДЕНИИ В РАЗНОЕ ВРЕМЯ СУТОК НА ВКЛЮЧЕНИЕ МЕЧЕНОГО ПРЕДШЕСТВЕННИКА В ЯДЕРНЫЕ БЕЛКИ ИНТАКТНОЙ ПЕЧЕНИ КРЫС

Центральная научно-исследовательская лаборатория II Московского медицинского Института им. Н. И. Пирогова

В регулирующем действии гормонов на многие метаболические процессы существенная роль принадлежит их влиянию на ДНК-зависимый синтез матричных РНК. Так, под действием гидрокортизона повышаются матричная активность хроматина и синтез белков, ускоряется фосфорилирование гистоновых и негистоновых белков, меняется их конформация и, следовательно, функциональная и синтетическая активность ДНК [1—4].

Большинство нормальных тканей обладает неодинаковой чувствительностью к действию гормонов, которая определяется временем его воздействия [5—7]. Ранее нами установлено, что импульсное введение гидрокортизона в разное время суток вызывает изменения в синтезе ядерных белков, наиболее выраженные для гистонов [8].

В данной работе представлены результаты изучения влияния гидрокортизона на интенсивность включения  $^{14}\text{C}$ -лизина в ядерные белки печени крыс в разные периоды суток при однократном отсроченном от времени умерщвления животных введении гормона.

### Методика

Опыты выполнены на 66 беспородных крысах-самцах массой 130 г. Гидрокортизон вводили однократно внутривбрюшинно в дозе 10 мг/кг массы: в I серии экспериментов — в 11 ч дня, во II — в 23 ч, т. е. в точках ранее обнаруженного нами минимального и максимального уровня синтеза ядерных белков у интактных животных [8]. В качестве меченого предшественника использовали  $^{14}\text{C}$ -лизин, который инъецировали тем же способом за  $1\frac{1}{2}$  ч до забоя в дозе 50 мкКи на крысу.

Активность аминотрансфераз (в мкмоль пирувата на 1 г ткани за 30 мин) в ткани мозга крыс при гипотермии (20 °С) разной продолжительности

Условия опыта	АЛТ				АСТ			
	температура инкубации, °С							
	10	20	30	37	10	20	30	37
Контроль	3,2±0,14	9,6±0,50	13,6±0,27	18,2±0,33	12,3±0,89	20,9±0,43	26,17±0,66	34,8±0,53
Гипотермия	2,1±0,13 <0,001	6,8±0,29 <0,001	9,3±0,29 <0,001	12,4±0,58 <0,001	8,3±0,71 <0,001	13,8±0,35 <0,001	19,93±0,81 <0,001	24,2±0,57 <0,001
Гипотермия, пролонгированная 1 ч	2,2±0,25 <i>P</i> <0,05 <i>P</i> <sub>1</sub> <0,01	13,1±0,40 >0,05 <0,001	10,6±0,23 >0,01 <0,001	14,9±0,65 <0,01 <0,02	16,3±0,57 <0,02 <0,001	22,3±0,45 <0,02 <0,001	29,3±0,60 <0,01 <0,001	36,8±0,97 >0,05 <0,001
Гипотермия, пролонгированная 2 ч	3,5±0,19 <i>P</i> >0,05 <i>P</i> <sub>1</sub> <0,01 <i>P</i> <sub>2</sub> <0,001	7,1±0,34 <0,01 <0,001 >0,05	10,4±0,23 <0,001 <0,001 >0,05	16,5±0,45 <0,02 >0,05 <0,001	17,9±0,63 <0,001 >0,05 <0,001	25,8±0,47 <0,001 <0,001 <0,001	29,9±0,47 <0,001 >0,05 <0,001	40,9±0,73 <0,001 <0,001 <0,001

Примечание. *P* — достоверность изменений по сравнению с показателями в контроле; *P*<sub>1</sub> — достоверность изменений по сравнению с показателями кратковременной гипотермии; *P*<sub>2</sub> — достоверность изменений по сравнению с показателями при пролонгированной 1 ч гипотермии.

Таблица 2

Активность аминотрансфераз (в мкмоль пирувата на 1 г ткани за 30 мин) в ткани мозга адrenaлэктомированных крыс при гипотермии (20 °С)

Условия опыта	АЛТ				АСТ			
	температура инкубации, °С							
	10	20	30	37	10	20	30	37
Контроль	3,2±0,14	9,6±0,50	13,6±0,27	18,2±0,33	12,3±0,83	20,9±0,43	26,1±0,66	34,8±0,53
Ложная операция	3,9±0,34 >0,05	9,3±0,38 >0,05	14,6±0,37 >0,05	17,7±0,54 >0,05	11,7±0,93 <0,01	16,8±0,73 <0,001	23,8±0,96 <0,001	29,5±0,66 <0,001
Адреналэктомия	5,6±0,51 <0,01	13,8±0,52 <0,001	17,6±0,47 <0,001	23,3±0,93 <0,001	8,1±0,56 <0,01	13,7±0,44 <0,001	17,4±0,41 <0,001	27,9±0,46 <0,001
Гипотермия ложнооперированных крыс	1,3±0,55 <0,01	2,9±0,18 <0,001	6,8±0,40 <0,001	9,8±1,1 <0,001	15,1±0,37 <0,02	22,2±0,51 <0,001	26,2±0,66 >0,05	31,0±0,53 <0,01
Гипотермия адrenaлэктомированных крыс	4,1±0,14 <0,001	9,1±0,41 >0,05	11,9±0,37 <0,001	15,6±0,58 <0,001	19,2±0,98 <0,001	24,6±0,52 <0,001	33,9±0,38 <0,001	39,7±0,87 <0,001

Примечание. *P* — достоверность изменений по сравнению с показателями в контроле; *P*<sub>1</sub> — достоверность изменений по сравнению с показателями у ложнооперированных животных; *P*<sub>2</sub> — достоверность изменений по сравнению с показателями у адrenaлэктомированных крыс.

нально накоплению свободного  $^{14}\text{C}$ -лизина в ткани печени увеличивается и радиоактивность кислотонерастворимой фракции. Поэтому на основании полученных данных нельзя судить о наличии или отсутствии стимуляции синтеза общего белка печени. При введении гормона в ночное время создается другая картина: синтез белков печени четко индуцируется через 4 ч. Это позволяет предположить, что способность органа отвечать на гормональный сигнал зависит от состояния ядерного и цитоплазматического аппарата клетки, которое определяется присущим каждому органу суточным ритмом функционирования. В связи с этим представляется важным проанализировать изменения синтеза индивидуальных белков ядер при разных схемах введения гормона. Как видно из представленных в таблице данных,

**Изменение отнесенной к контролю удельной радиоактивности ядерных белков и свободной и связанной  $^{14}\text{C}$ -радиоактивности печени при однократном введении гидрокортизона**

Время введения гидрокортизона, ч	Время введения изотопов	Время забора животных	Гистоновые белки			Негистоновые белки	Отношение свободная РА связанная РА (гомогенат печени)
			H1	H2A/H3H4	H2B		
11	12 ч	13 ч	$0,67 \pm 0,18$	$0,20 \pm 0,03$	$1,00 \pm 0,16$	$0,37 \pm 0,04$	1,25
11	13 ч	30 мин	$2,0 \pm 0,40$	$11,97 \pm 0,09$	$0,50 \pm 0,17$	$3,29 \pm 1,00$	0,88
11	15 ч	15 ч	$1,05 \pm 0,09$	$1,70 \pm 0,20$	$1,22 \pm 0,19$	$1,38 \pm 0,08$	0,73
11	16 ч	30 мин	$1,84 \pm 0,27$	$1,23 \pm 0,12$	$1,57 \pm 0,17$	$1,46 \pm 0,05$	0,92
23	24 ч	1 ч	$1,88 \pm 0,04$	$1,80 \pm 0,20$	$0,81 \pm 0,12$	$2,15 \pm 0,40$	1,02
23	1 ч	30 мин	$2,06 \pm 0,18$	$2,04 \pm 0,23$	$2,64 \pm 0,57$	$2,06 \pm 0,26$	0,35
23	3 ч	3 ч	$1,32 \pm 0,11$	$1,48 \pm 0,14$	$2,32 \pm 0,26$	$0,71 \pm 0,01$	0,70
23	4 ч	30 мин	$0,95 \pm 0,04$	$0,91 \pm 0,07$	$0,63 \pm 0,05$	$1,14 \pm 0,04$	1,05

гидрокортизон, введенный однократно днем (в 11 ч), вызывает через  $2\frac{1}{2}$  ч ингибицию синтеза всех белков, входящих в состав ДНП, — как гистоновых, так и негистоновых. Через 4 ч после введения отмечается индукция синтеза всех белков ДНП (за исключением фракции H2B гистонов), особенно выраженная для негистоновых белков ДНП. На этих двух сроках происходят истинная ингибиция и индукция синтеза белков, поскольку уровень накопления свободного  $^{14}\text{C}$ -лизина печенью не отличается от контрольного. По отношению к своему временному контролю синтез всех гистоновых белков от  $5\frac{1}{2}$  до 7 ч после введения гормона остается повышенным. Однако свободная радиоактивность в контроле в этих сроках была в 2—3 раза ниже, чем в опыте, поэтому определяемая по отношению к контролю интенсификация синтеза может быть кажущейся. Таким образом, введение гидрокортизона в дневное время неоднозначно влияет на синтез разных белков ДНП как по времени возникновения ответа, так и по его направленности. В первые  $2\frac{1}{2}$  ч осуществляется истинное угнетение синтеза всех белков, наименее выраженное для H1-гистонов и наиболее выраженное для H3H4H2A-гистонов и негистоновых белков ДНП; через 4 ч наблюдается индукция синтеза всех белков ДНП (за исключением H2B), наиболее выраженная для негистоновых белков ДНП. Самыми последними отвечают H2B-гистоны. Эта особенность может быть связана с различной длительностью синтеза соответствующих белков на матрице или с влиянием гормона на сам процесс транскрипции специфических мРНК.

При введении гидрокортизона в ночное время (в 23 ч) отсутствует фаза угнетения синтеза ядерных белков в первые  $2\frac{1}{2}$  ч. Синтез всех белков возрастает через 4— $5\frac{1}{2}$  ч и снижается через 7 ч после поступления гормона. Имеющиеся различия скорее всего зависят от изменения транспорта аминокислоты в орган, а не от истинного изменения интенсивности синтеза белков. Лишь синтез H2B-гистонов существенно угнетается через 7 ч после при-

вания посмертных изменений в коже млекопитающих и особенно человека малочисленны и выполнялись в основном на морфологическом уровне с помощью световой и электронной микроскопии [3—5].

Имеются отдельные сведения об изменениях некоторых физико-химических свойств тканей в посмертном периоде [6, 7]. Однако эти опыты проводились в разных условиях и не связывались с данными об изменении биохимического состава тканей.

Нами изучены содержание основных биохимических компонентов кожи человека и крысы, а также физико-химические свойства кожи на разных сроках посмертного хранения.

## Методика

Для исследования использовали образцы аутопсийной кожи живота трупов мужчин 50—75 лет (причиной смерти являлась сердечно-сосудистая недостаточность). Полученные данные сопоставляли с результатами исследования кожи белых крыс, которую снимали с тушки непосредственно перед испытанием. Исследуемые образцы кожного покрова хранили в эксикаторе над водой при 22 и 5 °С и относительной влажности 92 и 96 %. В качестве антисептика применяли тимол.

Образцы исследовали с помощью следующих методов. На специально сконструированном эластодинамометре измеряли деформацию растяжения кожного покрова в физиологическом растворе [8]. Модуль упругости рассчитывали по линейной части кривой зависимости напряжение — удлинение [9].

Температуру гидротермического сваривания определяли на том же приборе.

Таблица 1

Содержание воды в коже человека и крысы при разных сроках посмертного хранения

Длительность посмертного периода, ч	Кожа человека				Кожа крысы	
	при 22 °С		при 5 °С		при 22 °С	
	общее содержание воды, %	количество связанной воды, %	общее содержание воды, %	количество связанной воды, %	общее содержание воды, %	количество связанной воды, %
3	—	—	—	—	59,3	29,6
24	66,3	33,4	66,3	33,4	59,0	29,5
48	66,0	32,7	66,9	34,00	58,3	27,2
72	65,4	32,9	66,7	34,0	—	—
96	65,0	31,2	66,4	33,5	55,3	24,8
120	64,2	29,0	66,0	33,4	—	—
600	—	—	—	—	50,3	23,5

Таблица 2

Изменение физико-химических свойств кожи человека и крысы при хранении

Объект исследования	Температура сваривания, °С	Модуль упругости, дин/см <sup>2</sup>	Характеристическая вязкость, [η]		Удельное оптическое вращение, [α] <sub>D</sub> <sup>20</sup>
			чел	крыс	
Кожа человека:					
исходная	59,0	1,20	14,0	—	1050
после 48 ч аутолиза	62,0	1,90	—	—	—
после 96 ч аутолиза	62,0	2,35	10,5	—	915
Кожа крысы:					
исходная	58,0	1,05	17,5	—	1216
после 48 ч аутолиза	65,0	3,6	—	—	—
после 96 ч аутолиза	66,0	9,2	12,0	—	878

Методика исследования заключалась в определении температуры, при которой началось линейное сокращение образца кожи при его нагревании в воде со скоростью 0,5 °С в минуту. Линейные изменения образца фиксировали с точностью до 0,1 °С. Общее влагосодержание в образцах определяли по методу Фишера [10]. Метод определения гидратно-связанной воды основывался на свойстве ее не удаляться при отпрессовывании под давлением 80 МПа [10]. Оставшуюся после отжатия в образце воду определяли также с помощью реактива Фишера. О содержании коллагена в коже судили по количеству оксипролина [11], количество гликозаминогликанов устанавливали по уровню гексозаминов и гексуроновых кислот в гидролизатах ткани [12, 13]. Для выяснения степени изменения физико-химических свойств основного белка кожного покрова коллагена изучали свойства его кислоторастворимой фракции. Получение кислоторастворимой фракции коллагена сводилось к следующему. Мелкоизмельченную кожу освобождали от глобулярных белков экстракцией 10% NaCl в течение 24 ч при 5 °С. Промытую водой ткань несколько раз последовательно экстрагировали свежими порциями 0,5 М СН<sub>3</sub>СООН при 5 °С, которые через каждые 48 ч сливали и центрифугировали. Раствор диализировали против воды, и полученный диализат вновь растворяли в 0,5 М уксусной кислоте. Вязкость растворов коллагена определяли на вискозиметре Убеллоде. По предельному значению приведенной вязкости при концентрации раствора, стремящейся к нулю, рассчитывали характеристическую вязкость. Удельное оптическое вращение определяли на поляриметре фирмы «Перкин-Эльмер», модель 241 МС, точность измерения составляла 0,01°.

Е. В. Кудокоцева, А. Д. Гордиенко, А. М. Белоус

## ВЛИЯНИЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ НА ПРОЦЕССЫ ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ В ИЗОЛИРОВАННЫХ ГЕПАТОЦИТАХ

Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, Харьков

В настоящее время исследуются возможности использования ксеногенных гепатоцитов для лечения печеночной недостаточности [1]. Особый интерес этот вопрос приобретает в связи с развитием методов низкотемпературной консервации различных биологических объектов при условии сохранения их основных биологических свойств после деконсервации [2, 3]. Создание запасов гепатоцитов в условиях низкотемпературного банка имеет большое практическое значение в связи с их использованием в клинической практике [4, 5].

В настоящей работе исследована возможность консервации изолированных гепатоцитов при  $-196^{\circ}\text{C}$  с сохранением их детоксицирующих свойств.

### М е т о д и к а

Гепатоциты получали из печени белых крыс-самцов массой 200—250 г по методу Канасов и соавт. [6] и суспендировали в среде выделения, содержащей 250 мМ сахаразы, 5,0 мМ KCl, 0,4 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,4 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2,0 мМ дитиотрептола, 2,0 мМ ЭДТА, 0,8 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1 % альбумина pH 7,4 с конечной концентрацией клеточного белка 25—30 мг/мл. Белок определяли по Лоури и др. [7] в присутствии 0,1 % дезоксихолата натрия.

Гепатоциты, окрашенные 0,2% раствором трипанового синего, имели округлую форму; клеточные мембраны и ядра были четко дифференцированы, а цитоплазма не прокрашивалась. Жизнеспособность клеток по данным прижизненного окрашивания составляла 90—95%. Показателем интактности клеток служил уровень окислительного фосфорилирования, о котором судили по увеличению скорости дыхания после добавления разбавителя 2,4-динитрофенола (ДНФ) на фоне экзогенного субстрата — сукцината  $\frac{V_{\text{ДНФ}}}{V_{\text{сукц.}}}$  [6]. Скорость потребления кислорода определяли на полярографе

ОН-102 (Венгрия) при  $30^{\circ}\text{C}$  со стандартным платиновым электродом типа Кларка. Скорость N-деметилирования диметиланилина (ДМА), аминопирина (АП) и этилморфина (ЭМ) определяли по количеству образовавшегося формальдегида (ФА) [8]; для расчета использовали коэффициент молярной экстинкции окрашенного комплекса ФА с реактивом Наше [9], равный  $1,5 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ . Скорость л-гидроксилирования анилина (АН) определяли по количеству образовавшегося п-аминофенола (п-АФ) [10]; для расчета использовали коэффициент молярной экстинкции окрашенного индофенольного комплекса п-АФ с фенолом в присутствии  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , равный  $10,7 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{X} \cdot \text{см}^{-1}$  [11].

1,0 мл инкубационной смеси как в первом, так и во втором случае содержал 80 мМ трис-HCl-буфера pH 7,6, 16 мМ  $\text{MgCl}_2$ , НАДФ-H-генерирующую систему (9 мМ глюкозо-6-фосфата, 0,5 ФЕ глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, 0,1 мМ НАДФ+ или 10 мМ изоцитрат натрия, 0,5 ФЕ изоцитратдегидрогеназы, 0,1 мМ НАДФ+), 6,0 мМ ДМА, или 16,7 мМ АП, или 1,0 мМ ЭМ, или 3,0 мМ АН, 3 мг белка клеток. В контроле субстраты гидроксилирования добавляли после остановки реакции. Реакцию инициировали добавлением субстратов.

Часть клеток, суспензированных в среде выделения, хранили при температуре  $2-4^{\circ}\text{C}$  в холодильнике в течение 6 дней. Другую часть перед низкотемпературной консервацией выдерживали 15 мин при  $4^{\circ}\text{C}$  в средах, содержащих 10% растворы криопротекторов — этиленгликоля (ЭГ) или диметилсульфоксида (ДМСО), после чего замораживали до  $-196^{\circ}\text{C}$  по многоэтапной программе: на первом этапе клетки охлаждали со скоростью  $20-27^{\circ}$  в 1 мин до  $-6^{\circ}\text{C}$ , на втором — со скоростью  $2-4^{\circ}$  в 1 мин до  $-30^{\circ}\text{C}$ , на третьем — со скоростью  $300-400^{\circ}$  в 1 мин до  $-196^{\circ}\text{C}$ . Ряд проб замораживали быстро со скоростью  $300-400^{\circ}$  в 1 мин до  $-196^{\circ}\text{C}$  без криозащитных добавок. Пробы отогревали при температуре  $41^{\circ}\text{C}$ . Удаление криопротекторов из размороженной суспензии осуществляли путем 10-кратного разведения клеточной суспензии средой суспендирования с последующим центрифугированием на ручной центрифуге при 50g в течение 2 мин.

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

Установлено, что нативные гепатоциты с ненарушенным механизмом сопряжения окисления и фосфорилирования обладают высокой гидроксилазной активностью. Однако, как видно из табл. 1, хранение клеток при тем-

При этом исследовании оксипролин отщепляется в составе низкомолекулярной фракции коллагена [18]. Следовательно, можно предположить, что в посмертном периоде происходят изменения в структуре молекулы коллагена, что подтверждено результатами изучения физико-химических свойств кислоторастворимой фракции коллагена. Оказалось (см. табл. 2), что характеристическая вязкость и удельное оптическое вращение растворов коллагена, полученных из ткани, после аутолиза значительно ниже, чем того же раствора из исходной ткани. Это свидетельствует о том, что в условиях хранения кожного покрова *in vitro* в коллагене происходят денатурационные процессы по типу спираль → клубок. Те же показатели кожи, изученные у человека и крысы, в процессе хранения при 5 °С менялись незначительно и статистически недостоверно. Однако направленность процессов была аналогична наблюдавшейся у образцов, выдерживаемых при 22 °С.

Таким образом, изменения при аутолизе многообразны. Они проявляются в уменьшении количества связанной воды, повышении температуры сваривания и модуля упругости, разрушении гликозаминогликанов, увеличении растворимости коллагена при 65 °С, изменении физико-химических свойств кислоторастворимой фракции коллагена в направлении денатурации. Имеющиеся данные еще не позволяют определить, какое из этих изменений является первичным. Вместе с тем несомненно, что уменьшение количества гидратно-связанной воды при наличии в системе избытка свободной влаги не связано с эффектом подсыхания. Это согласуется с данными многомесячного хранения дермы животных в стерильных условиях в водной среде [19]. Очевидно, после прекращения жизнедеятельности организма расклинивающее действие межструктурной жидкости уменьшается, что приводит к усилению водородных связей. Этот процесс можно отчасти увязать с постепенным разрушением гликозаминогликанов и дегидратацией ткани в первые часы после смерти. Однако устойчивость коллагена в условиях обработки водой при 65 °С, т. е. после разрушения водородных связей, не только не возрастает, но даже снижается, а свойства кислоторастворимой фракции коллагена меняются в направлении денатурации [20].

Исходя из полученных данных, процессы, протекающие в первый период посмертного аутолиза, можно разделить на две группы: связанные с образованием дополнительных межструктурных водородных связей и вызываемые действием протеолитических ферментов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Лушников Е. Ф., Шапиро Н. А. Аутолиз. М., 1974, с. 8.
2. Evans W. F. D. The Chemistry of Death. Springfield, 1963, p. 36.
3. Саркисов Д. С., Втюрин Б. В. Электронная микроскопия деструктивных и регенераторных внутриклеточных процессов. М., 1967.
4. Braun-Falco O., Winter W. — Arch. klin. exp. Derm., 1964, Bd 220, S. 344—361.
5. Михайлов Н. Н. Структура и функция эпидермиса. М., 1979, с. 189.
6. Schmid H. — Virchow's Arch. path. Anat., 1965, Bd 339, S. 168.
7. Smith J. W. — J. Anat. (Lond.) 1954, v. 88 p. 369.
8. Пчелин В. А., Николаева С. С. — Высокомолекулярные соедин., 1966, т. 8, № 1, с. 136.
9. Elden H. R. Biophysical Properties of the Skin. New York, 1971, p. 394.
10. Климова В. А. Основные микрометоды анализа органических соединений. М., 1967, с. 166—190.
11. Зайдес А. Л., Михайлов А. Н., Пушенко О. И. — Биохимия, 1964, № 1, с. 5—7.
12. Exley D. — Biochem. J., 1957, v. 67 p. 52.
13. Eastoe J. E., Courts A. Practical Analytical Methods for Connective Tissue Proteins. London, 1963, p. 96.
14. Verzar F. — Schweiz. med. Wschr., 1963, Bd 93, S. 1036.
15. Фишер Р. А. Статистические методы для исследователей. М., 1958.
16. Bartos F. — Gerontologia (Basel), 1967, v. 13, p. 81.
17. Никитин В. Н., Перский Е. Э., Утевская Л. А. Возрастная и эволюционная биохимия коллагеновых структур. Киев, 1977, с. 140.
18. Schaub M. C. — Gerontologia (Basel), 1963, v. 8, 16, p. 114.
19. Tancous J. J. — J. Am. Leather Chem. Ass., 1970, v. 65, p. 176.
20. Михайлов А. Н. Химия и физика коллагена кожного покрова. М., 1980

Поступила 12/V 1980 г.

происходило разобщение дыхания и окислительного фосфорилирования, в результате чего отношение  $\frac{V_{\text{ДНФ}}}{V_{\text{сукц.}}}$  снижалось с  $2,2 \pm 0,2$  в контроле до  $1,0 \pm 0,08$  в опыте ( $P < 0,001$ ).

Данные по гидроксигированию в изолированных гепатоцитах, замороженных по многоэтапной программе с 10 % ЭГ, представлены в табл. 2. Как видно, скорость реакции гидроксигирования ДМА составляла 71,4 %, при использовании АП — 80,5 %, АН — 59,1 % от уровня контроля.

Если применяли ЭМ, то скорость реакции гидроксигирования увеличивалась на 30 % по сравнению с контролем. В клетках, замороженных по многоэтапной программе с 10 % ДМСО, при использовании ДМА скорость реакции гидроксигирования составляла 80,2 %, АП — 85,6 %, АН — 68,2 % от уровня контроля; при гидроксигировании ЭМ также происходило некоторое увеличение скорости реакции на 15,4 % (см. табл. 2). Замораживание гепатоцитов по многоэтапной программе под защитой ЭГ и ДМСО сохраняло функциональные свойства митохондрий на 30 и 40 % соответственно. При этом отношение  $\frac{V_{\text{ДНФ}}}{V_{\text{сукц.}}}$  изменялось от  $2,0 \pm 0,1$  до  $1,3 \pm 0,05$  ( $P < 0,001$ ) при использовании ЭГ и от  $2,0 \pm 0,1$  до  $1,4 \pm 0,05$  ( $P < 0,001$ ) после замораживания под защитой ДМСО.

Таким образом, проведенные исследования показывают, что замораживание нарушает нормальное течение процессов гидроксигирования в изолированных клетках печени.

Выявленное нами снижение скорости гидроксигирования исследованных субстратов при замораживании может происходить за счет структурных нарушений в мембране, на которой локализована цепь переноса электронов, осуществляющая процессы гидроксигирования в гепатоцитах [14]. Обнаруженное увеличение скорости гидроксигирования ЭМ после замораживания может быть связано с более высокой проницаемостью клеток для этого субстрата, хотя конкретный механизм этого явления остается неясным.

Результаты исследований показывают, что нарушение процессов гидроксигирования в клетках во многом зависит от режима охлаждения и приотгрева применяемого криопротектора. Так, сразу же после быстрого отогрева гепатоцитов, замороженных быстро до  $-196^\circ\text{C}$ , система их микросомального окисления сохраняет некоторую способность к гидроксигированию субстратов, в то время как функции митохондрий полностью подавляются. Это свидетельствует о том, что мембраны эндоплазматического ретикулума и ассоциированные с ними ферментные комплексы являются довольно устойчивыми системами к действию ультранизких температур, несмотря на то что они находятся в составе клеток, в которых под действием холода активируются факторы, ведущие к разрушению внутриклеточных мембранных структур [15]. Использованные в работе криопротекторы в значительной мере улучшали функциональное состояние как митохондрий, так и особенно системы микросомального окисления, активность которой сразу после отогрева составляла, по усредненным данным, с ЭГ 70,3 %, а с ДМСО 78 % от уровня контроля, в то время как уровень функциональной активности митохондрий сохранялся на 30 % при замораживании клеток с ЭГ и на 40 % при использовании ДМСО.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Островерхов Г. Е.* — В кн.: Патогенез и методы лечения печеночной недостаточности. М., 1979, с. 3.
2. *Пушкарь Н. С., Белоус А. М., Цуцаева А. А.* и др. — В кн.: Криобиология и криомедицина. Киев, 1976, вып. 2, с. 3.
3. *Цуцаева А. А., Попов Н. Н., Воскобойникова Т. Н.* — В кн.: Криобиология и криомедицина. Киев, 1978, вып. 4, с. 47.
4. *Гаспарян С. А., Малюгин Э. Ф., Бруслик В. Г.* и др. Способ дезинтоксикации организма в эксперименте. А. С. 493227 (СССР).
5. *Островерхов Г. Е., Бруслик В. Г., Малюгин Э. Ф.* и др. — В кн.: Патогенез и методы лечения печеночной недостаточности. М., 1979, с. 32.
6. *Канаева И. П., Карякин А. В., Аленичева Т. В.* и др. — Цитология, 1975, т. 17, № 5, с. 545.

В растворимой фракции определяли транскетолазную активность. Гомогенность выделенных субклеточных фракций оценивали под электронным микроскопом. Содержание  $^{14}\text{C}$ -тиамина и его фосфорных эфиров в гиалоплазме, митохондриях и микросомах определяли методом ионообменной хроматографии [11].

Для изучения изменений распределения тиамина во времени животным однократно вводили  $^{14}\text{C}$ -тиамин (0,46 мкКи/мг) по 200 мг/кг массы. Через различные промежутки времени в гиалоплазме определяли общий уровень метки, а также количество белковосвязанной и свободной форм ТДФ [12] гель-фильтрацией на колонке (1,5×20 см) с сефадексом G-25. Гиалоплазму печени получали центрифугированием гомогената [9] 1 ч при 105 000 g. Надосадок, содержащий метку (связанный  $^{14}\text{C}$ -ТДФ), подвергали депротеинизации. Радиоактивность во фракциях измеряли на сцинтилляционном счетчике «Magk-II» («Nuclear Chicago», США), используя сцинтилляционную жидкость, содержащую диоксан, PPO, POPOP и нафталин.

Во фракциях белковосвязанной и свободной меток, полученных гель-фильтрацией [2], рассчитывали содержание тиамина и его фосфорилированных форм [11]. Очистку транскетолазы из гиалоплазмы печени проводили после разовой инъекции  $^{14}\text{C}$ -тиамина (46 мкКи/мг) в дозе 50 мкг/100 г массы животного. Спустя 12 ч (наибольшее включение метки в белок) после введения печень тщательно перфузировали и готовили гомогенат на среде указанного выше свойства в условиях, предотвращающих разрушение субклеточных фракций. После центрифугирования в течение 1 ч при 105 000 g осадок отбрасывали, а надосадочную жидкость подвергали фракционированию сульфатом аммония между 50—70% насыщения. Осадок растворяли, обессаливали на колонке с сефадексом G-25 и наносили на колонку с ДЭАЭ-сефадексом А-50, уравновешенную трис-НСI-буфером (рН 7,3). Для дальнейшей очистки отбирали фракции не связанного с ионообменником белка, содержащие наибольшее количество метки. После концентрации белка высаливанием осадок растворяли в минимальном объеме указанного буфера и подвергали гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-200. Степень очистки транскетолазы выражали в условных единицах удельной радиоактивности. На конечной стадии очистки активность фермента находили по описанному методу [13], определяя скорость восстановления НАД+ за счет окисления 3-фосфоглицеринового альдегида в сопряженной реакции с глицеральдегиддегидрогеназой. В качестве субстрата использовали смесь пентоз [14].

## Результаты и обсуждение

Из представленных в табл. 1 результатов следует, что после 7-дневных внутримышечных инъекций  $^{14}\text{C}$ -тиамина основное количество метки сосредоточено в цитоплазме. На долю ядерной фракции приходится около 20 %

Таблица 1

Распределение  $^{14}\text{C}$ -тиамина в гомогенате гепатоцитов и после удаления различных субклеточных фракций, имп/мин/мл,  $10^{-3}$

№ опыта	Цельный гомогенат	Без ядер	Без митохондрий	Без микросом (гиалоплазма)
1	45*	37	26	22,5
2	50,5	42	28	24
3	49	42,5	29	25,5

\* В каждом опыте объединена печень от 10—15 животных.

меченого витамина, однако повторная трехкратная гомогенизация осадка ядер с последующим центрифугированием приводит к значительному уменьшению метки в осадке. Электронномикроскопически чистая фракция ядер почти не содержала метку. Использование тиохромного метода определения тиамина [15] подтверждает полученные результаты. Таким образом, обнаруженное рядом авторов наличие тиамина в ядерной фракции в количестве до 20 % от содержания в гомогенате и приписывание тиамину в ядрах каких-то неизвестных особенных функций [8] вряд ли является корректным. Присутствие тиамина в «ядрах» скорее всего объясняется загрязнением их гиалоплазмой, целыми клетками, эритроцитами. Тщательно отмытые ядра в отличие от «грязных» не обладали транскетолазной активностью.

На долю митохондрий приходится не более 26—30 % от метки гомогената, полученного после осаждения ядер. Таким образом, фракция мито-

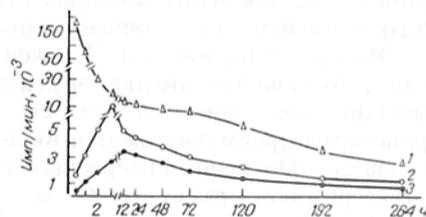


Рис. 1. Распределение  $^{14}\text{C}$ -тиамина в гиалоплазме печени крыс.

1—общая радиоактивность; 2—радиоактивность общего ТДФ; 3—радиоактивность белковосвязанного ТДФ.

АЛТ (КФ 2.6.1.2) и АСТ (КФ 2.6.1.1) определяли по Рейтману и Френкелю [3] в модификации Коровкина [4], Розенберга и Бялко [5]. Температурная зависимость исследована в диапазоне 10—37 °С. Инкубацию проводили при 10, 20, 30 и 37 °С.

## Результаты и их обсуждение

У интактных крыс температурные зависимости активности АЛТ и АСТ существенно различаются. В аррениусовских координатах  $\lg A - T^{-1}$ , где  $A$  — активность фермента,  $T$  — абсолютная температура, активность АСТ хорошо аппроксимируется прямой с наклоном, соответствующим эффективной энергии активации  $E_a$ , равной  $2,7 \pm 0,2$  ккал/моль. Температурная зависимость АЛТ в аррениусовских координатах существенно отклоняется от линейной зависимости: при инкубации при 10 °С активность резко падает. Эти различия температурных кривых для АЛТ и АСТ обусловлены, вероятнее всего, различной локализацией трансаминаз в субклеточных структурах и неодинаковой прочностью связи с мембранами у этих ферментов [6, 7].

Охлаждение животных до ректальной температуры 20 °С (табл. 1) вызывает снижение активности АЛТ и АСТ на 31,9 и 30,5 % соответственно по сравнению с активностью ферментов у интактных животных (при температуре инкубации 37 °С). Характер температурной зависимости и соответствующие эффективные энергии активации остаются без изменений.

Чтобы выяснить влияние надпочечников на активность аминотрансфераз при гипотермии, были проведены исследования на ложноперирированных и адреналэктомированных животных. Ложная операция практически не влияла на активность АЛТ в гомогенатах мозга крыс и незначительно снижала активность АСТ (табл. 2). Адреналэктомия увеличивала активность АЛТ по сравнению как с интактными, так и с ложноперирированными животными соответственно на 27,8 и 31,4 %. Активность АСТ, напротив, снизилась на 34,2 % по сравнению с интактными животными и на 21,7 % по сравнению с ложноперирированными (сравнения проведены при температуре инкубации 37 °С). Охлаждение ложноперирированных животных приводит к резкому снижению активности АЛТ ткани мозга на 46,0 % по сравнению с интактными животными и на 44,4 % по сравнению с ложноперирированными. При этом происходит значительное изменение характера температурной зависимости активности АЛТ. У гипотермированных ложноперирированных животных температурная зависимость АЛТ характеризуется прямой с наклоном, соответствующим  $E_a = 5,3 \pm 0,2$  ккал/моль, в то время как сама ложная операция не изменяет характера температурной зависимости по сравнению с интактными животными.

При гипотермии адреналэктомированных животных происходит снижение активности АЛТ мозга на 33,1 % по сравнению с ее активностью у адреналэктомированных животных (см. табл. 2); изменения температурной зависимости не происходит. Таким образом, кратковременная гипотермия у животных всех трех исследованных групп вызывает снижение активности АЛТ в ткани мозга. Наиболее вероятный вывод из полученных данных заключается в том, что изменения активности АЛТ при кратковременной гипотермии не определяются, по-видимому, реакцией надпочечников, а являются следствием процессов, происходящих в самой ткани мозга.

При гипотермии ложноперирированных крыс активность АСТ увеличивается незначительно (на 5,1 %) по сравнению с нормотермией ложноперирированных животных; температурная зависимость при этом напоминает таковую для АЛТ у интактных животных. Гипотермия у адреналэктомированных животных характеризуется увеличением активности АСТ на 73,3 % по сравнению с нормотермией у адреналэктомированных животных. Таким образом, адреналэктомия приводит к изменению реакции АСТ на охлаждение, и в этом, видимо, также проявляется ее функциональное отличие от АЛТ. Пролонгирование гипотермического состояния (20 °С) в течение 1 ч приводит к возрастанию активности аминотрансфераз (см. табл. 1). Температурная зависимость активности АЛТ при этом изменяется весьма значи-

часть представлена ТТФ и ТДФ на 90 %, а ТМФ и тиамином на 10 %. Таким образом, видно, что никаких продуктов метаболизма витамина в митохондриях не выявляется.

Включение метки в белки митохондрий и гиалоплазмы дает возможность производить маркировку ТДФ-зависимых ферментов, а затем осуществлять их дальнейшую очистку без определения удельной активности. Известно, что при гель-фильтрации, хроматографии и ряде других методов очистки белков в профиле элюции получают большое количество фракций, в которых необходимо определять искомую активность. В случае транскетолазы для этого требуется ряд субстратов и дополнительный фермент. Поскольку ТДФ в указанном энзиме, выделенном из печени крысы, связан достаточно прочно [19] и в гиалоплазме печени является единственным белком, связывающим ТДФ [2], выделение и очистку транскетолазы можно проводить, определяя повышение удельной радиоактивности в очищаемом препарате. В табл. 2 представлен ряд этапов очистки печеночной транскето-

Таблица 2

Выделение и очистка транскетолазы из печени крысы

Этап очистки	Объем, мл	Белок, мг/мл	Общая радиоактивность, имп/мин	Удельная радиоактивность, имп/мг белка/мин	Удельная активность, ед/мг белка	Степень очистки	Выход, %
Гиалоплазма	1200	9	2 268 000	210	0,015	—	—
Фракционирование сульфатом аммония	12	130	936 000	600	—	3	57
Гельфильтрация на сефадексе G-25	50	25	930 000	760	—	3,5	55
Хроматография на ДЭАЭ-сефадексе А-50	70	4	530 000	1 860	—	9	23
Гельфильтрация на сефадексе G-200	20	2,2	396 000	9 000	—	42	17
Рефильтрация на сефадексе G-200	15	0,7	230 000	21 900	1,2	95	11

лазы, маркированной <sup>14</sup>С-тиамином, который после внутримышечной инъекции включается в виде ТДФ в транскетолазу. Как следует из представленных данных, исходный уровень метки в гиалоплазме после диализа в расчете на белок составляет 210 имп/мг/мин, а на конечном этапе после гель-фильтрации — 21 900 имп/мг/мин. Удельная активность очищенного препарата равнялась 1,2 ед/мг белка. На рис. 2 представлены результаты гель-фильтрации препарата на колонке с сефадексом G-200. Видно, что метка выходит узкой зоной. Расчет удельной радиоактивности показывает, что она почти одинакова во фракциях 20—28. Это свидетельствует о высокой степени чистоты полученного препарата, содержащего малое количество примесных белков. Об этом свидетельствуют и данные по определению удельной активности транскетолазы. Таким образом, из приведенных результатов видно, что, взяв за тест определение количества белковосвязанного <sup>14</sup>С-ТДФ в гиалоплазме без расчета транскетолазной активности, можно успешно проводить очистку этого фермента. При этом значительно сокращается время на проведение анализов.

Как уже указывалось, транскетолаза является единственным белком в гиалоплазме печени, связывающим ТДФ. В отношении митохондрий, депонирующих до 30 % ТДФ, имеются указания, что, помимо дегидрогеназ  $\alpha$ -кетокислот, в их составе имеется и транскетолаза. В этой связи нами осуществлено разделение митохондриальных белков и определение радиоактивности и тиамина в профиле элюции. Из представленного на рис. 3 профиля элюции митохондриальных белков, полученных после замораживания и оттаивания митохондрий или обработкой их 0,4 % тритоном X-100, видно,

тельно. Активность фермента при температуре инкубации 30 °С оказывается ниже, чем при 20 °С. Столь значительное изменение физико-химических свойств АЛТ при пролонгировании гипотермического состояния свидетельствует, очевидно, о существенных перестройках ферментного аппарата клетки. Дальнейшее пролонгирование гипотермического состояния приводит к повышению активности АЛТ и также сопровождается изменением температурной зависимости. После пролонгирования гипотермии в течение 2 ч температурная зависимость АЛТ может быть аппроксимирована прямой с наклоном, соответствующим  $E_a = 5,3 \pm 0,2$  ккал/моль.

Температурная зависимость АСТ при пролонгировании гипотермии также претерпевает заметные изменения, заключающиеся в том, что эффективная энергия активации уменьшается до  $2,3 \pm 0,2$  ккал/моль. Эти изменения  $E_a$  сопровождаются повышением активности фермента, и через 2 ч пролонгирования гипотермии она оказывается даже выше, чем у интактных животных. В общем изменения активности АЛТ и АСТ коррелируют с динамикой содержания в мозге таких важных компонентов азотистого метаболизма, как амидные группы белков, аммиак, глутамат, аспарат и  $\gamma$ -аминомасляная кислота. В динамике гипотермии (20 °С) содержание указанных соединений претерпевает фазные изменения, причем через 2—3 ч количество этих веществ приближается к норме. Эти изменения активности аминотрансфераз и количества азотистых метаболитов в ткани мозга при гипотермии, безусловно, следует считать взаимосвязанными и отражающими переход метаболизма мозга в качественно новое стационарное состояние.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Петров И. Р., Гублер Е. В. Искусственная гипотермия. Л., 1961.
2. Мак-Ильвейн Г. Биохимия и центральная нервная система. М., 1962.
3. Reitman S., Frankel S. — Am. J. clin. Path., 1957, v. 28, p. 56—63.
4. Коровкин Б. Ф. Ферменты и диагностика инфаркта миокарда. Л., 1965.
5. Розенберг П. А., Бялко Н. К. Химические методы исследования биологических субстратов в профпатологии. М., 1969, с. 82.
6. Катунума М., Окада М., Фудзико А. и др. — В кн.: Химия и биология пирадоксалевого катализа. Под ред. А. Е. Браунштайна. М., 1968, с. 155—165.
7. Черногузов В. М. — Вестн. Белорус. ун-та. Сер. 11, 1969, № 2, с. 48—53.

Поступила 28/V 1980 г.

#### ALTERATION IN ACTIVITIES OF ALANINE- AND ASPARTATE TRANSAMINASES IN RAT BRAIN UNDER CONDITIONS OF HYPOTHERMIA OF VARIOUS DURATION AND IN ADRENALECTOMY

T. N. Daudova, I. S. Meylanov, E. Z. Emirbekov

V. I. Lenin Dagestan State University, Makhach-Kala

Cooling of rats down to the rectal temperature of 20° decreased the alanine- and aspartate transaminase activities in brain tissue. Activity of the enzymes studied was increased after prolongation of the hypothermia within 2 hrs. In adrenalectomized animals hypothermia was responsible for activation of aspartate transaminase and for a decrease in activity of alanine transaminase.

УДК 612.79.015.349

С. С. Николаева, В. А. Дубинская, А. Н. Михайлов, О. А. Королева

#### ВЛИЯНИЕ АУТОЛИЗА НА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОЖНОГО ПОКРОВА МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Научно-исследовательская лаборатория биологических структур Министерства здравоохранения СССР, Москва

При консервировании органов и тканей и различных судебно-медицинских исследованиях необходимо учитывать динамику посмертных изменений тканей на разных структурных уровнях [1]. Известно, что соединительная ткань устойчива к действию аутолитических процессов [2]. Исследо-

творимой части гепатоцитов только в транскетолазу. В ядрах ТДФ не накапливается. В митохондриях ТДФ связывается исключительно с дегидрогеназами  $\alpha$ -кетокислот. Никаких продуктов деградации витамина в митохондриях не обнаруживается. Длительное удерживание тиаминовой метки в виде различных продуктов метаболизма в гиалоплазме печени в отличие от опыта с окситиамином указывает на образование необходимых для организма метаболитов, с чем, вероятнее всего, можно связать проявления некоферментной активности тиамин.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Воскобоев А. И., Гриценко Э. А., Грушник В. В. — В кн.: Пентозофосфатный путь превращения углеводов и его регуляция. Гродно, 1978, с. 35—36.
2. Островский Ю. М., Воскобоев А. И., Гриценко Э. А. и др. — Прикладная биохим., 1979, № 5, с. 728—734.
3. Гуляя М. Н., Германюк Я. Л., Гижко А. В. — Укр. біохім. ж., 1971, т. 43, с. 487—491.
4. Kiessling K. H., Lundquist C. G. — Exp. cell. Res., 1962, v. 26, p. 189—197.
5. Цоквава J. — Vitamins, v. 32, p. 205—214.
6. Рыбина А. С. — Укр. біохім. ж., 1969, т. 41, с. 475—479.
7. Лейс М. Ф. — Там же, 1967, т. 39, с. 308—312.
8. Balagahi M., Pearson W. M. — J. Nutr., 1966, v. 89, p. 127—134.
9. Deus H., Blum H. — Biochim. biophys. Acta, 1970, v. 219, p. 489—492.
10. De Duce C., Pressmann V. C., Gianetto R. et al. — Biochem. J., 1955, v. 60, p. 604—610.
11. Черникевич И. П., Воскобоев А. И., Грушник В. В. и др. — Изв. АН БССР, Серия биол. наук, 1976, № 3 с. 112—116.
12. Островский Ю. М., Воскобоев А. И., Горенштейн Б. И. и др. — Биохимия, 1979, т. 44, с. 1551—1557.
13. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. М., 1971.
14. De la Haba G., Leder J. G., Racker E. — J. biol. Chem., 1955, v. 214, p. 409—415.
15. Bessey O. A., Lowry O. H., Davis E. — Ibid., 1952, v. 195, p. 453—457.
16. Островский Ю. М. Активные центры и группировки в молекуле тиамин. Минск, 1975.
17. Воскобоев А. И., Черникевич И. П., Островский Ю. М. — Биохимия, 1976, т. 41, с. 1784—1787.
18. Островский Ю. М. Тиамин. Минск, 1971.
19. Кочетов Г. А., Минин А. А. — Биохимия, 1978, т. 43, с. 1631—1635.
20. Кудрявцева Г. В., Гайло Т. А., Колотилова А. И. — Там же, 1976, т. 41, с. 363—367.

Поступила 12/V 1980 г.

#### STORAGE OF $^{14}\text{C}$ -THIAMINE IN RAT LIVER SUBCELLULAR FRACTIONS

A. I. Voskoboyev, V. A. Averb, Yu. M. Ostrovsky

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

Distribution of  $^{14}\text{C}$ -thiamine and its incorporation into TPP-dependent enzymes of rat liver subcellular fractions were studied. Thiamine was stored mainly in hyaloplasm and mitochondria. In nuclear and microsomal fractions presence of the vitamin was due to contamination by hyaloplasm components during the destruction of liver cells. In the proteins of hyaloplasm the label was incorporated in transketolase only. On the basis of these findings a procedure for isolation of the enzyme was developed. The purification process is monitored by calculation of specific radioactivity instead of the specific enzymatic activity of transketolase. In the mitochondria  $^{14}\text{C}$ -TPP was incorporated only into  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complexes; transketolase was not found in the mitochondria. Metabolism of subcutaneously injected  $^{14}\text{C}$ -thiamine was studied in liver mitochondria and hyaloplasm.

Кроме того, определяли так называемый «оксипролиновый» тест Верцара. Суть этого исследования заключалась в том, что при нагревании ткани в воде при 65 °С в течение 10 мин в раствор переходит коллаген [14]. По содержанию оксипролина в гидролизате оставшейся ткани рассчитывали количество белка, перешедшего в горячую воду.

Полученные данные обрабатывали статистически [15]. В табл. 1—3 и на рисунке приведены среднеарифметические данные исследования кожи 15 трупов мужчин и 10 крыс. Доверительный интервал величины не превышал 4% при вероятности 0,99.

Таблица 3

Влияние посмертного хранения на состав биохимических компонентов кожи человека и крысы

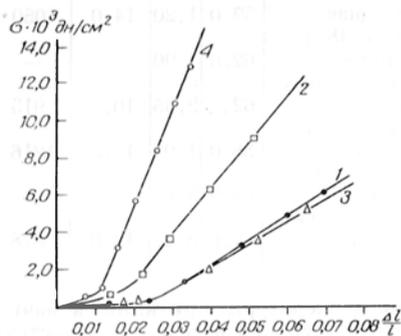
Объект исследования	Длительность посмертного периода, ч	Содержание гексуроновых кислот, г/100 г сухой ткани	Убыль, %	Содержание гексозаминов, г/100 г сухой ткани	Убыль, %	Содержание оксипролина, г/100 г сухой ткани	Количество белка, перешедшего в воду при 65°С, %
Человек	24	0,46		0,41		9,5	4,0
»	96	0,37	20,0	0,33	21,0	9,5	20,0
Крыса	3	0,29		0,44		7,0	26,0
»	24	0,28		0,44		7,0	—
»	48	0,22	24,1	0,36	22,7	7,0	—
»	96	0,21	27,6	0,32	27,3	7,0	49,0

### Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены результаты исследования общей и гидратно-связанной воды в коже крысы и человека на различных сроках посмертного хранения. Установлено, что в процессе хранения образцов кожи при 22°С в условиях, затрудняющих подсыхание, заметно уменьшается количество гидратно-связанной воды при достаточно высоком общем влагосодержании.

В тех же условиях при 5°С влагосодержание практически не изменяется.

Исследования показали, что в течение 24—96 ч хранения при 22°С происходит незначительное увеличение температуры гидротермического сокращения кожи (см. табл. 2). Из данных о зависимости удлинения от напряжения (см. рисунок) видно, что после хранения в течение 96 ч образцы исследуемой кожи обладают меньшей деформируемостью, чем исходные. Модуль упругости, рассчитанный по линейной части кривой, при хранении постепенно увеличивается (см. табл. 2). Следует отметить, что в коже человека эти изменения менее выражены, чем в коже крысы. Аналогичные дан-



Зависимость напряжение — удлинение кожи.

1 — кожа человека исходная; 2 — кожа человека после аутолиза в течение 96 ч; 3 — кожа крысы исходная; 4 — кожа крысы после аутолиза в течение 96 ч.

ные получены при хранении сухожилий крысиных хвостов на воздухе и в 0,9% NaCl [16—17]. Результаты биохимических исследований, приведенные в табл. 3, показывают снижение содержания гликозаминогликанов в кожном покрове у крысы на 28%, у человека — на 20%. Содержание оксипролина в исследуемых образцах в процессе посмертного хранения не меняется, что подтверждает известные данные об устойчивости коллагена к действию аутолитических процессов. При определении «оксипролинового» теста Верцара установлено, что из исходной кожи человека переходит в раствор около 4% белка, а после аутолиза в течение 96 ч — 20%.

*Определение содержания лизоцима в сыворотке крови.* Определенные производили в пуле сыворотки крови от 5 животных методом диффузии в агар [10]. В качестве тест-микроба использовали убитую ацетоном культуру *Micrococcus lysodeicticus*. Стандартными растворами служили растворы лизоцима яичного белка в концентрации 1, 2 и 4 мкг/мл. Содержание лизоцима в сыворотке крови в микрограммах на 1 мл определяли по величине диаметров зон лизиса. По данным, полученным для стандартных растворов лизоцима, строили калибровочную кривую, пользуясь которой вычисляли содержание лизоцима в испытуемых сыворотках крови. Опыты повторяли не менее 3 раз. Метод использован для оценки состояния гуморальных факторов естественного иммунитета.

*Определение радиозащитного действия препаратов.* Известно, что при действии на организм ионизирующих излучений в дозах, вызывающих костномозговой синдром, гибель животных обусловливается в основном инфекционными осложнениями, которые развиваются вследствие повреждения клеточных и гуморальных механизмов естественного иммунитета. Это позволяет рассматривать вещества, оказывающие радиозащитное действие, как стимуляторы естественной резистентности организма к инфекции. Определенное радиозащитного действия производили, как сообщалось ранее [7]. Опытные и контрольные группы состояли из 25—30 животных. Подопытным животным вводили липидные препараты, контрольным—дистиллированную воду. Для сравнения эффективности действия была использована еще одна контрольная группа животных, которым был введен сальмосан. Через 24 ч после введения препаратов животных облучали  $\gamma$ -излучением ( $^{60}\text{Co}$ ) на установке «Эку-50.» Доза облучения 725 рад ( $\text{ЛД}_{90/30}$ ), мощность дозы 82 рад/мин [7, 8]. Радиозащитное действие препаратов оценивали по числу выживших животных в течение 30 дней после облучения. Все исследованные препараты были проверены не менее чем в 3—5 опытах.

### Результаты и обсуждение

В табл. 2 представлены данные по определению биологической активности различных препаратов нейтраль-

Таблица 1

Исследованные препараты нейтральных липидов

№ препарата	Наименование препарата	R	R' = R"
I	1-0-Гексадецил-сп-глицерин (хмилловый спирт)	$\begin{array}{l} \text{H}-\text{C}_{16}\text{H}_{33} \\ \text{H}-\text{C}_{16}\text{H}_{33} \\ -\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_3 \\ -(\text{CH}_2)_6\text{OH}; -\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3 \\ -(\text{CH}_2)_8-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3 \\ -\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_6 \\ \text{цис} \\ -\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3 \\ \text{транс} \end{array}$	$\begin{array}{l} -\text{H} \\ -\text{H} \\ -\text{H} \\ -\text{H} \\ -\text{H} \\ -\text{H} \\ -\text{H} \end{array}$
II	1-0-Октадецил-сп-глицерин (батыловый спирт)		
III	1-0-(2-Окснхексадецил)-сп-глицерин		
IV	Цис-1-0-(9-октадеценил)-сп-глицерин		
V	Цис, цис-1-0-(9, 12-октадекадиенил)-сп-глицерин		
VI	Цис, цис-1-0-(1,9-октадекадиенил)-сп-глицерин		
VII	Транс, цис-1-0-(1,9-октадекадиенил)-сп-глицерин		
VIII	3-0-(1-Гексадецил)-холестерин	$\begin{array}{l} \text{H}-\text{C}_{16}\text{H}_{33} \\ -\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3 \\ -(\text{CH}_2)_8-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3 \\ -\text{CO}-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3 \end{array}$	
IX	3-0-(1-Гексадецил)-холестерин		
X	3-0-(9-Октадеценил)-холестерин		
XI	Линолевый эфир холестерина		

## EFFECT OF AUTOLYSIS ON THE PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF MAMMALIAN SKIN

S. S. Nikolaeva, V. A. Dubinskaya, A. N. Mikhailov, O. A. Koroleva

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

Alterations in physico-chemical properties and in content of several biochemical components were found in skin during postmortal storage of the tissue at the temperature 22° and 5° and relative moisture 92%. Within 96-120 hrs of the postmortal storage a decrease in content of hydrate-bound water and of glycosaminoglycans occurred in the tissue. The alterations were accompanied by an increase in temperature of hydrothermic denaturation and in module of elasticity of the skin. As a result of autolysis solubility of collagen in water was increased at 65° and its acid soluble fractions tended to become denaturated although the content of hydroxyproline was unaltered. The processes occurring in the skin within the first period after death, might be considered as a two-step sequence: formation of additional interstructural hydrogen bonds and structure transformation of both collagen and glycosaminoglycans due to the effect of proteinases.

УДК 612.351.1.015.641.1

*А. И. Воскобоев, В. А. Аверин, Ю. М. Островский*

### ДЕПОНИРОВАНИЕ <sup>14</sup>С-ТИАМИНА В СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ ПЕЧЕНИ БЕЛЫХ КРЫС

Отдел регуляции обмена веществ АН БССР, Гродно

Ранее нами было показано, что <sup>14</sup>С-тиамин в виде своего пиррофосфорного эфира в гиалоплазме печени крыс включается исключительно в транскетолазу [1, 2]. В митохондриях тиаминдифосфат (ТДФ) входит в состав дегидрогеназ  $\alpha$ -кетокислот.

Однако существует мнение о наличии транскетолазы в этих органах [3]. Имеются также противоречивые данные относительно распределения тиамин в различных субклеточных фракциях [4—8].

Целью данной работы было выяснение депонирования и определения природы белков, связывающих <sup>14</sup>С-ТДФ в субклеточных фракциях гепатоцитов.

#### М е т о д и к а

Опыты проводили на белых крысах-самцах массой 180—200 г. Для изучения распределения тиамин по фракциям клетки животных в течение 10 дней содержали на В<sub>1</sub>-авитаминозной диете. Для насыщения организма меткой крысам в течение 7 сут. вводили <sup>14</sup>С-тиамин (удельная радиоактивность 25 мКи/ммоль) по 50 мкг/100 г массы животного. Крыс брали в опыт спустя 24 ч после заключительной инъекции метки. Печень декапитированных животных перфузировали охлажденным раствором 0,25 М сахарозы [9], гомогенизировали в среде, содержащей 0,25 М сахарозы, 0,01 М три-НСl, 0,001 М ЭДТА (рН 7,4). Субклеточные фракции получали методом дифференциального центрифугирования [10]. Для выделения ядер гомогенат центрифугировали 10 мин при 600 г. Полученный осадок подвергали повторной гомогенизации с последующим центрифугированием для полного удаления целых клеток и примесей других фракций. Митохондрии выделяли из постядерного супернатанта центрифугированием при 13 000 g 10 мин и трижды промывали средой выделения до исчезновения метки в промывной жидкости. Митохондрии разрушали многократным замораживанием и оттаиванием или обработкой 0,4% тритоном X-100. Нерастворившуюся часть митохондрий удаляли центрифугированием, а надосадочный слой подвергали фракционированию на колонке (1,7×90 см) с сефадексом G-200, уравновешенной 0,01 М три-НСl-буфером, содержащим 0,05 М NaCl (рН 7,2). В ряде случаев в качестве маркера во фракционируемую смесь добавляли очищенный препарат гиалоплазматической транскетолазы. В профиле элюции определяли радиоактивность и активность транскетолазы.

Микросомы получали из постмитохондриального надосадка, центрифугируя его в течение 1 ч при 105 000 g. В некоторых экспериментах использовали «тяжелую» фракцию микросом, осаждаемую при 16 000 g. Микросомы разрушали 4-кратной заморозкой и оттаиванием. В полученном после центрифугирования матриксе и мембранах определяли концентрацию метки. Матрикс подвергали фракционированию на колонке с сефадексом G-25 [2], для определения свободной и белковосвязанной форм ТДФ.

Более подробное изучение влияния структурных особенностей соединений с двумя двойными связями позволило установить, что положение двойных связей в цепи жирных спиртов в какой-то мере сказывается на уровне биологической активности. Соединения с положением двойных связей — 9, 12 (V) действовали слабее, чем с положением — 1,9 (VI и VII). Напротив, не было отмечено влияния на эффективность биологического действия цис-, цис- и транс-, дис-изомерии, как это показано на примере изомеров соединений с положением двойных цепей — 1,9 в боковой цепи (VI, VII). Испытание холестериновых производных глицерина (VIII, IX, X, XI) показало, что они также являются биологически активными соединениями. Для этих препаратов были выявлены те же особенности зависимости структуры и действия, что и для монопроизводных глицерина. Увеличение на 2 метиленовые группировки, а также изменение положения двойной связи в боковой цепи практически не сказались на уровне биологического действия, как это видно из сопоставления результатов действия соединений X и IX. Наличие одной двойной связи в боковой цепи также не изменяло биологической активности препаратов, что показано на примере соединений VIII и IX.

Оценивая в целом эффективность испытанных липидных препаратов, предпочтение следует отдать 1-о-октадецил-сп-глицерину (батиловому спирту). При использовании этого препарата во всех опытах были получены стабильные, хорошо воспроизводимые положительные результаты. Простая молекулярная структура, лишенная каких-либо лабильных группировок, обеспечивающая химическую устойчивость этого соединения, относительная легкость технологической схемы получения и др. делают этот препарат особенно интересным с точки зрения возможности его дальнейшего использования в качестве стимуляторов неспецифической резистентности организма к инфекции.

Сопоставление действия нейтральных липидов со взятым в качестве стандарта сальмозаном показало, что в целом липидные препараты уступали по биологической активности полисахаридному препарату. Следует отметить, что в настоящих опытах были использованы условия, оптимальные для проявления действия сальмозана (доза вещества, пути и сроки введения и др.). Возможно, что дальнейшие специальные исследования липидных препаратов позволят найти иной режим работы, более благоприятный для проявления их стимулирующего действия.

Таким образом, проведенные исследования показали, что нейтральные липиды могут представить интерес в качестве веществ, стимулирующих естественный иммунитет. Для проявления биологического действия не требуется особо сложной химической структуры нейтральных липидов. Достаточно активными являются монопроизводные глицерина. Следует подчеркнуть, что исследование зависимости между структурой препаратов и способностью стимулировать неспецифический иммунитет представляет значительные трудности. Только использование разнообразных иммунологических методов может позволить выявить отдельные системы иммунокомпетентных клеток или их субпопуляции, на которые преимущественно действуют определенные структуры нейтральных липидов. Несомненно, необходимо продолжение дальнейших исследований нейтральных липидов для получения большей информации о механизме их стимулирующего действия.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Chedid L. — Bull. Inst. Pasteur, 1976, v. 74, p. 103—105.
2. Ginsberg M. N., Morrison D. C. — J. Immunol., 1978, v. 120, p. 317—319.
3. Алексеева В. М. — Биофизика, 1958, т. 3, № 1, с. 101—107.
4. Ashikawa J. K., Anderson O. K. — J. radiat. Res., 1960, v. 13, p. 99—107.
5. Magsood M., Ashikawa J. K. — Int. J. Radiat. Biol., 1962, v. 4, p. 521—531.
6. Poe W. J., Michael J. G. — Immunology, 1976, v. 30, p. 241—248.
7. Дуплищова А. П., Синилова Н. Г., Иванов К. К. — Радиобиол. радиотер., 1972, т. 13, № 1, с. 113—122.
8. Туманян М. А., Дуплищова А. П., Гордеева М. С. и др. — В кн.: Успехи иммунологии. М., 1977, с. 113—119.

хондрий никоим образом не может стоять на первом месте по содержанию тиамин в клетке в расчете на 1 г сырой ткани [6, 7]. Полученные нами данные согласуются с результатами ряда других исследователей [4, 5]. После осаждения микросом содержание метки в растворимой фракции уменьшалось на 17%. В последующем выяснилось, что метка в микросомах имеет гиалоплазматическое происхождение. Сосредоточена она в основном в более тяжелой фракции этих органелл, представляющих собой на электронно-микроскопических снимках микросомы, мембраны которых унизаны рибосомами.

Соотношение свободной и связанной форм витамина  $B_1$  в матриксе этих образований такое же, как и в гиалоплазме. Следовательно, в основном метка распределяется между митохондриями и гиалоплазмой. В этой связи представляло интерес определить, в виде каких метаболитов и в какие ферментные системы включается  $^{14}C$ -тиамин в вышеуказанных компонентах.

На рис. 1 представлено распределение  $^{14}C$ -тиамин в гиалоплазме печени в виде общей метки, свободного ТДФ и ТДФ, связанного с белком. Видно, что максимум включения метки в ТДФ наблюдается к 3-му часу после инъекции, а наибольшее включение в белок происходит к 12 ч. Спустя сутки по сравнению с 30-минутным периодом количество метки в гиалоплазме составляет 7%. Однако, по-видимому, нельзя считать, что к этому времени вся оставшаяся часть метки является протеидизированной, как на это указывалось ранее [16]. Количество связанного на белке ТДФ даже на 2-е и 3-и сутки после инъекции в 3—4 раза меньше концентрации общей метки.

Если сравнить полученные результаты с аналогичными опытами [12], в которых изучалось распределение  $^{14}C$ -тиамин, то наблюдаемые сходства и различия дают объяснение механизму взаимодействия витамина и антивитамина с транскетолазой в условиях *in vivo*. Общим является лишь то, что максимум образования фосфорилированных форм наблюдается к 2—3 ч от момента введения меченых предшественников. Наибольшее включение  $^{14}C$ -ТДФ в белки гиалоплазмы происходит к 12 ч, а затем по мере поступления экзогенного тиамин с пищей наблюдается разведение метки. Характерно, что количество  $^{14}C$ -ТДФ, связанного с белком, уменьшается за 48 ч вдвое. Такой же срок необходим для полного восстановления активности транскетолазы после 30-дневного пищевого  $B_1$ -авитаминоза [2]. Данный промежуток времени, по-видимому, можно считать периодом полужизни этого фермента или, точнее, периодом полубомена кофермента.

Максимум включения  $^{14}C$ -окси-ТДФ происходит на 2-е сутки после инъекции. Количество антикофермента к этому времени в гиалоплазме чрезвычайно мало, однако в силу его более высокого сродства к апоферменту происходит преимущественное включение окси-ТДФ в активный центр транскетолазы. Не менее интересным является и тот факт, что спустя 2 сут в случае разовой инъекции  $^{14}C$ -окситиамин концентрация общей метки, свободного и белковосвязанного окси-ТДФ практически одинакова и держится на одном и том же уровне до 11 сут опыта. Эти данные свидетельствуют о том, что окситиамин, превращаясь в киназной реакции в пиррофосфорный эфир [17], включается в ТДФ-зависимые ферменты. Остальная его часть, возможно, в силу жесткости тиазолового цикла [18] не может подвергаться никаким метаболическим превращениям и выводится из организма. При инъекции  $^{14}C$ -тиамин (см. рис. 1) количество общей метки даже к 11 сут опыта превышает концентрацию свободной и белковосвязанной форм ТДФ. Необходимо указать, что не связанная с белком форма витамина  $B_1$  спустя 3—11 сут после инъекции лишь на 40% представлена фосфорными эфирами и на 7% --- тиаминном. Остальные 53% являются различными не идентифицированными нами продуктами метаболизма тиамин. Тот факт, что даже на 11-е сутки они удерживаются в организме, дает возможность предположить участие этих метаболитов в обмене веществ. С этим, наверное, можно связать и некоторые проявления некоферментной активности тиамин  $B_1$  [16].

При исследовании распределения  $^{14}C$ -тиамин в митохондриях наблюдается несколько другая картина. Через 24 ч после инъекции белковосвязанная часть метки ( $1/3$  часть) представлена на 98—100% ТДФ. Свободная

ный из спинного мозга быка методом колоночной хроматографии [14]. Невритогенным антигеном служил миелин, выделенный из периферических нервов быка [15]. ОБМ растворяли, а миелин взвешивали в 0,4 мл физиологического раствора и смешивали с 0,4 мл полного адьюванта Фрейнда (ПАФ). Сенсибилизированных животных ежедневно контролировали для своевременного обнаружения неврологических симптомов ЭАЭ и ЭАП: мышечной слабости атаксии, парезов, двигательных и функциональных параличей, кахексии и др. У всех животных перед инокуляцией и в разные сроки после инокуляции невритогенной или энцефалитогенной смеси исследовали взятую из ушной вены кровь для определения в ней холестерина, триглицеридов и суммарной фракции  $\beta$ - и пре- $\beta$ -ЛП. Количество холестерина и триглицеридов в крови измеряли на автоанализаторе АА-2 фирмы «Техникон» с применением международной стандартизации исследования липидов крови [16], суммарную фракцию  $\beta$ - и пре- $\beta$ -ЛП — турбидиметрическим методом [17]. Спектр ЛП в сыворотке крови анализировали методом дискового электрофореза в полиакриламидном геле [18]. Сыворотку крови исследовали на содержание антител с помощью реакции связывания комплемента (РСК) при 4 °С [19] в присутствии антигена в концентрации 0,1 мг/кг.

## Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены изменения концентрации холестерина в сыворотке крови кроликов с ЭАП, ЭАЭ, а также животных, инокулированных ПАФ и физиологическим раствором. Как видно из этого рисунка, уже к 10-му дню от начала эксперимента уровень холестерина в сыворотке крови у заболевших ЭАЭ и ЭАП кроликов возрастал в среднем в  $1\frac{1}{2}$  раза. В последующем (на 20-й и 30-й дни) концентрация холестерина превышала контроль в  $2\frac{1}{2}$  раза. В то же время у кроликов, инокулированных только ПАФ или невритогенной смесью, но не заболевших, количество холестерина повышалось незначительно и не достигало того уровня, при котором у подопытных кроликов развивалось заболевание. Обращает на себя внимание также увеличение содержание триглицеридов в сыворотке крови кроликов с ЭАП и ЭАЭ (табл. 1).

В сыворотке крови животных, инокулированных невритогенной и энцефалитогенной смесями, но не заболевших, содержание триглицеридов было даже ниже контрольного уровня, тогда как у кроликов, инокулированных ПАФ, концентрация триглицеридов в сыворотке крови была значительно увеличена и составляла 140 мг/100 мл.

Повышение концентрации триглицеридов и холестерина в сыворотке крови животных с ЭАП и ЭАЭ может указывать на увеличение концентрации в крови липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП) и липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) соответственно. В сыворотке крови незболевших кроликов содержание холестерина и триглицеридов практически не превышало контроля. И, следовательно, можно ожидать, что количество ЛПНП и ЛПОНП в крови этих животных не повышалось. На основании этих фактов можно сделать вывод о том, что увеличение содержания в сыворотке крови кроликов с ЭАП и ЭАЭ триглицеридов и холестерина, а следовательно, ЛПОНП и ЛПНП в определенной степени коррелирует с развитием этих патологических процессов.

Изменения содержания в сыворотке крови кроликов с ЭАП суммарной фракции  $\beta$ - и пре- $\beta$ -ЛП представлены на рис. 2. Уже к 10-му дню после инокуляции невритогенной смеси количество суммарной фракции  $\beta$ - и пре- $\beta$ -ЛП возрастало, достигая к 30-му дню 580 мг/100 мл при исходном уровне 120 мг/100 мл, т. е. данный показатель возрастал в 4,8 раза. Электрофоретический анализ ЛП сыворотки крови кроликов также показал, что у животных с ЭАП заметно повышалась интенсивность полос  $\beta$ - и пре- $\beta$ -ЛП, тогда как интенсивность полосы  $\alpha$ -ЛП заметно снижалась (рис. 3 на стр. 427). При этом важно отметить, что у сенсибилизированных, но не заболев-

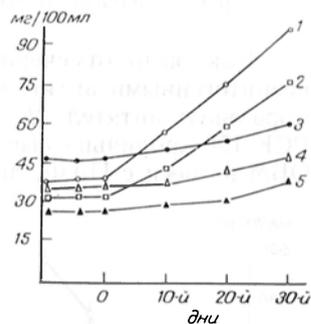


Рис. 1. Концентрация холестерина в сыворотке крови кроликов с ЭАЭ (1), с ЭАП (2), инокулированных ПАФ (3), незболевших (4) и инокулированных физиологическим раствором (5).

что метка с колонки выходит двумя пиками. Первый представляет собой белковосвязанный ТДФ, второй — свободную кокарбоксилазу. Фракции из первого пика не обладали транскетолазной активностью. Характерно, что если на колонку дополнительно в качестве маркера добавляли гиалоплазматическую транскетолазу, не меченную по ТДФ, то в зоне элюции этого фермента метка не обнаруживается. Определение тиамин тioxромным методом подтверждает полученные данные. Это дает право с полной уверенно-

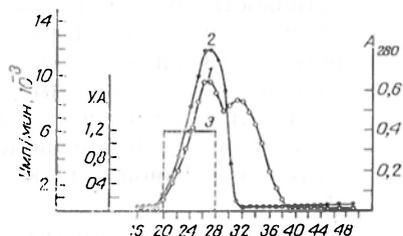


Рис. 2. Гель-фильтрация белкового препарата на колонке с сефадексом G-200.

1 — профиль элюции белка; 2 — профиль радиоактивности; 3 — удельная активность транскетолазы. Здесь и на рис. 3, 4: По оси абсцисс — номер фракции.

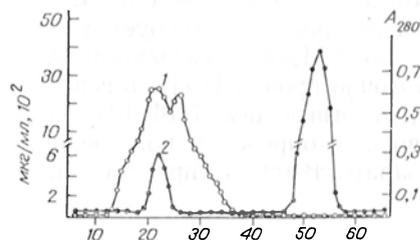


Рис. 3. Профиль элюции митохондриальных белков.

1 — профиль элюции белка; 2 — профиль элюции метки.

стью утверждать, что ТДФ в митохондриях печени включается исключительно в состав дегидрогеназ  $\alpha$ -кетокислот. Обнаружение транскетолазы в митохондриях печени [3, 20] следует, по-видимому, считать артефактом. Нами было установлено, что если при выделении митохондрий их отмывка проводится недостаточно тщательно, то они, как правило, загрязнены тяжелыми микросомами, сосаждающимися при центрифугировании с митохондриями. Вероятно, поэтому транскетолазная активность обнаруживается лишь после обработки препарата (митохондрии + микросомы) детергентами, когда происходит освобождение энзима из микросом. Для доказательства гиалоплазматического происхождения транскетолазы в указанных выше структурах

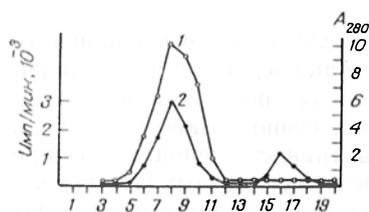


Рис. 4. Гель-фильтрация матрикса микросом на колонке с сефадексом G-25.

1 — профиль элюции белка; 2 — профиль элюции метки.

нами из постмитохондриального надосадка печени крыс, получавших  $^{14}\text{C}$ -тиамин, были выделены эти пузырьки центрифугированием при 16 000 g а течение 10 мин. Отмывку осадка производили до исчезновения метки в отмывающей жидкости. Полученные структуры, содержащие около 10% метки от общего гомогената, подвергали многократному замораживанию и оттаиванию. В матриксе и тенях определяли активность транскетолазы и содержание метки. При этом оказалось, что метка почти полностью обнаруживается в матриксе. Там же сосредоточена и транскетолазная активность. Из представленных на рис. 4 данных по гель-фильтрации матрикса на колонке с сефадексом G-25 видно, что количество белковосвязанной метки составляет около 72%, а свободной — 28%. Определение тиамин в этих фракциях флуориметрическим методом дает такое же соотношение, как и в гиалоплазме [2]. Нет также различий и по качественному составу метки. Удельная активность транскетолазы из матрикса и гиалоплазмы почти одинакова и составляет 0,06 ед/мг белка. Отсюда можно сделать предположение, что ТДФ, обнаруживаемый в микросомальной фракции, по сути дела является гиалоплазматическим.

В заключение следует сделать вывод, что после внутримышечного введения  $^{14}\text{C}$ -тиамин он в виде своего пирофосфорного эфира включается в рас-

творимой части гепатоцитов только в транскетолазу. В ядрах ТДФ не накапливается. В митохондриях ТДФ связывается исключительно с дегидрогеназами  $\alpha$ -кетокислот. Никаких продуктов деградации витамина в митохондриях не обнаруживается. Длительное удерживание тиаминовой метки в виде различных продуктов метаболизма в гиалоплазме печени в отличие от опыта с окситиамином указывает на образование необходимых для организма метаболитов, с чем, вероятнее всего, можно связать проявления некоферментной активности тиамин.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Воскобоев А. И., Гриценко Э. А., Грушник В. В. — В кн.: Пентозофосфатный путь превращения углеводов и его регуляция. Гродно, 1978, с. 35—36.
2. Островский Ю. М., Воскобоев А. И., Гриценко Э. А. и др. — Прикладная биохим., 1979, № 5, с. 728—734.
3. Гулая М. П., Германюк Я. Л., Гижко А. В. — Укр. біохім. ж., 1971, т. 43, с. 487—491.
4. Kiessling K. H., Lundquist C. G. — Exp. cell. Res., 1962, v. 26, p. 189—197.
5. Itokava J. — Vitamins, v. 32, p. 205—214.
6. Рыбина А. С. — Укр. біохім. ж., 1969, т. 41, с. 475—479.
7. Лейс М. Ф. — Там же, 1967, т. 39, с. 308—312.
8. Balagahi M., Pearson W. M. — J. Nutr., 1966, v. 89, p. 127—134.
9. Deus H., Blum H. — Biochim. biophys. Acta, 1970, v. 219, p. 489—492.
10. De Duve C., Pressmann V. C., Gianetto R. et al. — Biochem. J., 1955, v. 60, p. 604—610.
11. Черникевич И. П., Воскобоев А. И., Грушник В. В. и др. — Изв. АН БССР, Серия биол. наук, 1976, № 3 с. 112—116.
12. Островский Ю. М., Воскобоев А. И., Горенштейн Б. И. и др. — Биохимия, 1979, т. 44, с. 1551—1557.
13. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. М., 1971.
14. De la Haba G., Leder J. G., Racker E. — J. biol. Chem., 1955, v. 214, p. 409—415.
15. Bessey O. A., Lowry O. H., Davis E. — Ibid., 1952, v. 195, p. 453—457.
16. Островский Ю. М. Активные центры и группировки в молекуле тиамин. Минск, 1975.
17. Воскобоев А. И., Черникевич И. П., Островский Ю. М. — Биохимия, 1976, т. 41, с. 1784—1787.
18. Островский Ю. М. Тиамин. Минск, 1971.
19. Кочетов Г. А., Минин А. А. — Биохимия, 1978, т. 43, с. 1631—1635.
20. Кудрявцева Г. В., Гайло Т. А., Колотилова А. И. — Там же, 1976, т. 41, с. 363—367.

Поступила 12/V 1980 г.

#### STORAGE OF $^{14}\text{C}$ -THIAMINE IN RAT LIVER SUBCELLULAR FRACTIONS

A. I. Voskoboyev, V. A. Averin, Yu. M. Ostrovsky

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

Distribution of  $^{14}\text{C}$ -thiamine and its incorporation into TPP-dependent enzymes of rat liver subcellular fractions were studied. Thiamine was stored mainly in hyaloplasm and mitochondria. In nuclear and microsomal fractions presence of the vitamin was due to contamination by hyaloplasm components during the destruction of liver cells. In the proteins of hyaloplasm the label was incorporated in transketolase only. On the basis of these findings a procedure for isolation of the enzyme was developed. The purification process is monitored by calculation of specific radioactivity instead of the specific enzymatic activity of transketolase. In the mitochondria  $^{14}\text{C}$ -TPP was incorporated only into  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complexes; transketolase was not found in the mitochondria. Metabolism of subcutaneously injected  $^{14}\text{C}$ -thiamine was studied in liver mitochondria and hyaloplasm.

М. А. Туманян, А. П. Дуплищева, Н. Г. Синилова,  
Г. А. Серебренникова, В. Н. Клыков

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НЕЙТРАЛЬНЫХ ЛИПИДОВ В КАЧЕСТВЕ СТИМУЛЯТОРОВ ЕСТЕСТВЕННОГО НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУНИТЕТА

Лаборатория естественного иммунитета Института эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР, Москва, кафедра технологии тонких органических соединений Московского института тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова

Современная медицина нуждается в препаратах, которые могли бы направленно регулировать иммунологические процессы, подавляя или стимулируя их.

Изучению подвергаются вещества, относящиеся к различным классам химических соединений. В частности, в отечественной и зарубежной литературе имеются данные, свидетельствующие о том, что некоторые липиды растительного и животного происхождения обладают биологической активностью: повышают продукцию специфических антител у интактных и облученных животных, оказывают радиозащитное действие, являются митогенами В-лимфоцитов и др. [1—6]. Однако влияние этих веществ на естественный иммунитет изучено недостаточно. Практически отсутствуют данные о взаимосвязи между особенностями структуры липидов и их биологическим действием.

Целью настоящей работы было изучить влияние нейтральных липидов с известной химической структурой на некоторые показатели естественного неспецифического иммунитета.

### М е т о д и к а

В работе использованы указанные в табл. 1 нейтральные липиды: 1-алкиловые эфиры глицерина (I—V), 1-0-(1-алкенил)-sn-глицерины (VI—VII), а также алкиловые (VIII, X), 1-алкениловые (XI) и ацильные (IX) производные холестерина. Препараты были получены на кафедре химии и технологии тонких органических соединений Московского института тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова. В качестве стандартного препарата для сравнения был использован хорошо изученный нами ранее стимулятор естественного иммунитета сальмозан, представляющий собой полисахарид О-соматического антигена бактерий брюшного тифа (*S. typhi*, 4446) [7, 8]. Препарат сальмозан приготовлен в лаборатории естественного иммунитета Института эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР. Опыты поставлены на белых беспородных мышах-самцах массой 18—20 г.

Все препараты вводили животным однократно внутривентриально в дозе 100 мкг в виде водных эмульсий, приготовленных с использованием твина-20. Препарат полисахарида О-соматического антигена применяли в виде водных растворов. Вышедших из опыта животных усыпляли парковым эфиром.

В настоящее время не существует единого метода, с помощью которого можно однозначно определять уровень естественного неспецифического иммунитета. Поэтому для характеристик состояния естественного иммунитета обычно используют несколько методов, позволяющих оценить различные факторы клеточного и гуморального иммунитета. Для первичной оценки биологического действия липидных препаратов были использованы следующие тесты: определение неспецифической резистентности мышей к заражению бактериями брюшного тифа; определение содержания лизоцима в сыворотке крови; определение радиозащитного действия.

*Определение неспецифической резистентности животных к заражению.* Каждая опытная и контрольная группа состояла из 24 животных. Подопытным мышам вводили липидные препараты, контрольным — физиологический раствор. Через 3 дня после введения липидных препаратов или физиологического раствора животных заражали внутривентриально кратными дозами (1000, 200, 40, 8 млн. микробных клеток) живой культуры бактерий брюшного тифа (штамм *S. typhi*, 4446). Учитывали гибель мышшей в течение 5 дней после заражения. Для каждой группы животных вычисляли дозу бактериальной культуры (в миллионах микробных тел), убивающую 50% зараженных мышшей — ЛД<sub>50</sub> [9] и индексы резистентности (ИР). Последний представляет собой отношение ЛД<sub>50</sub> для опытной группы к ЛД<sub>50</sub> для контрольной группы животных. Опыты были повторены не менее 5 раз. Метод позволяет оценить состояние клеточных механизмов естественного иммунитета.

*Определение содержания лизоцима в сыворотке крови.* Определение производили в пуле сыворотки крови от 5 животных методом диффузии в агар [10]. В качестве тест-микроба использовали убитую ацетоном культуру *Micrococcus lysodeicticus*. Стандартными растворами служили растворы лизоцима яичного белка в концентрации 1, 2 и 4 мкг/мл. Содержание лизоцима в сыворотке крови в микрограммах на 1 мл определяли по величине диаметров зон лизиса. По данным, полученным для стандартных растворов лизоцима, строили калибровочную кривую, пользуясь которой вычисляли содержание лизоцима в испытуемых сыворотках крови. Опыты повторяли не менее 3 раз. Метод использован для оценки состояния гуморальных факторов естественного иммунитета.

*Определение радиозащитного действия препаратов.* Известно, что при действии на организм ионизирующих излучений в дозах, вызывающих костномозговой синдром, гибель животных обуславливается в основном инфекционными осложнениями, которые развиваются вследствие повреждения клеточных и гуморальных механизмов естественного иммунитета. Это позволяет рассматривать вещества, оказывающие радиозащитное действие, как стимуляторы естественной резистентности организма к инфекции. Определение радиозащитного действия производили, как сообщалось ранее [7]. Опытные и контрольные группы состояли из 25—30 животных. Подопытным животным вводили липидные препараты, контрольным—дистиллированную воду. Для сравнения эффективности действия была использована еще одна контрольная группа животных, которым был введен сальмозан. Через 24 ч после введения препаратов животных облучали  $\gamma$ -излучением ( $^{60}\text{Co}$ ) на установке «Эку-50». Доза облучения 725 рад ( $\text{LD}_{50/30}$ ), мощность дозы 82 рад/мин [7, 8]. Радиозащитное действие препаратов оценивали по числу выживших животных в течение 30 дней после облучения. Все исследованные препараты были проверены не менее чем в 3—5 опытах.

### Результаты и обсуждение

В табл. 2 представлены данные по определению биологической активности различных препаратов нейтраль-

Таблица 1

Исследованные препараты нейтральных липидов

№ препарата	Наименование препарата	R	R' = R*
I	1-0-Гексадецил-сп-глицерин (химический спирт)	$\begin{array}{l} \text{H}-\text{C}_{16}\text{H}_{33} \\ \text{H}-\text{C}_{18}\text{H}_{37} \\ -\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-(\text{CH}_2)_{13}-\text{CH}_3 \\ -(\text{CH}_2)_8\text{OH}-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3 \\ -(\text{CH}_2)_8-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3 \\ -\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3 \\ \text{цис} \end{array}$	$\begin{array}{l} -\text{H} \\ -\text{H} \\ -\text{H} \\ -\text{H} \\ -\text{H} \\ -\text{H} \\ -\text{H} \end{array}$
II	1-0-Октадецил-сп-глицерин (химический спирт)		
III	1-0-(2-Оксигексадецил)-сп-глицерин		
IV	Цис-1-0-(9-октадеценил)-сп-глицерин		
V	Цис, цис-1-0-(9, 12-октадекаденил)-сп-глицерин		
VI	Цис, цис-1-0-(1,9-октадекаденил)-сп-глицерин		
VII	Транс, цис-1-0-(1,9-октадекаденил)-сп-глицерин		
VIII	3-0-(1-Гексадецил)-холестерин	$\begin{array}{l} \text{H}-\text{C}_{16}\text{H}_{33} \\ -\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3 \\ -(\text{CH}_2)_8-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3 \\ -\text{CO}-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{l} -\text{H} \\ -\text{H} \\ -\text{H} \\ -\text{H} \\ -\text{H} \end{array}$
IX	3-0-(1-Гексадецил)-холестерин		
X	3-0-(9-Октадеценил)-холестерин		
XI	Линолевый эфир холестерина		

ных липидов. Как видно, все исследованные препараты оказались биологически активными соединениями. Они повышали резистентность животных к заражению бактериями брюшного тифа, изменяли содержание лизоцима в сыворотке крови и обладали радиозащитной способностью. Особенно это было заметно по такому показателю, как изменение резистентности животных к заражению. Препараты нейтральных липидов в 2—5 раз повышали устойчивость животных к заражению и на 10—18 % по сравнению с контролем — выживаемость летально облученных животных.

Таблица 2

Влияние препаратов нейтральных липидов на резистентность животных к заражению *S. typhi*<sub>2</sub> 4446, содержание лизоцима в сыворотке крови и устойчивость мышей к  $\gamma$ -излучению

№ препаратов (по табл. 1)	Резистентность к заражению ( <i>n</i> = 24)		Содержание лизоцима ( <i>n</i> = 5)	Радиопротективное действие, ( <i>n</i> = 30)
	ЛД <sub>50</sub> , млн. микробных клеток $\pm m$	ИР	мкг/мл $\pm m$	% выживших $\pm m$
I	329,9 $\pm$ 57,9	4,4	2,05 $\pm$ 0,5	16,9 $\pm$ 3,6
II	359,8 $\pm$ 77,7	4,8	2,1 $\pm$ 0,37	18,5 $\pm$ 3,4
III	365,7 $\pm$ 38,6	4,9	2,2 $\pm$ 0,41	17,3 $\pm$ 4,4
IV	331,1 $\pm$ 68,7	4,4	2,18 $\pm$ 0,35	17,5 $\pm$ 3,3
V	195,2 $\pm$ 33,5	2,6	2,21 $\pm$ 0,26	10,0 $\pm$ 3,3
VI	249,9 $\pm$ 48,1	3,3	2,27 $\pm$ 0,24	15,9 $\pm$ 2,8
VII	241,9 $\pm$ 38,5	3,2	2,4 $\pm$ 0,19	13,1 $\pm$ 2,5
VIII	152,9 $\pm$ 28,4	2,0	2,1 $\pm$ 0,4	14,6 $\pm$ 4,1
IX	135,3 $\pm$ 20,6	1,8	2,1 $\pm$ 0,4	16,0 $\pm$ 4,2
X	—	—	—	17,3 $\pm$ 4,4
XI	232,9 $\pm$ 41,0	3,1	2,2 $\pm$ 0,27	12,0 $\pm$ 6,5
Сальмозан	1330,0 $\pm$ 196,6	17,8	2,35 $\pm$ 0,22	33,3 $\pm$ 5,8
Контроль	74,6 $\pm$ 3,9	1,0	1,9 $\pm$ 0,2	5,4 $\pm$ 2,3

Для исследований по выяснению взаимосвязи между эффективностью действия и особенностями химической структуры липидной молекулы были использованы для большей наглядности разнообразные монопроизводные глицерина (см. табл. 1). Было показано, что соединения, содержащие высшие насыщенные жирные спирты в боковой цепи — химоловый и батиловый спирты (I и II), оказались достаточно эффективными и имели приблизительно одинаковую биологическую активность по всем трем показателям. Они в 4—5 раз повышали резистентность мышей к заражению бактериями брюшного тифа. Выживаемость облученных животных, получивших эти препараты, более чем в 3 раза превышала выживаемость в контроле. Сопоставление действия химолового и батилового спиртов показало, что различие на 2 метиленовые группировки в боковой цепи липидной молекулы мало сказывается на уровне биологического действия. Однако была отмечена некоторая тенденция к более высокой активности у октадецилового производного глицерина (II) по сравнению с гексадециловым (I).

Соединения, содержащие окси-группировку (III), обладали аналогичным свойством. Наличие в липидной молекуле одной (IV) или двух (V, VI, VII) двойных связей не увеличивало эффективности препаратов. Однако соединение с одной двойной связью (IV) по уровню действия не уступало вышеназванным препаратам (I, II, III). Насыщенные соединения с двумя двойными связями (V, VI, VII) действовали несколько слабее, чем соединения, не содержащие (I, II, III) или содержащие (IV) одну двойную связь. Тем не менее они более чем в 2 раза повышали резистентность к инфекции и статистически достоверно увеличивали выживаемость летально облученных животных.

Более подробное изучение влияния структурных особенностей соединений с двумя двойными связями позволило установить, что положение двойных связей в цепи жирных спиртов в какой-то мере сказывается на уровне биологической активности. Соединения с положением двойных связей — 9, 12 (V) действовали слабее, чем с положением — 1,9 (VI и VII). Напротив, не было отмечено влияния на эффективность биологического действия цис, цис- и транс, дис-изомерии, как это показано на примере изомеров соединений с положением двойных цепей — 1,9 в боковой цепи (VI, VII). Испытание холестеринových производных глицерина (VIII, IX, X, XI) показало, что они также являются биологически активными соединениями. Для этих препаратов были выявлены те же особенности зависимости структуры и действия, что и для монопроизводных глицерина. Увеличение на 2 метиленовые группировки, а также изменение положения двойной связи в боковой цепи практически не сказались на уровне биологического действия, как это видно из сопоставления результатов действия соединений X и IX. Наличие одной двойной связи в боковой цепи также не изменяло биологической активности препаратов, что показано на примере соединений VIII и IX.

Оценивая в целом эффективность испытанных липидных препаратов, предпочтение следует отдать 1-о-октадецил-сп-глицерину (батыловому спирту). При использовании этого препарата во всех опытах были получены стабильные, хорошо воспроизводимые положительные результаты. Простая молекулярная структура, лишенная каких-либо лабильных группировок, обеспечивающая химическую устойчивость этого соединения, относительная легкость технологической схемы получения и др. делают этот препарат особенно интересным с точки зрения возможности его дальнейшего использования в качестве стимуляторов неспецифической резистентности организма к инфекции.

Сопоставление действия нейтральных липидов со взятым в качестве стандарта сальмозаном показало, что в целом липидные препараты уступали по биологической активности полисахаридному препарату. Следует отметить, что в настоящих опытах были использованы условия, оптимальные для проявления действия сальмозана (доза вещества, пути и сроки введения и др.). Возможно, что дальнейшие специальные исследования липидных препаратов позволят найти иной режим работы, более благоприятный для проявления их стимулирующего действия.

Таким образом, проведенные исследования показали, что нейтральные липиды могут представить интерес в качестве веществ, стимулирующих естественный иммунитет. Для проявления биологического действия не требуется особо сложной химической структуры нейтральных липидов. Достаточно активными являются монопроизводные глицерина. Следует подчеркнуть, что исследование зависимости между структурой препаратов и способностью стимулировать неспецифический иммунитет представляет значительные трудности. Только использование разнообразных иммунологических методов может позволить выявить отдельные системы иммунокомпетентных клеток или их субпопуляции, на которые преимущественно действуют определенные структуры нейтральных липидов. Несомненно, необходимо продолжение дальнейших исследований нейтральных липидов для получения большей информации о механизме их стимулирующего действия.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Chedid L. — Bull. Inst. Pasteur, 1976, v. 74, p. 103—105.
2. Ginsberg M. N., Morrison D. C. — J. Immunol., 1978, v. 120, p. 317—319.
3. Алексеева В. М. — Биофизика, 1958, т. 3, № 1, с. 101—107.
4. Ashikawa J. K., Anderson O. K. — J. radiat. Res., 1960, v. 13, p. 99—107.
5. Magsood M., Ashikawa J. K. — Int. J. Radiat. Biol., 1962, v. 4, p. 521—531.
6. Poe W. J., Michael J. G. — Immunology, 1976, v. 30, p. 241—248.
7. Дуплищева А. П., Синилова Н. Г., Иванов К. К. — Радиобиол. радиотер., 1972, т. 13, № 1, с. 113—122.
8. Туманян М. А., Дуплищева А. П., Гордеева М. С. и др. — В кн.: Успехи иммунологии. М., 1977, с. 113—119.

9. Reed L., Muench H. — *Am. J. Hyg.*, 1938, v. 27, p. 493—497.  
10. Каграманова К. А., Ермольева З. В. — *Антибиотики*, 1966, № 10, с. 917—919.

Поступила 10/VI 1980 г.

## NEUTRAL LIPIDS AS STIMULATORS OF NATURAL UNSPECIFIC IMMUNITY

M. A. Tumanyan, A. P. Duplischeva, N. G. Sinilova, G. A. Serebryannikova,  
V. N. Klykov

Laboratory of Natural Immunity, N. F. Gamaleya Institute of Epidemiology and Microbiology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Chair of Technology of Fine Organic Substances, M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow

Neutral lipids (various monoglycerides and cholesterol derivatives) were used as stimulators of natural unspecific immunity. All the compounds studied exhibited the biological activity. Saturated monoglycerides (chimyol and batyl alcohols) and cholesterol derivatives possessed the highest activity. Unsaturated lipids with double bonds were less active.

УДК 616.833-002.031.14+616.832-0021-092.9-07:616.153.96\*915

В. М. Плесков, В. Ф. Трюфанов, Ю. Л. Житнухин, Г. В. Коновалов

## ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ ЛИПИДОВ И ЛИПОПРОТЕИДОВ В КРОВИ КРОЛИКОВ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМИ АЛЛЕРГИЧЕСКИМИ ПОЛИНЕВРИТОМ И ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТОМ

Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины АМН СССР,  
Ленинград

Экспериментальные аллергические полиневрит и энцефаломиелит (ЭАП и ЭАЭ соответственно), воспроизводимые путем инокуляции животным основных белков миелина (ОБМ) периферической и центральной нервной системы в смеси со стимулятором Фрейнда, относятся к аутоиммунным заболеваниям нервной системы [1]. Известно, что сенсибилизация животных энцефалито- и невритогенными антигенами приводит, как правило, к появлению гуморальных антител [2—6]. В то же время характер нарушений липидного обмена при ЭАП и ЭАЭ практически не изучен. Между тем эта сторона проблемы привлекает к себе большое внимание. Так, исследованиями последних лет установлена способность различных аутоантител индуцировать гиперлипидемию [7]. Подобный эффект наблюдается и при различных гипериммунизациях [8]. Кроме того, обнаружено наличие аутоантител к  $\beta$ -липопротеидам ( $\beta$ -ЛП) у лиц миеломной болезнью или ревматоидным синдромом [9, 10]. На основании этих данных был выявлен и описан новый тип липидемии — аутоиммунная гиперлипидемия — повышенные уровни липидов в крови в ответ на различные виды сенсибилизации.

Механизм аутоиммунной гиперлипидемии до сих пор не изучен. Высказано предположение о том, что указанный феномен связан с блокированием антителами участков липопротеидной частицы, подвергающихся воздействию липопротеидлипазы, а возможно, и с прямым действием антител на молекулу данного фермента [11—13]. Поскольку у животных с ЭАЭ и ЭАП имеется специфическая сенсибилизация с гуморальным и клеточным типом иммунного ответа, целесообразно было выяснить в этих условиях особенности липидного обмена и их влияние на течение аутоиммунных процессов.

Задачей настоящего исследования явилось изучение липидного обмена у кроликов с ЭАП и ЭАЭ в условиях реализации патогенного эффекта аутоиммунных реакций и сопоставление выявленных изменений с заболеваемостью и динамикой развития указанных выше заболеваний.

### Методика

Опыты проведены на кроликах-самцах породы шиншилла массой 2,5—3,0 кг. ЭАП и ЭАЭ вызывали подкожной (в подушечки лап) инокуляцией неврито- и энцефалогенной смеси соответственно. Для индукции ЭАЭ использовали ОБМ, выделен-

ный из спинного мозга быка методом колоночной хроматографии [14]. Невритогенным антигеном служил миелин, выделенный из периферических нервов быка [15]. ОБМ растворяли, а миелин взвешивали в 0,4 мл физиологического раствора и смешивали с 0,4 мл полного адьюванта Фрейнда (ПАФ). Сенсибилизированных животных ежедневно контролировали для своевременного обнаружения неврологических симптомов ЭАЭ и ЭАП: мышечной слабости, атаксии, парезов, двигательных и функциональных параличей, кахексии и др. У всех животных перед инокуляцией и в разные сроки после инокуляции невритогенной или энцефалитогенной смеси исследовали взятую из ушной вены кровь для определения в ней холестерина, триглицеридов и суммарной фракции  $\beta$ - и пре- $\beta$ -ЛП. Количество холестерина и триглицеридов в крови измеряли на автоанализаторе АА-2 фирмы «Техникон» с применением международной стандартизации исследования липидов крови [16], суммарную фракцию  $\beta$ - и пре- $\beta$ -ЛП — турбидиметрическим методом [17]. Спектр ЛП в сыворотке крови анализировали методом дискового электрофореза в полиакриламидном геле [18]. Сыворотку крови исследовали на содержание антител с помощью реакции связывания комплемента (РСК) при 4 °С [19] в присутствии антигена в концентрации 0,1 мг/кг.

## Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены изменения концентрации холестерина в сыворотке крови кроликов с ЭАП, ЭАЭ, а также животных, инокулированных ПАФ и физиологическим раствором. Как видно из этого рисунка, уже к 10-му дню от начала эксперимента уровень холестерина в сыворотке крови у заболевших ЭАЭ и ЭАП кроликов возрастал в среднем в  $1\frac{1}{2}$  раза. В последующем (на 20-й и 30-й дни) концентрация холестерина превышала контроль в  $2\frac{1}{2}$  раза. В то же время у кроликов, инокулированных только ПАФ или невритогенной смесью, но не заболевших, количество холестерина повышалось незначительно и не достигало того уровня, при котором у подопытных кроликов развивалось заболевание. Обращает на себя внимание также увеличение содержания триглицеридов в сыворотке крови кроликов с ЭАП и ЭАЭ (табл. 1).

В сыворотке крови животных, инокулированных невритогенной и энцефалитогенной смесями, но не заболевших, содержание триглицеридов было даже ниже контрольного уровня, тогда как у кроликов, инокулированных ПАФ, концентрация триглицеридов в сыворотке крови была значительно увеличена и составляла 140 мг/100 мл.

Повышение концентрации триглицеридов и холестерина в сыворотке крови животных с ЭАП и ЭАЭ может указывать на увеличение концентрации в крови липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП) и липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) соответственно. В сыворотке крови незболевших кроликов содержание холестерина и триглицеридов практически не превышало контроля. И, следовательно, можно ожидать, что количество ЛПНП и ЛПОНП в крови этих животных не повышалось. На основании этих фактов можно сделать вывод о том, что увеличение содержания в сыворотке крови кроликов с ЭАП и ЭАЭ триглицеридов и холестерина, а следовательно, ЛПОНП и ЛПНП в определенной степени коррелирует с развитием этих патологических процессов.

Изменения содержания в сыворотке крови кроликов с ЭАП суммарной фракции  $\beta$ - и пре- $\beta$ -ЛП представлены на рис. 2. Уже к 10-му дню после инокуляции невритогенной смеси количество суммарной фракции  $\beta$ - и пре- $\beta$ -ЛП возрастало, достигая к 30-му дню 580 мг/100 мл при исходном уровне 120 мг/100 мл, т. е. данный показатель возрастал в 4,8 раза. Электрофоретический анализ ЛП сыворотки крови кроликов также показал, что у животных с ЭАП заметно повышалась интенсивность полос  $\beta$ - и пре- $\beta$ -ЛП, тогда как интенсивность полосы  $\alpha$ -ЛП заметно снижалась (рис. 3 на стр. 427). При этом важно отметить, что у сенсибилизированных, но не заболев-

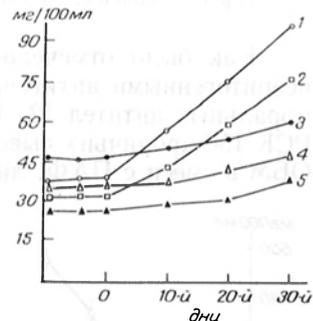


Рис. 1. Концентрация холестерина в сыворотке крови кроликов с ЭАЭ (1), с ЭАП (2), инокулированных ПАФ (3), незболевших (4) и инокулированных физиологическим раствором (5).

ших ЭАП и ЭАЭ кроликов уровень  $\alpha$ -ХС в сыворотке крови возрастал. Так, при норме содержания  $\alpha$ -ХС в сыворотке крови 13 мг/100 мл его концентрация у незаболевших кроликов составляла 18 мг/100 мл. Полученные данные свидетельствуют о резком (в 4,8 раза) увеличении уровня ЛПОИП и ЛПНП и снижении содержания ЛП высокой плотности в сыворотке крови кроликов с ЭАП и ЭАЭ. Подобные закономерности, но более выраженные, наблюдались и у животных с экспериментальным (холестериновым) атеросклерозом, что в определенной степени указывает на сходство отдельных патогенетических звеньев этих заболеваний.

Таблица 1

Содержание холестерина и триглицеридов в сыворотке крови кроликов ( $M \pm m$ )

Показатель, мг/100 мл	Группа животных					
	контрольная (26)	с ЭАП (6)	с ЭАЭ (12)	неболевшие (4)	инокулированные ПАФ (2)	инокулированные физиологическим раствором (2)
Холестерин	32 ± 1,18	76 ± 3,41	98 ± 4,1	44	58	39
Триглицериды	63 ± 2,27	165 ± 6,07	157 ± 5,31	54	140	81

Примечание. В скобках — число исследованных животных.

Как было отмечено выше, сенсibilизация животных энцефалито- и невритогенными антигенами приводит к появлению в сыворотке крови гуморальных антител [2—6]. В данной работе при исследовании с помощью РСК 156 кроличьих сывороток, полученных в разные сроки от инокуляции ОБМ в смеси с ПАФ, лишь в 4 удалось обнаружить антитела в невысоком (1 : 10) титре через 21 день после сенсibilизации. В то же время при иммунизации кроликов миелином, выделенным из периферических нервов быка, комплементсвязывающие антитела к этому антигену в относительно высоких титрах выявлены во всех сыворотках в период с 7-го по 42-й день после введения невритогена (табл. 2).

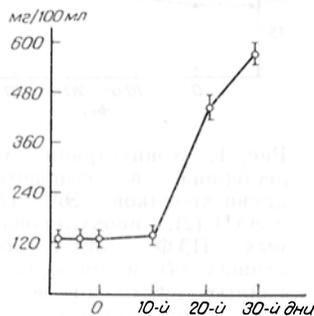


Рис. 2. Концентрация суммарной фракции  $\beta$ - и пре- $\beta$ -ЛП в сыворотке крови кроликов с ЭАП.

Из приведенных данных видно, что в сыворотке крови животных с ЭАЭ, индуцированной высокоочищенным энцефалитогеном, практически не обнаружены комплементсвязывающие антитела, в то время как у животных с ЭАП отмечалось четкое нарастание их титра. На основании полученных результатов можно предположить, что антитела против миелина, встречающиеся в сыворотке крови животных с ЭАП, — не специфические в отношении ОБМ, а являются следствием иммунной реакции на входящие в состав миелина другие антигены, обладающие более высокой иммуногенной активностью.

Установлено, что ЭАЭ может быть индуцирован у морских свинок широким диапазоном доз ОБМ без продукции поддающихся определению количеств антител к энцефалитогену [20]. Известно также, что изменением пропорции антигена и микобактерий можно индуцировать антитела к гомологичному антигену у морских свинок без того, чтобы ЭАЭ клинически и гистологически отличался от заболевания, индуцированного без антител [21]. В свете этих данных возникает вопрос о необходимости образования антител при иммунизации животных ОБМ для индукции аутоиммунного процесса. На основании результатов нашего исследования можно высказать предположение, что либо ОБМ является слабым антигеном и не стимулирует продукцию антител в количестве, поддающемся определению

с помощью применяемых методов, либо, что более вероятно, продуцируемые антитела формируют комплекс, например, с циркулирующими в крови  $\beta$ - и пре- $\beta$ -ЛП, количество которых в сыворотке крови заболевших животных, как было установлено, резко возрастает. Повышение уровня липидов и суммарной фракции  $\beta$ - и пре- $\beta$ -ЛП свидетельствует также о развитии у кроликов с ЭАП и ЭАЭ аутоиммунной гиперлипидемии, которая в этом случае может протекать по антилипопротеиновому типу, т. е. в результате блокирования антителами участков, расположенных на поверхности ЛП, подвергающихся действию расщепляющих их энзимов. В то же время об-

Таблица 2

Комплементсвязывающие антитела в сыворотке крови кроликов с ЭАП

Иммунологический показатель	Срок после введения невритогенной смеси, сут					
	7	10	12	14	17	19
Частота обнаружения антител*	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8
Средние титры антител**	4,4±0,4	7,1±0,2	7,5±0,1	8,0±0,1	8,2±0,1	8,4±0,1

*Продолжение*

Иммунологический показатель	Срок после введения невритогенной смеси, сут					
	21	24	27	31	34	42
Частота обнаружения антител*	8/8	7/7	7/7	7/7	7/7	6/6
Средние титры антител**	8,8±0,1	8,9±0,1	8,9±0,1	8,4±0,3	8,4±0,3	8,0±0,3

\* Числитель — число сывороток с антителами; знаменатель — число испытанных сывороток.

\*\* Титры антител выражены в  $Lg_2$ .

разовавшиеся иммунные комплексы могут, фиксируясь на эндотелии сосудов, изменять его проницаемость и вызывать повреждение сосудистой стенки, что установлено в отношении иммунных комплексов, образующихся при развитии и прогрессировании атеросклероза [22].

Таким образом, на основании приведенных данных можно предположить, что у животных с аутоиммунными заболеваниями, такими как ЭАЭ и ЭАП, гуморальные антитела формируют комплексы с ЛПОИП и ЛПНП, образование которых в организме способствует развитию аутоиммунной гиперлипидемии и изменению проницаемости сосудов гематоэнцефалического барьера, что, несомненно, играет важную роль в патогенезе этих заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жаботинский Ю. М. — В кн.: Современные проблемы иммунологии и иммунопатологии. Л., 1970, с. 231.
2. Житнухин Ю. Л., Зубжицкий Ю. Н. — Бюлл. exper. биол., 1972, № 8, с. 63.
3. Whitaker J. N. — J. Immunol., 1975, v. 114, p. 823.
4. Swierkosz J. E., Swanborg R. H. — J. Immunol., 1975, v. 114, p. 840.
5. Vucenik I., Veselic B., Vitalie B. — Period. biologorum.
6. Fritz R. B., Chou C.-H. J., Randolph D. H. et al. — Ibid., 1978, v. 121, p. 1865.
7. Beaumont J. L. — Rev. Europ. Etud. Clin. Biol., 1970, v. 15, p. 1037.
8. Hardin H. J., Minick C. R., Murphy G. E. — Am. J. Path., 1973, v. 73, p. 301.
9. Beaumont J. L. — C. R. Acad. Sci. (Paris), 1966, v. 263-D, p. 2046.
10. Noseda G., Risen W., Schlumpf E. et al. — Schweiz. med. Wschr., 1972, Bd 102, S. 969.
11. Beaumont J. L., Beaumont V. — Atheroscler. Rev., 1978, v. 3, p. 133.
12. Beaumont J. L., Beaumont V. — In: Atherosclerosis. Ed. by G. Schettler and A. Weirel, v. 3, p. 579.
13. Glueck C. I., McKenzie M. R., Glueck C. J. — J. Lab. clin. Med., 1972, v. 79, p. 731.
14. Плесков В. М., Саакян И. Л., Житнухин Ю. Л. — Вопр. мед. химии, 1979, № 4, с. 420.

15. Коновалов Г. В., Аннанепесов Х. А., Красильникова В. И. — Бюлл. exper. биол., 1969, № 5 с. 110.
16. Триуфанов В. Ф., Сучкова С. И. — В кн.: Дислипидпротеидемии и шемическая болезнь сердца. М., 1980, с. 151.
17. Климов А. Н., Ловягина Т. И., Баньковская Э. Б. — Лабор. дело, 1966, № 5, с. 276.
18. Маграчева Е. Я. — Вопр. мед. химии, 1973, № 6, с. 652.
19. Иоффе В. И., Розенталь К. М. — Ж. микробиол., 1963, № 12, с. 65.
20. Lisak R. P., Heinze R. G., Kies M. W. et al. — Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1969, v. 130, p. 814.
21. Driscoll B. F., Kies M. W., Alvord E. S. — Fed. Proc., 1972, v. 31, p. 2971.
22. Klimov A. N., Zubzhitsky Yu. N., Nagornev V. A. — Atheroscler. Rev., 1979, v. 4, p. 119.

Поступила 18/VI 1980 г.

## ALTERATION IN CONTENT OF LIPIDS AND LIPOPROTEINS IN BLOOD OF RABBITS WITH EXPERIMENTAL ALLERGIC POLYNEURITIS AND ENCEPHALOMYELITIS

V. M. Pleskov, V. F. Tryufanov, Yu. L. Zhitnukhin, G. V. Konovalov

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

Experimental allergic encephalomyelitis and polyneuritis were caused in male rats of 2.5-3.0 kg body mass of the *Shinshilla* strain by means of administration into the foot of the animals pads of homogenous basic protein myelin from bovine spinal cord and myelin from bovine sciatic nerve as a mixture containing complete Freund's adjuvant. In the impaired rabbits total fraction of  $\beta$ - and pre- $\beta$ -lipoproteins as well as content of cholesterol and triglycerides were increased in blood. Antibodies against the basic protein myelin were not found in blood of the animals with experimental allergic encephalomyelitis, whereas the titres of these antibodies were increased in the animals with experimental allergic polyneuritis. Complex formation of antibodies with  $\beta$ - or pre- $\beta$ -lipoproteins appears to take place in blood of the animals.

УДК 616.36-005.4-092.9-07:616.36-008.939.15-074

Л. Б. Дудник, М. В. Биленко, А. В. Алесенко, М. П. Могилевская,  
Е. Б. Буракова

## РОЛЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ В ПОВРЕЖДЕНИИ ЛИПИДОВ МЕМБРАН ПРИ ИШЕМИИ ПЕЧЕНИ

Институт химической физики АН СССР, лаборатория по пересадке органов и тканей  
ЛМН СССР, Москва

При ишемическом повреждении органов в липидах клеточных мембран наблюдается повышение уровня неэстерифицированных жирных кислот и лизофосфоглицеридов [1—3]. В большинстве случаев исследователи объясняют это явление действием эндогенных фосфолипаз, активирующихся в условиях ишемии [1, 4, 5]. Известно, однако, что состав липидов может подвергаться значительным изменениям в процессе перекисного окисления липидов (ПОЛ) [6]. Интенсификация ПОЛ, коррелирующая со степенью повреждения структуры и функции органов, была обнаружена при ишемии почки, печени, сердца, конечности, головного мозга [7—9].

Задачей настоящего исследования явилось изучение изменения жирнокислотного и фосфолипидного состава гомогената, митохондриальной, микросомальной и ядерной фракций клеток печени крыс после различных сроков ее тепловой ишемии и связи этих изменений с интенсификацией ПОЛ.

### Методика

Опыты проводили на 180 крысах линии Август. Ишемию вызвали наложением зажима на сосудистую ножку печеночной дольки. Операцию производили под внутрибрюшинным гексеналовым наркозом. Субклеточные фракции выделяли методом дифференциального центрифугирования [10—12]. Экстракцию липидов проводили по методу Фолча [13]. Состав липидов изучали с помощью двумерной тонкослойной хроматографии [14]. Состав липидов субклеточных фракций был использован в качестве критерия их чистоты [12]. Изменение жирнокислотного состава липидов исследовали

методом газо-жидкостной хроматографии метиловых эфиров жирных кислот на хроматографе «Хром-4». Метиловые эфиры жирных кислот получали методом щелочного метанолиза липидов изучаемых образцов [15]. Содержание гидроперекисей липидов определяли йодометрически [16]. Концентрацию белка в образцах определяли с помощью биуретовой реакции.

## Результаты и обсуждение

Исследование изменения содержания гидроперекисей липидов мембран клеточных органелл и гомогената показало резкую интенсификацию процессов ПОЛ уже на самых ранних сроках ишемии (увеличение содержания

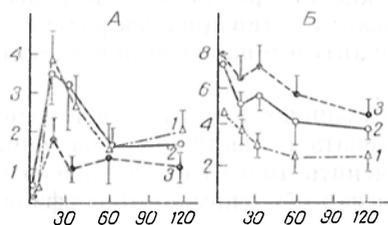


Рис. 1. Изменение жирнокислотного состава липидов мембран и интенсификация ПОЛ при ишемии печени.

По оси абсцисс — время ишемии (в мин); по оси ординат на А — концентрация гидроперекисей (в экв на 1 мг липидов); А — изменение количества гидроперекисей липидов; В — изменение содержания арахидоновой кислоты; по оси ординат на В — количество арахидоновой кислоты (в мг на 1 г белка); 1 — гомогенат; 2 — митохондрии; 3 — микросомы.

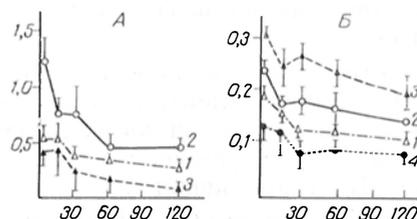


Рис. 2. Изменение липидного состава мембран при ишемии печени.

А — изменение количества кардиолипина. В — изменение количества общих липидов. По оси ординат на А — содержание кардиолипина (в мг на 1 г белка); по оси ординат на В — отношение,  $\frac{\text{г липида}}{\text{г белка}}$ . По оси абсцисс — время ишемии (в мин). 1 — гомогенат; 2 — митохондрии; 3 — микросомы; 4 — ядра.

гидроперекисей липидов в гомогенате в 13 раз, во фракции митохондрий в 10 раз, во фракции в 7 раз после 15 мин ишемии) (рис. 1, А).

Поскольку скорость ПОЛ возрастает с увеличением числа двойных углерод-углеродных связей, перекисному окислению подвергаются в основном полиненасыщенные жирные кислоты в  $\beta$ -положении фосфолипидов. Выявленная нами закономерность в изменении содержания суммарных жирных кислот липидов гомогената и субклеточных фракций связана со степенью их ненасыщенности и ролью в реакциях ПОЛ.

Уровень арахидоновой кислоты, содержащей 4 двойных углерод-углеродных связи, монотонно снижался в липидах всех изученных мембран и после 2 ч ишемии от исходного составлял 40% в гомогенате, во фракции митохондрий — 48%, во фракции микросом — 57% от исходного (рис. 1, В). Изменение количества жирных кислот, содержащих меньшее число двойных связей, было статистически недостоверным. Изменение содержания индивидуальных фосфолипидов также находилось в соответствии со степенью их подверженности перекисному окислению. В работах [6, 17] показано, что высокую способность к окислению (большая начальная скорость зарождения радикалов) обладают фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозит и кардиолипин.

Мы обнаружили, что кардиолипин, наиболее ненасыщенный по жирнокислотному составу по сравнению с остальными фосфолипидами мембран, в процессе ишемии подвергался наибольшим изменениям и после 1 ч ишемии содержание его в митохондриальной и ядерной фракциях составляло 32%, в гомогенате — 50% от исходного уровня (рис. 2, А).

Напротив, количество сфингомиелина, который содержит насыщенные жирные кислоты, в процессе ишемии существенно не менялось, а на поздних сроках ишемии наблюдалась тенденция к увеличению его содержания по отношению к остальным фосфолипидам.

Количество фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина постепенно уменьшалось в процессе ишемии во всех изученных субклеточных фрак-

циях. В липидах гомогената и микросом происходило накопление лизофосфатидов по отношению к количеству суммарных фосфолипидов. В микросомах количество лизофосфатидов к 2 ч ишемии возрастало в 3,6 раза.

Все изменения происходили на фоне монотонного понижения общих липидов и фосфолипидов к белку (рис. 2, Б). Как было указано выше, исследования изменения состава липидов при ишемии, приводимые в литературе, в основном касаются фракции свободных жирных кислот. Так, в работе [2] было обнаружено 7-кратное повышение количества свободных жирных кислот при ишемии печени и методом газо-жидкостной хроматографии исследован их качественный состав. Наиболее резко выраженное возрастание во фракции свободных жирных кислот уровня ненасыщенных жирных кислот позволило авторам предположить активацию фосфолипазы  $A_2$ , отщепляющей ненасыщенные жирные кислоты в  $\beta$ -положении фосфолипидов.

Выявленные нами изменения состава суммарных жирных кислот липидов мембран клеточных органелл и гомогената (в частности, снижение уровня арахидоновой кислоты) нельзя объяснить только фосфолипазным механизмом повреждения мембран, но они легко объяснимы интенсификацией ПОЛ при ишемии.

Из опытов *in vivo* известно о тесной взаимосвязи фосфолипазного и перекисного механизма повреждения мембран. Согласно данным [18], окисленные фосфолипиды являются более доступными действию фосфолипаз, в то же время фосфолипазы нарушают структурную организацию липидов и путем увеличения доступа кислорода способствуют интенсификации ПОЛ [19]. Интересно также отметить действие экзогенной фосфолипазы  $A_2$  [20, 21].

Проведенное в настоящей работе исследование позволяет предположить, что наблюдаемое при ишемии повреждение липидной фазы клеточных мембран может обуславливаться наряду с фосфолипазным механизмом интенсификацией ПОЛ и представляет собой косвенное доказательство взаимосвязанности этих двух процессов *in vivo*.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Трумплицас Ю. А., Толейкис А. И. — В кн.: Острая ишемия органов и ранние постишемические расстройства. М., 1978, с. 201.
2. Boime J., Smith E. E., Hunter F. E. — Arch. Biochem., 1970, v. 139, p. 425.
3. Cenedella R. J., Gall C., Paoletti R. — Lipids, 1975, v. 105, p. 290.
4. Сороковой В. И., Брагин Е. О., Черников В. П. и др. — В кн.: Консервация органов. Москва — Тбилиси, 1975, с. 257.
5. Сороковой В. И., Владимиров Ю. А. — В кн.: Молекулярная патология мембранных структур. М., 1975, с. 11.
6. Бурлакова Е. Б., Алесенко А. В., Молочкина Е. М. и др. — Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте. М., 1975.
7. Биленко М. В. — В кн.: Острая ишемия органов и ранние постишемические расстройства. М., 1978, с. 51.
8. Bilenko M., Alesenko A., Shelenkova L. — Europ. surg. Res., v. 9, p. 82.
9. Strosznajder J., Dabrowiecki Z. — Bull. Acad. pol. Sci., 1975, v. 23, p. 647.
10. Chauveau J., Moule J., Rouller C. — Exp. Cell. Res., 1956, v. 11, p. 317.
11. Schneider N. C. — J. biol. Chem., 1948, v. 176, p. 259.
12. Биохимическое исследование мембран. Под ред. Э. Мэдди. М., 1979, с. 227.
13. Folch J., Lees M., Stanley G. H. S. — J. biol. Chem., 1957, v. 226, p. 497.
14. Svetashev V. I., Vaskovsky V. E. — J. Chromatogr., 1972, v. 67, p. 376.
15. Ganglitz E. J., Lehman L. W. — J. Am. Oil chem. Soc., 1963, v. 40, p. 197.
16. Нейфах Е. А., Каган В. Е. — Биохимия, 1969, т. 34, № 3, с. 511.
17. Архипова Г. В., Бурлакова Е. Б. — В кн.: Свободнорадикальное окисление липидов в норме и патологии. М., 1976, с. 42.
18. Каган В. Е., Ритов В. Б., Котелевцев С. В. и др. — В кн.: Физиохимические основы функционирования надмолекулярных структур клетки. М., 1974, с. 89.
19. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972.
20. Велена А. Х., Дубур Г. Я. — В кн.: Острая ишемия органов и ранние постишемические расстройства. М., 1978, с. 70.
21. Тимофеев А. Б., Артамонов С. Д., Чубарова А. В. и др. — Там же, с. 197.

Поступила 30/VI 1980 г.

## ROLE OF PEROXIDATION IN DESTRUCTION OF MEMBRANE LIPIDS UNDER CONDITIONS OF LIVER TISSUE ISCHEMIA

*L. B. Dudnik, M. V. Bilenko, A. V. Alesenko, M. P. Mogilevskaya, E. B. Burlakova*

Institute of Chemical Physics, Academy of Sciences of the USSR, Laboratory of Tissue Transplantation, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Alterations in phospholipid and fatty acid composition were studied in homogenates, mitochondrial, microsomal and nuclear fractions during intensification of lipid peroxidation under conditions of liver tissue ischemia. Increase in content of lipid hydroperoxides and decrease in content of arachidonic acid were observed in lipids of all the membranes studied. Content of individual phospholipids altered depending on their susceptibility to peroxidation. In ischemia content of total lipids and phospholipids was decreased. The data obtained suggest the important role of peroxidation in impairment of membrane lipids under conditions of ischemia.

УДК 616-006-008.934.954

*О. Ю. Абакумова, Н. Г. Куценко*

### МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АКТИВАЦИЯ N-МЕТИЛ-N-НИТРОЗОМОЧЕВИНЫ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

N-метил-N-нитрозомочевина (МНМ) является противоопухолевым препаратом, активно действующим на основные биохимические процессы в клетках: синтез белка, РНК и ДНК [1—5]. В настоящее время применяется в клинике ряд производных нитрозомочевины при лечении опухолей человека. Полагали, что эти соединения не требуют метаболической активации для проявления своей биологической активности [6, 7], так как МНМ и некоторые ее производные относительно быстро спонтанно разрушаются в физиологических условиях, превращаясь в активные соединения. Ранее мы установили, что МНМ, как и нитрозамины, подвергается быстрой метаболической активации в животных тканях и эта активация необходима для проявления биологической активности МНМ, по крайней мере для алкилирования макромолекул в клетках [8]. Полученные нами данные подтвердили предположение Хилла и соавт. [9] о том, что в метаболизме МНМ в микросомах печени участвует цитохром Р-450-зависимая реакция.

Целью настоящей работы явилось изучение метаболической активации МНМ в опухолевых клетках асцитной формы гепатомы 22а.

#### М е т о д и к а

Использовали  $^{14}\text{C}$ -МНМ фирмы «Isocommerz» (ГДР) с удельной активностью 9,5 мКи/ммоль,  $^{14}\text{C}$ -метионин (ВНР),  $^{14}\text{C}$ -тимидин фирмы «Amersham» (Англия) с удельной активностью соответственно 220 и 62 мКи/ммоль, циклогексимида, фенобарбитала фирмы «Calbiochem» (США), НАДФ·Н фирмы «Reanal» (ВНР).

Исследование выполнено на мышках-самцах линии СЗНА массой 20—22 г, содержащихся на стандартной диете. Асцитную форму гепатомы 22а трансплантировали мышам внутрибрюшинно. Опухолевые клетки брали в эксперимент на 7—8-й день после перевивки.

Для индукции цитохрома Р-450 животным в течение 2 дней вводили ежедневно внутрибрюшинно фенобарбитал в дозе 60 мг на 1 кг массы тела.

Для постановки экспериментов в условиях суспензионной культуры использовали среду Игла или Эрла. Опухолевые клетки собирали в охлажденный льдом буфер I, содержащий 35 мМ трис-НСl, рН 7,6 и 140 мМ NaCl, дважды промывали этим же буфером и помещали в среду Игла, содержащую на 10 мл 0,025 г бикарбоната натрия, 50 ЕД стрептомицина сульфата и 100 ЕД калиевой соли бензилпенициллина, 0,03% L-глутамин. 1 мл суспензионной культуры содержал  $20 \cdot 10^6$  клеток. Перед началом эксперимента клетки преинкубировали при 37 °С в течение 30 мин. Для исследования синтеза белка и ДНК к клеткам добавляли соответственно либо 0,5 мКи  $^{14}\text{C}$ -метионина, либо 5 мКи  $^{14}\text{C}$ -тимидина на 10 мл среды Эрла. При изучении влияния ингибиторов туда же добавляли 10 мг циклогексимида или 0,4 мг  $\text{NaN}_3$ , после чего клетки преинкубировали перед добавлением меченых предшественников в течение 20 мин при 37 °С. Пробы для определения радиоактивности отбирали через 5 мин в течение первых 30 мин, а затем через 40, 50, 60 и 120 мин от начала инкубации с  $^{14}\text{C}$ -препаратами. Реакцию останавливали, помещая пробы в баню со

льдом и добавляя 2 мл 10% ТХУ, содержащей при определении скорости синтеза белка 0,1% метионина.

Для анализа кинетики алкилирования макромолекул в клетках гепатомы в условиях суспензионной культуры на 10 мл среды, содержащей  $25 \cdot 10^6$  клеток/мл, добавляли 10 мкМ  $^{14}\text{C}$ -МНМ, 36 мкМ циклогексимида и 6 мкМ  $\text{NaN}_3$ . Пробы для измерения радиоактивности отбирали через 5 мин в течение первых 30 мин, а затем через 1, 2, 3, 4, 5 и 6 ч. Радиоактивность кислоторастворимой фракции и макромолекул клеток измеряли как описано ранее [10], алкилирование отдельных макромолекул анализировали по модифицированному методу Кеннела [11].

Для получения микросом из клеток гепатомы их промывали буфером I, затем проводили осмотический шок в буфере II, содержащем 10 мМ трис- $\text{HCl}$ , pH 7,6, 10 мМ  $\text{KCl}$  и 1,5 мМ  $\text{MgCl}_2$  в течение 20 мин и гомогенизировали в гомогенизаторе Даунса. К гомогенату добавляли  $1/9$  объема буфера III, содержащего 30 мМ трис- $\text{HCl}$ , pH 7,6, 125 мМ  $\text{KCl}$ , 5 мМ  $\text{MgCl}_2$  и 7 мМ меркаптоэтанол. Микросомы осаждали из постмитохондриального супернатанта при 105 000 g в течение 90 мин [12].

Ферментативную активацию  $^{14}\text{C}$ -МНМ исследовали при инкубации проб микросом, содержащих 0,2—0,4 мг белка, как описано ранее [9]. Проба объемом 0,4 мл содержала 1 мкмоль  $^{14}\text{C}$ -МНМ и 1,2 мкмоль НАДФ·Н, в качестве ингибитора микросомальных оксидаз добавляли 6 мкмоль  $\text{NaN}_3$ .

Измерение радиоактивности, определение ДНК и белка в клетках и микросомной фракции проводили, как описано ранее [9].

## Результаты и обсуждение

Метаболизм нитрозосоединений в микросомах обычно исследуют путем анализа влияния кофакторов и идентификации образующихся метаболитов [13, 14]. Ранее [8] мы применили метод прямого определения степени алки-

лирования микросомальных мишеней продуктами, образовавшимися при метаболической активации  $^{14}\text{C}$ -МНМ, катализируемой микросомальными ферментами. Было установлено, что присутствие НАДФ·Н и  $\text{O}_2$  значительно стимулирует реакцию алкилирования макромолекул, а добавление  $\text{NaN}_3$  полностью снижает этот эффект. Алкилирование мишеней в микросомах клеток печени было обусловлено активными продуктами, образовавшимися как вследствие спонтанного химического распада МНМ, так и в ферментативной системе микросом, использующей МНМ как субстрат. Поскольку в

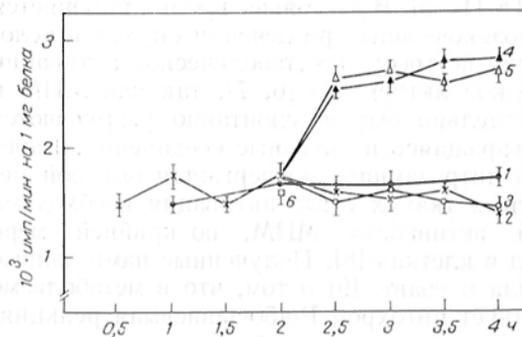


Рис. 1. Кинетика алкилирования макромолекул в микросомах клеток гепатомы 22а.

1 — микросомы +  $^{14}\text{C}$ -МНМ; 2 — 1 + НАДФ·Н +  $\text{O}_2$ ; 3 — 1 + НАДФ·Н; 4 — 2 +  $^{14}\text{C}$ -МНМ (через 2 ч инкубации); 5 — 2 + ( $^{14}\text{C}$ -МНМ + НАДФ·Н; через 2 ч инкубации); 6 — инкубация в течение 2 ч с  $\text{NaN}_3$ .

качестве кофактора необходим НАДФ·Н и ингибитором является  $\text{NaN}_3$ , мы предположили, что в ферментативной активации МНМ участвует цитохром P-450.

Результаты, полученные при анализе способности микросом, выделенных из клеток гепатомы 22а, образовывать активные продукты в реакции ферментативной активации МНМ, представлены на рис. 1. Очевидно, что то алкилирование мишеней в микросомах, которое мы здесь наблюдаем, обусловлено образованием активных продуктов в результате спонтанного распада МНМ, так как добавление кофактора и ингибитора ферментативной реакции не изменяет ситуацию, имеющуюся при добавлении к микросомам только  $^{14}\text{C}$ -МНМ. Добавление  $^{14}\text{C}$ -МНМ к микросомам через 2 ч инкубации вызывает дополнительное алкилирование мишеней опять же за счет спонтанного распада добавленной МНМ. При обработке мышей фенобарбиталом, вызывающим индукцию ферментативной системы, метаболизирующей МНМ в клетках печени [8], мы получили результаты, аналогичные приведенным на рис. 1. Таким образом, мы не обнаружили эффекта метаболической активации МНМ в микросомах, выделенных из клеток гепатомы 22а.

Применение различных концентраций НАДФ·Н также не стимулировало образования активных продуктов из МНМ (см. таблицу).

Однако при постановке экспериментов в условиях суспензионной культуры в среде Игла мы получили четкую картину метаболической активации

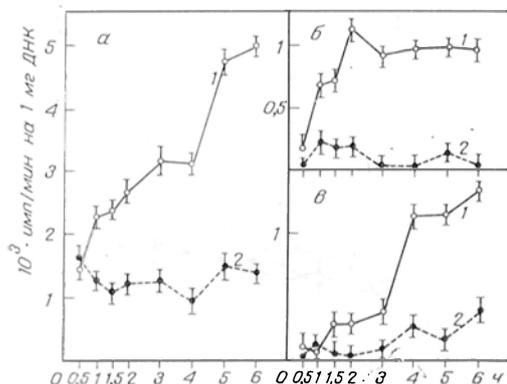


Рис. 2. Кинетика алкилирования макромолекул (а), ДНК (б) и белка (в)  $^{14}\text{C}$ -МНМ в клетках гепатомы 22а в условиях суспензионной культуры в среде игла без (1) и при добавлении в среду  $\text{NaN}_3$  (2).

МНМ этими клетками гепатомы 22а (рис. 2). Уровень алкилирования макромолекул (суммарных, ДНК и белка), наблюдаемый в присутствии  $\text{NaN}_3$ , характеризует алкилирование за счет спонтанного распада МНМ. Из приведенных данных очевидно, какой большой вклад в алкилирование мишеней вносят активные продукты, образующиеся из МНМ в результате метаболической активации.

Отсутствие эффекта метаболической активации МНМ в микросомах, выделенных из клеток гепатомы 22а, может быть обусловлено несколькими причинами: 1) общеизвестной редукцией ретикулула в опухолевых клетках и в связи с этим — резким снижением количества ферментов в клетках, способных метаболизировать лекарственные препараты; 2) деградацией системы метаболической активации в процессе выделения микросом; 3) повышенной чувствительностью системы метаболической активации к повреждающему действию МНМ. Полученные данные, свидетельствующие о повреждении этой системы при введении диэтилнитрозамина [15]; 4) локализацией ферментов метаболической активации МНМ в клетках гепатомы 22а в основном не в микросомах, а на мембранах клеточной оболочки.

Поскольку среда Игла содержит аминокислоты, которые алкилируются при добавлении в среду МНМ и затем могут вносить вклад в мечение макромолекул, мы следующие эксперименты с суспензионной культурой проводили в среде Эрла. В специальных экспериментах была проанализирована способность клеток гепатомы синтезировать белок и ДНК в среде Эрла. Показано (рис. 3), что в течение по крайней мере 2 ч синтез белка и ДНК идет с достаточной интенсивностью, с практически линейной скоростью, присутствие  $\text{NaN}_3$  не влияет на синтез белка, а циклогексимид, как и следовало ожидать, значительно ингибирует его.

При анализе кинетики алкилирования макромолекул  $^{14}\text{C}$ -МНМ в суспензионной культуре в среде Эрла было обнаружено, что в первые 30 мин после добавления  $^{14}\text{C}$ -МНМ циклогексимид и  $\text{NaN}_3$  не влияют на уровень алкилирования макромолекул (рис. 4). Между 30 и 60 мин обнаруживается разница в алкилировании как тотальных макромолекул (рис. 4, а), так и белка (рис. 4, б). Полученные результаты можно объяснить тем, что в пер-

Влияние различных концентраций НАДФ·Н и  $^{14}\text{C}$ -МНМ на алкилирование макромолекул в микросомах клеток гепатомы 22а в системе ферментативной активации

НАДФ·Н, $10^{-6}$ М	Радиоактивность макромолекул, имп/мин на 1 мг белка микросом	$^{14}\text{C}$ -МНМ, $10^{-6}$ М	Радиоактивность макромолекул, имп/мин на 1 мг белка хромосом
0,3	1610	0,5	595
0,6	1394	1,0	1400
1,2	1400	2,5	3195
2,4	1630	5,0	7106
4,8	1869	10,0	15332
8,4	1109		

Примечания. 1. Приведены средние данные из 3 экспериментов. 2. При исследовании различных концентраций НАДФ·Н концентрация  $^{14}\text{C}$ -МНМ была постоянной и составляла 1 мкМ; при исследовании различных концентраций  $^{14}\text{C}$ -МНМ концентрация НАДФ·Н всегда была равна 1,2 мкМ.

вые 30 мин инкубации с  $^{14}\text{C}$ -МНМ алкилирование обусловлено только ее спонтанным распадом, а затем — активными продуктами, образовавшимися в результате ферментативной активации. Последний процесс ингибирует

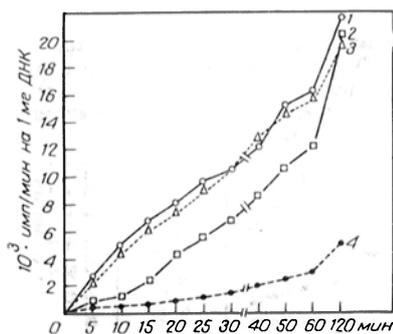


Рис. 3. Синтез белка в контроле (1), в присутствии  $\text{NaN}_3$  (2) и циклогексимида (4) и синтез ДНК (3) асцитными клетками гепатомы 22а в условиях суспензионной культуры в среде Эрла.

$\text{NaN}_3$ . Наличие 30-минутного лаг-периода, вероятно, связано с тем, что либо ферменты метаболической активации проходят стадию активации из латентного состояния (что мало вероятно, так как время лаг-периода велико), либо МНМ индуцирует их синтез de novo.

Полученные результаты не обусловлены нарушением проницаемости клеток гепатомы для  $^{14}\text{C}$ -МНМ в присутствии циклогексимида и  $\text{NaN}_3$ . На рис. 5 представлена кинетика содержания радиоактивности в кислоторастворимой фракции клеток в условиях суспензионной культуры в среде Эрла при добавлении ингибиторов. Очевидно, что ингибиторы не нарушают проницаемости клеточных оболочек для МНМ, количество радиоактивности внутри клеток во время инкубации практически одинаково.

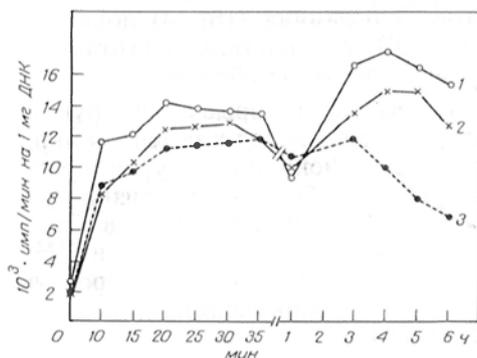


Рис. 5. Радиоактивность кислоторастворимой фракции клеток гепатомы 22а при их инкубации в условиях суспензионной культуры в среде Эрла с  $^{14}\text{C}$ -МНМ в контроле (1), в присутствии циклогексимида (2) и  $\text{NaN}_3$  (3).

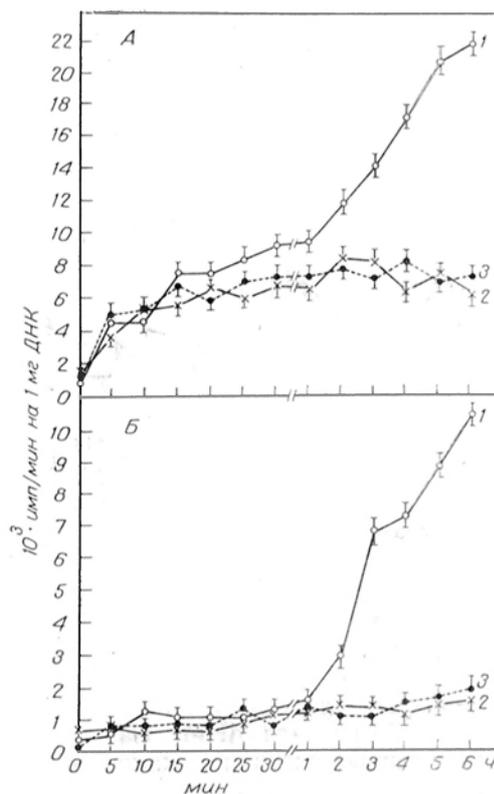


Рис. 4. Кинетика алкилирования макромолекул (А) и белка (Б)  $^{14}\text{C}$ -МНМ в клетках гепатомы 22а в условиях суспензионной культуры в среде Эрла в контроле (1), в присутствии  $\text{NaN}_3$  (2) и циклогексимида (3).

наши данные подтверждают существование цитохром Р-450-зависимого метаболизма МНМ в онколевых клетках, хотя пока неясна локализация этой системы на клеточном уровне. Так как активные продукты интенсивно алкилируют клеточные макромолекулы, включая ДНК, они могут быть ответственными за биологическое действие МНМ. Можно предположить, что различная чувствительность к МНМ, наблюдаемая в разных клетках и тканях, является

следствием не только различной скорости процессов, удаляющих поврежденные макромолекулы и репарирующих ДНК [16], но и различной активности микросомальных ферментов, активирующих МНМ.

Признание факта метаболической активации нитрозомочевин позволяет предложить общий принцип действия всех применяемых в химиотерапии алкилирующих веществ, что имеет большое значение для экспериментальной и клинической химиотерапии опухолей.

Авторы выражают благодарность старшему лаборанту Л. Н. Михайловой за квалифицированную помощь при выполнении данной работы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Абакумова О. Ю., Угарова Т. Ю., Горбачева Л. В. et al.* — *Cancer Res.*, 1974, v. 34, p. 1542—1547.
2. *Пилипенко Н. Н., Соколова И. С., Угарова Р. Ю. и др.* — *Биохимия*, 1977, № 1, с. 171—174.
3. *Дедерер Л. Ю., Кукушкина Г. В., Горбачева Л. В.* — *Докл. АН СССР*, 1975, т. 221, с. 736—739.
4. *Kleihues P.* — *Arzneimittel — Forsch.*, 1969, Bd 19, S. 1041—1043.
5. *Kleihues P., Magee P. N.* — *Biochem. J.*, 1973, v. 136, p. 303—309.
6. *Montgomery J. A.* — *Cancer Treatm. Rep.*, 1976, v. 60, p. 703—707.
7. *Singer B.* — *Nature*, 1976, v. 264, p. 333—339.
8. *Абакумова О. Ю., Куценко Н. Г., Лерман М. И.* — *Биохимия*, 1978, № 11, с. 2092—2099.
9. *Hill D. L., Kirk M. C., Struck R. F.* — *Cancer Res.*, 1975, v. 35, p. 296—301.
10. *Lerman M. I., Abakumova O. Yu., Kutsenko N. G. et al.* — *Ibid.*, 1974, v. 34, p. 1536—1541.
11. *Абакумова О. Ю.* — В кн.: *Современные методы в биохимии*. М., 1977, с. 338—343.
12. *Geltain H. V., Kinoshita N., Wietel F. J.* — *Fed. Proc.*, 1972, v. 31, p. 1298—1301.
13. *May H. E., Boose R., Reed D. J.* — *Biochemistry (Wash.)*, 1975, v. 14, p. 4723—4730.
14. *Hilton J., Walker M. D.* — *Biochem. Pharmacol.*, 1975, v. 24, p. 2153—2158.
15. *Коляда А. Ю., Кобляков В. А., Панышин О. А. и др.* — *Вопр. мед. химии*, 1980, № 1, с. 47—51.
16. *Куценко Н. Г., Абакумова О. Ю., Лерман М. И. и др.* — *Биохимия*, 1976, № 11, с. 1987—2000.

Поступила 30/VI 1980 г.

#### METABOLIC ACTIVATION OF N-METHYL-N-NITROSE UREA IN TUMORAL CELLS

*O. Yu. Abakumova, N. G. Kutsenko*

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

An enzymatic activation of N-methyl-N-nitrose urea (MNU) was studied in microsomes, isolated from hepatoma 22a ascites cells, using a procedure which enabled to reveal the MNU enzymatic activation in mice liver microsomes. The MNU metabolic activation was not observed in hepatoma cell microsomes; at the same time, the MNU activation occurred when the cells were incubated under conditions of a suspension culture. The enzymes, participating in metabolic activation of MNU, were apparently arranged at the surface of the tumoral cells. Alkylation of MNU macromolecules was shown to be a two-step process. At the first step alkylation was due to spontaneous degradation of MNU and at the second step it was responsible for formation of active products as a result of MNU metabolic activation. MNU appears to induce synthesis of enzymes required of its metabolic activation in hepatoma 22a cells within 30 min.

*И. К. Филиппов, В. Н. Титов, И. Г. Кантарджян,  
М. Ю. Дубровский, И. А. Маслова*

## ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ИЗОЭНЗИМОВ КРЕАТИНФОСФОКИНАЗЫ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА НА АЦЕТАТЕ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

Всесоюзный кардиологический научный центр АМН СССР, Москва

Увеличение активности креатинфосфокиназы в сыворотке крови является достоверным тестом в диагностике инфаркта миокарда [1—3]. Повышение активности фермента в сыворотке крови, которое регистрируют с 4—5-го часа от момента ангинозного приступа, достигает максимума к середине 2-х суток, затем активность снижается до нормы к 68—72-му часу [4, 5]. Однако увеличение этого показателя происходит и при ревматическом процессе, дегенеративном поражении поперечнополосатой мускулатуры, заболеваниях нервной системы, патологии простаты [6, 7].

Общая активность креатинфосфокиназы в сыворотке крови складывается из активности 3 изоэнзимов — ММ, МВ и ВВ, состоящих из субъединиц М и В [8]. В ткани мозга присутствует изоэнзим ВВ, фракция ММ преобладает в скелетных мышцах, в миокарде содержатся 2 изофермента — МВ и ММ, причем активность МВ составляет около 25% от общей. Увеличение активности МВ изофермента в сыворотке крови коррелирует с наличием очага поражения миокарда, а при длительном динамическом наблюдении — и с размером зоны некроза [1, 3]. В некоторых случаях при инфаркте миокарда, когда активность МВ достоверно повышена, общая активность креатинфосфокиназы остается неизменной.

Высокая диагностическая значимость исследования изофермента МВ в клинике требует отработки метода, который можно применить в клинико-диагностических лабораториях кардиологических центров и специализированных кардиологических отделений медицинских учреждений при использовании отечественного оборудования. Электрофорез является наиболее предпочтительным методом разделения изоферментов креатинфосфокиназы. Он быстр, экономичен, производителен, но до последнего времени его проводили на импортном оборудовании и ацетатцеллюлозной пленке. Это вызывает настоятельную необходимость отработки метода разделения изоферментов креатинфосфокиназы на ацетатцеллюлозной пленке отечественного производства.

Цель данной работы — отработать метод электрофореза изоферментов креатинфосфокиназы на ацетатцеллюлозной пленке, который можно предположить в качестве унифицированного для использования в биохимических лабораториях специализированных кардиологических учреждений. Для этого представлялось важным оценить аналитические качества ацетатцеллюлозной пленки выпускаемой НИИ синтетических смол в г. Владимире, адаптировать метод к отечественному оборудованию и описать принципы контроля качества разделения изоферментов.

### М е т о д и к а

Прежде чем отрабатывать метод разделения изоферментов креатинфосфокиназы, необходимо было дать детальную оценку аналитических свойств пленки из ацетатцеллюлозы, производимой НИИ синтетических смол в г. Владимире. С этой целью использовали аналитическую систему для сепарирования изоферментов фирмы «Хелена» (США). Применяя фирменный буфер и реактивы для визуализации фракций креатинфосфокиназы, исследовали активность изоферментов в одних и тех же сыворотках и пробах крови параллельно на ацетатцеллюлозной пленке отечественного производства и пленке, выпускаемой в США. В качестве контрольной сыворотки использовали стандарт фирмы «Хелена», содержащий 3 фракции креатинфосфокиназы (ММ, МВ и ВВ). Для большей достоверности оценки аналитических свойств ацетатцеллюлозной пленки отечественного производства мы применили ее для сепарирования изоферментов не только креатинфосфокиназы, но и лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Исследование показало хорошие аналитические качества поддерживающей среды отечественного производства. На рис. 1. приведены денситограммы электрофореза фрак-

ций креатинфосфокиназы на импортной и отечественной ацетатцеллюлозной пленке. На рис. 2 отражены данные электрофореза на 2 поддерживающих средах изоферментов ЛДГ. Различие в активности отдельных фракций креатинфосфокиназы и ЛДГ не превышало 2-5%. В экспериментах установлены хорошие аналитические свойства ацетатцеллюлозной пленки отечественного производства, что дало нам основание применить ее при отработке метода. Разделение изоферментов креатинфосфокиназы на отечественной пленке осуществлено на аппарате для разделения высокомолекулярных соединений в геле агарозы ПЭФ-3. Для проведения электрофореза создан новый электрофоретический буфер.

Буфер готовили следующим образом: 1,34 г веронала, 10,3 г мединала, 5,06 г триса растворяли в дистиллированной воде при нагревании, после охлаждения доливали до 1 л, pH 8,8, ионная сила 0,075. Для определения активности изоферментов креатинфосфокиназы приготавливали ряд субстратных растворов:

Раствор 1 (в молях): триэтанолламин — 0,11, глюкоза — 21,8, ацетат Mg — 11,0, АДФ — 1,1, АМФ — 11,0, НАДФ — 0,65, креатинфосфат — 38,1. Раствор 2: — 9,0 М

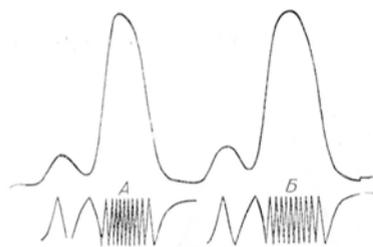


Рис. 1. Денситограммы изоэнзимов креатинфосфокиназы больного инфарктом миокарда, выполненные на отечественной ацетатцеллюлозной пленке (А) и пленке фирмы «Хелена» (Б).

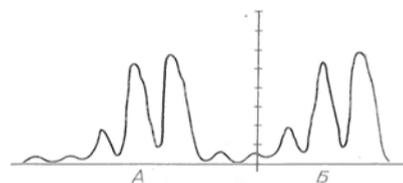


Рис. 2. Денситограммы изоэнзимов ЛДГ больного инфарктом миокарда, выполненные на отечественной ацетатцеллюлозной пленке (А) и пленке фирмы «Бекман» (Б).

глутатиона. Инкубационная смесь состояла из растворов 1, 2, гексокиназы (1,2 ед/мл) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (1,2 ед/л). Субстратный раствор (в мкл): раствор 1 — 1000, раствор 2 — 50, гексокиназа — 50, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа — 50.

Каждую порцию субстратной смеси замораживали и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Перед электрофорезом порцию субстратной смеси размораживали и использовали для окраски одной пластинки ацетатцеллюлозы размером  $95 \times 75$  мм, исследуя одновременно 8 проб крови.

Для отработки метода и выполнения контроля качества в процессе исследования необходимо иметь контрольный материал, который содержал бы активность МВ и ММ креатинфосфокиназы. Для этой цели мы используем гомогенат сердечной мышцы.

**Выделение креатинфосфокиназы.** К 2 г измельченной ткани сердечной мышцы добавляли 7,5 мл 20% сахарозы, стоящей во льду, гомогенизировали при 3000 об/мин дважды в течение 10 с с 60-секундными интервалами для предупреждения нагревания гомогената. Гомогенат центрифугировали при  $4^{\circ}\text{C}$  в течение 10 мин при 10 000 об/мин. Надосадочную фракцию отбирали и замораживали отдельными порциями по 100 мкл. При электрофоретическом разделении гомогената мышцы отчетливо определены фракции ММ и МВ.

**Ход определения.** Ацетатцеллюлозные пленки замачивали в электродном буфере в течение 20 мин, просушивали фильтровальной бумагой и помещали на стекло. Отступя 3,5 см от катодного края пленки, наносили 10 мкл исследуемой сыворотки пастеровской пипеткой с оттянутым носиком, после чего пленку помещали в электрофоретическую камеру. На пленку размером  $95 \times 75$  мм наносили 6—8 образцов сыворотки крови. Пленку укладывали так, чтобы краями она лежала на фильтровальной бумаге, насыщенной буфером. Продолжительность электрофореза 10 мин, напряжение 350 В. Во время электрофореза инкубационную смесь наносили на другую пластинку такого же размера, замоченную в электродном буфере. Субстратную смесь наносили пипеткой в количестве 1 мл при легком покачивании. В результате этого смесь равномерно растекалась по поверхности пластинки, после чего ее помещали на стекло. Инкубационная смесь должна находиться на пленке не менее 8 мин. По истечении времени электрофореза пленку, на которой происходило разделение, извлекали из камеры, и стороной, где были образцы крови, накладывали на пленку с инкубационным раствором. Пленки прижимали грузом (200 г) и помещали в термостат при  $37^{\circ}\text{C}$  на 30 мин. Затем их извлекали, разъединяли и просушивали при той же температуре 10 мин.

### Результаты и обсуждение

При освещении ультрафиолетовым светом на электрофореграмме обнаруживаются светлые фракции креатинфосфокиназы на темном фоне. При электрофорезе сыворотки крови здорового человека видна одна фракция

фермента, слабо окрашенная, самая медленная по скорости движения в электрическом поле (ММ). Фракция МВ, вторая по скорости движения, появляется при электрофорезе сыворотки крови больного инфарктом миокарда, при этом интенсивность фракции ММ возрастает, так как общая активность креатинфосфокиназы увеличивается. Вторая фракция при 10-минутном форезе располагается на расстоянии 10 мм от фракции ММ. Наиболее быстрая фракция ВВ определяется только в контрольной сыворотке на расстоянии 10 мм от фракции МВ.

При электрофоретическом разделении фракций креатинфосфокиназы при некоторых клинических состояниях, в частности хронической почечной недостаточности, появляется неспецифическая фракция — так называемая псевдо-МВ [9], следующая в электрическом поле впереди истинной фракции МВ и располагающаяся между МВ и ВВ. В некоторых случаях она может быть принята за истинную фракцию МВ и приводить к гипердиагно-

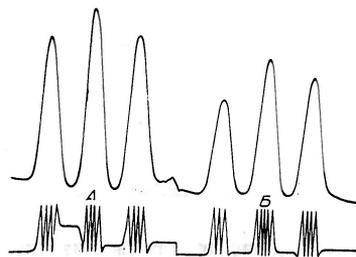


Рис. 3. Денситограммы изоферментов креатинфосфокиназы контрольной сыворотки, выполненные на отечественной ацетатцеллюлозной пленке (А) и пленке фирмы «Хелена» (Б).

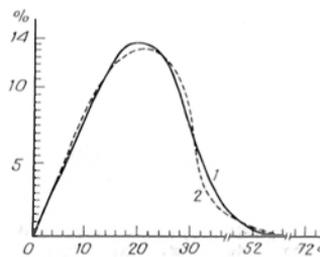


Рис. 4. Изменения активности изофермента МВ у больного инфарктом миокарда, зафиксированные на отечественной ацетатцеллюлозной пленке (1) и пленке фирмы «Хелена» (2).

стике инфаркта миокарда. Наличие фракции миокиназы также может затруднить интерпретацию результатов электрофореза. Для исключения подобных артефактов и проведения контроля качества в каждой серии исследуемых образцов необходимо использовать экстракт гомогената миокарда, содержащий фракции МВ и ММ. При проведении разделения исследуемых образцов и экстракта на одной пластинке можно легко дифференцировать истинную МВ от псевдо-МВ и миокиназы.

При электрофоретическом разделении изоферментов креатинфосфокиназы сыворотки крови 16 больных инфарктом миокарда, исследование которых проводилось динамически в течение 3 сут от начала заболевания, установлено, что различия в активности фракции МВ, установленной модифицированным и фирменным методами, не достигали 2,5% (рис. 3). На рис. 4 даны денситограммы больных инфарктом миокарда, полученные этими двумя методами.

Высокая диагностическая ценность исследования активности МВ-изофермента креатинфосфокиназы при инфаркте миокарда со сложной клинической картиной обусловила необходимость разработки методов исследования, различающихся приемами разделения, чувствительностью и специфичностью. Различие в аналитической процедуре обусловлено тем, что не во всех случаях полученные результаты совпадают. В число методов сепарирования изоферментов креатинфосфокиназы входит их разделение на колонке с ионообменной смолой или ДЭАЭ-целлюлозой с последующим спектрофотометрическим анализом активности ферментов [10, 11], иммунологическое ингибирование субъединиц М антителами и спектрофотометрическим детектированием активности МВ [12, 13], электрофоретическое разделение изоферментов в геле агарозы [14]. В зарубежных клинко-диагностических лабораториях широко применяется метод разделения изоферментов креатинфосфокиназы электрофорезом на ацетатцеллюлозной пленке. Однако он не получил распространения в отечественных биохимических лабораториях. Разработаны новые методы, обладающие большей чувствительностью,

что позволяет детектировать поражение сердечной мышцы в более короткие сроки после ангинозного приступа [14]. Последним методом, который использован для исследования активности креатинфосфокиназы и изофермента MB, является биолюминесценция [16, 17]. Метод является лучшим ввиду быстроты и низкой стоимости исследования. В настоящее время он проходит стадию клинической апробации.

Отработанный нами метод разделения фракций креатинфосфокиназы путем электрофореза на ацетатцеллюлозных пленках отечественного производства с использованием аппарата ПЭФ-3 может применяться в клиничко-диагностических лабораториях медицинских учреждений. Разделение изоферментов на ацетате целлюлозы можно провести более быстро, с большей производительностью и малой затратой реактивов. Метод электрофореза креатинфосфокиназы на ацетате целлюлозы предпочтителен для экспресс-диагностики.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Воронков Ю. И. Внутриклеточное распределение креатинфосфокиназы и изучение возможности количественной оценки величины ишемического повреждения миокарда по изменениям ее сывороточной активности. Автореф. дис. канд. М. 1977.
2. Roarh S. F., Wagner G. S., Irlor H. J. et al. — *Circulation*, 1976, v. 53, p. 965—969.
3. Sobel B. E., Shell W. E. — *Progr. cardiovasc. Dis.*, 1975, v. 4, p. 165—198.
4. Масенко В. П., Филиннов И. К., Староверов И. И. и др. — В кн.: Всесоюзный съезд врачей-лабораторов. 2-й. Тезисы докладов. М., 1979, с. 120—122.
5. Roe C. R., Limbird L. E., Wagner G. S. et al. — *L. Lab. chin. Med.*, 1972, v. 80, p. 577—590.
6. Jockers-Wretton E., Gerike K., Pauly H. E. et al. — *Fresenius Z. analyt. Chem.*, 1980, 301, 154—155.
7. Hockel J. M., Puschendorf B., Dienst F. et al. — *Infusionsther. Klin. Ernähr.*, 1978, Bd 5, S. 204—207.
8. Dreyfus J. C., Schapira G., Resnais J. et al. — *Rev. franç. Etud. Clin. Biol.*, 1960, v. 5, p. 386—387.
9. Alleyssine H., Tonks D. B., Kaye M. — *Clin. Chem.*, 1978, v. 24, p. 492—494.
10. Denton M. S., Bostik W. D., Dinsmore S. R. et al. — *Ibid.*, p. 1408—1413.
11. Mercer D. W. — *Ibid.*, 1974, v. 20, p. 36—40.
12. Тищенко В. А. — Кинетические и иммунологические свойства изоферментов креатинфосфокиназы человека и метод их количественного определения. Автореф. дис. канд. М., 1979.
13. Jockers-Wretton E., Pfeleiderer G. — *Clin. Chim. Acta*, 1975, v. 58, p. 223—232.
14. Shell W. E., Kligerman M., Rorker M. P. et al. — *Am. J. Cardiol.*, 1979, v. 44, p. 67—75.
15. Roberts R., Sobel B. E., Parker C. W. — *Science*, 1976, v. 194, p. 855—857.
16. Lövgren T., Lundben A. — *Fresenius Z. analyt. Chem.*, 1980, Bd 301, S. 149—150.
17. Wulff K., Doeppen W., Staehler F. — *Ibid.*, S. 173—174.

Поступила 7/VI 1980 г.

#### FRACTIONATION OF CREATINE PHOSPHOKINASE ISOENZYMES BY MEANS OF ACETATE CELLULOSE ELECTROPHORESIS

I. K. Filippov, V. N. Titov, I. G. Kantardzhyan, M. Yu. Dubrovsky, I. A. Maslova  
All-Union Cardiological Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR,  
Moscow

A modified procedure is developed for estimation of creatine phosphokinase (CPK) isoenzymes in blood serum. The method is used for diagnostics of early steps of myocardial infarction. The procedure is based on electrophoretic separation of CPK isoenzymes by means of Soviet equipment and acetate cellulose films manufactured by the Institute of Synthetic Resins in Vladimir. Similar data were obtained with the acetate cellulose films provided by «Helena» USA. The procedure may be recommended as a standard one for clinico-diagnostic laboratories specialized in cardiology.

Б. В. Покровский, М. Е. Шабанова, Б. И. Мицнер

РЕЦЕПЦИЯ РЕТИНОЛА В СЕТЧАТКЕ КРЫС: РАЗЛИЧНЫЕ  
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФОРМЫИнститут морфологии человека АМН СССР, Институт тонкой химической технологии  
им. М. В. Ломоносова, Москва

Проблема первичного связывания биологически активных соединений привлекает к себе в последнее время большое внимание. Общепризнанной стала концепция, согласно которой специфическое взаимодействие между внутриклеточными регуляторами с их рецептором является первой ступенью реализации биологического эффекта, нарушение которой ведет к целому ряду патологических ситуаций, в том числе клинических [1]. Значительное количество работ проведено по изучению гормональных рецепторов, в частности цитоплазматических рецепторов стероидных гормонов [2]. В последнее время близкие к ним по ряду параметров рецепторы обнаружены в различных тканях животных и человека для ретинола [3]. Ранее было предположено, что одной из причин наследственного поражения сетчатки — пигментного ретинита, ведущего к потере фоточувствительности элементов сетчатки и к слепоте, может являться недостаток проретиновой части зрительного белка — ретиналя [4, 5]. Это предположение делает целесообразным изучение транспорта витамина А из крови в сетчатку и его трансформации в ней. В настоящей работе приводятся результаты исследования рецепции ретинола в растворимой фракции сетчатки крыс.

## М е т о д и к а

Опыты ставили на половозрелых крысах-самцах линии Вистар, а также на крысах с наследственной дистрофией сетчатки (линия Кэмпбелл; получены из Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова АН СССР). Все определения, связанные с сетчаткой и различными формами витамина А, проводили при тусклом красном свете. Сетчатки выделяли на холоду и гомогенизировали в 10 мМ трис-НСI-буфере рН 7,6, содержащем 10 мМ КСI, 1 мМ ЭДТА и 1 мМ дитиотреитол, или в 0,033 М Na-фосфатном буфере рН 7,2, содержащем 0,1 М NaCl (3 мл буфера на ткань от 10 крыс), вручную в стеклянном гомогенизаторе. Растворимую фракцию получали центрифугированием при 39 000 об/мин в течение 1 ч в центрифуге «Beckman» в роторе SW-65 и или использовали сразу, или замораживали аликвотами по 1 мл и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$  не более 2—3 нед.

В опытах с гель-фильтрацией 1 мл растворимой фракции инкубировали с меченым ретинолом (добавляли в этаноле в объеме 10—20 мкл) при  $4^{\circ}\text{C}$  в течение 18 ч и наносили на колонку (18×1 или 43×1,2 см, с водяным охлаждением) с сепадексами различного типа. Фильтрацию проводили со скоростью 10—20 мл/ч; колонку калибровали пропусканием растворов голубого декстрана (мол. масса  $2 \cdot 10^6$ ), бычьего сывороточного альбумина (68 000) и папаина (23 000). Уровень белка во фракциях (объем 1 мл) определяли по поглощению при 280 нм; для определения радиоактивности к фракциям добавляли 10 мл сцинтилляционной смеси Брэя [6].

При фракционировании с помощью градиентного центрифугирования 0,3 мл цитосола сетчатки инкубировали с 5 мкл меченого витамина  $4^{\circ}\text{C}$  в течение 2—3 ч и наслаивали на 4,7 мл 5—20% линейного градиента сахарозы. Центрифугирование вели в полиаломерных пробирках ротора SW-65 при 48 000—54 000 об/мин в течение 16—18 ч. Пробирки прокалывали и собирали фракции по 2 или 3 капли; радиоактивность определяли в смеси Брэя или в стандартном толуольном сцинтилляторе. Коэффициенты седиментации определяли описанным ранее методом [7]; седиментацию маркерных белков устанавливали по поглощению при 280 нм, а также (в случае альбумина) по радиоактивности преобразованного комплекса с меченым ретинолом.

В качестве меченых препаратов использовали [карбинол —  $^{14}\text{C}$ ] витамин А фирмы «Амершем» (удельная радиоактивность 4,7—10 мКи/ммоль),  $1\text{-}^3\text{H}$ -транс-витамин А<sub>1</sub> фирмы NEN (4,5 Ки/мм) и  $1\text{-}^3\text{H}$ -витамин А, полученный нами из ретиналя (фирма «Сигма»). Чистоты препаратов проверяли непосредственно перед опытом снятием спектров поглощения на регистрирующем спектрофотометре АСТА («Beckman»). Гидрирование проводили  $^3\text{H}$ -Na-боргидридом объединение «Изотоп» или фирмы «Амершем» (5 Ки/мм). 3 мкг ретиналя растворяли в 80 мкл этанола, добавляли 20 мкл  $\text{H}_2\text{O}$  рН 8,0 и 0,3 мл  $\text{NaB}^3\text{H}_4$  (1 мКи). Через 45 мин в 0,1 мл инкубационной смеси определяли спектр поглощения в диапазоне 300—400 нм, к оставшейся части добавляли 0,1 мл  $\text{H}_2\text{O}$  и экстрагировали 2 мл петroleйного эфира дважды. Верхние слои объ-

едняли, упаривали под азотом и растворяли в этаноле. Меченый ретинол очищали с помощью ТСХ на силуфоле в смеси хлороформ — этанол (99:1) или гексан — ацетон (6:1). При препаративном выделении  $^3\text{H}$ -ретинола смесь после инкубации наносили полоской, локализовали радиоактивность просчитыванием края хроматограммы, после чего пиковые фракции экстрагировали 1 мл этанола, 3 мл петролейного эфира и 1,5 мл  $\text{H}_2\text{O}$ , упаривали органическую фазу и проводили повторное хроматографирование. Удельная активность полученного ретинола составляла около 1 Ки/Ммоль. Препараты меченого ретинола хранили при  $-20^\circ\text{C}$  в атмосфере азота. В связи с тем что ретинол в растворах легко окисляется с образованием смеси различных продуктов, в процессе работы постоянно проверялась его стабильность. Препаративная ТСХ дает возможность получения меченого ретинола достаточной степени чистоты (рис. 1).

Немеченый ретинол готовили непосредственно перед экспериментами гидрированием  $\text{NaBH}_4$  с последующей аналогичной экстракцией и контролем спектрофотометрически. Для расчета количества ретинола принимали молярную экстинкцию при 325 нм в этанольном растворе равной 46 000, молярную экстинкцию ретинола при 383 нм — 43 000. Количество белка в сетчатке определяли по Лоури.

### Результаты и обсуждение

В первых опытах изучение рецепции витамина А в растворимой фракции сетчатки велось с помощью гель-фильтрации. Инкубация меченого ретинола с цитосолом сетчатки при  $4^\circ\text{C}$  в течение 18 ч с последующей фильтрацией на сефадексе Г-50 позволяет обнаружить, что ретинол связывается с высокомолекулярным компонентом сетчатки, четко отделяющимся от пика свободного ретинола (рис. 2). В этих опытах использовали концентрации ретинола, близкие к концентрации витамина А в сыворотке в обычных условиях (2—4 мкМ). Высокомолекулярный компонент обнаруживается при фильтрации как в изо-, так и в гипотоническом буферном растворе. Среднее содержание радиоактивности в высокомолекулярном пике составляло 11,6% от суммарной радиоактивности элюата (диапазон 9,5—13,1%).

Выявляемый при гель-фильтрации компонент, связывающий ретинол, обладает высокой стереоспецифичностью. Добавление к смеси после получасовой инкубации с  $2,5 \cdot 10^{-6}$ — $5,0 \cdot 10^{-6}$  М меченым ретинолом 100-кратного избытка немеченого ретинола снижало количество радиоактивности в высокомолекулярном пике до 1,8% (см. таблицу). В то же время аналогичное добавление 100-кратного избытка альдегидной формы витамина А — рети-

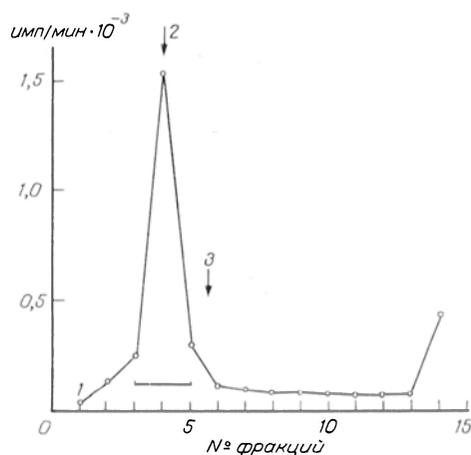


Рис. 1. Тонкослойная хроматография меченого ретинола.

1 — меченый ретинол; 2 — стандарт ретинола; 3 — стандарт ретинола. Система растворителей  $\text{CHCl}_3$ — $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (99:1); меченый витамин наносили полоской с помощью эфира. Фракции № 3—5 экстрагировали, как описано в разделе «Методика», и использовали для анализа рецепторов. Стандарты идентифицировали обработкой хроматограммы концентрированной  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

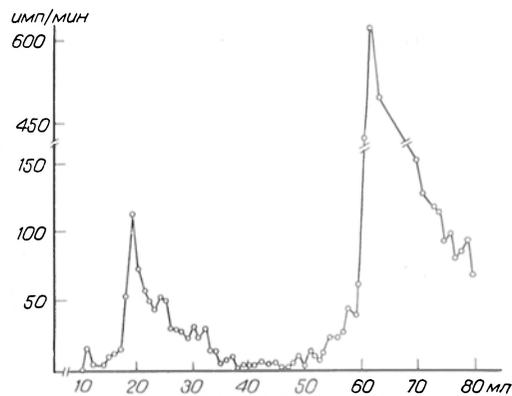


Рис. 2. Связывание ретинола с растворимой фракцией сетчатки крыс.

Гель-фильтрация на сефадексе Г-50 (тонкий); 0,033 М Na-фосфатный буфер pH 7,2—0,1 М NaCl. Скорость элюции 10 мл/ч.  $^{14}\text{C}$ -ретинол (конечная концентрация 5 мкМ) добавляли в 10 мкл этанола.

наля (являющегося хромофором родопсина) — не изменяло связывания ретинола.

В дальнейших опытах рецепция ретинола сетчаткой была исследована с помощью центрифугирования в сахарозном градиенте, которое по ряду параметров считается более точным методом анализа связывающих ретинол белков сетчатки [8]. Центрифугирование цитосола сетчатки после его ин-

Связывание ретинола рецептором по данным гель-фильтрации

Линия крыс	Состав проб	Общая радиоактивность элюата, имп/мин	Радиоактивность высокомолекулярного пика, %	Количество белка в цитосоле, мг/мл
Внстар	$5 \cdot 10^{-6}$ М $^{14}\text{C}$ -ретинола	5060	11,1	0,92
»	$2,5 \cdot 10^{-6}$ М $^{14}\text{C}$ -ретинола	1600	13,1	0,92
»	$5 \cdot 10^{-6}$ М $^{14}\text{C}$ -ретинола - - - - $5 \cdot 10^{-4}$ М $^{12}\text{C}$ -ретинола	5460	1,8	0,92
»	$5 \cdot 10^{-6}$ М $^{14}\text{C}$ -ретинола - - - - $6,7 \cdot 10^{-5}$ М $^{12}\text{C}$ -ретинола	4760	9,5	0,78
»	$2,5 \cdot 10^{-6}$ М $^{14}\text{C}$ -ретинола - - - - $2,5 \cdot 10^{-4}$ М $^{12}\text{C}$ -ретинола	3180	12,7	0,78
Кэмпбелл	$5 \cdot 10^{-6}$ М $^{14}\text{C}$ -ретинола	3970	5,6	0,26

Примечание. Сефадекс Г-50 (тонкий). В опытах с конкуренцией пробы инкубировали с меченым ретинолом в течение 30 мин, затем добавляли немеченый лиганд и инкубировали в течение  $17\frac{1}{2}$  ч. Радиоактивность дана за вычетом фона.

кубации с микромолярными концентрациями ретинола выявило его связывание в 7S-области, с компонентом с коэффициентом седиментации 4,5—5,1S, а также радиоактивное плечо в низкомолекулярной части градиента (рис. 3, А). Более интенсивное центрифугирование хорошо разделяет

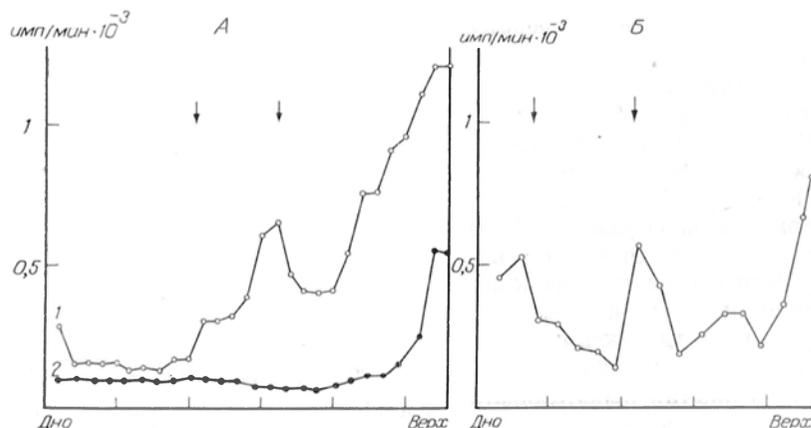


Рис. 3. Градиентный анализ рецепторов ретинола сетчатки.

А: 1 —  $1,6 \cdot 10^{-5}$  М  $^{14}\text{C}$ -ретинола инкубировали с цитосолом в течение 2 ч при  $4^\circ\text{C}$ . Центрифугирование при 48 000 об/мин в течение 16 ч; концентрация белка в пробе 0,66 мг/мл; 2 — инкубация меченого ретинола с буфером; Б:  $1,3 \cdot 10^{-5}$  М меченого ретинола. Центрифугирование при 50 000 об/мин в течение 17 ч, концентрация белка в цитосоле 0,96 мг/мл. Стрелками обозначена седиментация 4,7S — бычьего сывороточного альбумина и 7,0S —  $\gamma$ -глобулина.

7S- и 5S-компоненты и вновь выявляет дополнительный низкомолекулярный компонент (рис. 3, Б). Многокомпонентный характер связывания  $^{14}\text{C}$ - и  $^3\text{H}$ -ретинола был выявлен при градиентном центрифугировании во всем исследованном диапазоне концентраций ( $1 \cdot 10^{-6}$ — $1,6 \cdot 10^{-5}$  М).

В дальнейших экспериментах связывание ретинола с рецепторами сетчатки было исследовано при низких (гипофизиологических) концентрациях витамина, что дает возможность также выяснить, какой из обнаруженных компонентов обладает наибольшим сродством к лиганду. Центрифугирование растворимой фракции после инкубации с  $6 \cdot 10^{-8}$  М меченого ретинола

выявило, что в этих условиях витамин связывается практически только с низкомолекулярным компонентом с коэффициентом седиментации 2S. Доминирующий 2S-компонент обнаруживается и при увеличении содержания белка в пробе (рис. 4, А). Инкубация таких наномольных концентраций меченого ретинола в присутствии 100-кратного избытка немеченого ретинола ведет к резкому снижению количества радиоактивности в 2S-пике (до 13% от связывания без конкурента) (рис. 4, Б). Одновременно с резким снижением связывания с низкомолекулярным рецептором увеличивается связывание в 5S- и 7S-областях. (В отдельных опытах с инкубацией нано-

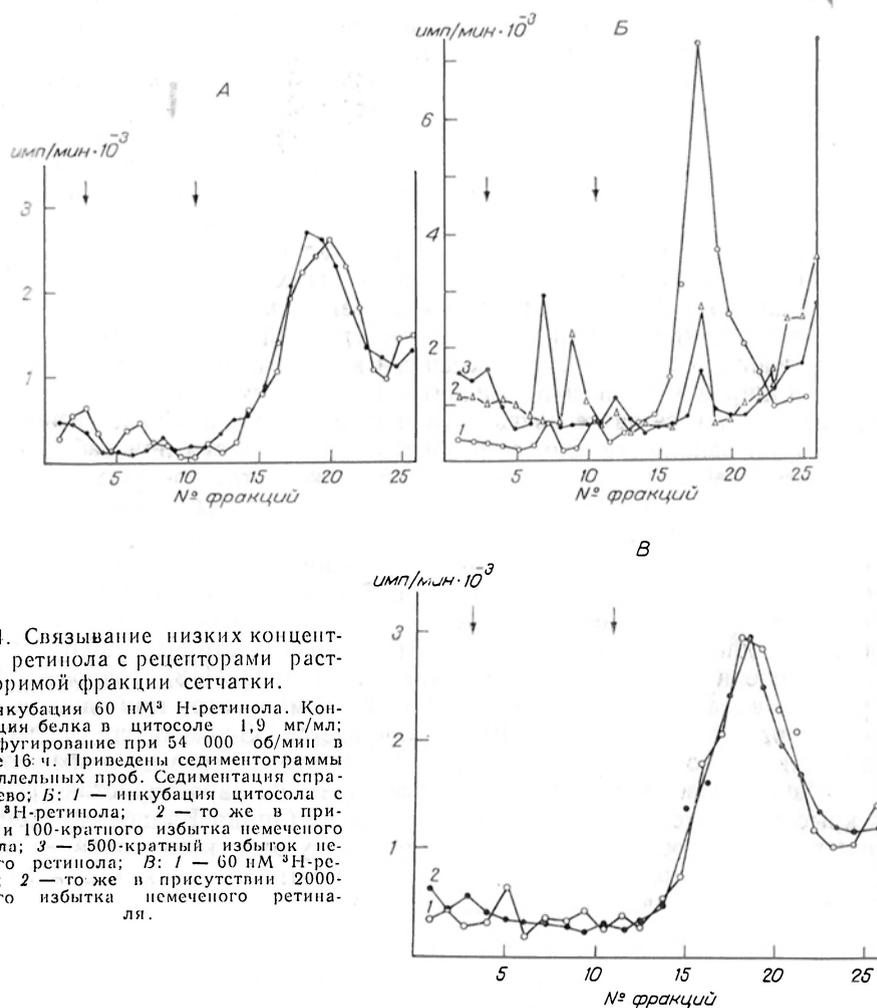


Рис. 4. Связывание низких концентраций ретинола с рецепторами растворимой фракции сетчатки.

А — инкубация  $60 \text{ нМ}^3$  Н-ретинола. Концентрация белка в цитосоле  $1,9 \text{ мг/мл}$ ; центрифугирование при  $54\,000 \text{ об/мин}$  в течение  $16 \text{ ч}$ . Приведены седиментограммы 2 параллельных проб. Седиментация справа налево; Б: 1 — инкубация цитосола с  $90 \text{ нМ}^3$  Н-ретинола; 2 — то же в присутствии 100-кратного избытка немеченого ретинола; 3 — 500-кратный избыток немеченого ретинола; Б: 1 —  $60 \text{ нМ}^3$  Н-ретинола; 2 — то же в присутствии 2000-кратного избытка немеченого ретинола.

мольных концентраций ретинола без конкурента обнаруживалось связывание в 5S-области градиента, но оно было очень незначительным.) Инкубация в присутствии 500-кратного избытка немеченого ретинола снижала связывание с 2S-рецептором до 7,5% и еще больше увеличивала связывание с высокомолекулярными компонентами. В то же время инкубация меченого ретинола в присутствии даже 2000-кратного избытка ретинола практически не изменяла связывания (рис. 4, Б). Инкубация цитосола с ретинолом при  $20^\circ\text{C}$  давала в целом такие же результаты, что и инкубация при  $4^\circ\text{C}$ , хотя абсолютная интенсивность связывания была несколько ниже.

Полученные данные позволяют сделать вывод о множественности рецепторов ретинола в цитоплазме сетчатки, выявляющихся при различных его концентрациях. Возможно, этот факт имеет физиологический смысл, так как известно, что концентрация витамина А в плазме варьирует очень широко в зависимости от характера пищи [9]. В работах, проведенных за

последнее время по характеристике рецепторов витамина А в сетчатке, были получены весьма противоречивые данные. Так, Хеллер с использованием гель-фильтрации выявил присутствие в сетчатке крупного рогатого скота высокомолекулярного рецептора (мол. масса выше 150 000) [10, 11]. В то же время Саари и Футерман был идентифицирован в пигментном эпителии и сетчатке быков низкомолекулярный рецептор (мол. масса 17 000) [12, 13]. При использовании группой Виггерт градиентного центрифугирования были опубликованы в одних работах данные о высокомолекулярных (7—8S, 5S), в других — только о низкомолекулярных (2S) рецепторах ретинола [14—16]. Полученные нами результаты дают возможность критически оценить ранее опубликованные данные. Очевидно прежде всего, что анализ рецепторов сетчатки с применением только одного метода не дает исчерпывающей информации. С одной стороны, гель-фильтрация легко выявляет высокомолекулярные компоненты, связывающие витамин А, с другой — в ряде случаев не позволяет четко охарактеризовать низкомолекулярный компонент. (В наших опытах с гель-фильтрацией иногда наблюдалось «плечо» в восходящей части заключительного пика, но его трудно было анализировать из-за высокой радиоактивности свободного ретинола.) Другим (и, возможно, более важным) фактором является концентрация лиганда при проведении анализа. Как правило, во всех работах авторы применяли только какую-либо одну концентрацию ретинола. Хеллером [10] была использована концентрация  $1,2 \cdot 10^{-5}$  М, группой Саари —  $1 \cdot 10^{-6}$  М, Виггерт и соавт. —  $2 \cdot 10^{-7}$  М. Проведенный в настоящей работе анализ связывания в широком диапазоне концентраций позволяет считать, что связывание ретинола в сетчатке осуществляется не одним, а множественными рецепторами, однако эта множественность не выявляется при работе с одной концентрацией лиганда. В свете вышеизложенного, по-видимому, следует очень осторожно подходить к опубликованным данным об отсутствии того или иного рецептора ретинола у некоторых видов животных или при патологии [17]. Эти данные требуют подтверждения путем использования достаточно большого интервала концентраций и нескольких независимых методов анализа. Неполная адекватность использованных методических подходов, по-видимому, объясняет и тот факт, что в некоторых работах имеется неопределенная трактовка выявленных рецепторов [18], говорится об отсутствии высокомолекулярных ( $>100\ 000$ ) компонентов при одновременной демонстрации 7S-рецептора [19], уравнивается 5S-компонент с сывороточным альбумином, хотя их пики в большинстве случаев не совпадают [14].

Наши проведены предварительные опыты по характеристике рецепции у крыс с наследственной дистрофией сетчатки (линия Кэмпбелл). Приведенные в таблице результаты показывают, что у этих крыс сохранен высокомолекулярный компонент, связывающий ретинол, хотя его абсолютное количество несколько снижено.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Blecher M. — Clin. Chem., 1979, v. 25, p. 11—19.
2. Baxter J., Funder J. — New Engl. J. Med., 1979, v. 301, p. 1149—1161.
3. Ковь И. Я., Натансон А. О. — Вопр. мед. химии, 1980, № 1, с. 3—13.
4. Шабанова М. Е., Терещенко О. Д., Остапенко И. А. — Вестн. АМН СССР, 1978, № 10, с. 21—29.
5. Авцын А. П., Фукс Б. Б., Шабанова М. Е. и др. — Там же, 1977, № 1, с. 71—79.
6. Bray G. — Analyt. Biochem., 1960, v. 1, p. 279.
7. Marlin R., Ames B. — J. biol. Chem., 1961, v. 236, p. 1372.
8. Wiggert B. et al. — Biochim. biophys. Acta, 1977, v. 498, p. 336.
9. Rask L., Peterson P. — J. biol. Chem., 1976, v. 251, p. 6360.
10. Heller J. — Ibid., p. 2952.
11. Chen C., Heller J. — Ibid., 1977, v. 252, p. 5216—5221.
12. Saari J., Fullerman S., Bredberg L. — Ibid., 1978, v. 253, p. 6432—6436.
13. Saari J., Fullerman S. et al. — Invest. Ophthalm., 1978, v. 17, p. 988—992.
14. Wiggert B., Chader G. — Exp. Eye Res., 1975, v. 21, p. 143.
15. Wiggert B. et al. — Invest. Ophthalm., 1979, v. 18, p. 306—310.
16. Wiggert B. et al. — Biochim. biophys. Acta, 1979, v. 582, p. 115—121.
17. Bersman D., Wiggert B. et al. — Nature, 1977, v. 265, p. 66.
18. Wiggert B. et al. — Biochem. J., 1978, v. 169, p. 87.
19. Wiggert B. et al. — J. Neurochem., 1977, v. 29, p. 947—954.

Поступила 10/VII 1980 г.

## RECEPTION OF RETINOL IN RAT RETINA: VARIOUS MOLECULAR FORMS

*B. V. Pokrovsky, M. E. Shabanova, B. I. Milsner*

Institute of Human Morphology, Academy of Medical Sciences of the USSR, M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow

Analysis of vitamin A-binding components in a soluble fraction of rat retina was carried out using gel filtration and gradient ultracentrifugation. Use of a wide range of concentrations of labelled retinol ( $6 \cdot 10^{-8} = 2 \cdot 10^{-5}$  M) enabled to detect both high and low molecular forms of the binding components in retina. High molecular components (5 S, 7 S) were mainly found at physiological concentrations of retinol and at the higher ( $10^{-6} = 10^{-5}$  M) concentrations. Low molecular mass receptor (2 S) prevailed under conditions of loading of the soluble fraction with subphysiological ( $\mu$ mol) concentrations of retinol.

УДК 615.917'262.036.11.07:616.153.96'915-055.1-074

*В. Ф. Трюфанов, М. С. Усатенко, И. В. Бокий*

### КОНЦЕНТРАЦИЯ ЛИПИДОВ И АПОЛИПОПРОТЕИНОВ А-I, А-II и Е В ПЛАЗМЕ КРОВИ МУЖЧИН, СТРАДАЮЩИХ ХРОНИЧЕСКИМ АЛКОГОЛИЗМОМ

Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины АМН СССР, наркологическая клиника Психоневрологического института им. В. М. Бехтерева, Ленинград

Систематическое употребление больших количеств алкоголя, приводящее к хронической алкогольной интоксикации организма, по данным литературы, часто сопровождается гиперлипидемией, главным образом гипертриглицеридемией. Принято считать, что вызванная этанолом гиперлипидемия является результатом усиленной продукции печенью липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП) [1, 2]. Большинство алкогольных нарушений липидного обмена приводит также к накоплению липидов в печени, а в тяжелых случаях — к жировому перерождению органа. При этом отмечается, что степень поражения печени и изменения уровня липидов в крови зависят от количества принимаемого алкоголя и длительности его употребления. Найдено, что при употреблении лицами, страдающими алкоголизмом, не менее 160 г этанола в день у 75% из них развиваются только тяжелые поражения печени, а при приеме небольших доз этанола такие изменения в печени наблюдаются в 17% случаев [2—4]. Если злоупотребление алкоголем продолжается более 15 лет, жировое перерождение печени встречается в 8 раз чаще, чем у лиц, регулярно принимающих алкоголь в течение 5 лет. В экспериментах на животных показано [5], что степень развития гипертриглицеридемии зависит от количества принятого алкоголя и вида пищи. Халтаев и соавт. [6] уточнили разновидность углеводов, употребление которых при приеме алкоголя людьми приводит к повышению концентрации триглицеридов, а в некоторых случаях и холестерина в крови.

Несмотря на то, что во многих исследованиях имеется указание на прямую связь между приемом алкоголя и развитием гиперлипидемии, объяснение наблюдаемому явлению дается неоднозначное. При применении меченых соединений, включающихся в обмен липидов, показано [7], что хроническое употребление алкоголя приводит лишь к незначительному увеличению синтеза триглицеридов и не влияет на обмен холестерина. Одноразовое введение большой дозы алкоголя экспериментальным животным не приводит к увеличению синтеза жирных кислот [8]. В ряде работ [9, 10] имеется указание на то, что увеличение концентрации триглицеридов в крови после приема алкоголя является следствием увеличения образования ЛПОНП. В последние годы появились работы [11, 12], в которых приведены данные о повышении уровня липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) в крови у лиц, злоупотребляющих алкоголем.

Таким образом, результаты экспериментальных и клинических исследований о влиянии алкоголя на обмен липидов неоднозначны, а иногда и

противоречивы. Большинство авторов [2, 5, 7, 13], изучающих влияние алкоголя на обмен липидов, склонны объяснять разнородность результатов разным функциональным состоянием печени у больных хроническим алкоголизмом. Но некоторые исследователи [14] расценивают повышение уровня триглицеридов или холестерина в крови как результат раздражения алкоголем или продуктами его распада гладкого эндоплазматического ретикулула и усиления синтеза ЛПВП в клетках печени. В ряде случаев противоречивость результатов исследований о влиянии алкоголя на обмен липидов может быть объяснена разнородностью обследуемого контингента людей, а также применением разных по точности и воспроизводимости методов анализа липидов [14].

Целью настоящей работы было изучение изменений концентрации липидов и аполипопротеинов в плазме крови мужчин, больных хроническим алкоголизмом II и II—III стадий. Все обследуемые находились на лечении в наркологическом отделении Ленинградского психоневрологического института им. В. М. Бехтерева.

### М е т о д и к а

Обследовано 130 мужчин в возрасте от 21 года до 60 лет. По выраженности проявлений алкоголизма все обследованные были разделены на 3 группы. В 1-ю группу включено 58 больных, поступивших в наркологическое отделение в состоянии алкогольного абстинентного синдрома (ААС). У 31 больного этой группы имелись резко выраженные соматовегетативные и психические проявления ААС, а у 6 из них через 1 сут после поступления в клинику развился алкогольный делирий. У остальных 27 больных имелись слабо выраженные признаки ААС. У всех больных 1-й группы отмечалась прямая зависимость между степенью проявления ААС и выраженностью предшествовавшей интоксикации. 2-ю группу составили 55 больных хроническим алкоголизмом, находившихся во время обследования в состоянии внутрибольничной ремиссии. 3-ю, контрольную, группу составляли 17 бывших больных алкоголизмом, находившихся в состоянии устойчивой (более 5 лет) ремиссии и приглашенных в клинику для проверки состояния здоровья и контроля эффективности проведенного ранее лечения.

Через 1 сут после поступления в клинику и 12—14-часового голодания у больных всех групп брали кровь из локтевой вены для определения уровня липидов. Повторные взятия крови натошак у больных 1-й группы были произведены после купирования признаков ААС, что соответствовало 10—14-му дню их пребывания в клинике, а также в конце 4-й недели лечения. У больных 2-й группы брали повторно кровь не ранее чем через 2 нед после первого анализа.

Определение общего холестерина, холестерина ЛПВП и триглицеридов в плазме крови выполняли на автоанализаторе АА-II фирмы «Техникон» при постоянной стандартизации методов и прибора по международной программе стандартизации контроля и качества исследований липидов [15]. Холестерин ЛПВП определяли в надосадочной жидкости после осаждения из плазмы крови липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) и ЛПОНП гепарином в присутствии ионов марганца. Содержание холестерина ЛПНП и ЛПОНП определяли расчетным путем, который заключается в следующем. Величина, получаемая после деления концентрации триглицеридов на 5, соответствует уровню холестерина ЛПОНП, а разница, которая получается после вычитания из концентрации общего холестерина суммы концентраций холестерина ЛПВП и ЛПОНП, соответствует концентрации холестерина ЛПНП [16].

Содержание аполипопротеинов в плазме крови определяли методом ракетного иммуноэлектрофореза в агарозном геле, содержащем кроличью иммунную моноспецифическую сыворотку против человеческих аполипопротеинов А-I, А-II или Е. Для исследования была взята плазма у 9 больных в состоянии ААС, т. е. при поступлении их на лечение (повторное исследование выполнено через 4 нед), а также у 7 больных в состоянии внутрибольничной ремиссии (повторное исследование через 2—3 нед, перед выпиской из стационара). При определении уровня аполипопротеинов крови в группу лиц с ААС были взяты пациенты с наиболее высоким уровнем холестерина ЛПВП, для того чтобы найти наиболее выраженные изменения в концентрации аполипопротеинов по сравнению с контрольной группой, где отмечался нормальный уровень холестерина ЛПВП. Во 2-й группе больных отмечен как нормальный, так и умеренно повышенный уровень холестерина ЛПВП. В крови всех больных, кроме уровня липидов, определяли концентрацию сахара, билирубина, мочевины и активность трансаминаз, с целью исключения сопутствующих заболеваний.

Кроме лабораторных исследований, всем больным проводили тщательное и всестороннее клиническое обследование. Статистическая обработка полученных результатов выполнена на ЭВМ «Минск-32».

Таблица 1

Концентрация липидов в плазме крови больных хроническим алкоголизмом<sup>1</sup>

Группа обследованных	Очередность проведенных анализов <sup>1</sup>	Число обследованных	Средний возраст обследованных, годы	Холестерин, мг/100 мл					Триглицериды, мг/100 мл
				общин	ЛПВП	холестерин ЛПВП, % от общего холестерина	ЛПНП	ЛПОНП	
1-я	1	58	37,2±1,1	220±6,6	76,7±3,4	34,8±1,7	119±6,8	24,7±2,7	123±6,1
	2	58	37,2±1,1	198±4,5	53,2±1,9	26,8±1,3	119±11,9	25,6±3,1	128±9,9
	3	51	37,2±1,1	199±4,6	47,1±1,3	23,6±0,8	130±6,5	22,5±3,6	112±6,5
2-я	1	55	36,8±1,2	201±4,1	51,5±1,8	25,6±1,4	122±8,1	27,2±1,4	136±14,4
	2	54	36,3±1,1	201±4,9	46,3±1,2	23,0±1,0	132±8,6	22,5±1,1	112±6,1
3-я	1	17	42,3±2,2	210±8,5	45,7±2,6	21,8±1,7	144±8,1	21,2±2,5	108±12,3

<sup>1</sup> Срок пребывания больных в клинике и очередность проведения анализов указаны в разделе «Методика».

Таблица 2

## Концентрация холестерина ЛПВП и аполиipoproteинов А-I, А-II и Е в плазме крови больных хроническим алкоголизмом

Группа обследованных	Число обследованных	Очередность проведенных анализов <sup>1</sup>	Холестерин ЛПВП	Аполиipoproteины, мг/100 мл			Коэффициент	
				А-I	А-II	Е	холестерин ЛПВП/аполиipoproteин А-I	холестерин ЛПВП/аполиipoproteин А-II
1-я	9	При поступлении в клинику При выписке из клиники	103±7,5	169±4,5	65,0±1,3	9,2±0,8	0,61	1,58
			52,7±4,4	132±2,9	55,8±1,7	10,8±0,8	0,40	0,94
2-я	7	При поступлении в клинику При выписке из клиники	53,6±7,7	133,0±0,4	54,6±1,9	11,4±1,3	0,40	0,98
			51,1±6,4	130,0±2,0	54,7±1,2	10,5±0,2	0,39	0,93
3-я	8		46,1±3,3	126,6±6,0	56,8±1,4	10,2±0,6	0,36	0,81

<sup>1</sup> Срок пребывания больных в клинике указан в разделе «Методика».

## Результаты и обсуждение

Результаты проведенных исследований липидов представлены в табл. 1, из которой видно, что у больных хроническим алкоголизмом в состоянии ААС уровень общего холестерина крови составлял в среднем 220 мг/100 мл. Отметим, что такой уровень общего холестерина крови для мужчин 40—59 лет был установлен при популяционном обследовании населения Ленинграда в качестве средней величины нормы [17]. По данным литературы [18], у лиц более молодого возраста уровень липидов крови был немного ниже. Через 2 нед, при повторном исследовании липидов у этих больных, содержание общего холестерина крови было в среднем на 22 мг/100 мл (10%) ниже, чем при первом исследовании, и держалось на этом уровне до конца наблюдения. Такое же содержание общего холестерина крови (около 200 мг/100 мл) было найдено как при первом, так и при повторном исследовании крови больных 2-й группы, которые находились в состоянии внутрибольничной ремиссии. Следовательно, при хроническом алкоголизме с явными признаками ААС наблюдается хотя и небольшое (всего на 10%), но статистически достоверное ( $P < 0,05$ ) повышение уровня общего холестерина крови, которое, однако, исчезает после прекращения приема алкоголя уже через 2 нед. В контрольной группе уровень общего холестерина крови составил в среднем 209 мг/100 мл, что также ниже средней величины, установленной для мужчин 40—49 лет [17].

Представляло интерес выяснение вопроса, за счет какой фракции холестерина происходит наблюдаемое изменение уровня общего холестерина крови. Проведенные исследования показали (см. табл. 1), что основные изменения происходят за счет холестерина ЛПВП. У больных в состоянии ААС средний уровень холестерина ЛПВП составлял 76,7 мг/100 мл, что значительно превышает результаты, полученные при популяционном обследовании мужчин Ленинграда (54,7 мг/100 мл), а также данные, опубликованные многими другими исследователями [17, 18]. При последующих определениях холестерина ЛПВП было установлено резкое снижение его уровня через 2 нед, к концу срока обследования он достиг уровня контроля, снизившись до 47,1 мг/100 мл.

Уровень холестерина ЛПНП в 1-й и 2-й группах был ниже, чем в контроле ( $P > 0,05$ ). В период ремиссии наблюдалось увеличение его содержания в среднем на 100 мг/100 мл, не достигшее, однако, уровня контроля. Холестерин ЛПОНП в 1-й и 2-й группах обследуемых был несколько выше, чем в контроле. В конце ремиссии содержание холестерина ЛНОНП снизилось и почти достигло уровня контроля.

Как и другие авторы, изучающие влияние алкоголя на липиды крови, мы обнаружили повышение уровня триглицеридов крови у больных хроническим алкоголизмом в среднем на 20—25% по сравнению с контролем, к концу периода обследования этот показатель уменьшался, но еще не достигал уровня контроля.

Известно, что аполипопротеины А-I и А-II являются основными белковыми компонентами ЛПВП [19], а аполипопротеин Е содержится преимущественно в ЛПОНП [20]. В настоящее время имеется ряд сведений о тесной связи между обменом ЛПВП и ЛПОНП при дислипидемиях [21]. Предполагается, что в регуляции обмена ЛПВП и ЛПОНП важная роль принадлежит изменениям концентрации аполипопротеинов А-I, А-II и Е в плазме крови. В связи с наличием высокого уровня холестерина ЛПВП у больных хроническим алкоголизмом представлялось целесообразным исследовать содержание указанных аполипопротеинов в плазме крови. Результаты исследований представлены в табл. 2, из которой видно, что при ААС одновременно с резким увеличением уровня холестерина ЛПВП имеет место повышение концентрации аполипопротеина А-I (со 132 до 169 мг/100 мл), составляющего, как известно, основную массу белка этого липопротеида.

Содержание аполипопротеина А-II у этих больных также повышалось, но в меньших пределах, чем А-I. Если полученные результаты сопоставить

с уровнем аполипопротеинов А-I и А-II у здоровых людей, то увеличение составляет 25 и 13% соответственно. Таким образом, в плазме крови больных хроническим алкоголизмом наиболее выражены изменения концентрации аполипопротеина А-I. Концентрация аполипопротеина Е, содержащегося преимущественно в ЛПОНП, у больных с ААС была слегка снижена (на 10%) по сравнению с контролем. Наиболее высокое содержание аполипопротеина Е наблюдалось в крови больных, находящихся в состоянии внегоспитальной ремиссии, — на 24% выше, чем у больных с ААС. К концу периода обследования у больных с ААС одновременно с нормализацией уровня холестерина ЛПВП содержание аполипопротеинов А-I, А-II и Е в плазме крови становилось также близким к контрольным величинам.

В настоящее время получены сведения о том, что содержание ЛПВП в плазме крови повышается под влиянием ряда веществ, вызывающих гипертрофию гладкого эндоплазматического ретикулума печени [21]. К таким веществам относится и этанол, который повышает функциональную активность микросом печени, главным образом активность гладкого эндоплазматического ретикулума, участвующего в образовании липопротеидных комплексов. Следовательно, повышение концентрации аполипопротеинов А-I и А-II в плазме крови больных хроническим алкоголизмом может быть обусловлено стимулирующим влиянием этанола на функцию микросом печени. Вместе с тем сопоставление степени увеличения холестерина ЛПВП и уровня аполипопротеинов А-I и А-II в плазме крови лиц с ААС показывает, что содержание ЛПВП увеличивается в большей степени, чем концентрация аполипопротеинов. Коэффициенты холестерина — ЛПВП/аполипопротеин А-I и холестерин ЛПВП/аполипопротеин А-II у больных с ААС значительно выше контрольных величин (см. табл. 2). Эти данные свидетельствуют о том, что увеличение уровня ЛПВП в крови при алкогольном отравлении организма вряд ли связано только с усилением синтеза аполипопротеинов А-I и А-II. Не исключено, что имеет место нарушение катаболизма ЛПВП в паренхиматозных клетках печени, пораженной алкоголем. Во всяком случае полученные данные указывают на то, что при ААС процентное содержание аполипопротеинов А-I и А-II в ЛПВП снижается, несмотря на абсолютное их повышение в плазме крови. Уменьшение содержания аполипопротеинов А-I и А-II в ЛПВП может привести к снижению транспортной функции последних в отношении холестерина. Показательно в связи с этим, что у лиц с ААС несколько снижен и уровень аполипопротеина Е, обладающего способностью связывать холестерин [22].

Таким образом, увеличение уровня холестерина ЛПВП и самих ЛПВП у больных хроническим алкоголизмом может быть результатом как стимуляции образования последних, так и следствием нарушенного их катаболизма в пораженной алкоголем печени.

Из результатов проведенных исследований можно заключить, что систематическое употребление алкоголя, приводящее к алкоголизму, сопровождается относительно небольшим повышением уровня общего холестерина крови, которое снижается уже через 2 нед после прекращения приема алкоголя. Повышение уровня общего холестерина крови у больных хроническим алкоголизмом с наличием ААС происходит в основном за счет холестерина ЛПВП, что подтверждается увеличением концентрации аполипопротеинов А-I и А-II и в меньшей степени за счет холестерина ЛПОНП. У больных хроническим алкоголизмом отмечается повышение уровня триглицеридов крови, которое держится дольше, чем изменение уровня общего холестерина крови.

После длительного воздержания от приема алкоголя содержание общего холестерина, холестерина ЛПВП и концентрация аполипопротеинов А-I, А-II и Е постепенно нормализуются.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Beltrage P., Begr B., Hägerstrand J.* et al. — *Europ. J. clin. Invest.*, 1977, v. 7, p. 127—131.
2. *Lieber C. S.* — *Med. Chem.*, 1976, v. 2, p. 183—220.

3. *Lelbach W. K.* — Acta hepato-splenol. (Stuttg.), 1966, Bd 13, S. 321—329.
4. *Castelli W. P., Gordon T., Hjortland M. C.* et al. — Lancet, 1977, v. 2, p. 153—155.
5. *Lieber C. S.* — Lipids, 1974, v. 9 p. 103—116.
6. *Халтаев И. Г., Мазур И. А., Бубнов Ю. Н.* и др. — Бюлл. Всесоюз. кардиол. науч. центра, 1979, № 1, с. 70—74.
7. *Ontko J. A.* — J. Lipid. Res., 1973, v. 14, p. 78—86.
8. *Madsen N. P.* — Biochem. Pharmacol., 1969, v. 18, p. 261—267.
9. *Koga A., Hirayama C.* — Experientia (Basel), 1968, v. 24, p. 438—439.
10. *Berg B., Johansson B. G.* — Acta med. scand., 1973, Suppl. 552, p. 13—18.
11. *Johansson B. G., Medhus A.* — Ibid., 1974, v. 195, p. 273—277.
12. *Nikkila E. A.* — In: High Density Lipoproteins and Atherosclerosis. Ed. A. M. Gotlo et al. Amsterdam, 1978, p. 177—192.
13. *Sabesin S. M., Hawkins H. L., Kaiken L.* et al. — Gastroenterology, 1977, v. 72, p. 510—518.
14. *Бондарь Э. А., Старовойтова С. П., Иванец И. И.* и др. — Тер. арх., 1975, № 2, с. 95—99.
15. *Трюфанов В. Ф., Сучкова С. Н.* — В кн.: Дислипипротендемии и ишемическая болезнь сердца. М., 1980, с. 151—167.
16. Фенотипирование гиперлипипротендемии (Метод. рекомендации). Под ред. А. Н. Климова, И. Е. Ганелиной. М., 1975.
17. *Климов А. Н., Герасимова Е. П., Шестов Д. Б.* и др. — Кардиология, 1979, № 4, с. 61—67.
18. *Rifkind B. M., Tamir J., Heiss G.* et al. — Lipids, 1979, v. 14, p. 105—112.
19. *Curry M. D., Alaupovic P., Suenram C. A.* — Clin. Chem., 1976, v. 22, p. 315—322.
20. *Curry M. D., McConathy W. J., Alaupovic P.* et al. — Biochim. biophys. Acta, 1976, v. 439, p. 413—425.
21. *Nikkila E. A.* — Europ. J. clin. Invest., 1978, v. 8, p. 111—113.
22. *Тимова Г. В., Клюева И. И., Кожевникова К. А.* и др. — Биохимия, 1980, № 1, с. 51—55.

Поступила 10/VII 1980 г.

#### CONCENTRATION OF LIPIDS AND APOLIPOPROTEINS A-I, A-II AND E IN BLOOD PLASMA OF MEN WITH CHRONIC ALCOHOLISM

*V. F. Tryufanov, M. S. Usatenko, I. V. Bokiij*

Institute of Experimental Medicine, Academy of medical Sciences of the USSR,  
*V. M. Bekhterev Psychoneurological Institute, Leningrad*

Content of lipids and apolipoproteins A-I, A-II and E was studied in blood plasma of patients with chronic alcoholism under conditions of alcoholic abstinence syndrome and remission. Concentration of total cholesterol was higher by 10% in patients with alcoholic abstinence syndrome as compared with the control group of patients studied at the state of remission. Content of cholesterol in high density lipoproteins was increased up to 76.7 mg/100 ml as compared with 45.7 mg/100 ml in the controls. The increase in cholesterol content was accompanied by elevation in concentration of apo A-I from 132 to 169 mg/100 ml, whereas the content of apo A-II was increased by 9.2 mg/100 ml. In the patients the content of apo E tended to decrease. Content of triglycerides was increased by 20-25% in blood. All the alterations in concentration of lipids and apolipoproteins returned to the normal level after 3-4 weeks of abstinence from alcohol intake. The increase in content of cholesterol in high density lipoproteins and of these lipoproteins was apparently due to stimulation of these substances formation and inhibition of their catabolism in liver tissue impaired with alcohol.

УДК 618.36-008.939.6-07:[543.544+616-078.7

*О. П. Шевченко, Г. А. Козляева, Д. Д. Петрунин,  
Ю. С. Татаринев, Т. М. Цагараева*

#### СОЧЕТАНИЕ АДСОРБЦИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ И ИММУНОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ ПЛАЦЕНТЫ

Кафедра биохимии и проблемная лаборатория по иммунохимии злокачественных и эмбриональных тканей II Московского медицинского института

Препаративные методы выделения антигенно активных макромолекул, позволяющие эффективно фракционировать белковые смеси, имеют важное значение, так как наличие даже полуочищенных препаратов какого-либо

белка позволяет получить антисыворотки более высокого качества, использовать высокочувствительные методы его определения, такие, как радиоиммунологический и энзимоиммунологический, а также производить тестирование биологической активности исследуемых белков.

Адсорбционная хроматография принадлежит к числу давно и хорошо известных методов препаративного фракционирования белков и в настоящее время применяется наряду с тонкими современными методами для их очистки [1, 2]. Однако возможности адсорбционной хроматографии используются далеко не полностью.

В настоящей работе приводится методический подход к поиску способов очистки белков с помощью адсорбционной хроматографии и изложены полученные на его основе результаты по исследованию и выделению специфических белков плаценты — хорионического  $\alpha_1$ -микроглобулина [3] и плацентарного лактогена [4].

### М е т о д и к а

В работе использовали большой набор адсорбентов, выпускаемых отечественной промышленностью (см. таблицу). Влажный адсорбент смешивали с биологическим материалом (амниотическая жидкость, тканевый экстракт, сыворотка крови) в соотношении 1 : 1 и тщательно перемешивали в течение 20 мин. Адсорбент и надосадочную жидкость разделяли центрифугированием при 5000 g. Осадок после трехкратного промывания дистиллированной водой делили на 4 порции и проводили элюцию сорбированных белков равными объемами 10% NaCl, 30%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , насыщенного раствора  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  и 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

В исходном материале, надосадочной жидкости, элюционных пробах определяли концентрацию специфических белков методом иммунодиффузии, титруя исследуемые пробы вокруг стандартной тест-системы [5]. Полуколичественное определение плацентарного лактогена в экстракте плаценты с помощью стандартной тест-системы показано на рис. 1 (см. стр. 427). Содержание примесных антигенов исследовали иммунодиффузионным методом [6] с помощью антисыворотки против белков сыворотки крови человека («Behringwerke», ФРГ) и кроличьей антисыворотки против белков плаценты человека. Кроме того, во всех фракциях определяли содержание общего белка спектрофотометрически при 280 нм. Перекрестный иммуноэлектрофорез проводили в 1% геле агарозы по Вееке [7].

Исходным материалом для выделения хорионического  $\alpha_1$ -микроглобулина служила амниотическая жидкость, полученная на 16—25-й неделе беременности. Плацентарный лактоген выделяли из экстракта зрелой плаценты. Получение моноспецифических антисывороток против хорионического  $\alpha_1$ -микроглобулина описано ранее [3, 8]. Антисыворотки против плацентарного лактогена получали путем иммунизации кроликов фракцией, приготовленной из зрелой плаценты в результате осаждения 0,25% риванолом и сернистым аммонием при 60% насыщения. Антисыворотки истощали плазмой доноров и смесью экстрактов органов взрослого человека.

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

Поиск эффективных приемов фракционирования белков с помощью адсорбционной хроматографии начинали с определения отношения выделяемого белка к достаточно большому набору различных адсорбентов. В качестве примера представлены результаты изучения связывания хорионического  $\alpha_1$ -микроглобулина с различными адсорбентами. Как видно из таблицы, этот антиген в отличие от большинства примесных белков практически не сорбируется пирофосфатом кальция. Адсорбция примесей пирофосфатом кальция оказалась эффективным приемом и была дважды использована на последних этапах очистки хорионического  $\alpha_1$ -микроглобулина.

В число адсорбентов, применяемых для предварительной апробации, были включены некоторые реагенты, которые обычно не использовались для адсорбционной хроматографии белков (тальк, силикагель, пиро- и гидрофосфат кальция), но оказались весьма эффективными для этих целей. Все использованные адсорбенты обладают высокой емкостью сорбции белков и не требуют применения колонок.

При изучении связывания плацентарного лактогена с различными адсорбентами было установлено, что он полностью сорбируется из экстракта плаценты окисью алюминия и не снимается с нее 10% NaCl, но элюируется насыщенным раствором  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Кроме того, этот антиген хорошо связыв-

вается с силикагелем и элюируется с него только 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Комбинация этих двух адсорбентов позволяет добиться эффективного обогащения препарата плацентарного лактогена (рис. 2 стр. 427). Для этого экстракт плаценты обрабатывали окисью алюминия (влажный адсорбент добавляли к экстракту в объемном соотношении 2 : 3). После трехкратной отмывки несвязавшихся белков дистиллированной водой сорбент дополнительно отмывали 10%  $\text{NaCl}$ , что позволило удалить часть примесей без потери специфической активности антигена. Элюцию с окиси алюминия производили насыщенным раствором гидрофосфата натрия, элюат обрабатывали равным объемом силикагеля. Следует отметить, что плацентарный лактоген в отличие от ряда других белков полностью сорбируется силикагелем в фосфатной среде. Тот факт, что плацентарный лактоген связывается с сили-

Характеристика связывания хорионического  $\alpha_1$ -микроглобулина с различными адсорбентами

Адсорбент	Надосадок		Элюирующий раствор							
	А	Б	10% $\text{NaCl}$		30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		$\text{Na}_2\text{HPO}_4$		10% $\text{Na}_2\text{CO}_3$	
			А	Б	А	Б	А	Б	А	Б
Каолин	—	+	—	+	—	+	—	++	—	++
Силикагель	—	+	—	+	—	++	—	++	++++	++
Окись алюминия	—	+	—	+	—	++	++++	++++	++++	++
Окись магния	++	++	—	++	—	++	—	++	—	++
Тальк	—	+	—	+	—	+	—	++	+	++
Сернокислый барий	++	++	—	+	+	++	++	++	++	++
Гидрофосфат кальция	++++	++	—	+	—	++	—	++	—	++
Гидрофосфат алюминия	++	++	—	+	—	+	++	++	++	++
Пирофосфат кальция	++++	+	—	+	—	+	—	++	—	++

Примечание. А — хорионический  $\alpha_1$ -микроглобулин, Б — примеси.

кагелем в присутствии гидрофосфата натрия, позволяет использовать второй адсорбент без предварительного диализа препарата. Кроме того, присутствие гидрофосфата натрия исключает сорбцию ряда примесных антигенов, которые связываются с силикагелем, но элюируются с него гидрофосфатом натрия. Дополнительная обработка силикагеля 30%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  также способствует удалению ряда примесных белков. Элюция с силикагеля 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  позволяет получить полуочищенный препарат плацентарного лактогена (см. рис. 2) с выходом не менее 40%.

Определение концентрации специфических антигенов и примесей с помощью иммунохимического анализа служит для оценки отдельных этапов в процессе выделения этих антигенов. По-видимому, количество добавляемого адсорбента должно зависеть от степени сорбции выделяемого антигена. Для плацентарного лактогена, который хорошо связывается с окисью алюминия, подбирали минимальное количество адсорбента, необходимое для фиксации из жидкой фазы всего антигена. Для хорионического  $\alpha$ -микроглобулина, который плохо сорбируется пирофосфатом кальция, находили возможно большую дозу адсорбента с целью максимального удаления из жидкой фазы примесных белков.

Применение четырех элюирующих растворов, по нашим данным, позволяет фракционировать адсорбированные белки с большей разрешающей способностью, чем использование градиента ионной силы какого-либо одного элюирующего агента. Если адсорбированный антиген не смывался каким-то элюирующим раствором, проводили дополнительную отмывку этим раствором адсорбента с целью удаления примесных белков. Как видно из таблицы, из четырех использованных элюирующих растворов наи-

более эффективным элюантом оказался раствор карбоната натрия, а наименее сильным — раствор поваренной соли.

Таким образом, предлагаемый методический подход к изучению возможностей адсорбционной хроматографии для препаративного выделения белков плаценты предполагает сочетание адсорбционной хроматографии с иммунохимическим анализом и включает в себя 2 этапа. На первом этапе определяется отношение антигена к широкому набору адсорбентов (своего рода «скрининг»), что позволяет сразу отобрать наиболее эффективные реагенты. Второй этап состоит в комбинировании наиболее удачных приемов в рациональную схему очистки антигена. Сочетание адсорбционной хроматографии с другими методами позволяет в ряде случаев решить проблему препаративного выделения и очистки белков.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Келлер С., Блок Р. — В кн.: Аналитические методы белковой химии. М., 1963, с. 70—105.
2. Bohn H., Schmidtberger R., Zilg H. — Blut, 1976, Bd 32, S. 103—113.
3. Петрунин Д. Д., Грязнова И. М., Петрунина Ю. А. и др. — Акуш. и гин., 1977, № 1, с. 64—65.
4. Josimovich J. B., MacLaren J. A. — Endocrinology, 1962, v. 71, p. 209—220.
5. Храмова Н. И., Абедев Г. И. — Бюлл. exper. биол., 1961, № 12, с. 107—110.
6. Ouchterlony O. — Progr. Allergy, 1958, v. 5, p. 1—78.
7. Вееке В. — В кн.: Руководство по количественному иммуноэлектрофорезу. Методы и применение. М., 1977, с. 58—67.
8. Петрунин Д. Д., Грязнова И. М., Петрунина Ю. А. и др. — Бюлл. exper. биол., 1978, № 5, с. 600—602.

Поступила 30/VII 1980 г.

#### ISOLATION OF PLACENTAL PROTEINS BY MEANS OF COMBINED USE OF ADSORPTION CHROMATOGRAPHY AND IMMUNOCHEMICAL ANALYSIS

O. P. Shevchenko, G. A. Kozl'jeva, D. D. Petrunin, Yu. S. Tatarinov, T. M. Sagaracva  
N. I. Pirogov II Medical School, Moscow

Absorption chromatography was used to isolate antigens from placenta; the most effective purification of the antigens was achieved by selection of suitable eluents. Combined use of adsorption chromatography and immunochemical analyses showed that chorionic  $\alpha_1$ -globulin was isolated most effectively by means of calcium pyrophosphate and placental lactogene on the columns with silica gel and aluminium hydroxide.

УДК 612.35.014.3:612.6+612.352.3:612.398.145.1

**В. М. Родионов**, А. В. Поспелова, Н. А. Кузьмичева, Н. В. Горелова

#### ВЛИЯНИЕ ХАЛОНОВ ПЕЧЕНИ ИНТАКТНЫХ КРЫС НА СИНТЕЗ ДНК И МИТОТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ГЕПАТОЦИТОВ РЕГЕНЕРИРУЮЩЕЙ ПЕЧЕНИ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Изучение факторов, регулирующих деление клеток в организме млекопитающих, представляет большой интерес. Практическое значение этих работ трудно переоценить. От их успеха в значительной мере зависит решение таких проблем, как стимуляция заживления ран и тканевых дефектов и, по-видимому, лечение злокачественных заболеваний.

Известно, что пролиферация тканей может регулироваться различными веществами, присутствующими в организме.

Предположение о том, что регуляция деления клеток в организме может осуществляться посредством тканеспецифических ингибиторов деления, было показано еще в 50-х годах. Однако изучение этих ингибиторов, впоследствии получивших название халонов, началось после работ Бэллоу и Лауренс [1] и Иверсена [2] на эпидермисе.

Для эпидермиса [3] и тонкого кишечника [4] показано существование халонов 2 типов:  $G_1$ -халона, препятствующего переходу готовящихся к делению клеток из  $G_1$ -периода клеточного цикла в S-период, и  $G_2$ -халона, блокирующего переход из  $G_2$ -периода в митоз.

Значительно меньше данных имеется о халонах печени. В последние годы показано, что в печени, как и в других тканях, по-видимому, существует 2 типа халонов —  $G_1$  и  $G_2$  [5—7]. Однако в высокоочищенном состоянии получен пока  $G_1$ -халон [5]. Что же касается  $G_2$ -халона, то до настоящего времени отсутствуют данные о методах его очистки. Это обстоятельство и заставило нас использовать для работы экстракт печени.

Задачей настоящей работы явилось изучение влияния халонов печени крыс обоих типов на синтез ДНК и митотическую активность клеток регенерирующей печени в разные сроки после операции.

### М е т о д и к а

Для выделения экстракта печени использовали крыс-самцов массой 250—300 г. Печень животных перфузировали физиологическим раствором, гомогенизировали (на 10 г печени 5 мл физиологического раствора). Гомогенат центрифугировали на центрифуге К-24 при 13 000×g в течение 40 мин. Для введения животным использовалась подсосочную жидкость, т. е. экстракт печени, в котором находятся  $G_1$ - и  $G_2$ -халоны.

Экстракт печени крыс вводили внутривентриально белым беспородным крысам-самцам с массой 170—200 г с регенерирующей печенью. Контрольным животным в таком же объеме вводили физиологический раствор. Контрольных животных оперировали одновременно с подопытными. Животные подвергались 70% гепатэктомии. За 60 мин до забоя крысам внутривентриально вводили раствор  $^3H$ -тимидина в 0,9% NaCl из расчета 0,5 мкКи на 1 г массы. Печень перфузировали сначала 0,14 М NaCl, затем 0,25 М сахарозой. Выделение ядер проводили по методу Шово и соавт. [8] в 2,2 М сахарозе, содержащей 3 мкМ  $CaCl_2$ . Чистоту выделенных ядер контролировали микроскопически. ДНК определяли, используя метод Шмидта, Таннхаузера [9] и спектрофотометрический метод Спирина [10]. Радиоактивность ДНК определяли в сцинтиляционном счетчике.

При определении митотической активности животным внутривентриально за 2 ч до забоя вводили колхицин из расчета 1 мкг на 1 г массы тела. Кусочки печени фиксировали в жидкости Карнуа, подвергали гистологической обработке, красили гематоксилином. Митотический индекс определяли подсчетом числа митозов на 3000 клеток. Количество белка определяли методом Лоури.

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

В таблице приведены данные, характеризующие включение  $^3H$ -тимидина в ДНК регенерирующей печени крыс при разной длительности действия экстракта печени интактных животных. Экстракт печени вводили через 21, 39, 42, 44 и 45 ч после гепатэктомии.

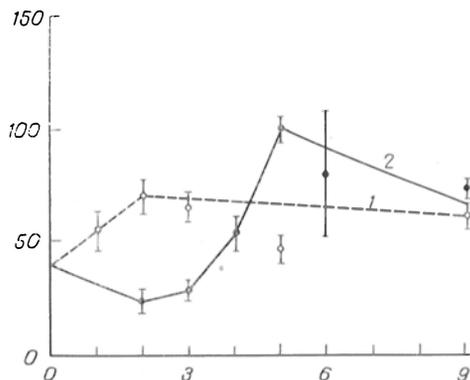
Выбор срока 21 ч после частичной гепатэктомии для введения экстракта печени обусловлен данными Чекулаевой и соавт. [11], которые при анализе изменения индекса меченых ядер после введения халонов в разное время после частичной гепатэктомии, одновременно меняя время частичной гепатэктомии, отметили максимальный ингибирующий эффект через 21 ч после частичной гепатэктомии и через 8 ч после введения халонов. Время 39 ч и более было выбрано для исследования влияния экстракта печени на синтез ДНК, когда он еще имеет место в регенерирующей печени, но уже не характеризуется максимальной скоростью. Нами было прослежено влияние экстракта печени на угнетение синтеза ДНК в течение 2, 3, 5, 7, 8, 9, 11 и 12 ч.

Как видно из таблицы, в параллельных опытах наблюдается большой разброс данных. Так, при введении экстракта печени через 21 ч после гепатэктомии и забоя животных через 8 ч синтез ДНК снижался до 60—18% по сравнению с контролем. 3-часовое воздействие экстракта печени вызывало угнетение синтеза ДНК до 60—32%, т. е. примерно в тех же пределах. После 2-часового воздействия экстракта печени отмечали небольшое снижение синтеза ДНК, через 11 ч после введения экстракта печени его действие, по-видимому, прекращалось (в двух последних случаях приведены данные одного опыта).

Торможение синтеза ДНК при введении экстракта печени через 39—46 ч после частичной гепатэктомии и забое животных через 3, 5, 7, 9 и 12 ч после его введения было несколько меньшим, чем через 21 ч после операции, и его действие прекращалось, по-видимому, через 9—12 ч. Введение экстракта печени в количестве 0,25, 0,50 или 1,0 мг на 1 г массы тела животного вызывало одинаковую степень торможения синтеза ДНК.

**Влияние экстракта печени интактных крыс на включение <sup>3</sup>H-тимидина в ДНК регенерирующей печени**

Время введения экстракта печени после частичной гепатэктомии, ч	Срок, прошедший после введения экстракта печени, ч	Число животных		Количество вводимого экстракта печени, мг белка	Синтез ДНК, % к контролю
		опыт	контроль		
21	2	3	2	100	89,7
21	3	5	4	100	31,8—60,3
21	5	3	3	100	65,4
21	8	3	3	200	54,3
21	8	11	10	100	18,0—60,9
21	8	9	8	50	38,2—55,9
21	11	2	2	100	107
46	3	2	2	100	75,1
44	5	2	2	100	62,4
42	7	2	2	100	34,1
44	7	4	4	100	70,9—85,9
42	9	4	4	100	105—120
39	12	4	4	100	82—91,2



Изменение митотического индекса у гепатэктомизированных крыс.

1 — гепатэктомизированные животные (контроль); 2 — гепатэктомизированные животные, получившие через 27 ч после операции инъекцию экстракта интактной печени. По оси абсцисс — время (в ч); по оси ординат — митотический индекс (в %).

На рисунке представлены данные по изменению митотического индекса в контроле и у гепатэктомизированных крыс, получивших через 27 ч после операции инъекцию экстракта интактной печени (опыт). Полученные данные статистически достоверны.

Из анализа полученных данных следует, что у подопытных животных самое большое снижение митотической активности наблюдается через 2 ч после введения экстракта печени. В более поздние сроки влияние экстракта уменьшается и прекращается полностью к 4—5 ч. К 6 ч наблюдается увеличение митотической активности за счет выхода в митоз тех клеток, которые были блокированы экстрактом печени. Далее вновь происходит снижение митотической активности и возвращение ее к контрольному уровню к 9 ч, что свидетельствует об обратимости действия халонов.

В этой работе подтверждаются данные других авторов [11, 12] о наличии в ткани печени G<sub>2</sub>-халона. Кроме того, показано, что G<sub>1</sub>-халон вызывает торможение синтеза ДНК на максимальном уровне в течение 5 ч, в то время как G<sub>2</sub>-халон тормозит митотическую активность на максимальном уровне в течение 1 ч. Действие халонов обратимо.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Bullough W. S., Laurence E. B. — Proc. roy. Soc., Edinb. B, 1960, v. 151, p. 517.
2. Iversen O. H. — Acta path. microbiol. scand., 1961, v. 50, p. 17.
3. Elgio K. — Nat. Cancer Inst. Monogr., 1973, v. 38, p. 71.
4. Brugal G., Pelmont I. — Cell. Tissue Kinet., 1975, v. 8, p. 171.
5. Verly W. G., Deschampe Y. J. et al. — Canad. J. Biochem., 1971, v. 49, p. 1376.
6. Sekas G., Cook R. T. — Exp. Cell. Res., 1976, v. 102, p. 422.
7. Окулов В. Б., Чекулаева Л. И. — Арх. анат., 1976, № 1, с. 106.
8. Chauveau J., Moule J., Rouiller C. — Exp. Cell. Res., 1956, v. 11, p. 317.
9. Smidt G., Thanhauser I. J. — J. biol. Chem., 1945, v. 161, p. 83.
10. Спиринов А. С. — Биохимия, 1958, т. 23, с. 656.

11. Чекулава Л. И., Кетлинский С. А., Окулов В. Б. — Цитология, 1978, № 4, с. 436.
12. Логинов А. С., Сперанский М. Д., Аруин Л. И. — Бюлл. exper. биол., 1976, № 12, с. 1482.

Поступила 22/IX 1980 г.

## EFFECT OF CHALONES FROM LIVER TISSUE OF INTACT RATS ON DNA SYNTHESIS AND MITOTIC ACTIVITY IN HEPATOCYTES OF REGENERATING LIVER TISSUE

V. M. Rodionov, A. V. Pospelova, N. A. Kuz'micheva, N. V. Gorelova

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

Activity of  $G_1$  and  $G_2$  chalones was found in liver tissue extract. The chalone  $G_1$  as compared with the chalone  $G_2$  was responsible for longer effect on mitosis of regenerating liver cells. The influence of the chalones was reversible. DNA synthesis was inhibited similarly after treatment of the animals with 1.0, 0.5 or 0.25 mg of the liver tissue extract per 1.0 g of the body mass.

## МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 616.153.1:577.152.421]-07

А. В. Мужиченко, В. В. Недогада

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ СЕРИН- И ТРЕОИНДЕГИДРАТАЗНОЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТКИ КРОВИ

Кафедра биохимии и пропедевтической терапии Волгоградского медицинского института

В практике клинического обследования больных с патологией печени используется определение активности более 20 ферментов [1]. Количество ферментных проб продолжает увеличиваться; при этом особого внимания клиницистов заслуживают тесты, отличающиеся высокой органоспецифичностью и способствующие выявлению начальных признаков патологии.

В настоящей работе предлагается способ оценки активности L-сериндегидратазы — СДГ (КФ 4.2.1.13) и L-треониндегидратазы ТДГ (КФ 4.2.1.16) в сыворотке крови. Особенностью этих ферментов являются их преимущественная локализация в цитоплазме гепатоцитов [2, 3] и короткий период полураспада (2—3 ч по сравнению с 40—48 ч для аланин- и аспаратаминотрансферазы) [4]. В ряде работ проведена физико-химическая и кинетическая характеристика СДГ и ТДГ печени животных [5—10] и человека. Некоторые авторы [10, 11, 13] высказывают предположение о том, что дезаминирование L-серина и L-треонина в печени катализируется одним ферментом. В доступной литературе не удалось найти сведений об определении активности СДГ и ТДГ в сыворотке крови людей в норме и при патологии.

Для оценки активности ферментов мы использовали колориметрический учет нарастания продуктов реакции дезаминирования L-серина (пировиноградная кислота) и L-треонина ( $\alpha$ -кетомасляная кислота) при помощи реакции с 2,4-динитрофенилгидразином (ДНФГ) в щелочной среде. Эта реакция считается одной из самых чувствительных реакций на  $\alpha$ -кетоки-

слоты [14]. Позже реакцию использовали для оценки активности СДГ и ТДГ в тканях животных [2, 15] и в бактериях [16, 17]. В настоящей работе пользовались прямой колориметрией динитрофенилгидразонов кетокислот, образующихся под влиянием ферментов. При этом исключается трудоемкая процедура перевода хромогенов в органическую фазу, но сохраняются воспроизводимость и достаточная чувствительность метода.

### М е т о д и к а

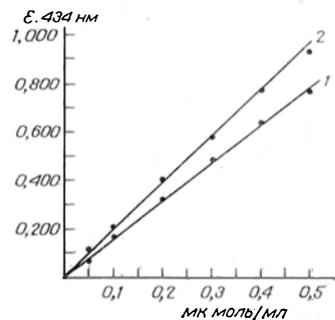
Использована свежая сыворотка крови без следов гемолиза. Для выяснения влияния гемолиза на результаты анализов исследованы донорская сыворотка с различной степенью гемолиза, а также взвесь эритроцитов доноров в буферной системе (рН, оптимальный для исследуемых ферментов). Материал хранили не более 6 ч.

**Реактивы:** 1) 0,1 М К-фосфатный буфер рН 8,0; 2) М/50 раствор L-серина в К-фосфатном буфере рН 8,0; 3) М/50 раствор L-треонина в К-фосфатном буфере рН 8,0. При отсутствии L-изомеров аминокислот можно использовать L-аминокислоты в тех же концентрациях. Растворы субстратов хранили в холодильнике не более 1 нед; 4) 20% раствор ТХУ; 5) 0,1% раствор в 2 н. соляной кислоте. Устойчив при хранении в холодильнике в течение 1 нед; 6) 2,5 н. NaOH. **Определение.** В каждую из двух центрифужных пробирок (можно пользоваться полиэтиленовыми) отмеривают по 0,5 мл К-фосфатного буфера рН 8,0. Добавляют по 1 мл раствора субстрата (серин или треонин) в этом же буфере, хорошо смешивают и перед добавлением сыворотки доводят температуру смеси в термостате до 37 °С. В обе пробирки вносят по 0,5 мл сыворотки крови и после смешивания одну из них (опытную) инкубируют в термостате при 37 °С в течение 1 ч, а во вторую (контрольную) добавляют 1 мл 20% раствора ТХУ для предотвращения действия фермента и осаждения белков. В опытную пробирку ТХУ добавляют после инкубации. Центрифугированием в течение 10 мин при 5000 об/мин осаждают и отбрасывают белки. В обычные пробирки отмеривают по 1 мл супернатанта опытной и контрольных проб ( $\frac{1}{3}$  пробы). Для проведения цветной реакции в обе пробирки добавляют по 0,2 мл 0,1% ДНФГ в 2 н. соляной кислоте, перемешивают и

Т а б л и ц а 1

Приготовление стандартных растворов для количественного определения пирувата и  $\alpha$ -кетобутирата

№ разведения	Количество исходного раствора, мл	Количество воды, мл	Содержание вещества, мкмоль/мл	Оптическая плотность ДНФГ-производных	
				пируват	$\alpha$ -кетобутират
1	0,05	0,95	0,05	0,088	0,120
2	0,1	0,9	0,10	0,160	0,220
3	0,2	0,8	0,20	0,320	0,400
4	0,3	0,7	0,30	0,480	0,580
5	0,4	0,6	0,40	0,640	0,760
6	0,5	0,5	0,50	0,790	0,940
7	0,6	0,4	0,60	0,950	1,120



Калибровочные кривые для определения количества ДНФГ-производных пирувата (1) и  $\alpha$ -кетобутирата (2).

оставляют при комнатных условиях на 5 мин. В обе пробы быстро вносят по 1,5 мл 2,5 н. NaOH и развившуюся окраску измеряют на ФЭК М-56 против контрольной пробы при 434 нм (СФ-4) в кюветах с толщиной слоя 5 мм. Найденную оптическую плотность оценивают по предварительно построенной калибровочной кривой (см. рисунок). Для построения калибровочной кривой мы пользовались растворами пирувата и  $\alpha$ -кетобутирата натрия, содержащими 1 мкмоль чистого вещества в 1 мл. Из этих растворов готовили разведения, как указано в табл. 1.

Измерение оптической плотности ДНФГ-производных обеих  $\alpha$ -кетокислот каждые 5 мин показало, что величины плотности находятся в линейной зависимости от концентрации в течение 15—90 мин после добавления щелочи. По нашим данным, кривые оптической плотности ДНФГ-производных кетокислот в пределах концентраций 0,05—0,5 мкмоль/мл отвечают закону Ламберта — Бера. Следует отметить, что оптическая плотность ДНФГ- производного  $\alpha$ -кетобутирата несколько выше найденной для аналогичного производного пирувата. Эти различия составляют от 17 до 35% оптической плотности и возрастают по мере снижения концентрации веществ. Активность СДГ и ТДГ целесообразно выражать в микромолях продуктов реакций, образовавшихся за 1 ч инкубации при 37 °С, на 1 л сыворотки крови, что соответствует требованиям перехода на Международную систему единиц [18].

**Пример расчета** активности СДГ и ТДГ в сыворотке крови больной С. с хроническим активным гепатитом и больного К. с токсическим гепатитом. Для исследования

Таблица 2

Активность печеночно-специфических ферментов в сыворотке крови больных с заболеваниями печени

Заболевание	Число больных	СДГ		ТДГ	СУ	СГ	Ф-1-ФА, ед
		мкмоль/л/ч					
Хронический персистирующий гепатит	36	114,18±13,86	82,86±11,22	0,20±0,04	0,17±0,03	0,98±0,14	
Хронический активный (агрессивный) гепатит	46	368,28±27,72	284,46±23,76	0,65±0,05	0,61±0,05	2,73±0,40	
Острый токсический гепатит	5	706,20±19,24	574,2±17,82	1,50±0,08	1,40±0,06	6,30±1,44	
Портальный цирроз печени	22	322,08±47,52	249,82±40,26	0,83±0,13	0,75±0,12	3,97±0,25	
Постнекротический цирроз печени	16	386,10±52,8	320,76±16,50	0,94±0,28	0,84±0,14	3,30±0,45	
Новообразование печени	6	357,72±67,32	287,7±62,70	0,84±0,28	0,69±0,21	3,00±0,74	

Примечание. Активность СУ и СГ рассчитывали, как рекомендовано в работе [14].

взято по 0,5 мл сыворотки, время инкубации 1 ч. Прирост оптической плотности опытных проб по отношению к контрольным для СДГ и ТДГ составил 0,070 и 0,040 у больной С. в первом случае и 0,570 и 0,550 у больного К. во втором.

Активность СДГ у больной С. равна

$$\frac{0,045 \times 3 \times 1000}{0,5 \times 1} = 270 \text{ мкмоль/л/ч,}$$

где 3 — множитель для пересчета на 1 мл сыворотки (так как для цветной реакции взято 1 мл из 3-х); 1000 — множитель для пересчета на 1 л сыворотки; 0,5 — объем сыворотки, взятой для анализа; 1 — время инкубации (в ч).

Активность ТДГ у больной С. равна:

$$\frac{0,025 \times 3 \times 1000}{0,5 \times 1} = 150 \text{ мкмоль/л/ч.}$$

У больного К. активность ферментов, рассчитанная таким же образом, была равна 1080 мкмоль/л/ч для СДГ и 858 мкмоль/л/ч для ТДГ.

### Результаты и обсуждение

Активность СДГ и ТДГ изучена у 115 доноров в возрасте от 18 до 52 лет и у 126 больных с заболеваниями печени в возрасте от 16 до 69 лет (табл. 2). У 45 больных активность ферментов изучалась в динамике от 2 до 5 раз. Показатели СДГ и ТДГ у всех больных соотносились с активностью сывороточной урокиназы (СУ) и гистидазы (СГ), фруктозо-1-фосфатаальдозазы (Ф-1-ФА), аспаргат-аминотрансферазы и аланин-аминотрансферазы. Наряду с проведением подробного клинического обследования у всех больных детально изучали функциональное состояние печени с помощью обычных лабораторных тестов (сывороточная энзимграмма, сулемовая, тимоловая и другие пробы), а также реогепаграммы, ультразвуковой и радиоизотопной индикации. Среди обследованных больных хронический активный гепатит был у 46, хронический персистирующий гепатит — у 36, острый токсический гепатит — у 5, холестатический гепатит — у 2, портальный цирроз печени — у 22, постнекротический цирроз печени — у 16, билиарный цирроз печени — у 3, злокачественные новообразования печени — у 6. Исследование сыворотки доноров не выявило заметной активности СДГ и ТДГ, т. е. у здоровых людей активность указанных ферментов в сыворотке крови практически равна нулю. Различная степень гемолиза не отражалась на результатах исследований, что свидетельствует об отсутствии СДГ и ТДГ в эритроцитах. Наиболее высокая активность СДГ и ТДГ выявлялась у больных острым токсическим гепатитом (706,2±19,24 и 574,2±17,82 мкмоль/л/ч соответственно). Максимальная активность ферментов (СДГ — 1080 мкмоль/л/ч, ТДГ — 858 мкмоль/л/ч)

обнаружена у больного с отравлением четыреххлористым углеродом. Умеренная активность СДГ (198 мкмоль/л/ч) и ТДГ (151,8 мкмоль/л/ч) оказалась у больной с легким отравлением искусственной эссенцией. Следует отметить, что во всех случаях имелась полная корреляция между активностью СДГ и ТДГ и других печеночно-специфических ферментов и тяжестью клинической картины острого токсического гепатита.

Большой интерес, на наш взгляд, представляют результаты исследования СДГ и ТДГ у больных персистирующим и активным гепатитом. Средние показатели активности СДГ и ТДГ были в 3 раза выше у больных активным гепатитом:  $368,28 \pm 27,72$  мкмоль/л/ч против  $114,18 \pm 13,86$  и  $284,46 \pm 23,76$  мкмоль/л/ч против  $82,50 \pm 11,22$  мкмоль/л/ч соответственно.

В группе больных персистирующим гепатитом нулевая активность СДГ была у 7 человек, а ТДГ — у 10 из 36 больных, в то время как СУ и СГ отсутствовали в сыворотке 21 больного. Минимальная активность СДГ (менее 60 мкмоль/л/ч) выявлялась у 6 больных, а существенное ее повышение (более 120 мкмоль/л/ч) было у 17 больных, т. е. почти в половине случаев. Значительного увеличения активности СУ и СГ не было ни у одного больного; у 15 больных активность СУ и СГ оказалась ниже 1 ед.

Что касается больных хроническим активным гепатитом, то активность СДГ и ТДГ не выявлялась лишь у 2 из 46 больных, а СУ и СГ — у 3. Факт отсутствия активности как печеночно-специфических, так и универсально-распространенных ферментов у этих больных при наличии выраженной гепатомегалии и значительной длительности заболевания (более 10 лет) требует дальнейшего изучения.

Существенное повышение активности СДГ и ТДГ отмечено у 44 (95 %) больных хроническим активным гепатитом, причем значительное повышение активности (более 300 мкмоль/л/ч) было у 29 (63 %) больных, в то время как активность СУ и СГ менее 1 ед., т. е. умеренная активность, выявлялась у 31 (67,8 %) больного, а активность более 1 ед. определялась лишь у 12 (26 %) больных.

Активность СДГ всегда превышала активность ТДГ, но у 2 больных персистирующим гепатитом и у 4 больных активным гепатитом активность ТДГ оказалась в  $1\frac{1}{2}$ —2 раза выше активности СДГ. Мы не можем объяснить указанное выше явление, несомненно, заслуживающее дальнейшего исследования.

При изучении СДГ и ТДГ у больных циррозом печени и при опухолевом ее поражении выявлен полный параллелизм между уровнем гиперферментемии и тяжестью клинической картины. Средние показатели активности ферментов были выше у больных постнекротическим циррозом. Так, в этой группе больных средние показатели СДГ составили  $386,10 \pm 52,8$  мкмоль/л/ч, ТДГ —  $320,76 \pm 16,50$  мкмоль/л/ч, а у больных портальным циррозом печени показатели СДГ составили  $322,08 \pm 47,52$  мкмоль/л/ч, ТДГ —  $249,82 \pm 40,26$  мкмоль/л/ч. Подобная же тенденция отмечалась и при сравнении активности уростаниназы, гистидазы и фруктозофосфатаццидозы, но уровень гиперферментемии был, как правило, умеренным (см. табл. 2). У 4 из 36 больных циррозом печени активность всех изученных ферментов оказалась нулевой, хотя у этих больных была яркая клиническая картина прогрессирующей печеночной недостаточности. На аутопсии были обнаружены участки некроза на фоне глубокой перестройки дольковой структуры печени. Выявленная диссоциация между тяжелой клинической картиной печеночной недостаточности и отсутствием гиперферментемии, вероятнее всего, является результатом резчайшего снижения синтеза ферментов вследствие разрушения печеночной паренхимы. Следовательно, падение активности СДГ, ТДГ и других органоспецифических ферментов на фоне выраженной печеночной недостаточности является весьма грозным прогностическим симптомом.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что определение серин- и треониндегидратазной активности сыворотки крови позволяет выявить как самые ранние стадии цитолитического синдрома, так и переход его в необратимую стадию — стадию гибели гепатоцитов. Большая лабиль-

ность активности СДГ и ТДГ и короткий период их полураспада дают возможность наиболее оперативно контролировать изменения ферментной функции печени при его поражениях. Следует также подчеркнуть высокую чувствительность указанных ферментных тестов, что позволяет рекомендовать их для широкого применения в клинической практике.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. West M., Zimmerman H. — Med. Clin. N. Amer., 1959, v. 43, 371—390.
2. Pagani R., Lusini P., Ciccoli L. et al. — Boll. Soc. ital. Biol. sper., 1970, 1971, v. 46, p. 824—826.
3. Kitagawa T., Pitot H. C. — Am. J. Path., 1975, v. 78, p. 309—314.
4. Крицман М. Г., Коникова А. С. Индукция ферментов в норме и патологии. М., 1968.
5. Sayre F. W., Greenberg D. M. — J. biol. Chem., 1956, v. 219, p. 787—799.
6. Pestana A. — FEBS Letters, 1971, v. 3, p. 59—61.
7. Grillo M. A. — Acta vitaminol. enzymol., 1973, v. 27, p. 51—56.
8. Nath M., Sanwall G. G. — Arch. Biochem., 1972, v. 151, p. 420—426.
9. Протасова Т. Н., Юдаев И. А. — Биохимия, 1976, т. 41, № 1, с. 124—132.
10. Покровский Б. В. — Вопр. мед. химии, 1979, № 2, с. 128—132.
11. Акопов М. А., Каган Э. С., Березов Т. Т. и др. — Биохимия, 1978, т. 43, № 11, с. 2027—2032.
12. Акопов М. А., Каган Э. С., Березов Т. Т. и др. — Там же, 1979, т. 44, № 2, с. 282—292.
13. Kapke G., Davis L. — Biochemistry (Wash.), 1975, v. 14, v. 44, N 2, p. 4273—4276.
14. Friedemann T. E., Haugen G. E. — J. biol. Chem., 1943, v. 147, p. 415—442.
15. Pagani R., Lusini P., Marinello E. et al. — Boll. Soc. ital. Biol. sper., 1972, 1973, v. 48, p. 747—749.
16. Alföldi L., Rasko J., Karekes J. — J. Bact., 1968, v. 96, p. 1512—1518.
17. Brunner A., Devellers-Mire A., de Rabichon-Szulmayster H. — Europ. J. Biochem. 1969, v. 10, p. 172—183.
18. Меньшиков В. В., Делекторская Л. И. — Лабор. дело, 1977, № 11, с. 694—702.
19. Буробин В. А. — Вкн.: Методы исследования активности некоторых ферментов в клинике. М., 1967. с. 28—33.

Поступила 28/III 1980 г.

#### ESTIMATION OF SERINE- AND THREONINE DEHYDRATASE ACTIVITY OF BLOOD SERUM

A. V. Muzhichenko, V. V. Nedogodova

Chair of Biochemistry and Propedeutic Therapy, Medical School, Volgograd

A procedure for estimation of serine dehydratase (SDH) and threonine dehydratase (TDH) activities in blood serum was based on the colorimetric measurement of the products, increasing after deamination of l-serine (pyruvic acid) and l-threonine ( $\alpha$ -keto-butyric acid) using the reaction with 2,4-dinitrophenyl hydrazine in an alkaline medium. Conditions for the enzymatic reaction were developed. Activity of enzymes was expressed as  $\mu$ m of the reaction products per 1 L of blood serum within 1 hr of incubation at 37°. Blood serum from normal donors did not exhibit the SDH and TDH activities. The enzymatic activity was estimated in 126 patients with various impairments of liver tissue. The procedure developed was shown to be highly sensitive and informative. It enabled to detect both the earliest periods of the cytolytic syndrome and transition of the syndrome into its irreversible step.

УДК 612.826.33.018:612.433.62.018

В. А. Исаченков, Е. П. Бадосов, О. Г. Кривошеев, Л. В. Нагорная,  
Е. К. Карпенко, Г. П. Никифорова

#### ПРОСТЫЕ ВЫСОКОСПЕЦИФИЧНЫЕ МЕТОДЫ РАДИОИМУНОХИМИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВЫХ ГОРМОНОВ ГИПОФИЗА

Методы радиоиммунохимического анализа (РИА) физиологически активных веществ заняли к настоящему времени важное место в аналитической клинической биохимии. Однако сложность и многоэтапность существующих методик РИА, а также их малая универсальность сдерживают широкое

внедрение этих прогрессивных методов в практику. В настоящее время развитие этого вида анализа идет главным образом по пути создания упрощенных, унифицированных и легко воспроизводимых методик.

Одним из принципиальных методических приемов ускорения, упрощения и унификации методов РИА является использование в системе иммобилизованных антигенов. Это так называемые твердофазные варианты РИА. Ранее нами был предложен эффективный способ приготовления водонерастворимого сорбента для высокоспецифичного, простого и быстрого метода РИА лютеинизирующего гормона (ЛГ) [1, 2]. Такого рода сорбенты могут быть положены в основу РИА разнообразных антигенов, что, в частности, уже было продемонстрировано количественным определением гонадотропного вещества гормона [3]. Во всех перечисленных выше примерах приготовления сорбентов основывается на сополимеризации общих белков антисыворотки с помощью изобутилового эфира хлоругольной кислоты. Полученные таким способом сорбенты обладают достаточной для методов РИА емкостью, высокой специфичностью и стабильностью (хранятся без заметного ухудшения свойств 3—5 лет).

В настоящем сообщении эти методические принципы распространены на другие гипофизарные гормоны. Кроме того, дальнейшим развитием работ по унификации методов явилось применение в твердофазном варианте РИА сорбентов, полученных полимеризацией антисывороток к  $\gamma$ -глобулину кроликов ( $\gamma$ -Г-сорбент) [1—3]. Последняя модификация позволяет использовать в РИА универсальный сорбент, пригодный для определения разнообразных антигенов, и избавляет от получения иммуносорбентов к каждому новому антигену.

#### М е т о д и к а

В качестве антигенов использовали следующие гормоны, выделенные из свежемороженых гипофизов крупного рогатого скота и овец по опубликованным методам: лактогенный гормон (пролактин, ЛТГ) [4], соматотропин (СТГ) [5] и  $\beta$ -липотропин [6]. На последней стадии очистки  $\beta$ -липотропина вместо описанной авторами рехроматографии на ионообменной целлюлозе применяли изоэлектрофокусирование. Изоэлектрофокусирование проводили на колонке LKB-8102 («ЛКБ-приборы», Швеция) в градиенте сахарозы в интервале рН 6—8 при концентрации амфолинов, равной 1%. Фракцию с рН 7,3—7,5 собирали и лиофилизировали. Низкомолекулярные вещества отделяли при последовательной хроматографии на сефадексах G-25 и G-50 в 0,1 М уксусной кислоте. Адренокортикотропный гормон быка (АКТГ) выделяли по методу Ли и соавт. [7], фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) овцы — по методу Шервуда и соавт. [8].  $\beta$ -Эндорфин, Leu-энкефалин и Met-энкефалин — фирмы «Серва» (ФРГ), окситоцин — фирмы «Калбисхем» (Швейцария).

*Получение антисывороток к пролактину, соматотропину и  $\beta$ -липотропину.* Сыворотки к указанным гормонам получали иммунизацией кроликов породы шиншилла массой 2—2,5 кг. Курс иммунизации осуществляли по схеме: антиген (в количестве 100 мкг) вводили 30 внутрикожными инъекциями (однократно); реиммунизацию проводили через 30 дней внутримышечно введением гормонов в тех же количествах. Спустя 7—14 дней после реиммунизации из краевой вены уха забирали кровь. Препараты вводили в суспензии, состоящей из равных объемов полного адьюванта Фрейнда и физиологического раствора.

*Получение антисывороток к  $\gamma$ -глобулину кролика.* В качестве антигена использовали  $\gamma$ -глобулин кроликов, выделенный по опубликованному методу [9]. Анти- $\gamma$ -глобулиновую сыворотку получали иммунизацией барана по схеме, аналогичной схеме иммунизации кроликов, расходуя при каждой инъекции по 20 мг этого антигена.

*Приготовление иммуносорбентов.* Иммуносорбенты к гормонам получали по следующей методике: 1 г лиофилизированной антисыворотки растворяли в 15 мл 0,2 М натрий-ацетатного буфера рН 6,5 при 18—20 °С. К раствору при непрерывном перемешивании постепенно прибавляли 3 мл изобутилового эфира хлоругольной кислоты, после чего добавлением кристаллического  $\text{NaHCO}_3$  поддерживали значение рН 5,5. Образовавшийся плотный полимер после выдерживания в течение 1 ч при 5 °С диспергировали гомогенизацией, а затем отмывали раствором  $\text{NaCl}$  до исчезновения запаха эфира хлоругольной кислоты. Последующую обработку проводили согласно методике, описанной ранее [1].

*Йодирование изотопом  $^{125}\text{I}$  пролактина, соматотропина и  $\beta$ -липотропина.* Включение изотопа йода в гормоны проводили ферментным методом [10] в следующей модификации. Пазеску гормона от 50 до 100 мкг растворяли в 10 мкл 0,1 н.  $\text{NaOH}$  и добавляли 0,5 М фосфатный буфер рН 7,5 до концентрации гормона 1 мкг/мкл ( $\beta$ -липотропин растворяли в одном фосфатном буфере). Во флакон, содержащий 0,5 мКи  $\text{Na}^{125}\text{I}$  (удельная радиоактивность 13—17 мКи/мкг $^{125}\text{I}$ ), добавляли 20 мкл 0,14 М  $\text{NaCl}$  и 4—5 мкг гормона в 0,5 М фосфатном буфере. После тщательного перемешива-

ния реагентов во флакон вносили 10 мкл раствора лактопероксидазы («Колбиохем», активность 100 МЕ/флакон, концентрация (50 мкг/мл), растворенной в бидистиллированной воде. Затем во флакон вливали 5 мкл раствора глюкозооксидазы («Серва», концентрация 30 мкг/мл) и 25 мкл 0,1% раствора глюкозы. Содержимое флакона перемешивали 90 с и реакцию останавливали добавлением 200 мкл охлажденного 0,05 М фосфатного буфера pH 7,5, содержащего 0,14 М NaCl, 0,25 % бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 16% сахарозы. Последующую хроматографию проводили в условиях, описанных ранее [1]. Радиоактивные  $^{125}\text{I}$ -ЛТГ,  $^{125}\text{I}$ -СТГ и  $^{125}\text{I}$ - $\beta$ -липотропин использовали для проведения РИА в индикаторной дозе (ИД) 25 000—30 000 имп/мин на пробу. Удельная радиоактивность гормонов была равна 60—70 мКи/мкг.

*Условия связывания  $^{125}\text{I}$ -СТГ и  $^{125}\text{I}$ - $\beta$ -липотропина с  $\gamma$ -Г-иммуносорбентом.* В кроличьих антисыворотках предварительно определяли титры антител, используя ИД  $^{125}\text{I}$ -СТГ и  $^{125}\text{I}$ - $\beta$ -липотропина. Затем определяли количество  $\gamma$ -Г-иммуносорбента, необходимое для полного осаждения «первых» антител, связывающих 50% иммунокомпетентной части ИД меченых гормонов. Для разных партий сорбентов такая доза колебалась от 10 до 20 мкг сорбента на пробу. Инкубационная смесь при изучении конкурентного связывания гормонов состояла из 0,1 мл ИД  $^{125}\text{I}$ -СТГ или  $^{125}\text{I}$ - $\beta$ -липотропина; 0,1 мл стандарта гормона или исследуемого образца; 0,1 мл 0,05 М натрий-фосфатного буфера pH 7,5, содержащего 0,14 М NaCl и 0,25 % БСА; 0,1 мл кроличьей антисыворотки в соответствующем разведении. Суспензию сорбента в количестве 0,1 мл добавляли непосредственно после внесения всех перечисленных выше ингредиентов или после предварительной инкубации в течение 10—24 ч. Все последующие процедуры по инкубации образцов, удалению не связавшегося с сорбентом гормона и просчитыванию образцов на счетчике были аналогичны опубликованным ранее [1].

*Условия связывания  $^{125}\text{I}$ -ЛТГ с иммуносорбентом.* Инкубационная смесь при изучении конкурентного связывания пролактина состояла из 0,1 мл ИД  $^{125}\text{I}$ -ЛТГ; 0,1 мл стандарта гормона или исследуемого образца; 0,2 мл буфера, описанного в предыдущем разделе, и 0,1 мл суспензии сорбента, приготовленного из кроличьей антисыворотки к пролактину. Процедуры по инкубации образцов, удалению не связавшегося с сорбентом гормона и просчитыванию образцов на счетчике были аналогичны опубликованным ранее [1].

## Результаты и их обсуждение

*Калибровочные кривые РИА ЛТГ.* В предыдущем сообщении [1] было показано, что чувствительность радиоиммунохимического метода в данном варианте находится в обратной зависимости от количества вносимого в пробу иммуносорбента. По этой причине для построения калибровочных кривых, отражающих конкуренцию за полимеризованные антитела между различными дозами меченого и меченого ЛТГ, использовали дозу сорбента, способную связать 50 % иммунореактивной ИД. Эта конкуренция для ЛТГ наблюдается в интервале доз от 0,5 до 50 нг/мл (рис. 1), а кривая зависимости связывания меченого гормона имеет линейный характер в диапазоне доз от 2 до 20 нг/мл. В случае определения ЛТГ кинетика процесса, описывающая состояние равновесия в системе сорбент — гормон —  $^{125}\text{I}$ -гормон как функцию времени и температуры, имела те же характерные закономерности, что и при РИА ЛГ [1]. Это позволило считать время, равное 3 ч, сроком, достаточным для проведения РИА ЛТГ при 20 °С.

*Калибровочные кривые РИА СТГ и  $\beta$ -липотропина.* В основу предлагаемого варианта радиоиммунохимического определения данных гормонов положены принципы, используемые в методе двойных антител. В соответствии с этим чувствительность данного РИА определяется количеством вносимых «первых» антител (кроличья антисыворотка) и наблюдается максимальной в зоне их дефицита. Количество иммуносорбента из «вторых» антител выбирается достаточным для полного осаждения «первых» антител. Для обоих гормонов кривые конкурентного связывания меченых гормонов в присутствии немеченых с иммуносорбентом (калибровочные кривые) были линейными в диапазоне доз от 1 до 10 нг/мл (рис. 2).

*Кинетические характеристики РИА  $\beta$ -липотропина и СТГ.* Классический вариант РИА по методу двойных антител предполагает двустадийное проведение процесса определения антигена. На первой стадии РИА происходит образование водорастворимого комплекса между «первыми» антителами и антигеном. На второй стадии образуется водонерастворимый преципитат между комплексом «первых» антител с антигеном и «вторыми» антителами (анти- $\gamma$ -глобулинами). Вследствие медленного протекания реакции на каждой из стадий суммарное время всего анализа занимает не менее 48—72 ч.

При изучении кинетики связывания меченых гормонов в условиях РИА нами было установлено, что применение полимеризованной антисыворотки из «вторых» антител позволяет сократить продолжительность инкубации по связыванию комплекса «первых» антител с антигеном до 1—2 ч. Дальнейшее увеличение времени инкубирования до 12, 24 и 48 ч не приводило к более полному связыванию комплекса «первых» антител с антигеном  $\gamma$ -Г-сорбентом. Более того, как оказалось (см. рис. 2), эта стадия может быть проведена одновременно с этапом по связыванию антигена «первыми» антителами. Изучение кинетики всего процесса РИА по этому способу позволило выяснить, что в первые 10 ч равновесие устанавливается до 80—90 % от максимально возможного уровня. По этой причине оптимальным временем для инкубации являются 10—16 ч. Следовательно, в нашем варианте РИА по методу двойных антител весь процесс удастся осуществить одноэтапно за 10—16 ч.

**Специфичность методов.** Для доказательства специфичности определе-

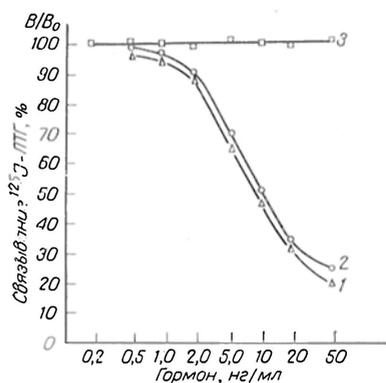


Рис. 1. Конкурентное ингибирование связывания  $^{125}\text{I}$ -ЛТГ быка с антителами к ЛТГ быка в присутствии различных доз ЛТГ быка (1), ЛТГ овцы (2). Отсутствие конкуренции за антитела между  $^{125}\text{I}$ -ЛТГ и ЛГ, и ФГС овцы, СТГ,  $\beta$ -липотропина и АКТГ быка, окситоцина (3).

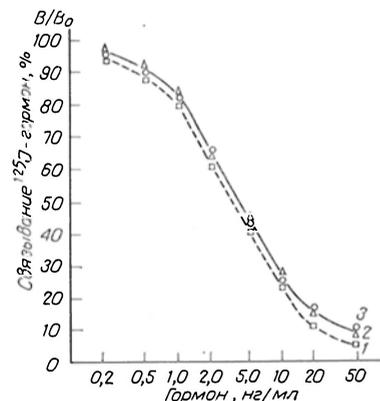


Рис. 2. Конкурентное ингибирование связывания  $^{125}\text{I}$ -СТГ быка с антителами к СТГ быка в присутствии различных доз СТГ быка (1). 2, 3 — кривые конкурентного связывания  $^{125}\text{I}$ - $\beta$ -липотропина быка с антителами к  $\beta$ -липотропину быка в присутствии различных доз  $\beta$ -липотропина быка. Кривая 2 получена при раздельной инкубации  $\beta$ -липотропина, антител и  $\gamma$ -Г-сорбента, кривая 3 — при одновременной инкубации всех ингредиентов в течение 16 ч. Подробно условия инкубации описаны в разделе «Материалы и методы».

ния ЛТГ, а также СТГ и  $\beta$ -липотропина в предлагаемых методах исследовали способность нижеследующих белково-пептидных гормонов конкурировать в условиях радиоиммунохимического определения за антитела с мечеными ЛТГ, СТГ и  $\beta$ -липотропином: ЛГ овцы, СТГ быка,  $\beta$ -липотропина быка, АКТГ быка, ФГС овцы, пролактина овцы,  $\beta$ -эндорфина, Леу-энкефалина, Met-энкефалина, окситоцина (максимальные дозы — 100 нг, минимальные — 0,02 нг/мл). Как видно из рис. 3, ни один из перечисленных выше гормонов или пептидов не конкурировал за антитела к ЛТГ, СТГ или  $\beta$ -липотропину. В случае определения ЛТГ быка такое исключение составил пролактин овцы вследствие его иммунохимического родства лактогеину гормону быка.

Показателем специфичности и адекватности для практического использования настоящих вариантов РИА служат также результаты, представленные в таблице.

Из данных таблицы видно, что экзогенные гормоны определяются в стандартной сыворотке крови с вполне удовлетворительной точностью на линейных участках соответствующих калибровочных кривых.

Таким образом, описанные в настоящем сообщении методы РИА ЛТГ, а также СТГ и  $\beta$ -липотропина быка являются чувствительными и высоко-специфичными, а определяемые этими методами количества СТГ,  $\beta$ -липотропина и ЛТГ в сыворотке крови крупного рогатого скота, указанные в таблице, лежат в пределах, определяемых классическими вариантами РИА [11, 12].

В предыдущих публикациях [1, 2] были перечислены достоинства твердофазного варианта РИА с использованием полимеризованных анти-сывороток: быстрое проведение анализа, простая техника его выполнения. Эти преимущества сохраняются при проведении РИА и по методу двойных антител с применением иммуносорбента. По сравнению с классическим вариантом РИА по методу двойных антител [13] в описываемой па-

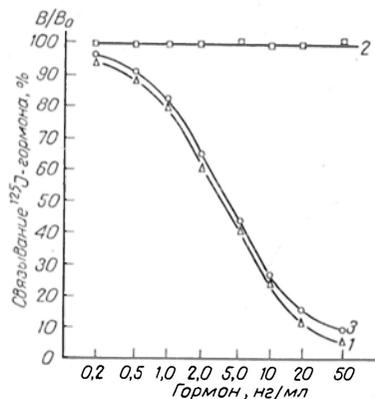


Рис. 3. Конкурентное ингибирование связывания  $^{125}\text{I}$ -СТГ быка с антителами к СТГ быка в присутствии различных доз СТГ быка (1). Отсутствие конкуренции антитела за между  $^{125}\text{I}$ -СТГ и ЛГ, и ФСГ овцы,  $\beta$ -липотропина, АКТГ и ЛТГ быка, окситоцина (2). Конкурентное ингибирование связывания  $^{125}\text{I}$ - $\beta$ -липотропина быка с антителами к  $\beta$ -липотропину быка в присутствии различных доз  $\beta$ -липотропина быка (3). Отсутствие конкуренции за антитела между  $^{125}\text{I}$ - $\beta$ -липотропином и ЛГ, и ФСГ овцы, СТГ, ЛТГ и АКТГ быка, окситоцина,  $\beta$ -эндорфина, Leu-энкефалина и Met-энкефалина (2).

Влияние сыворотки крови быка на определение ЛТГ, СТГ и  $\beta$ -липотропина радиоиммунохимическим методом\*

Внесено гормона, нг/мл	Пролактин		Соматотропин		$\beta$ -Липотропин	
	определено, нг/мл	открыто, %	определено, нг/мл	открыто, %	определено, нг/мл	открыто, %
0	11,0	—	9,7	—	13,5	—
0,5	11,4	99,1	10,2	100,0	13,9	99,3
1,0	12,0	100,0	10,8	100,9	14,47	99,8
2,0	13,2	101,5	12,0	102,5	15,4	99,3
5,0	16,4	102,5	14,6	99,3	18,7	100,9
10,0	21,5	102,3	20,0	101,5	24,0	100,3
20,0	32,6	105,1	32,6	110,0	36,8	109,9
50,0	76,2	124,9	70,4	117,9	76,0	119,6

\* Использовали пул (20 особей) сывороток крупного рогатого скота. В 1 мл этой сыворотки определено содержание: ЛТГ — 11,0 нг/мл; СТГ — 9,7 нг/мл;  $\beta$ -липотропина — 13,5 нг/мл. В пробы вносили 0,2 мл сыворотки, содержащей указанное количество добавленного гормона.

ми модификации значительно сокращено время проведения анализа, что связано с заменой двухэтапного способа проведения РИА одноэтапным.

В то же время предлагаемый твердофазный вариант РИА сохраняет достоинства, присущие методу радиоиммунохимического определения в его жидкофазной модификации, — высокую чувствительность и специфичность. По этой причине становится возможным применение в качестве «первых» антител сывороток с низким титром, которые после полимеризации обычно полностью или частично инактивируются и, следовательно, не могут быть использованы в качестве сорбента в методе, описанном ранее [1, 2]. Это в особенности важно в тех случаях, когда высокие титры антител не удается получить из-за слабой иммуногенности антигена.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Никифорова Г. П., Антонов А. С., Кривошеев О. Г. и др. — Пробл. эндокринолог., 1977, № 1, с. 74.
2. Антонов А. С., Никифорова Г. П., Кривошеев О. Г. и др. — Там же, № 3, с. 80.
3. Бакалкин Г. Я., Ярыгин К. П., Исаченков В. А. — Там же, 1976, № 6, с. 72.
4. Cole R. D., Li C. H. — J. biol. Chem., 1955, v. 213, p. 197.
5. Free C., Sonengerg M. — Ibid., 1960, v. 241, p. 5076.

6. Панков Ю. А., Юдаев Н. А. — Биохимия, 1972, т. 37, с. 991.
7. Birk J., Li C. H. — Biochim. biophys. Acta, 1964, v. 82, p. 430.
8. Sherwood O. D., Grimek H. J., McShan W. H. — J. biol. Chem., 1970, v. 245, p. 2328—2336.
9. Wilkonson J. M., Press E. M., Porter R. R. — Biochem. J., 1966, v. 100, p. 303—308.
10. Marshall J. C., Odell W. D. — Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1975, v. 149, p. 351.
11. Rejnoert R. et al. — Ann. Endocr. (Paris), 1974, v. 35, p. 139—148.
12. Bourne R. A., Tucker H. A. — Endocrinology, 1975, v. 97, p. 473.
13. Morgan C. R., Lasarow A. — Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1962, v. 110, p. 29—32.

Поступила 22/IV 1980 г.

## SIMPLE, HIGHLY SPECIFIC PROCEDURES FOR RADIOIMMUNOCHEMICAL ESTIMATION OF HYPOPHYSEAL PROTEIN HORMONES

V. A. Isachenkov, E. P. Badosov, O. G. Krivosheev, L. V. Nagornaya, E. K. Karpenko, G. P. Nikiforov

Immunosorbents, prepared by means of polymerization of antiserum proteins using chlorcarbonic acid isobutyl ester, were used to increased reproducibility and simplicity of the radioimmunochemical procedures for estimation of the hypophyseal hormones. In the types of the radioimmunassay (RIA) studied the immunosorbents were prepared by means of polymerization of the first and second antibodies. The universal immunosorbent, suitable to estimation of various antigens, was prepared from the second antibodies. The procedure enabled to use as the first antibodies the blood sera with comparatively low antibody titre. High specificity of the RIA procedures described was demonstrated in estimation of bovine hypophyseal hormones — lactogenous (LTH), somatotropic (STH) and  $\beta$ -lipotropine. The calibration curves were linear in the concentration range from 2 to 20 ng/ml for LTH, and from 1 to 10 ng/ml for STH and  $\beta$ -lipotropine. Estimation of LTH by means of the RIA procedure required 3 hrs, and of STH and  $\beta$ -lipotropine — 16 hrs.

УДК 616.611+616.612/07:616.633.96-074

И. А. Пушкарев, У. А. Бруверис, Л. Н. Гусева, И. Р. Лазовский

## БИОХИМИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ГЛОМЕРУЛЯРНЫХ И ТУБУЛОИНТЕРСТИЦИАЛЬНЫХ ПОРАЖЕНИЙ ПОЧЕК

Рижский медицинский институт

Известно, что через клубочковый фильтр в сутки проходит 2—4 г белков, в основном с небольшой молекулярной массой (мол. м.). Преобладающая часть этих белков реабсорбируется и катаболизируется тубулярными клетками. Нарушения функций тубулярных клеток приводят к попаданию в окончательную мочу низкомолекулярных белков (тубулярная протеинурия). Поражение клубочков характеризуется фильтрацией белков с более высокой мол. м., не подвергающихся реабсорбции (гломерулярная протеинурия).

Таким образом, характеристика величины молекул выделяемых с мочой белков может способствовать диагностике почечной патологии.

Метод гель-хроматографии, применяемый для этой цели [1, 2], относительно трудоемкий, к тому же он не обладает достаточной разрешающей способностью.

Количественное иммунохимическое исследование индивидуальных белков [3, 4], как правило, не охватывает весь белковый спектр мочи; определение каждого белка требует моноспецифической антисыворотки и соответствующего стандарта.

Электрофорез (ЭФ) белков мочи на бумаге [5, 6] или ацетат-целлюлозной пленке, широко применяемый до сих пор, не может удовлетворить требования диагностики из-за ограниченной информативности (фракционирование белков осуществляется на основании разницы разряда, а не размера молекул).

Определенный успех в исследовании уропротеинов был достигнут при использовании ЭФ в крахмальном [7, 8] и полиакриламидном гелях (ПААГ), обладающих свойствами молекулярного сита. Высокая чувствительность и разделяющая способность — признаки, определяющие преимущества диск ЭФ в ПААГ для фракционирования белков мочи [9—16].

В последние годы при характеристике белков по их мол. м. широкое применение нашел ЭФ в ПААГ в присутствии анионного детергента — додецилсульфата натрия (ДСН) [17, 18]. Были предприняты попытки использовать этот метод для исследования уропротеинов, в частности для выяснения характера почечного поражения [11, 12, 19—23].

Все упомянутые исследователи применяли непрерывный ЭФ в ПААГ с ДСН. Нами был выбран вариант ЭФ в ПААГ с ДСН в прерывистой системе, т. е. диск-ЭФ [24—26], отличающийся более высокой силой концентрирования, а следовательно, и разрешающей способностью, особенно подходящей для разделения многокомпонентной системы белков мочи.

В целях оценки информативности метода диск-ЭФ в ПААГ с ДСН в дифференциальной диагностике почечных заболеваний нами был исследован с помощью этого метода белковый состав мочи здоровых лиц и больных бактериальным и абактериальным хроническим интерстициальным нефритом (ХИН), с различными клиническими формами (латентной, гипертонической, нефротической, смешанной) хронического гломерулонефрита (ХГН), а также больных парапротеинемическими гемобластозами, в основном миеломной болезнью, с парапротеинами разного вида, но при наличии в моче белка Бенс-Джонса, т. е. моноклоновых легких цепей (МЛЦ).

#### М е т о д и к а

Белки мочи были исследованы у 9 здоровых лиц, 84 больных с заболеваниями почек и 48 больных парапротеинемическими гемобластозами и с наличием МЛЦ в моче. Среди больных с заболеваниями почек у 28 был ХИН, у 14 — латентная форма ХГН, у 16 — гипертоническая форма ХГН, у 16 — нефротическая форма ХГН, у 10 — смешанная форма ХГН. У 9 больных ХИН и 12 больных с гипертонической и смешанной формами ХГН были явления хронической почечной недостаточности.

Среди гематологических больных у 43 была миеломная болезнь, у 2 — злокачественная лимфома, у 3 — хронический лимфолейкоз.

Все больные находились на обследовании или лечении в Нефрологическом и Гематологическом центрах Латвийской ССР. Клинические диагнозы поставлены на основании общеклинических и лабораторных исследований.

Содержание общего белка в моче определяли с сульфосалициловой кислотой по методу Кингсбери и соавт. в модификации Михесовой и Богодаровой [27].

В основу применяемого нами способа диск-ЭФ в ПААГ в присутствии ДСН были положены методики Дэвиса [24], Орнштейна [25], Лемли [26]. Диаметр гелей 5 мм, длина столбика 9% разделяющего геля 70 мм, 2,8% крупнопористого геля, полученного путем химической полимеризации, 8 мм. ПААГ содержал 0,1% ДСН (фирма «Serva», ФРГ). 0,1 мл мочи с содержанием белка 0,8—1,2 г/л в течение 2 ч инкубировали с равным объемом 1% ДСН при комнатной температуре, после чего на 90 с погружали в кипящую водяную баню. На гель наносили образец в объеме 0,1 мл, состоящий из инкубированной смеси, разведенной 40% раствором сахарозы (2:1). Таким образом, образец содержал 30—40 мкг белка. До необходимой концентрации белка мочу разводили электродным буфером или же концентрировали, диализуя против 30% раствора полиэтиленгликоля (мол. масса 40 000). Электродный трис-глициновый буфер готовили по методу Дэвиса [24] и использовали в разведении 1 : 1; содержание ДСН 0,05%. Длительность ЭФ контролировали по прохождению краски-свидетеля (бромфеноловый синий). При режиме 3 мА на гель время ЭФ было равно 2½ ч. После ЭФ гели погружали в смесь метанол — ледяная уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5) и оставляли на ночь для фиксации и удаления ДСН. Окрашивание проводили в течение 3 ч в 0,02% растворе красителя кумасси голубого, обесцвечивание фона — трехкратной сменой 7% уксусной кислоты. Количественную оценку фракций, полученных при ЭФ, осуществляли при помощи денситометра «Chromoscan» (фирма «Jouss Loebler», Англия).

Иммуноэлектрофорез проводили в 1,5% геле агарозы на медиал-ацетатном буфере рН 8,2 [28]. При иммунохимической идентификации моноклоновых иммунокомпонентов сыворотки крови и мочи у больных парапротеинемическими гемобластозами применяли поливалентную и моноспецифические антисыворотки к иммуноглобулинам человека (IgG, IgA), а также к легким цепям  $\chi$ - и  $\lambda$ -типа (производства Горьковского НИИ эпидемиологии и микробиологии).

## Результаты и обсуждение

### Исследование состава уропротеинов здоровых лиц

Данные литературы, касающиеся количественного и качественного состава белков нормальной мочи, немногочисленны и противоречивы. Последнее в определенной мере обусловлено применением разных методов исследования. Порой патологические отклонения в составе уропротеинов толкуются, исходя из устаревших, но укоренившихся представлений о норме, которые не подтверждаются при исследовании мочи здорового человека с помощью более современных методов фракционирования белков.

Нами был исследован состав уропротеинов здоровых лиц — 9 мужчин в возрасте от 21 года до 23 лет. Во всех случаях с сульфосалициловой кислотой белок в моче не был обнаружен, т. е. содержание белка составляло менее 0,02 г/л. После 50-кратного концентрирования мочи, применяя ЭФ в ПААГ в присутствии ДСН, уропротеины разделяли по мол. м. Было установлено количественное распределение белков в протеинограмме по зонам (фракциям) (табл. 1).

Таким образом, как видно из табл. 1, альбумин хотя и является количественно самым значимым индивидуальным белковым компонентом, составляет лишь около  $\frac{1}{5}$  белков нормальной мочи. Наши результаты ЭФ в ПААГ в присутствии ДСН в отношении содержания альбумина согласуются с данными Мулли и соавт. [14], а также с нормой, полученной при классическом варианте диск-ЭФ в ПААГ [15].

### Исследование состава уропротеинов у больных с заболеваниями почек

Количественное распределение белков в протеинограмме по зонам (фракциям) представлено в табл. 2. У всех больных с заболеваниями почек преобладающей является фракция альбумина (мол. м. 68 000). Наряду с альбумином имелось несколько фракций в зоне преальбуминов (мол. м. 10 000—55 000) и в зоне постальбуминов (мол. м. >68 000). Более подробный анализ показал, что уропротеинограммы у больных ХГН явно отличаются от таковых у больных ХИН.

У больных с различными клиническими формами ХГН в протеинограмме характерно преобладание постальбуминов над преальбуминами; в постальбуминовой зоне выделяется относительно большая фракция трансферрина (мол. м. 76 000). Наличие в уропротеинограмме в основном альбумина и трансферрина, наблюдаемое у больных ХГН, указывает на селективную гломерулярную протеинурию (рис. 1, а). У большинства больных ХГН в постальбуминовой зоне уропротеинограмм обнаруживалась также фракция с мол. м. около 160 000, содержащая иммуноглобулины (IgG, IgA), что указывало на неселективную гломерулярную протеинурию (рис. 1, б). Из преальбуминов у больных гломерулярной протеинурией преобладали белки с мол. м. около 55 000, возможно, тяжелые цепи или другие фрагменты иммуноглобулинов.

У больных ХИН с мочой выделялось относительно большое количество преальбуминов (но оно было меньше, чем у больных гломерулярной

Таблица 1

Состав уропротеинов (в %) у здоровых лиц, полученный при ЭФ в ПААГ в присутствии ДСН

Фракция уропротеинов	Мол. м., дальтон	Содержание	
		среднее	абсолютное (пределы)
Преальбумины	10 000—55 000	65,55	40,0—73,0
Альбумин	68 000	18,44	14,1—30,6
Постальбумины	>68 000	16,01	10,7—29,5
Трансферрин	76 000	3,8	2,7—4,8
Фракция, содержащая иммуноглобулины	Около 160 000	5,46	3,1—7,6

протеинурией), альбумина и трансферрина (рис. 1, в). Такой спектр белков мочи указывает на нарушения тубулярных фракций у этих больных. Особенно снижено было выделение трансферрина ( $P < 0,01$ ) по сравнению с таковым у больных ХГН.

Т а б л и ц а 2

Состав уропротеинов (в %) у больных с заболеваниями почек ( $x \pm ts$ ;  $P = 0,05$ )

Заболевание	Преальбу- мины	Альбумин	Постальбумины	
			общее количество	отдельно трансферрин
Интерстициальный нефрит:				
бактериальный	38,19±11,4	35,25±8,4	28,48±4,2	5,28±1,6
абактериальный	37,97±8,5	39,93±7,4	22,12±5,2	4,71±2,8
с хронической почечной не- достаточностью	42,46±16,0	36,68±13,6	20,87±6,8	5,84±2,4
Гломерулонефрит:				
латентная форма	18,25±3,5	56,50±4,9	29,80±2,9	9,85±1,5
нефротическая форма	15,90±3,5	48,90±7,3	32,77±5,9	13,83±2,2
гипертоническая форма	19,30±4,2	54,08±8,4	30,79±5,2	9,93±2,3
смешанная форма	12,30±2,6	53,70±10,2	34,00±4,2	12,60±7,1
с хронической почечной не- достаточностью	33,07±12,2	40,93±7,6	26,01±7,4	6,61±1,9

Наличие хронической почечной недостаточности у больных ХГН в части случаев обусловило выделение относительно большого количества также низкомолекулярных белков. При интерстициальных поражениях с явлениями хронической почечной недостаточности в уропротеинограммах отмечалось увеличение постальбуминовых фракций (рис. 1, г).

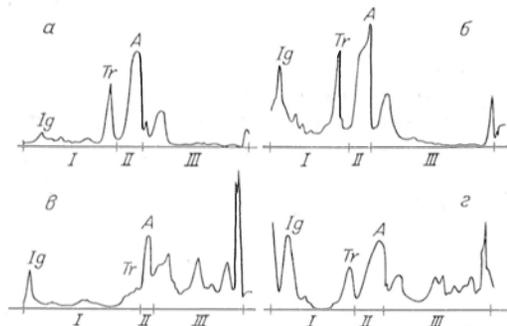


Рис. 1. Денситограммы уропротеинов больных с заболеваниями почек.

а — селективная гломерулярная протеинурия. Выделяется пик альбумина и трансферрина, фракция иммуноглобулинов выражена слабо; б — неселективная гломерулярная протеинурия. Кроме альбумина и трансферрина, выражена зона постальбуминов — белков с более высокой мол. м., особенно фракция иммуноглобулинов. В преальбуминовой зоне выделяется фракция с мол. м. 50 000; в — тубулярная протеинурия. Преобладают низкомолекулярные белки — преальбумины, фракция трансферрина выражена слабо; г — тубулярно-гломерулярная протеинурия (смешанная). Кроме альбумина, выражена зона преальбуминов, отмечаются также фракции трансферрина и иммуноглобулинов в постальбуминовой зоне. А — альбумин (мол. м. 68 000); Tr — трансферрин (мол. м. 76 000); Ig — иммуноглобулины (мол. м. 160 000). Здесь и на рис. 2: I — постальбумины; II — альбумин; III — преальбумины.

Таким образом, наши результаты показывают, что как при гломерулярной, так и при тубулярной протеинурии происходит выделение альбумина. Главным отличием являются состав и количество преальбуминовых и постальбуминовых фракций. Наши результаты, так же как и данные Раутенштрауха и Бэскена [20, 29], свидетельствуют о том, что характерной чертой гломерулярной протеинурии является присутствие значительного количества трансферрина в моче. Наличие в постальбуминовой зоне уропротеинограммы только трансферрина в основном указывает на селективность гломерулярной протеинурии [29].

Селективность гломерулярной протеинурии является прогностическим показателем предполагаемого успеха при назначении стероидных гормонов [7, 30]. Выраженная неселективность гломерулярной протеинурии служит прогностическим показателем безуспешности глюкокортикоидной терапии.

Как подтверждает наш опыт, в клинической практике для определения типа протеинурии часто достаточно визуальной оценки протеинограмм (денситограмм). При одновременной гломерулярной и тубулярной протеинурии

рии (смешанной) предлагается вычисление соотношений постальбуминовых и преальбуминовых фракций (количество белков с мол. м.  $>76\ 000$  к количеству белков с мол. м.  $<68\ 000$ ). При преимущественно тубулярных протеинуриях это соотношение ниже 1 [19].

*Исследование состава уропротеинов у больных парапротеинемиями при наличии МЛЦ в моче*

Уже ранее нами были исследованы уропротеины при миеломной болезни [31], а также при других лимфопролиферативных заболеваниях [15]. Было установлено, что протеинурия, начиная от 0,02 г/л и выше является обязательным признаком миеломной болезни, а в 67% случаев этого заболевания в моче присутствуют МЛЦ, т. е. отмечается преренальная протеинурия. У большинства остальных больных (без МЛЦ) при сравнении уропротеинограмм с таковыми здоровых лиц отмечались разного рода диспротеинурии, указывающие на почечные повреждения.

Что касается больных парапротеинемией с наличием МЛЦ в моче, то при их обследовании основное внимание, как правило, было сосредоточено на выявлении и количественном определении этого моноклонового компонента. До сих пор при парапротеинурии легких цепей мало исследованы белковые компоненты с большой мол. м., в частности целые иммуноглобулины, присутствие которых в моче может указывать на гломерулярное повреждение.

Ранее, применяя классический вариант диск-ЭФ в ПААГ вместе с иммунохимическими исследованиями, нам удалось показать, что независимо от выделения МЛЦ у определенного числа больных IgG- и IgA-миеломой в моче присутствуют значительные количества интактных иммуноглобулинов — IgG или IgA [31].

На этот раз мы исследовали состав уропротеинов у 48 больных парапротеинемией (из них 43 миеломной болезнью) с наличием МЛЦ в моче, применяя диск-ЭФ в ПААГ с ДСН, чтобы по распределению белков по мол. м. определить характер почечного поражения у этих больных.

Применение иммуноэлектрофореза позволило идентифицировать, т. е. определить, иммунологический тип МЛЦ. Относительно редко, однако, у больных IgG-парапротеинемией (5 случаев из 23) и IgA-парапротеинемией (4 случая из 10) этим методом удалось выявить в моче также целые моноклоновые иммуноглобулины.

ЭФ в ПААГ с ДСН в первую очередь позволил выявить МЛЦ и определить содержание их мономерной и димерной форм в моче (рис. 2, а, б). В этом отношении наши результаты, так же как и данные Вирелла и соавт. [32], показали, что МЛЦ  $\chi$ -типа присутствуют в основном в мономерной форме, тогда как  $\lambda$ -типа — в димерной.

Метод позволил также качественно и количественно определить альбумин, фракцию, содержащую IgG и мономерную форму IgA, и другие белки. Даже визуальная оценка уропротеинограмм дает возможность оценить соотношение низкомолекулярных и высокомолекулярных белков в моче и на основании этого отличить гломерулярную протеинурию от тубулярной и, следовательно, судить о виде почечного поражения (см. рис. 2, а, б).

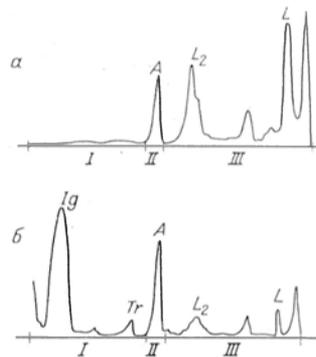


Рис. 2. Денситограммы уропротеинов больных парапротеинемиями с наличием МЛЦ в моче.

а — преобладание низкомолекулярных белков как преренального (МЛЦ), так и ренального происхождения, указывающее на тубулярное повреждение почек у большого миеломой Бенс-Джонса; б — выделение высокомолекулярного белка — моноклонового IgG — наряду с меньшим количеством низкомолекулярных белков, указывающее на гломерулярные и тубулярные повреждения почек у большого IgG-миеломой. А — альбумин; L — мономер МЛЦ (мол. м. 22 000); L<sub>2</sub> — димер МЛЦ (мол. м. 44 000); Tr — трансферрин; Ig — моноклоновый Ig G.

Фракция, по своей электрофоретической подвижности (мол. м.) соответствующая цельному иммуноглобулину, в данных случаях моноклоновому, при ЭФ в ПААГ с ДСН была выявлена и количественно определена у 69 % больных с IgG-парапротеинами и у 70 % больных с IgA-парапротеинами в сыворотке крови.

Таким образом, ЭФ в ПААГ с ДСН, имеющий более высокую разрешающую способность по сравнению с иммуноэлектрофорезом, выявляет значительно более высокий процент случаев наличия в моче IgG или мономера IgA, указывающий на частое повреждение почечных клубочков.

Результаты проведенного исследования у больных IgG- и IgA-парапротеинемиями при наличии МЛЦ в моче показывают, что для 9—10 % больных характерен тубулярный тип протеинурии (выделение исключительно низкомолекулярных белков), а для большинства таких больных — смешанный тип (выделение и низкомолекулярных белков, и цельных молекул иммуноглобулинов). У больных парапротеинурией или парапротеинемией с наличием МЛЦ (миелома Бенс-Джонса) избыточное выделение с мочой исключительно низкомолекулярных белков указывает на изолированные тубулярные повреждения; только у отдельных больных в сильно развитой фазе миеломы отмечалось выделение незначительных количеств высокомолекулярных белков.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Davis J. S., Flynn F. V., Platt H. S. — Clin. chim. Acta, 1968, v. 21, p. 357—376.
2. Галкина Л. П. — Тер. арх., 1972, т. 42, с. 83—87.
3. Peterson P. A., Evin P. E., Berggard I. — J. clin. Invest., 1969, v. 48, p. 1189—1198.
4. Hall P. W., Vasiljevic M. — J. Lab. clin. Med., 1973, v. 81, p. 897—904.
5. Butler E. A., Flynn F. V. — Lancet, 1958, v. 2, p. 978—980.
6. Цаленчук Я. П. Белковые фракции сыворотки крови и мочи при Брайтовой болезни и их динамика под влиянием климатического лечения. Автореф. дис. канд. М., 1963.
7. Цыкин Д. Б. Протеинограмма сыворотки крови и мочи и селективность протеинурии при некоторых заболеваниях почек. Автореф. дис. канд. Л., 1971.
8. Ратнер М. Я., Чиж А. С., Лобанова Е. Д. — Тер. арх., 1974, т. 46, № 7, с. 45—54.
9. Hemmingsen L., Skow F. — Clin. chim. Acta, 1968, v. 19, p. 81—87.
10. Saito H., Furuyama T., Shioji R. et al. — J. exp. Med., 1970, v. 101, p. 205—214.
11. Pesce A. J., Beresha I., Pollak V. E. — Clin. chim. Acta, 1972, v. 40, p. 27—34.
12. Waldmann T. A., Strober W., Mogielnicki R. P. — J. clin. Invest., 1972, v. 51, p. 2162—2172.
13. Саранкин С. В. — В кн.: Проблемы кардиологии и нефрологии. Казань, 1973, с. 169—170.
14. Mulli J. C., Balant L., Giromini M. et al. — Europ. J. clin. Invest., 1974, v. 4, p. 253—259.
15. Пушкарев И. А. — Haematologia, 1976, v. 10, p. 221—230.
16. Puschkarow I., Storch H., Gussewa L. — Z. ges. inn. Med., 1978, Jg. 33, S. 384—388.
17. Summers D. F., Maizel J. V., Darnel J. E. et al. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1965, v. 54, p. 503—513.
18. Weber K., Osborn M. — J. Biol. Chem., 1969, v. 244, p. 4406—4412.
19. Boesken W. H., Kopf K., Schollmeyer P. — Clin. Nephrology, 1973, v. 1, p. 311—318.
20. Boesken W. H. — Urologe, 1977, Bd 17, S. 473—479.
21. Virella G., Lopes-Virella M. F. L. — Clin. Chem., 1977, v. 23, p. 1793—1794.
22. Virella G., Smith R., Answorth S. K. — Clin. Res., 1977, v. 25, p. 43A.
23. Walb D. — Med. Welt. (Stuttg.), 1979, B. 30, S. 195—232.
24. Davis B. J. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964, v. 121, p. 404—427.
25. Ornstein L. — Ibid., 1964, v. 121, p. 321—349.
26. Laemmli V. — Nature, 1970, v. 227, p. 680—685.
27. Мухомов А. И., Богодарова И. А. — Лаб. дело, 1969, № 7, с. 441—442.
28. Kühn R. A. — Immunoelktrophorese — Fibel. Grundlagen und Anleitung zum Verständnis typischer Bilder. Jena, 1974.
29. Rautenstrauch H. — J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 1977, v. 15, p. 333—337.
30. Cameron J. S., Blandford G. — Lancet, 1966, v. 2, p. 242—247.

31. Пушкарев И. А. Иммуноглобулины и другие белки сыворотки крови и мочи у больных лимфопролиферативными заболеваниями. Автореф. дис. докт. М., 1975.  
 32. Virella G., Pires M. T., Coelho I. M. — Clin. chim. Acta, 1974, v. 50, p. 63—75.

Поступила 4/VI 1980 г.

## BIOCHEMICAL DIAGNOSIS OF GLOMERULAR AND TUBULO-INTERSTITIAL IMPAIRMENTS OF KIDNEY

I. A. Pushkarev, U. A. Bruveris, L. N. Guseva, I. R. Lasovskiy

Medical School, Riga

Using polyacrylamide gel disc electrophoresis in presence of sodium dodecylsulfate (SDS) urinary proteins were studied in apparently healthy persons, in patients with chronic glomerulonephritis, chronic interstitial nephritis as well as in patients with myeloma, urine of which contained monoclonic light chains of immunoglobulins. SDS polyacrylamide gel disc electrophoresis is a suitable procedure for differential diagnosis of glomerular and tubulo-interstitial impairments of kidney. In some cases the procedure enables to ascertain not only the type but also severity of the kidney impairment as well as to study dynamics of the disease without a recourse to such invasive methods as kidney biopsy.

### СОДЕРЖАНИЕ

### CONTENTS

<u>Родионов В. М.</u> , Кузьмичева Н. А., Поспелова А. В. Химические факторы, регулирующие деление клеток в организме (Обзор) . . . . .	291	<u>Rodionov, V. M.</u> , Kuzmicheva, N. A., Pospelova, A. V. Chemical factors regulating cell division in the body	
Шарманов Т. Ш., Мухамеджанов Э. К. Синтез, транспорт и утилизация аланина (аланин-глюкозный цикл) (Обзор) . . . . .	300	Sharmanov, T. Sh., Mukhamedzhanov, E. K. Synthesis, transport and utilization of alanine (alanine-glucose cycle)	
Трохименко Е. П., Середа А. Г., Павленко Л. Н., Бердышев Г. Д. Метилирование ДНК лимфоидных органов крыс при формировании иммунного ответа . . . . .	310	Trokhimenko, E. P., Sereda, A. G., Pavlenko, L. N., Berdyshev, G. D. Methylation of DNA from rat lymphoid tissues in development of immune response	
Иващенко А. Т., Кожанова С. В. Действие анионов на окислительное фосфорилирование и АТФ-азную активность митохондрий . . . . .	313	Ivaschenko, A. T., Kozhanova, S. V. Effect of anions on the oxidative phosphorylation and ATPase activity in mitochondria	
Михайлов В. В., Чикина Н. А., Позднякова З. Г. Содержание гистамина и серотонина в подчелюстной слюнной железе при ботулизме и токсической дифтерии у крыс . . . . .	317	Mikhailov, V. V., Chikina, N. A., Pozdnyakova, Z. G. Content of serotonin and histamine in rat submandibular gland under conditions of botulism and toxic diphtheria	
Чаяло П. П., Кожура И. М., Черкасский Л. П., Полинская В. И. Липиды крови и сосудистой стенки при воспроизведении экспериментального атеросклероза у кроликов разного возраста с почечной формой гипертонии . . . . .	320	Chayalo, P. P., Kozhura, I. M., Cherkassky, L. P., Polinskaya, V. I. Lipids of blood and blood vessel wall in rabbits of various age with renal form of hypertension under conditions of experimental atherosclerosis	
Лавриненко И. А., Шергин С. М., Лозовой В. П. Характеристика субпопуляций тимоцитов крыс по чувствительности к действию тимозина на синтез белка и рецепцию дексаметазона . . . . .	326	Lavrinenko, I. A., Shergin, S. M., Lozovoj, V. P. Susceptibility of rat thymocyte subpopulations to thymosine affecting their protein synthesis and dexamethasone reception	
Давыдов А. А., Сычева Г. Ф., Зборовский А. Б. Изучение тропомозинов мышечных и немышечных органов человека . . . . .	330	Davydov, A. A., Sycheva, G. F., Zborovskiy, A. B. Tropomyosins in human muscular and non-muscular tissues	
Давыдов В. В., Крауз В. А., Якушев В. С. Изменения активности Са, Mg-зависимой АТФ-азы в гипоталамусе и миокарде при формировании невротического состояния у крыс . . . . .	334	Davydov, V. V., Krauz, V. A., Yakushev, V. S. Alteration of Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> -ATPase activity from rat hypothalamus and myocardium in development of the neurotic state	
Гарибян Г. Г., Казарян П. А., Симаворян П. С. Нарушение обмена глицерофосфата и глицерина в миокарде при экспериментальном панкреатите . . . . .	337	Garibyan, G. G., Kazaryan, P. A., Simavoryan, P. S. Impairment of glycerophosphate and glycerol turnover in myocardium under conditions of experimental pancreatitis	

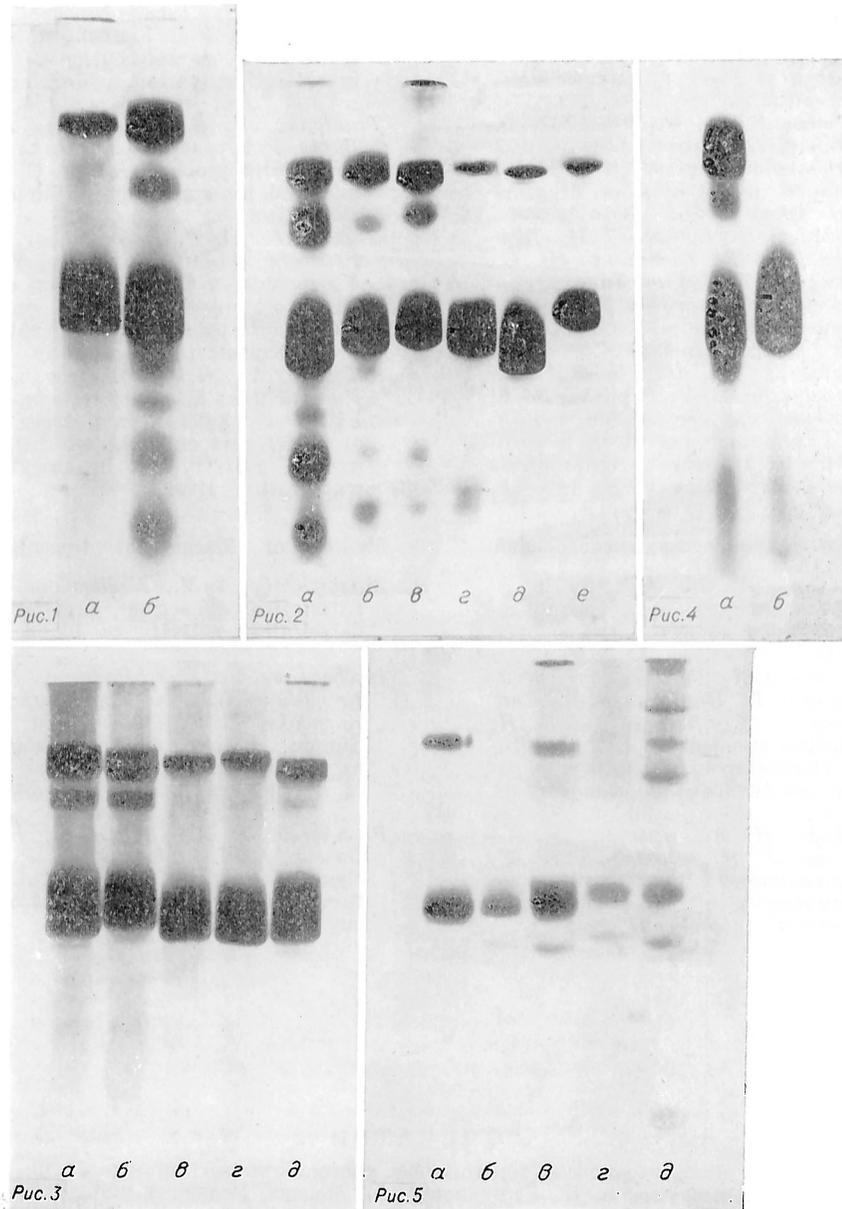
- Чистяков В. В., Приходько А. З. Влияние продолжительности введения тестостерона на индукцию цитохрома Р-450 в печени самок крыс фенобарбиталом . . . . . 340
- Калинкин М. Н., Голованов С. А., Белченко Д. И. Влияние гиперлипонротемии на липидный состав саркоплазматического ретикулула миокарда кроликов . . . . . 342
- Титов А. В., Слободская В. В., Тарасова Е. В., Терешин И. М. Влияние холестериноксидазы на обратное развитие экспериментальной гиперхолестеринемии у кроликов . . . . . 345
- Лихачев А. Я., Анисимов В. Н., Овсянников А. И. Алкилирование пуринов ДНК печени крыс разного возраста, подвергнутых воздействию диэтилнитрозамина . . . . . 349
- Савина М. И., Спиwak С. М. Влияние гидрокортизона при его однократном введении в разное время суток на включение меченого предшественника в ядерные белки интактной печени крыс . . . . . 352
- Кудокотсева Е. В., Гордиенко А. Д., Белоус А. М. Влияние замораживания на процессы гидроксилирования в изолированных гепатоцитах . . . . . 356
- Даудова Т. Н., Мейланов И. С., Эмирбеков Э. З. Температурная зависимость активности аланин- и аспартат-аминотрансфераз в мозге крыс при гипотермии разной длительности и при адrenaлэктомии . . . . . 359
- Николаева С. С., Дубинская В. А., Михайлов А. Н., Королева О. А. Влияние аутолиза на физико-химические свойства кожного покрова млекопитающих . . . . . 362
- Воскобоев А. И., Аверин В. А., Островский Ю. М. Депонирование <sup>14</sup>С-тиамина в субклеточных фракциях печени белых крыс . . . . . 366
- Туманян М. А., Дуплищева А. П., Синилова Н. Г., Серебрянникова Г. А., Клыков В. Н. Использование нейтральных липидов в качестве стимуляторов естественного неспецифического иммунитета . . . . . 372
- Плесков В. М., Трюфанов В. Ф., Житнухин Ю. Л., Коновалов Г. В. Изменения уровня липидов и липопротеидов в крови кроликов с экспериментальными аллергическими полиневритом и энцефаломиелиитом . . . . . 376
- Дудник Л. Б., Биленко М. В., Алесенко А. В., Могилевская М. П., Буракова Е. Б. Роль перекисного окисления в повреждении липидов мембран при ишемии печени . . . . . 380
- Абакумова О. Ю., Куценко П. Г. Метаболическая активация N-метил-N-нитрозомочевины в опухолевых клетках . . . . . 383
- Филиппов И. К., Титов В. Н., Кантардзьян И. Г., Дубровский М. Ю., Chistyakov, V. V., Prikhod'ko, A. Z. Effect of the long-term administration of testosterone on induction of cytochrome P-450 in rat female liver tissue using phenobarbital
- Kalinkin, M. N., Golovanov, S. A., Bel'chenko, D. I. Effect of hyperlipoproteinemia on lipid composition of sarcoplasmic reticulum of rabbit myocardium
- Titov, A. V., Slobodskaya, V. V., Tarasova, E. V., Tereshin, I. M. Effect of cholesterol oxidase on the involution of experimental hypercholesterolemia in rabbits
- Likhachev, A. Ya., Anisimov, V. N., Ovsyannikov, A. I. Alkylation of liver DNA purines in rats of different age treated with diethylnitrosamine
- Savina M. I., Spivak, S. M. Effect of a single administration of hydrocortisone within various periods of a day on the incorporation of the labelled precursor into nuclear proteins of rat intact liver tissue
- Kudokotseva, E. V., Gordienko, A. D., Belous, A. M. Effect of freezing on hydroxylation in isolated hepatocytes
- Daudova, T. N., Meylanov, I. S., Emircekov, E. Z. Alteration in activities of alanine- and aspartate transaminases in rat brain under conditions of hypothermia of various duration and in adrenalectomy
- Nikolaeva, S. S., Dubinskaya, V. A., Mikhailov, A. N., Koroleva, O. A. Effect of autolysis on the physicochemical properties of mammalian skin
- Voskoboyev, A. I., Averin, V. A., Ostrovsky, Yu. M. Storage of <sup>14</sup>C-thiamine in rat liver subcellular fractions
- Tumanyan, M. A., Duplischeva, A. P., Sinilova, N. G., Serebryannikova, G. A., Klykov, V. N. Neutral lipids as stimulators of natural unspecific immunity
- Pleskov, V. M., Tryufanov, V. F., Zhitnukhin, Yu. L., Konovalov, G. V. Alteration in content of lipids and lipoproteins in blood of rabbits with experimental allergic polyneuritis and encephalomyelitis
- Dudnik, L. B., Bilenko, M. V., Alesenko, A. V., Mogilevskaya, M. P., Burlakova, E. B. Role of peroxidation in destruction of membrane lipids under conditions of liver tissue ischemia
- Abakumova, O. Yu., Kutsenko, N. G. Metabolic activation of N-methyl-N-nitroso urea in tumoral cells
- Filippov, I. K., Titov, V. N., Kantardzhyan, I. G., Dubrovsky, M. Yu.,

<i>Маслова И. А.</i> Фракционирование изоэнзимов креатинфосфокиназы методом электрофореза на ацетате целлюлозы . . . . .	388	<i>Maslova, I. A.</i> Fractionation of creatine phosphokinase isoenzymes by means of acetate cellulose electrophoresis
<i>Токровский Б. В., Шабанова М. Е., Мицнер Б. И.</i> Рецепция ретинола в сетчатке крыс: различные молекулярные формы . . . . .	392	<i>Pokrovsky, B. V., Shabanova, M. E., Mitsner, B. I.</i> Reception of retinol in rat retina: various molecular forms
<i>Грюфанов В. Ф., Усатенко М. С., Бокий И. В.</i> Концентрация липидов и аполипопротеинов А-I, А-II и Е в плазме крови мужчин, страдающих хроническим алкоголизмом . . . . .	397	<i>Tryufanov, V. F., Usatenko, M. S., Bokiyy, I. V.</i> Concentration of lipids and apolipoproteins A-I, A-II and E in blood plasma of men with chronic alcoholism
<i>Шевченко О. П., Козляева Г. А., Петрунин Д. Д., Татаринов Ю. С., Цагарая Т. М.</i> Сочетание адсорбционной хроматографии и иммунохимического анализа для выделения белков плаценты . . . . .	402	<i>Shevchenko, O. P., Kozljaeva, G. A., Petrunin, D. D., Tatarinov, Yu. S., Tsagaraeva, T. M.</i> Isolation of placental proteins by means of combined use of adsorption chromatography and immunochemical analysis
<i>Родионов В. М., Поспелова А. В., Кузьмичева П. А., Горелова Н. В.</i> Влияние халонов печени интактных крыс на синтез ДНК и митотическую активность гепатоцитов регенерирующей печени . . . . .	405	<i>Rodionov, V. M., Pospelova, A. V., Kuz'micheva, N. A., Gorelova, N. V.</i> Effect of chalcones from liver tissue of intact rats on DNA synthesis and mitotic activity in hepatocytes of regenerating liver tissue
<b>Методы биохимических исследований</b>		<b>Methods of Biochemical Investigations</b>
<i>Мужиченко А. В., Недогода В. В.</i> Определение серин- и треониндегидратазной активности сыворотки крови . . . . .	408	<i>Muzhichenko, A. V., Nedogodova, V. V.</i> Estimation of serine- and threonine dehydratase activity of blood serum
<i>Исаченков В. А., Бадосов Е. П., Кривошеев О. Г., Нагорная Л. В., Карпенко Е. К., Никифорова Г. П.</i> Простые высокоспецифичные методы радиоиммунохимического определения белковых гормонов гипофиза . . . . .	412	<i>Isachenkov, V. A., Badosov, E. P., Krivosheev, O. G., Nagornaya, L. V., Karpenko, E. K., Nikiiforova, G. P.</i> Simple, highly specific procedures for radioimmunochemical estimation of hypophyseal protein hormones
<i>Пушкарев И. А., Бруверис У. А., Гусева Л. П., Лазовский И. Р.</i> Биохимическая диагностика гломерулярных и тубулоинтерстициальных поражений почек . . . . .	417	<i>Pushkarev, I. A., Bruveris, U. A., Guseva, L. N., Lasovsky, I. R.</i> Biochemical diagnosis of glomerular and tubulo-interstitial impairments of kidney

#### О П Е Ч А Т К И

к книге «Роль пероксисом в патологии клеток» авторы Панченко Л. Ф., Антоненков В. Д., Герасимов А. М. Москва, Медицина 1981

Стр.	Напечатано	Следует читать
66	формула кнофибрата	$\text{Ксантин} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{Мочевая кислота} + \text{H}_2\text{O}_2$ $\text{Мочевая кислота} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{Аллантоин} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{CO}_2$
67	формула нафенопина	



- Рис. 1. Электрофореграммы сердечного тропомиозина человека. *а* — тропомиозин, выделенный с трехкратной отмывкой; *б* — тропомиозин, выделенный без отмывки. Количество белка — 120 мкг на гель.
- Рис. 2. Электрофореграммы сердечного тропомиозина человека, очищенного различными насыщениями сульфатом аммония. *а* — до 60%; *б* — до 65%; *в* — до 70%; *г* — до 72%; *д* — до 75%; *е* — до 77%. Количество белка указано в тексте.
- Рис. 3. Электрофореграммы сердечного тропомиозина человека после диализа при различном рН. *а* — 3,3; *б* — 4,3; *в* — 5,3; *г* — 6,3; *д* — 7,1. Количество белка — 120 мкг на гель.
- Рис. 4. Электрофореграммы сердечного тропомиозина человека. *а* — без тепловой обработки; *б* — с тепловой обработкой. Количество белка — 120 мкг на гель.
- Рис. 5. Электрофореграммы тропомиозингов человека из мышечных и немышечных органов. *а* — сердечная мышца; *б* — скелетная мышца; *в* — печень; *г* — почки; *д* — легкие. Количество белка — 80 мкг на гель.

к ст. В. М. Плескова  
и соавт.

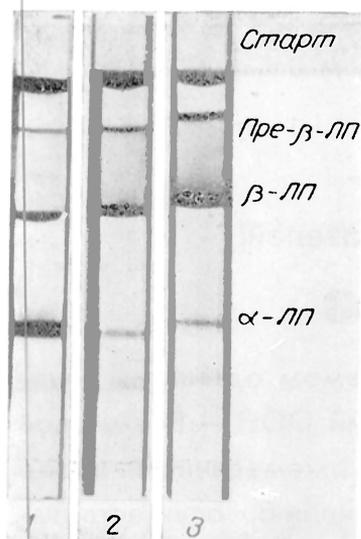


Рис. 3. Спектр липопротеидов сыворотки крови кроликов: контрольного (1), с легкой (2) и тяжелой (3) формами ЭЛП.

к ст. О. П. Шевченко  
и соавт.

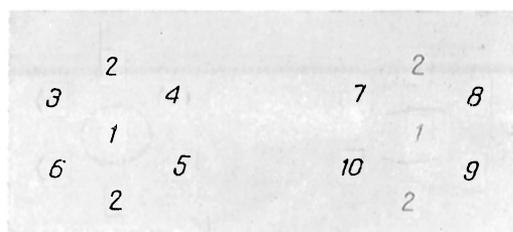


Рис. 1. Полуколичественное определение плацентарного лактогена в экстракте плаценты с помощью стандартной тест-системы.

1 — моноспецифическая антисыворотка против плацентарного лактогена; 2 — антиген в стандартном разведении; 3 — экстракт плаценты; 4—10 — экстракт плаценты, разведенный соответственно в 2, 4, 8, 16, 32, 64 и 128 раз.

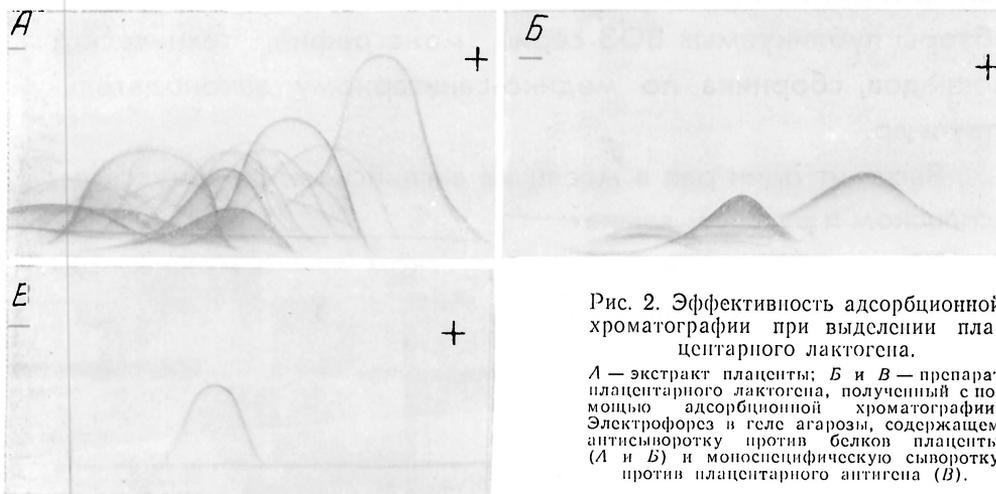


Рис. 2. Эффективность адсорбционной хроматографии при выделении плацентарного лактогена.

А — экстракт плаценты; Б и В — препарат плацентарного лактогена, полученный с помощью адсорбционной хроматографии. Электрофорез в геле агарозы, содержащем антисыворотку против белков плаценты (А и В) и моноспецифическую сыворотку против плацентарного антигена (В).