

ТОМ XXIX

ВЫПУСК 1

ЯНВАРЬ — ФЕВРАЛЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



МОСКВА МЕДИЦИНА 1983



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. И. МАЗУРОВ (зам. главного редактора), Т. Т. БЕРЕЗОВ, Е. Н. ГЕРАСИМОВА,
В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ, А. Н. КЛИМОВ, Л. А. ЛОКШИНА, В. Н. ОРЕХО-
ВИЧ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ, Е. Л. РОЗЕНФЕЛЬД, Ю. А. РО-
МАКОВ (ответственный секретарь), В. А. САКС, С. Е. СЕВЕРИН, В. Б. СПИРИЧЕВ,
И. В. ФИЛИППОВИЧ

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БЛЕВ А. А. (Москва)	ТРОИЦКИЙ Г. В. (Симферополь)
БЕЛИЦЕР В. А. (Киев)	ТАРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)
БЫЧКОВ С. М. (Москва)	ТЯХЕПЫЛЬДА Л. Я. (Тарту)
КОМЕТИАНИ П. А. (Тбилиси)	УТЕВСКИЙ А. М. (Харьков)
КОНСТАНТИНОВ А. А. (Хабаровск)	ШАПОТ В. С. (Москва)
КУДРЯШОВ Б. А. (Москва)	ЭНГЕЛЬГАРДТ В. А. (Москва)
ЛЯХОВИЧ В. В. (Новосибирск)	ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)
ПАСХИНА Т. С. (Москва)	ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)

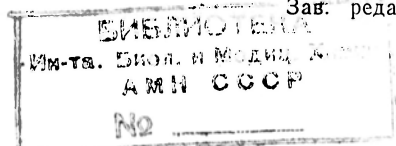
Адрес редакции журнала:

Москва, Солянка, 14

АМН СССР

Тел. 297-16-44

Зав. редакцией Л. А. Фирсова



З. А. Туникова

СРЕДИМОЛЕКУЛЯРНЫЕ УРЕМИЧЕСКИЕ ТОКСИНЫ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Ленинград

Интенсивные исследования эффективности применения гемодиализа для лечения почечной недостаточности, проводившиеся в последние 10—15 лет, подтвердили ранее известные данные об отсутствии прямой взаимосвязи тяжести уремической интоксикации и концентрации креатинина, мочевины и мочевой кислоты в плазме крови больных. В частности, было показано, что в отличие от гемодиализа хронический перитонеальный диализ предотвращает появление симптомов уремической нефропатии, несмотря на остающуюся после него относительно высокую концентрацию низкомолекулярных азотистых продуктов в крови больных. Это наблюдение позволило Скрибнеру [1] предположить существование относительно крупных (с молекулярной массой более 300) токсических молекул, ответственных за развитие уремической интоксикации, способных легко проходить через брюшину при перитонеальном диализе, но задерживаемых применявшимися при гемодиализе целлофановыми мембранами. В 1971 г. сотрудниками университета г. Сиэтла (Вашингтон, США) на основании созданной ими математической модели переноса через диализные мембраны веществ с различной молекулярной массой и большого числа клинических наблюдений была сформулирована гипотеза, связывающая эффективность гемодиализа по предотвращению уремической нефропатии с общим количеством часов диализа в неделю и величиной активной поверхности диализных мембран [2]. Полученные этими авторами дополнительные данные [3—6] о возможном участии в развитии уремической интоксикации токсических веществ с мол. м. 300—1500, так называемых средних молекул или молекул средней массы (МСМ), позволили им высказать гипотезу о

«средних» молекулах [7]. Результаты проведенных в дальнейшем многочисленных экспериментальных исследований и клинических наблюдений полностью подтвердили реальное существование МСМ, ответственных за развитие уремической интоксикации [8—12]. Кроме того, появились данные, свидетельствующие об участии токсических МСМ в патогенезе ряда других заболеваний: печеночной комы [13—15], острой ожоговой токсемии [16—18], инфаркта миокарда [19], иммунодепрессивных состояний [20, 21], обострений туберкулеза и ревматизма [22], различных форм циркуляторного шока [23], онкологических заболеваний [24, 25], физического перенапряжения [26, 27] и др. Однако накопленная к настоящему времени информация ни в отечественной, ни в зарубежной литературе не получила должного обобщения. В настоящем обзоре предпринята попытка систематизировать имеющиеся данные литературы о наиболее изученных представителях токсических МСМ — уремических токсинах.

Химическая структура МСМ. Химическая природа средномолекулярных уремических токсинов до сих пор точно не установлена. Известно, что они представляют собой олигопептиды с высоким содержанием дикарбоновых аминокислот, цистеина, лизина и глицина [28—30] и низким содержанием ароматических аминокислот, что обуславливает малую величину абсорбции света этими веществами при 260 нм [30]. Имеются данные о наличии в структуре МСМ углеводных компонентов [31].

Важной особенностью МСМ является их способность к агрегации, которая может играть определенную роль в реализации их биологической активности [30, 32].

Интенсивные исследования по иденти-

фикации токсических МСМ проводит группа японских ученых [33—38]. Сочетая методы ультрафильтрации, гель-фильтрации и ионообменной хроматографии, авторам удалось не только выделить индивидуальные представители этой группы веществ из биологических жидкостей больных с хронической почечной недостаточностью (ХПН), установить их химическую структуру и получить синтетические аналоги, но и доказать наличие у МСМ определенных токсических свойств. Так, из сыворотки крови больных ХПН был выделен дипептид Н·Асп-Гли·ОН, обладавший выраженной способностью подавлять трансформацию лимфоцитов, вызываемую фитогемагглютинином (ФГА) [33]. Другой представитель МСМ, выделенный авторами из плазмы крови больных ХПН, оказался линейным гептапептидом состава Н·Гис-Про-Ала-Глу-Асп-Гли-Лиз·ОН, идентичным по аминокислотной последовательности фрагменту β_2 -микροглобулина (положения 13—19) и, по-видимому, являющимся продуктом его деградации [34]. Аналогичный гептапептид был выделен и из мочи больных ХПН [35]. Выделенный гептапептид в концентрациях 3—5 мг/мл оказывал ингибирующее действие на розеткообразование лимфоцитов человека. Авторами была продемонстрирована важность сохранения нативной структуры пептида для проявления его биологической активности. Так, замещение пролина на глицин приводило к резкому снижению ингибирующего действия пептида на розеткообразование, а замена аланина на валин — к почти полной его потере [35]. Из мочи больных ХПН этой же группой авторов выделен токсический трипептид Н·глу-асп-гли·ОН [36], способный ингибировать активность лактатдегидрогеназы.

Токсические МСМ были выделены и из диализной жидкости больных с ХПН. Один из представителей этих веществ был идентифицирован как трипептид состава Н·гис-гли-глу·ОН [37], другой оказался пентапептидом Н·асп-лей-три-глу-лиз·ОН [38]. Выделенный пентапептид идентичен по аминокислотной последовательности отрезку β -цепи фибриногена, занимающему положения 123—127; показано наличие у него ингибиторной активности в отношении клеточного иммунитета.

Из сыворотки крови и диализной жидкости больных ХПН выделен специфи-

ческий сильно основной пептид, присутствующий только в крови больных с уремией и не встречающийся в норме [39, 40]. Аминокислотный анализ пептида показал присутствие в нем 3 остатков аргинина, 2 — глицина и аланина, по 1 остатку фенилаланина, аспарагиновой кислоты и спермидина. Наличие в составе пептида большого количества основных аминокислот и спермидина придает ему способность образовывать прочные комплексы с альбуминами плазмы и инсулином, что изменяет биологические свойства гормона. Кроме того, присутствие в молекуле пептида спермидинового остатка позволяет ему оказывать прямое токсическое действие на метаболизм клетки, в частности на процессы транспорта веществ через клеточную мембрану.

Биологические свойства МСМ. Одним из первых токсических эффектов МСМ, обратившим на себя внимание исследователей, является их участие в развитии характерного для ХПН состояния вторичной иммунодепрессии, в частности способность их влиять на реакцию бласттрансформации лимфоцитов в присутствии ФГА. Так, было показано [21], что включение ^3H -тимидина в ДНК лимфоцитов в присутствии ФГА при добавлении в инкубационную среду МСМ, выделенных из сыворотки крови больных с ХПН, снижается на 73—92 %, причем заметный ингибирующий эффект проявляется чрезвычайно быстро — уже через 1 ч инкубации. При внесении в инкубационную среду тотального препарата МСМ, полученного из сыворотки крови здоровых доноров, а также из сыворотки больных после гемодиализа, ингибирующий эффект был выражен значительно слабее.

Аналогичные данные были получены [20] при использовании других митогенов, хотя степень ингибирования была различной: при использовании аллогенных клеток ингибирующий эффект МСМ был более значительным, а при использовании митогена лаконоса и конканавалина А — менее выраженным, чем при стимуляции бласттрансформации ФГА. Этими же авторами показано ингибирующее действие МСМ, выделенных из биологических жидкостей больных ХПН, на образование розеток лимфоцитами с эритроцитами барана.

Подавление бласттрансформации лимфоцитов происходит и под влиянием МСМ, выделенных из диализата боль-

ных ХПН [32]. Так, в присутствии МСМ, выделенных из диализата, в течение первых 30 мин гемодиализа, включение меченого лейцина в ФГА-стимулируемую культуру лимфоцитов снижалось на 28—33%, в нестимулируемую культуру — на 11—27%. При внесении в инкубационную среду МСМ, выделенных из диализата в конце сеанса гемодиализа, включение метки в ФГА-стимулируемую культуру снижалось на 8%, а в отсутствие митогена — на 28—36%. Полученные данные свидетельствуют о том, что основная масса токсических МСМ, ингибирующих бласттрансформацию ФГА-стимулируемых лимфоцитов, удалась из крови больных уже в самом начале сеанса гемодиализа.

Из биологических жидкостей больных ХПН выделены также пептиды, блокирующие иммунодепрессивные эффекты МСМ [41—43].

Важным подтверждением участия МСМ в развитии характерной для уремических состояний вторичной иммунодепрессии являются данные о подавлении воспалительной реакции и замедлении отторжения кожных аллотрансплантатов при введении животным препарата МСМ [44].

Рядом исследователей показано ингибирующее действие МСМ на фагоцитарную активность лейкоцитов. Так, фагоцитоз латекса, зимозина и инулина в присутствии МСМ, выделенных из диализата больных ХПН, снижается соответственно на 86, 93 и 92% от фонового уровня [45]. Аналогичные данные получены в работе [46].

Существенное влияние МСМ оказывают на процессы клеточной миграции, причем одни фракции МСМ подавляют миграцию лейкоцитов, другие дают стимулирующий эффект [47]. В этой связи можно предполагать, что МСМ, изменяя скорость миграции клеток, играют определенную роль в регуляции реакций гиперчувствительности замедленного типа.

В работах [48, 49] представлены данные об ингибирующем действии МСМ, выделенных из диализной жидкости больных ХПН, на пролиферацию фибробластов.

Рядом авторов получены данные, свидетельствующие об участии МСМ в развитии характерной для ХПН анемии. Так, отмечено резкое снижение концентрации гемоглобина в крови и снижение интенсивности включения⁵⁹ Fe в эритро-

циты мышей после введения им тотального препарата МСМ, полученного из плазмы крови больных ХПН [50]. Аналогичные результаты получены авторами работы [51]. Показано ингибирующее влияние МСМ на эритропоэтические клетки *in vitro* [52]. В то же время при исследованиях *in vivo* не удалось выявить достоверного уменьшения количества гемопоэтических колоний в селезенке облученных мышей после введения им МСМ из сыворотки крови детей с терминальной стадией ХПН, что свидетельствует об отсутствии цитотоксического действия этих веществ на плюрипотентную стволовую клетку [53].

Особого внимания заслуживают данные о наличии у МСМ определенных нейро- и психотропных свойств. Об этом в первую очередь свидетельствует существование прямой взаимосвязи тяжести проявлений уремической невропатии и повышения содержания в крови больных отдельных фракций МСМ [54, 55]. Методами гель-фильтрации и ионообменной хроматографии из сыворотки крови больных ХПН выделена специфическая фракция МСМ, значительное накопление которой сопровождалось появлением симптомов уремической невропатии [56]. Эта фракция представляла собой пептид из 10—11 аминокислот с мол. м. 1187—1829, содержащий по 3 остатка аспарагиновой и глутаминовой кислот, 2 остатка глицина, 1 — аланина и 1 или 2 — серина. Нейротоксичность этой фракции МСМ показана в опытах *in vitro* [49, 56, 57]. Внутривенное введение белым мышам сыворотки крови больных с легкой стадией ХПН дает прямой нейротропный эффект, проявлявшийся в изменении поведенческого статуса животных [58]. Внутривенное введение сыворотки больным с тяжелой стадией ХПН вызывало гибель 30—50% животных, причем летальность была тем выше, чем большей концентрацией МСМ характеризовалась вводимая сыворотка.

Одним из возможных механизмов нейротоксического действия МСМ являются ингибирование Na^+ , K^+ -АТФ-азы и нарушение транспорта ионов Ca^{2+} [19, 59].

Обнаружено присутствие во фракции МСМ натрийуретического фактора, вызывающего при внутривенном введении крысам 40% увеличение экскреции натрия и способного ингибировать транспорт натрия в изолированной коже и эпителии мочевого пузыря [60—62]. На-

трийуретический фактор способен адсорбироваться на поверхности серозной оболочки мочевого пузыря и вызывать резкое снижение разности потенциалов по обе стороны серозной поверхности [63]. Изменение разности потенциалов наступает после 10-минутного лаг-периода и сохраняется в течение 60 мин. Содержание натрия в изолированных эпителиальных клетках мочевого пузыря при инкубации в присутствии натрийуретического фактора снижается до 7 экв/л; при этом содержание калия и воды в клетках существенно не изменяется. Этот же фактор вызывает снижение утилизации пировиноградной кислоты эпителиальными клетками.

Накопление МСМ в крови больных ХПН является важным звеном в развитии характерных для уремии нарушений обмена веществ. Многообразными метаболическими эффектами обладает, в частности, сильно основной пептид, выделенный из сыворотки крови и диализной жидкости больных ХПН [39]. Образуя прочный комплекс с инсулином, пептид изменяет химические свойства гормона, что затрудняет или делает невозможным его связывание специфическими клеточными рецепторами. Следствием этого является нарушение утилизации глюкозы тканями и процессов ионного транспорта, которые также находятся под контролем инсулина [64]. Кроме того, образование комплекса пептид — гормон подавляет стимулирующее влияние инсулина на Mg^{2+} -зависимую АТФ-азу мембран жировых клеток, что в свою очередь тормозит освобождение из них липопротеинлипазы и приводит к нарушению обмена триглицеридов [65, 66].

По-видимому, идентичен сильно основному пептиду Лютта выделенный [67, 68] из сыворотки крови больных ХПН ингибитор утилизации глюкозы — основной пептид с мол. м. 1000—1500, вызывающий *in vitro* 2—3-кратное снижение утилизации глюкозы срезами диафрагмы, коркового слоя почек, корой головного мозга крыс и эритроцитами человека. Из сыворотки крови и мочи больных ХПН выделен также ингибитор глюконеогенеза — пептид с мол. м. ~5000, вызывающий 30—60% снижение интенсивности биосинтеза глюкозы срезами почек при использовании в качестве субстрата α -кетоглутаровой, аспарагиновой, молочной и пировиноградной кислот; показано его тормозящее действие на активность фосфоенолпируваткиназы

[31, 69]. В то же время выделенный пептид не оказывал влияния на потребление кислорода и интенсивность гликолиза в тканях почек и печени. По мнению авторов, выделенные ими ингибиторы ответственны за свойственные уремии нарушения углеводного обмена.

Из плазмы крови больных с ХПН выделена фракция диализуемых веществ, предположительно относящихся к МСМ и вызывающих резкое подавление биосинтеза белка в бесклеточной системе, оцениваемое по включению 3H -лейцина [70]. Адекватный гемодиализ и трансплантация почки в значительной степени снижали ингибирующий эффект этой фракции сыворотки крови больных.

Детально исследовано влияние МСМ на процессы тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования [71, 72]. При использовании в качестве субстрата дыхания сукцината натрия и добавлении в инкубационную смесь МСМ, выделенных из крови больных ХПН, коэффициент дыхательного контроля и отношение Р/О снижались почти на 50%, в основном за счет уменьшения интенсивности дыхания в 3-м (контролируемом АДФ) метаболическом состоянии, в то время как интенсивность дыхания в 4-м состоянии существенно не изменялась. Полученные данные указывают на почти полное разобщение окисления и фосфорилирования и нарушение механизмов регуляции интенсивности дыхания адеиновыми нуклеотидами под влиянием МСМ.

МСМ, выделенные из биологических жидкостей больных ХПН, способны оказывать прямое ингибирующее влияние на активность ряда ферментов. Так, активность лактатдегидрогеназы из мышц кролика (преимущественно ЛДГ-5) и сердца быка (ЛДГ-1) за 1 ч инкубации в присутствии МСМ, выделенных из плазмы крови больных ХПН, снижается в среднем на 68% [73]. Часто наблюдаемое в клинике повышение активности ЛДГ-1 и ЛДГ-5 в сыворотке крови больных после сеанса гемодиализа, по данным автора, обусловлено удалением в процессе диализа МСМ, ингибирующих фермент. 100% ингибирование активности коммерческого препарата ЛДГ вызывает нейротоксичный трипептид Н-глу-ала-гли-ОН [36]. Имеются данные об ингибирующем действии МСМ *in vitro* на активность транскетолазы

[74], пируваткиназы [75], аденилатциклазы [76].

В заключение данного раздела необходимо подчеркнуть, что в отличие от других «кандидатов» на роль уремических токсинов (мочевины и мочевой кислоты, гуанидинов, ароматических аминов, микроглобулинов, цАМФ и т. д.) МСМ дают свои токсические эффекты *in vitro* в чрезвычайно низких концентрациях, сравнимых с их концентрациями в плазме крови больных ХПН [50, 66, 77].

Методы исследования МСМ. МСМ крови и мочи при уремии

Недостаток данных о химической природе и физико-химических свойствах МСМ существенно затрудняет разработку оптимальных методов их выделения и количественного анализа, годных для использования в клинической практике. Существующие в настоящее время методы довольно трудоемки и, как правило, позволяют получать лишь полуколичественные результаты.

Общим методическим подходом к исследованию МСМ является использование гель-фильтрации на сефадексах. Одна из первых методик выделения и количественного определения МСМ была предложена Лютцем [78]. При этом оказалось, что концентрация МСМ в плазме крови больных с нефротическим синдромом, определяемая по содержанию α -аминоазота после солянокислого гидролиза, в среднем в 2 раза выше, чем в плазме крови здоровых людей (соответственно $5,86 \pm 1,20$ и $2,94 \pm 0,72$ мкмоль/мл, $P < 0,01$). Аналогичными методами была исследована моча больных с нефротическим синдромом [79]. Общее содержание МСМ, выделенных из суточной мочи больных методом гель-фильтрации на сефадексе G-25, составило $32,4 \pm 2,45$ ммоль α -аминоазота лейцина при норме $21,4 \pm 4,20$ ммоль ($P < 0,01$).

Для исследования содержащихся в плазме крови больных ХПН токсических МСМ был разработан [80, 81] метод микроколоночной высокоскоростной гель-фильтрации на сефадексе G-15 с УФ-детекцией элюируемых веществ, ставший впоследствии наиболее популярным. Пользуясь этим методом, авторы исследовали более 500 проб крови и мочи, полученных от здоровых доно-

ров и 81 больного с хронической уремией.

Накопление МСМ в плазме крови больных ХПН подтверждено результатами ряда исследований [82—86]. Более того, показано наличие прямой взаимосвязи концентрации МСМ в плазме крови больных и тяжести симптомов уремической интоксикации, причем наиболее высокая их концентрация отмечается у больных с терминальной стадией уремии, тяжелой периферической нефропатией и уремическим перикардитом [50, 55, 58, 77]. С другой стороны, у больных с благоприятным клиническим течением заболевания содержание МСМ относительно невелико.

В заключение необходимо отметить, что практически ни один из применяемых в настоящее время методов исследования МСМ не позволяет получать индивидуальные вещества. Выделяемые фракции, как правило, представляют собой группы веществ со сходной химической структурой и близкими физико-химическими свойствами. Это относится и к одному из самых тонких методов — методу Фюрста и соавт. [77, 80, 87]. Исключение составляют, по видимому, лишь специально разработанные для препаративных целей многоступенчатые хроматографические методики, которые позволяют получать индивидуальные вещества или их полимеры [33—38, 40, 67].

Происхождение и физиологическая элиминация МСМ

Механизмы образования МСМ и их избыточного накопления в плазме крови больных ХПН до сих пор не выяснены. Результаты исследований [28], показавших наличие прямой взаимосвязи потребления белков и концентрации МСМ в плазме крови и независимость их концентрации от общей мышечной массы тела, позволяют предполагать, что МСМ являются продуктами распада белков пищи, поступающими в кровь из желудочно-кишечного тракта. Косвенным подтверждением алиментарного происхождения МСМ являются также данные [88] о значительном снижении концентрации МСМ в плазме крови больных, находящихся на диете, бедной белками.

С другой стороны, расшифровка химической структуры 2 представителей МСМ, проведенная группой Абики [34,

38] и показавшая, что они являются фрагментами β -цепи фибриногена и β_2 -макроглобулина, явно свидетельствует об образовании этих веществ в процессе катаболизма эндогенных белков.

Наличие остатка спермидина в составе основного пептида, выделенного Лютцем [40], позволяет предполагать, что, по крайней мере, некоторые представители МСМ являются продуктами жизнедеятельности кишечных бактерий.

Детальное исследование почечной экскреции МСМ проведено в опытах с перфузированной почкой крысы [87]. Показано, что почечный клиренс подфракций МСМ 7a, 7b, 7c и 7f, выделяемых по методу [80], существенно не отличается от клиренса инулина. Клиренс подфракций 7d и 7g составляет соответственно 66 и 80% клиренса инулина, что указывает на их частичную реабсорбцию в почечных канальцах. По данным [89], в норме все фракции МСМ подвергаются 70—90% канальцевой реабсорбции, которая при уремии снижается до 50%. Аналогичные данные получены в работе [84].

Сходство кривых элюции, получаемых при хроматографировании плазмы крови и мочи одного и того же больного, по мнению ряда авторов [55, 77, 79], свидетельствует о том, что основной причиной накопления МСМ при ХПН является их избыточное образование из экзо- или эндогенных белков [62].

МСМ и эффективность лечения ХПН

Наличие взаимосвязи тяжести клинических проявлений ХПН и концентрации МСМ в крови больных является важным подтверждением справедливости гипотезы Бабба и соавт. [1, 2, 7], и в то же время свидетельствует о принципиальной возможности использования данных количественного определения МСМ в качестве объективного критерия эффективности лечения, в частности для контроля адекватности гемодиализа и гемосорбции.

Литература, касающаяся этого вопроса, довольно обширна, причем несмотря на разнообразие используемых авторами методов выделения МСМ, в результате чего в эту группу попадают вещества с довольно широким спектром молекулярной массы (от 300—1200 до 500—5000), большая часть имеющихся данных свидетельствует о существенном

снижении концентрации МСМ в крови больных после проведения гемодиализа — до 50% от исходного уровня [28, 29, 82—84, 86, 90—93]. Сводные данные о степени элиминации МСМ при использовании различных типов диализаторов и диализных мембран приведены в работе [91].

Необходимо отметить, что предварительная экспериментальная оценка эффективности качественно новых диализаторов в отношении элиминации МСМ, как правило, производится по клиренсу веществ-маркеров, близких к МСМ по молекулярной массе, чаще всего — витамина B_{12} [94—97]. Однако получаемые при этом результаты не всегда соответствуют результатам клинических испытаний [28]. Очевидно, в условиях *in vivo* клиренс МСМ находится под влиянием неизвестных факторов, не воспроизводимых в модельных системах и требующих тщательного изучения.

Интересное направление дальнейшего повышения эффективности гемодиализа в отношении элиминации МСМ предложено Лютцем [40]. Показано, что добавление альбумина к диализной жидкости позволит значительно повысить эффективность гемодиализа в результате связывания токсического пептида с альбумином.

Еще большей эффективностью, чем гемодиализ, в отношении элиминации МСМ обладает гемосорбция. Так, за 4 ч гемодиализа с применением узлового диализатора Ultra-Flo 100 («Travenol») концентрация МСМ в плазме крови больных ХПН снижается в среднем на 24,4%, а за то же время гемосорбции на угольных колонках Absorba 300 C («Gambro») — на 59,2% [98—100]. Аналогичные данные получены другими авторами [13, 14, 101, 102].

Высокой сорбционной способностью по отношению к МСМ обладают ионообменные смолы на основе амберлита [103, 104].

Устранению интоксикации, обусловленной МСМ, способствуют и хирургические методы лечения ХПН, что указывает на существенную роль почек в устранении этих веществ из организма. Так, по данным авторов [105, 106], концентрация МСМ в сыворотке крови больных, перенесших трансплантацию почек, резко снижается, причем это снижение более значительно и наступает раньше, чем уменьшение концентраций мочевины

и креатинина. По мнению авторов, изменения концентрации МСМ в сыворотке крови вместе с классическими лабораторными данными могут более правильно отражать восстановление физиологических функций трансплантированной почки.

Снижение концентрации МСМ в плазме крови при уремии может быть достигнуто и с помощью химиотерапевтических средств. Так, внутривенное введение кроликам трасилола в дозе 2,5 тыс/кг значительно замедляло нарастание концентрации МСМ после билатерального лигатурирования мочеточников, не оказывая существенного влияния на концентрацию мочевины [107].

В заключение необходимо коснуться вопроса о патогенетической специфичности МСМ, т. е. о существовании принципиальных различий между МСМ, накапливающимися в крови больных ХПН, печеночной комой, острой ожоговой токсемией и т. д. Имеющиеся в литературе данные позволяют предполагать, что такие различия отсутствуют. В пользу этой точки зрения свидетельствует как сходство химической структуры МСМ, накапливающихся в крови больных с различными заболеваниями (все они являются олигонептидами), так и наличие у них общих токсических эффектов: разобщающего действия на процессы окислительного фосфорилирования, ингибирующего влияния на реакцию бласттрансформации и розеткообразование лимфоцитов и др. Окончательное решение вопроса о специфичности МСМ, так же как и вопросов об их происхождении, химической структуре, метаболизме, биологической активности и т. д., требует дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Scribner B. H.* — Trans. Am. Soc. artific. intern. Organs, 1965, v. 11, p. 29.
2. *Babb A. L., Popovich R. P., Christopher T. G.* et al. — Ibid., 1971, v. 17, p. 81—85.
3. *Christopher T. G., Cambi V., Harker L. A.* et al. — Ibid., p. 92—98.
4. *Ginn H. E., Bugen H. J., James L.* et al. — Proc. Clin. Dialys. Transpl. Forum, 1971, v. 1, p. 53—55.
5. *Milutinovic J., Mulur E. M., Harker L. A.* et al. — Ibid., p. 48—52.
6. *Rosenzweig J., Babb A. L., Vizzo J. L.* et al. — Ibid., p. 56—60.
7. *Babb A. L., Farrell P. C., Ucelli D. A.* et al. — Trans. Am. Soc. artific. intern. Organs, 1972, v. 18, p. 98—105.
8. *Fürst P., Asaba M., Gordon A.* et al. — Proc. europ. Dialys. Transpl. Ass., 1974, v. 11, p. 417—423.
9. *Scribner B. H., Fareli P. C., Milutinovic J.* et al. — In: International Congress of Nephrology. 5th Proceedings. Basel, 1974, v. 3, p. 190—199.
10. *Scribner B. H., Babb A. L.* — Kidney int., 1975, p. 349—351.
11. *Funck-Brentano J. L., Cuelle G. F., Man N. K.* — Ibid., 1978, v. 13, p. 31—35.
12. *Scribner B. H., Babb A. L.* — In: International Congress of Nephrology. 7th. Proceedings. Basel, 1978, p. 663—667.
13. *Chang T. M. S., Migchelsen M.* — Trans. Am. Soc. artific. intern. Organs, 1973, v. 19, p. 314—319.
14. *Chang T. M. S.* — Kidney int., 1975, v. 7, p. 382—392.
15. *Chang T. M. S.* — In: Artificial Kidney, Artificial Liver and Artificial Cells. Ed. T. M. S. Chang. New York, 1978, p. 301—305.
16. *Лифшиц Р. И.* — В кн.: Метаболические основы острой ожоговой токсемии. Омск, 1977, с. 135—141.
17. *Лифшиц Р. И., Рябинин В. Е., Чарная Л. Ф.* и др. — Вопр. мед. химии, 1980, № 1, с. 63—66.
18. *Рябинин В. Е.* Изучение функционального состояния митохондрий в период ранней ожоговой токсемии и при воздействии токсических пептидов крови. Автореф. дис. канд. Челябинск, 1979.
19. *Tkaczewski W., Lutz W., Szeszkow A.* — Acta med. pol., 1979, v. 20, p. 237—244.
20. *Traeger J., Touraine J. L., Revillard J. P.* et al. — In: International Congress of Nephrology. 6th. Proceeding. Basel, 1976, v. 1, p. 585—589.
21. *Touraine J. L., Navarro G., Corre C.* et al. — Biomedicine, 1975, v. 23, p. 180—184.
22. *Bergström J.* — In: Chronic Hemodialysis, its Consequences and Results of Treatment. Moscow, 1977, p. 1—6.
23. *Lefer A. M.* — Klin. Wschr., 1974, Bd 52, S. 358—370.
24. *Николаев В. Г., Стрелко В. В.* Гемосорбция на активированных углях. Киев, 1979.
25. *Глиньский Г. В., Николаев В. Г., Иванова А. В.* и др. — Экспер. онкология. 1980, № 1, с. 68—74.
26. *Markiewicz K., Lutz W., Cholewa M.* — Europ. J. clin. Invest., 1980, v. 10, p. 281—284.
27. *Lutz W.* — Acta physiol. pol., 1977, v. 28, p. 117—121.
28. *Peter J. H., Gotch F. A., Keen M.* et al. — Trans. Am. Soc. artific. intern. Organs, 1974, v. 20, p. 417—424.
29. *Migone L., Dall'Aglio P., Buzio C.* — Clin. Nephrol., 1975, v. 3, p. 83—93.
30. *Klein A., Sarnecka-Keller M., Hanicki Z.* — Clin. chim. Acta, 1978, v. 90, p. 7—11.
31. *Dzurik R., Spustová V., Cernáček P.* — Int. J. Biochim., 1980, v. 12, p. 103—106.
32. *Hanicki Z., Cichocki J., Sarnecka-Keller M.* et al. — Nephron, 1976, v. 17, p. 73—80.
33. *Abiko T., Kumikawa M., Dazai S.* et al. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1978, v. 82, p. 707—715.
34. *Abiko T., Kumikawa M., Higuchi H.* et al. — Ibid., v. 84, p. 184—194.

35. *Abiko T., Kumikawa M., Sekino H.* — Ibid., 1979, v. 86, p. 945—952.
36. *Abiko T., Onodera I., Sekino H.* — Chem. pharm. Bull., 1980, v. 28, p. 1629—1633.
37. *Abiko T., Kumikawa M., Ishikaki M.* et al. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1978, v. 83, p. 357—364.
38. *Abiko T., Nondera I., Sekino H.* — Ibid., 1979, v. 89, p. 813—821.
39. *Lutz W.* — Acta med. pol., 1975, v. 16, p. 159—170.
40. *Lutz W.* — Ibid., 1976, v. 17, p. 137—147.
41. *Abiko T., Kumikawa M., Dazai S.* et al. — Chem. pharm. Bull., 1979, v. 27, p. 2207—2211.
42. *Abiko T., Nondera I., Sekino H.* — Ibid., 1980, v. 28, p. 2507—2511.
43. *Abiko T., Onodera I., Sekino H.* et al. — Ibid., p. 667—669.
44. *Navarro J., Touraine J. L., Corre C.* et al. — Cell Immunol., 1977, v. 31, p. 349—354.
45. *Ringoir S. M. G., van Landschoot N., Le Smet R.* — Clin. Nephrol., 1980, v. 13, p. 109—112.
46. *Odeberg H., Olsson I., Thysell H.* — Trans. Am. Soc. artific. intern. Organs, 1973, v. 19, p. 484—452.
47. *Cichocki T., Hanicki Z., Komorowska Z.* et al. — In: Donausymposium für Nephrologie. Budapest, 1977, S. 13.
48. *Man N. K., Terlain B., Paris J.* et al. — Trans. Am. Soc. artific. intern. Organs, 1973, v. 19, p. 320—324.
49. *Man N. K., Cuenille G., Zingraff J.* et al. — Proc. europ. Dialys. Transpl. Ass., 1974, v. 11, p. 214—218.
50. *Bergström J., Fürst P.* — In: International Congress Nephrology 7th. Proceedings. Basel, 1978, p. 669—675.
51. *Goubeaud G., Leber H. W., Schott H. H.* et al. — Proc. europ. Dialys. Transpl. Ass., 1977, v. 13, p. 371—375.
52. *Gumman R. A., Huang A. T., Bouknight S. T.* — In: American Society of Nephrology Annual Meeting. 9th. Abstracts. Washington, 1976, p. 14—16.
53. *Гудим В. И., Сигалла П., Иванова В. С.* и др. — Бюлл. экспер. биол., 1980, т. 89, с. 592—594.
54. *Funck-Brentano J. L., Man N. K., Sause A.* et al. — Kidney int., 1975, v. 7, p. 352—356.
55. *Bergström J., Asaba H., Fürst P.* et al. — In: International Congress of Nephrology. 6th. Proceedings. Basel, 1976, v. 1, p. 600—611.
56. *Funck-Brentano J. L., Man N. K.* — In: Replacement of Renal Function by Dialysis. Ed. W. Drukker et al. Hague, 1979, p. 125—134.
57. *Funck-Brentano J. L., Man N. K., Sause A.* et al. — Trans. Am. Soc. artific. intern. Organs, 1976, v. 22, p. 163—168.
58. *Шумаков В. И., Габриэлян Н. И., Щербанева О. И.* и др. — Тер. арх., 1980, № 4, с. 62—64.
59. *Lutz W., Pawlak J.* — Acta med. pol., 1980, v. 21, p. 11—18.
60. *Bourgoignie J. J., Klahr S., Bricker N. S.* — J. clin. Invest., 1971, v. 50, p. 303—309.
61. *Bourgoignie J. J., Hwang K. H., Espinel C.* et al. — J. clin. Invest., 1972, v. 51, p. 514—521.
62. *Bourgoignie J. J., Hwang K. H., Ipakchi N. S.* — Ibid., 1974, v. 53, p. 1559—1567.
63. *Kaplan M. A., Bourgoignie J. J., Rosecan J.* et al. — Ibid., p. 1568—1577.
64. *Cuatrecasas P.* — Biochem. Pharmacol., 1974, v. 23, p. 2353—2361.
65. *Lutz W.* — Acta med. pol., 1979, v. 20, p. 131—141.
66. *Lutz W.* — Ibid., 1976, v. 17, p. 55—70.
67. *Dzurik R., Hupkova V., Carnacek P.* et al. — Clin. chim. Acta, 1973, v. 46, p. 77—83.
68. *Cajdos M., Dzurik R.* — Int. Urol. Nephrol., 1973, v. 5, p. 331—336.
69. *Dzurik R., Spustova V., Carnacek P.* — Int. J. Biochem., 1980, v. 12, p. 103—106.
70. *Delaporte C., Gros F., Anagnostopoulos T.* — Am. J. clin. Nutr., 1980, v. 33, p. 1404—1410.
71. *Rinaudo J. B., Gallice P., Crevat A.* et al. — Biomedicine, 1979, v. 30, p. 215—218.
72. *Muriasco A., Saingra S., Crevat A.* et al. — J. Urol. Nephrol., 1979, v. 85, p. 586—589.
73. *Lutz W., Markiewicz K., Klyszejko-Stefanowicz L.* — Acta med. pol., 1974, v. 15, p. 97—104.
74. *Lange K., Lonergan E. T., Semar M.* et al. — In: Uremia. Ed. R. E. Kluthe et al. Stuttgart, 1972, p. 24—31.
75. *Yamada T., Nakagawa S.* — Trans. Am. Soc. artific. intern. Organs, 1976, v. 22, p. 155—159.
76. *Cloix J. F., Cueille G., Funck-Brentano J. L.* — Biomedicine, 1976, v. 25, p. 215—219.
77. *Bergström J., Fürst P.* — In: Replacement of Renal Function by Dialysis. Ed. W. Drukker et al. Hague, 1979, p. 334—369.
78. *Lutz W., Markiewicz K., Klyszejko-Stefanowicz L.* — Clin. chim. Acta, 1972, v. 39, p. 319—326.
79. *Lutz W., Markiewicz K., Klyszejko-Stefanowicz L.* — Ibid., p. 425—431.
80. *Fürst P., Bergström J., Gordon A.* et al. — Kidney int., 1975, v. 7, p. 272—275.
81. *Zimmerman L., Baldesten A., Bergström J.* et al. — In: Biochemical and Biological Applications of Isotachopheresis. Amsterdam, 1980, p. 141—151.
82. *Гудим В. И., Сигалла П., Иванова В. С.* и др. — Вopr. мед. химии, 1980, № 6, с. 742—745.
83. *Dall' Aglio P., Buzio C., Gambi V.* et al. — Proc. europ. Dialys. Transpl. Ass., 1972, v. 9, p. 409—416.
84. *Dzurik R., Bozek P., Reznicek J.* et al. — Ibid., 1974, v. 11, p. 263—270.
85. *Chapman G. V., Ward R. A., Farrell P. C.* — Kidney int., 1980, v. 17, p. 82—88.
86. *Hanicki Z., Sarnecka-Keller M., Klein A.* et al. — Clin. chim. Acta, 1974, v. 54, p. 47—54.
87. *Shindhelm K., Schlatter E., Schurek H. J.* et al. — Contrib. Nephrol., 1980, v. 19, p. 191—200.
88. *Fürst P., Asaba M., Gordon A.* et al. — Proc. europ. Dialys. Transpl. Ass., 1974, v. 11, p. 417—426.
89. *Ward R. A., Farrell P. C.* — Цит. Shindhelm K. et al. (1980).
90. *Gotch F., Sargent J., Peters J.* — Kidney int., 1975, v. 7, p. 276—279.
91. *Hoenich N. A., Frost T. H., Herr D. N. S.* — In Replacement of Renal Function by Dia-

- lysis. Ed. W. Drukker et al. Hague, 1979, p. 80—124.
92. Bozek P., Erben J., Zahradnik J. et al. — Int. Urol. Nephrol., 1979, v. 11, p. 223—228.
 93. Gordon A., Lewin A., Rosenfeld J. et al. — In: International Congress Nephrology. 6th. Proceedings. Basel, 1976, v. 1, p. 612—617.
 94. Babb A. L., Johansen P. J., Strand M. J. et al. — Proc. europ. Dialys Transpl. Ass., 1974, v. 11, p. 247—256.
 95. Von Hartitzsch B., Hoenich N. A., Peterson R. J. et al. — Ibid., p. 522—527.
 96. Man N. K., Granger A., Rondon-Muente M. et al. — Ibid., p. 236—246.
 97. Calstro L. A., Hampel G., Gebhardt R. et al. — In: Artificial Kidney, Artificial Liver and Artificial Cells. Ed. R. M. S. Chang. New York, 1978, p. 193—198.
 98. Trznadel K., Kidawa Z., Walasek L. et al. — In: Donausymposium für Nephrologie. Budapest, 1977, S. 90.
 99. Trznadel K., Kidawa Z., Walasek L. et al. — Pol. Tyg. lek., 1978, v. 33, p. 257—259.
 100. Trznadel K., Walasek L., Kidawa Z. et al. — Clin. Nephrol., 1978, v. 10, p. 229—231.
 101. Chang T. M. S., Migchelsen M., Coffey J. F. et al. — Trans. am. Soc. artific. intern. Organs, 1974, v. 20, p. 364—370.
 102. Oules R., Asaba H., Neuhauser M. et al. — In: Artificial Kidney, Artificial Liver and Artificial Cells. Ed. T. M. S. Chang. New York, 1978, p. 153—165.
 103. Rosenbaum J. L. — Ibid., p. 217—224.
 104. Bobeck J. D., Cipoletti J. J., Wexler M. — Kidney int., 1978, v. 13, p. 163—169.
 105. Bozek P., Dzurik R., Danekova H. et al. — Cas. Lek. ces., 1977, v. 116, p. 52—55.
 106. Asaba H., Bergström J., Furst P. et al. — Clin. Nephrol., 1977, v. 82, p. 329—334.
 107. Waedy K., Lutz W., Grande G. — Pol. Tyg. lek., 1978, v. 33, p. 5—8.

Поступила 6.11.81

УДК 612.398-088.1+577.322.088.1

С. С. Шишкин

НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ В АНАЛИТИЧЕСКОМ ФРАКЦИОНИРОВАНИИ БЕЛКОВ (ОБЗОР)

Научно-исследовательская лаборатория биологических структур Минздрава СССР, Москва

Качественный скачок в развитии научных исследований обычно происходит с появлением нового метода, обеспечивающего расширение возможностей экспериментаторов. Этому скачку предшествует период внедрения нового метода в различные области исследований и накопления с его помощью новых экспериментальных данных. По всей видимости, подобная ситуация складывается в настоящее время в биохимическом изучении белков. Роль нового метода играет предложенный в 1975 г. О'Фарреллом [1] и в последующем несколько модифицированный [2] двумерный электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ).

Аналитическое фракционирование многокомпонентных белковых препаратов с целью сравнительного изучения их состава проводится при самых разнообразных биохимических исследованиях: от клинического анализа белков плазмы крови до изучения белкового состава субклеточных структур, изменений в спектре вновь синтезируемых белков и при характеристике очищенных белковых препаратов. Применение предложенного около 20 лет назад [3, 4] и ставшего теперь уже рутинным диск-электрофореза в ПААГ сделало возможным разделение сложных белковых смесей

в ходе одного анализа на десятки фракций. ПААГ образуется в широком диапазоне концентраций акриалмида, обеспечивая получение большого разнообразия «молекулярных сит» с заранее заданными свойствами [5—7], и этот метод входит почти как обязательный компонент в арсенал изучающих биохимию белков.

В 1970 г. Кальтшмидг и Виттманн [8, 9] разработали метод двумерного электрофореза в ПААГ для фракционирования рибосомных белков. Их метод существенно повысил разрешающую способность анализа — до 50—80 отдельных фракций, значительно поднял уровень исследований рибосомных белков, поскольку обеспечил получение фракций, соответствующих индивидуальным белкам рибосом [10—13]. В типичных модификациях двумерного электрофореза в ПААГ высокая разрешающая способность достигается благодаря тому, что в первом и втором направлении используются разные буферные системы, вследствие чего электрофоретическая подвижность белков в первом и втором направлении существенно различается и неразделяемые в первом направлении компоненты становятся разделяемыми во втором. Использование

такого метода оказалось очень эффективным в тех случаях, когда белки обладают сходными свойствами (Например, большая часть рибосомных белков имеет молекулярную массу в диапазоне 10 000—50 000 и изоэлектрические точки в щелочной зоне рН.) В то же время, если в белковой смеси имеются и щелочные и кислые белки, то добиться эффективного их анализа в одной методике было достаточно сложно (например, при анализе кислых рибосомных белков [13, 14]). Вариации в используемых модификациях двумерного электрофореза в настоящее время настолько широки, что даже для одной группы белков (рибосомных) получаются различные картины распределения. Это привело к появлению ряда исследований, в которых авторы проводят сопоставление результатов, полученных разными методиками, и стараются идентифицировать каждое пятно на электрофореграмме [15—18]. Задача идентификации пятен, как будет видно из дальнейшего, является одной из важнейших и при использовании метода О'Фаррелла.

Существенный прогресс в области фракционирования белковых смесей был достигнут после того, как в середине 70-х годов О'Фаррелл [1, 2] предложил свой оригинальный метод двумерного электрофореза в ПААГ, позволяющий в ходе одного анализа изучать как кислые, так и основные белки с очень высокой разрешающей способностью. При анализе грубых экстрактов этим методом было выявлено более 1000 фракций, и разрешающая способность его могла достигать даже 5000 фракций. В 1978 г. Андерсон и Андерсон [19, 20] разработали и описали систему «Изодалт», позволяющую автоматизировать процесс приготовления гелей и проведения анализа. Это дало им возможность сообщить в 1980 г., что с помощью данной системы в их лаборатории может проводиться до 100 анализов белковых смесей в день, и благодаря такой производительности и высоко разрешающей способности метода они приступают к систематическому картированию генов продуктов человека [21]. В том же году Блох и соавт. [22, 23] опубликовали данные об идентификации 81 и 55 белков *E. coli* после электрофореза по методу О'Фаррелла.

Получение большого количества пятен на электрофореграммах потребовало нового подхода к их анализу. В итоге по-

явились публикации о разработке методов и программ для компьютерной обработки результатов фракционирования белков, позволяющих получать не только качественные, но и количественные их характеристики [24—28]. Границы применения метода быстро расширяются, захватывая различные области биохимии — от анализа белков мочи [29] до изучения белков, синтезирующихся при вирусной инфекции [30, 31]. В зарубежной литературе уже появились первые обзоры об особенностях и результатах применения данного метода [26, 29, 32], однако эти вопросы еще не нашли достаточного отражения в отечественной литературе.

Основные принципы фракционирования белков по методу О'Фаррелла и краткое описание метода

Метод О'Фаррелла состоит из двух этапов, во время каждого из которых происходит разделение белков в ПААГ, но на основе различных независимых свойств. Благодаря этому белковые пятна распределяются практически по всей поверхности пластины геля, тогда как при применении иных систем двумерного электрофореза белковые пятна локализуются обычно около диагонали пластины. Следствием отмеченной особенности системы О'Фаррелла и является очень высокая разрешающая способность.

Первый этап (направление) представляет собой особый вид электрофоретического разделения — изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ). Метод ИЭФ был разработан шведскими биохимиками в 60-х годах [33, 34]. Поскольку белки являются амфолитами, их заряд определяется как аминокислотным составом, так и рН среды. В условиях стабильного градиента рН под действием электрического поля молекулы белка мигрируют в зону, где суммарный заряд белковой молекулы становится равным нулю, т. е. белки фокусируются. Распределение белков в среде, таким образом, происходит в соответствии с их изоэлектрическими точками (рI). Для создания стабильного градиента рН был предложен набор синтетических низкомолекулярных полиаминополикислот — амфолинов. Первоначально ИЭФ проводили в вертикальных колонках, где для предотвращения перемешивания зон со-

здавался градиент плотности сахарозы. Однако вскоре был разработан аналитический вариант — фракционирование в колонке ПААГ, подобной той, которая используется для диск-электрофореза [35]. Именно этот несколько модифицированный вариант применил О'Фаррелл для фракционирования белков в первом направлении. Гель формировался в трубках длиной 13 см и внутренним диаметром 2,5 мм. Малый диаметр геля способствует созданию узкой стартовой зоны при электрофорезе во втором направлении. В полимеризационной смеси содержалось 3,8% акриламида, 0,2% бисакриламида, 9 М мочевины, 2% нопидет Р-40, 2% амфолинов. Для полимеризации добавляли ТЕМЕД и персульфат аммония. В качестве анодного и катодного растворов использовали 0,01 М H_3PO_4 и 0,02 М NaOH. В первой работе О'Фаррелл [1] применял предварительное создание градиента рН в геле, для чего проводился презлектрофорез по следующей схеме: 200 В — 15 мин, 300 В — 30 мин, 400 В — 30 мин. Затем после отключения источника тока на катодный конец гелевой колонки насаивался образец объемом 10—20 мкл и фракционирование проводилось при напряжении 400 В 12 ч и еще 1 ч при напряжении 800 В. Высокая концентрация мочевины и присутствие детергента в полимеризационной смеси предупреждали преципитацию белков при ИЭФ в зонах рН, соответствующих рI. Следует отметить, что введение амфолинов в полимеризационную смесь замедляет полимеризацию акриламида.

Предполагалось, что использование амфолинов, обеспечивающих создание градиента рН от 3,0 до 10,0, позволит фракционировать белки, широко различающиеся по рI, и вместе с тем даст достаточно хорошее разделение белков с близкими рI. Однако в последующем было показано, что данная методика позволяет успешно фракционировать лишь белки с рI от 4 до 7, умеренно основные белки разделялись плохо, а сильно основные белки даже элюировались с геля [2, 36]. Чтобы сделать метод более универсальным, О'Фаррелл и соавт. [2] разработали новый способ фракционирования белков в первом направлении, названный ими неравновесным электрофорезом в градиенте рН (nonequilibrium рН gradient electrophoresis — «NEPHGE»). Авторы показали, что при

длительном действии электрического поля (необходимом для полного фокусирования белков) градиент рН в щелочной зоне разрушается и не обеспечивает вследствие этого хорошего разделения. Вместе с тем, если образец наносится со стороны кислотного резервуара и мигрирует по направлению к катоду, то за достаточно короткое время можно получить хорошее разделение компонентов. О'Фаррелл и соавт. [2] рекомендовали в качестве стандартных условий напряжение 1600 В-час (400 В в течение 4 ч), снижая его до 1200 В-ч в случае преобладания основных белков и повышая до 2000 В-ч для кислых белков. Метод О'Фаррелла с модифицированным таким образом первым направлением был недавно использован для эффективного фракционирования гистонов и основных негистоновых белков [37]. Точный механизм фракционирования белков при методе «NEPHGE» остается недостаточно изученным [2]. Чтобы добиться точного воспроизведения результатов при анализе белков, как указывает О'Фаррелл [1], необходимо строго контролировать длину гелей, в которых проводится ИЭФ. Этот параметр можно стандартизировать, используя проведение ИЭФ на пластинах ПААГ, которые затем разрезаются на узкие полоски и обрабатываются далее как обычные цилиндрические гелевые колонки [38].

Для разделения белков во втором направлении О'Фаррелл использовал хорошо известный метод электрофореза белков в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) [5—7]. Связывание SDS с молекулами различных белков приводит к нивелированию различий в зарядах и поэтому электрофоретическая подвижность в данных условиях в основном зависит от молекулярной массы. Таким образом, если фракционирование в первом направлении определяется различиями рI, то во втором — различиями молекулярной массы. К настоящему времени опубликован ряд исследований по подбору оптимальных условий для разделения белков электрофорезом в ПААГ [39—41] и показана целесообразность применения гелей, параметры «молекулярного сита» которых линейно меняются по длине геля. Такие гели формируются из двух полимеризационных смесей с разным содержанием акриламида с помощью двухкамерного смесителя как обычный градиент концентрации, а за-

тем полимеризуются. В своем методе О'Фаррелл проводил анализ во втором направлении в пластинке геля (размером 13×16 см) с градиентом концентрации акриламида 5—22,5%. Соотношение акриламида и бисакриламида было постоянным. Эти характеристики близки к оптимальным теоретически обоснованным значениям [7, 40, 41]. Некоторые авторы, модифицируя метод О'Фаррелла, используют гель без градиента концентрации акриламида [42].

Для проведения электрофореза во втором направлении гель, полученный после электрофореза в первом направлении, помещали на 2 ч в 0,0625 М трис-HCl буфер pH 6,8, содержащий 10% глицерина, 5% 2-меркаптоэтанола и 2,3% SDS, а затем фиксировали к торцу приготовленной заранее пластины ПААГ с помощью 1% агарозного геля. Электрофорез во втором направлении обычно проводят при токе 20 мА в течение 5 ч, используя в качестве маркера бромфеноловый синий [1, 2, 43].

Внесение слишком большого количества белка в анализируемую пробу (свыше 100 мкг), модификации белков во время выделения и при хранении образцов перед анализом, снижение концентрации мочевины и детергента в геле первого направления приводят к артефактной множественности пятен, появлению размытых и перекрывающих друг друга пятен и т. д. В то же время строгое выполнение условий фракционирования обеспечивает высокую воспроизводимость: по оценке автора абсолютные позиции пятен в параллельных анализах менялись менее чем на 2 мм [1].

Почти одновременно с О'Фарреллом двумерный электрофорез для фракционирования белков, представляющий собой комбинацию ИЭФ и SDS-ЭФ, был применен Шеле [44]. Наиболее существенное различие по сравнению с методом О'Фаррелла заключалось в том, что гели для ИЭФ в методе Шеле не содержали мочевины и нолидета Р-40, но содержали 12% раствор сахарозы. Таким образом, применение данного метода ограничивалось хорошо растворимыми белками, не преципитирующими в изоэлектрических точках. Достоинством метода является то, что после его применения удается определить ферментативную активность в получаемых фракциях.

В 1978 г. Зингер и соавт. [45] предложили еще одну систему двумерного

электрофореза, основанную на тех же принципах, что и метод О'Фаррелла. Различие заключалось в изменении порядка этапов фракционирования: по методу Зингер и соавт. [45] сначала белки разделяют SDS-ЭФ в гелевых колонках, а затем ИЭФ на пластине геля. Вероятно, эта система обеспечивает хорошую стандартизацию условий ИЭФ.

В заключение надо отметить, что в настоящее время фракционирование белков двумерным электрофорезом, представляющим собой сочетание ИЭФ и SDS-ЭФ, в подавляющем большинстве работ проводится по методу О'Фаррелла.

Методы выявления пятен и подходы к их идентификации

В большинстве исследований, проводившихся методом О'Фаррелла, обнаружение пятен белков на пластинах после разделения проводилось автордиографически [1, 2, 30, 36, 31]. Белковые препараты метили *in vivo* чаще всего ^{14}C или ^{35}S , что позволяло определять белки в количествах до 10^{-4} — $10^{-5}\%$ от суммарного белка. Обычно используемые методы окрашивания гелей оказались непригодными из-за того, что комплексы амфолин—SDS, образующиеся при обработке гелей первого направления 2% раствором, давали после электрофореза во втором направлении характерное распределение на пластине, связывали красители и тем самым мешали выявлению пятен белков [1]. Нивелирования этого эффекта можно добиться путем вымачивания пластины геля в 50% растворе этанола, содержащем 7% уксусной кислоты и 0,005% кумасси голубого, в течение 36 ч с последующим окрашиванием раствором кумасси голубого. Однако и в этом случае сохранялось, хотя и незначительное фоновое окрашивание. С помощью окраски кумасси голубым удавалось выявлять белки, содержание которых составляло $10^{-2}\%$ от суммарного белка — всего 400 пятен [1].

Применение очень чувствительного метода автордиографии ограничивается требованием использования для анализа меченых белков, т. е. необходимостью введения меченых аминокислот *in vivo* перед анализом. Вместе с тем в литературе описан ряд методов введения метки в белки *in vitro* с целью использования меченых производных для

детектирования положения зон белков после электрофореза [46—48]. Например, Шинг Йен и Рухо [46] применили введение ^{125}I за счет модификации лизиновых остатков в белках и отметили, что их способ позволяет улавливать до 1 нг белка. В 1981 г. Фингер и Чоо Конг [47] специально для выявления белковых зон при фракционировании по методу О'Фаррелла предложили восстановление метилирование ^{14}C -формальдегидом и NaB^3H_4 . В основе данной методики также лежит модификация лизиновых остатков в белках. Отмечая высокую чувствительность выявления белков при указанных методиках, можно думать, что модификации белков до фракционирования вызовут определенные изменения в их распределении при ИЭФ. Иной путь введения метки избрали Кристофер и соавт. [48]. Они обрабатывали гели после электрофореза и с помощью хлорамина Т включали в белки ^{125}I . При этой методике связывание метки определяется присутствием остатков тирозина в белках, молекулы, не содержащие или содержащие малые количества тирозина, должны плохо выявляться.

В качестве замены автордиографии предложено также использование флюоресцентных красителей [49]. Авторы после фиксации и отмывки пластин от амфолинов 10% раствором уксусной кислоты, содержащим 50% метанола, обрабатывали гели флюорескаминоном в среде диметилсульфоксида. При этом методе не образуется флюоресцирующего фона — флюоресцируют только продукты взаимодействия белков с флюорескаминоном, и, следовательно, не требуется отмывки от несвязавшегося красителя. Чувствительность метода не уступает окрашиванию кумасси голубым.

Недавно Меррил и соавт. [50, 51] разработали новый подход для выявления белковых пятен при фракционировании методом О'Фаррелла. Основываясь на опыте гистологических исследований, они предложили использовать реакцию белков с ионами серебра. Последняя модификация их метода включает 6 этапов обработки пластины: 1) фиксация гелей в 50% растворе метанола — 12% растворе уксусной кислоты; 2) отмывка в 10% растворе этанола — 5% растворе уксусной кислоты; 3) обработка 0,5% раствором $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$; 4) промывка в воде; 5) обработка красителем (0,2 г AgNO_3 , 0,2 г NH_4NO_3 , 0,5 мл 37%

раствора формальдегида и 0,06 мг бензотриазола, растворенные в 100 мл H_2O); 6) обработка 3% раствором соды, содержащим 0,5 мл 37% раствора формальдегида и 0,6 мг бензотриазола в 1 л. Окраску и промывание гелей проводили при освещении вольфрамовой лампой накаливания мощностью 1500 Вт. Реакцию останавливали удалением раствора соды и замачиванием геля в 1% растворе уксусной кислоты. Время обработки составляло около 50 мин. Чувствительность этого метода близка к таковой автордиографии и превышала чувствительность окраски кумасси голубым более чем в 100 раз. Можно ожидать, что применение подобных высокочувствительных и специфичных методов выявления белковых пятен позволит уменьшить количество белка, необходимого для анализа, и повысить разрешающую способность фракционирования.

Большое количество пятен, получаемое при анализе по методу О'Фаррелла, вынуждает проводить эксперименты по контролю стандартизации условий. К настоящему времени группой американских авторов разработаны методы оценки стандартизации разделения и в первом и во втором направлении [21, 52]. Они использовали реакцию карбамилрования стандартного белка для получения продуктов модификации, характеризующихся при одинаковой молекулярной массе различными $p\text{I}$. В ходе реакции происходило постепенное блокирование остатков лизина, что позволяло при соответствующих условиях приготовить смесь всех продуктов модификации, которые составляли как бы целый ряд белков. Соседние члены этого ряда различались лишь одним остатком немодифицированного лизина. С помощью такого ряда рекомендуется проводить стандартизацию фракционирования в первом направлении (ИЭФ). Например, Андерсен и Хикман [52] для креатинфосфокиназы из мышц кролика получили 36 отдельных пятен, что хорошо соответствует расчетному количеству (35 остатков лизина + 1). Эти данные наглядно показывают, что фракционирование методом О'Фаррелла позволяет разделять белки, суммарный заряд которых отличается лишь на 1. С другой стороны, очевидна необходимость использования очень чистой мочевины для предупреждения артефактной модификации анализируемых образцов. Надо отметить, что некоторые авторы

для защиты белков от такой модификации вводят в растворы, содержащие мочевины, лизин в 50 мМ концентрации [53].

Стандартизация анализа во втором направлении проводилась с помощью набора белков из сердца крыс [21]. Для этой цели готовили 5% гомогенат на 0,125 М трис-HCl буфере pH 6,8, содержащем 1% SDS и 0,5% дитиотриэтола, отфильтровывали и смешивали с равным объемом 1,4% агарозного раствора, приготовленного на том же буфере. Пробы, содержащие 2,5—20 мг ткани в 1 мл, хранили при -20°C до 12 мес. При фракционировании во втором направлении эти препараты давали до 80 полос, из которых 12 были наиболее выраженными и использовались как маркеры. Их молекулярная масса варьировала от 15 200 до 220 000 дальтон.

Значительный успех в расшифровке электрофоретических картин достигнут к настоящему времени при изучении бактериальных белков. Как уже отмечалось выше, группе исследователей удалось идентифицировать положение на пластине 136 белков *E. coli* среди более 1000 пятен, получаемых при анализе методом О'Фаррелла суммарного белкового препарата [22, 23]. Положение пятен определяли в прямоугольной системе координат (x, y), а их идентификацию проводили с использованием ряда подходов. В частности использовали миграцию очищенных препаратов белков (они служили маркерами), выявляли изменения положения или количества материала в пятне у соответствующих мутантов, анализировали штаммы, несущие плазмиды с изучаемым признаком, учитывали физиологические свойства белков, получали пептидные карты образцов [22, 23]. Среди уже идентифицированных белков находятся ряд важных ферментов, а также различные структурные белки. Таким образом, можно заключить, что сделан первый шаг в направлении прямого изучения всех белков, кодируемых геномом *E. coli*. Количество таких белков, по оценке Уотсона, должно составлять около 2500 [54], а разрешающая способность метода, по мнению О'Фаррелла, достаточна для решения данной задачи [1, 2].

Некоторые приложения метода О'Фаррелла

Поскольку пятна, получаемые на пластинках ПААГ при анализе белков методом О'Фаррелла, по-видимому, в большинстве случаев соответствуют индивидуальным белкам (по расчетам пятно, содержащее 0,1 % от общего белка, имеет не более 10% примесей [1]), этот метод дает возможность поднять на новый, более высокий уровень самые разнообразные исследования состава белков из разных источников и его изменений. О'Фаррелл и другие исследователи [1, 2, 22, 23, 36] рассматривают метод как важный инструмент в разного рода генетических исследованиях. Уже проведен ряд работ по изучению изменений состава белков бактерий и простейших при мутациях [22, 23, 36].

Известно, что при вирусных инфекциях в зараженных клетках происходит синтез новых белков, кодируемых нуклеиновыми кислотами вирусов, и что выявление этих белков, изучение динамики их накопления весьма важны для характеристики этого процесса. Некоторые авторы использовали метод О'Фаррелла в такого рода работах [30, 31]. Полученные результаты говорят о высоких потенциальных возможностях применения метода в вирусологических исследованиях.

Одним из отражений процессов дифференцировки являются изменения спектра белков в дифференцирующихся клетках, при этом особый интерес представляют изменения ядерных белков, которым приписывают регуляторную роль [55, 56]. Для анализа чрезвычайно сложной по составу популяции ядерных белков высокоразрешающий метод О'Фаррелла применили несколько групп исследователей [57—61]. В результате были отмечены изменения в синтезе некоторых негистоновых белков при обработке клеток веществами, стимулирующими деление. Нейцманн и соавт. [53] во время дифференцировки нервных клеток наблюдали изменения в спектре синтезируемых тотальных ядерных и негистоновых белков, в частности, отметили, что с прекращением пролиферации коррелирует появление двух новых сильно основных белков с молекулярной массой 35 000 и 38 000. Опубликовано также исследование состава ядерных белков из 4 видов нормальных и 4 видов опухолевых кле-

ток человека [62]. Авторы выявили 2 белка, которые встречались во всех видах опухолевых клеток и не присутствовали ни в одном виде нормальных клеток.

Двумерным электрофорезом по методу О'Фаррелла Гаррелс [27] провел анализ около 300 белков, синтезируемых клонированными линиями клеток В-103 (нервные клетки) и В-9 (глиальные клетки). Ни в одной линии не было обнаружено качественных изменений в стационарной фазе роста, хотя количественные изменения в отдельных фракциях были весьма значительными, иногда в 15 раз. Аффара и соавт. [63] методом О'Фаррелла изучали синтез мышечных белков в процессе дифференцировки мышечных миогенных клеток и им удалось выявить на стадии слияния клеток на фоне усиления синтеза главных сократительных белков появление некоторых новых белков и потерю или уменьшение ряда белков, синтезируемых мононуклеарными клетками.

В 1980 г. появилось сообщение об использовании метода О'Фаррелла для изучения изменений легких цепей миозина человека в процессе развития [42]. В том же году Холланд и соавт. [64] представили данные о сравнительном изучении белков плазматических мембран нормальных и дистрофических мышечных клеток.

Уже с 1977 г. начаты исследования методом О'Фаррелла белков плазмы крови [43], а затем и других биологических жидкостей [29, 50]. Двумерным электрофорезом, представляющим собой сочетание ИЭФ и SDS-ЭФ, несколько лет проводится изучение белкового состава сока поджелудочной железы [44, 65]. В 1981 г. Шеле и соавт. [65] идентифицировали на пластинах геля пятна, соответствующие трем формам трипсиногена, по двум формам прокалбопептидазы Б, проэластазы и колипазы, по одной форме амилазы, липазы, химотрипсиногена и профосфолипазы А₂.

Из представленных данных видно, что сейчас широким фронтом ведутся исследования белков с помощью метода О'Фаррелла, который обеспечивает существенно большее разрешение фракционирования белков, а следовательно, не только увеличивает количество информации, но и дает качественно новые сведения об изменениях белков при различных процессах. Можно думать, что с внедрением автоматизированных систем для анализа белковых смесей по методу

О'Фаррелла в сочетании с применением высокочувствительных методов выявления белковых пятен и компьютерным анализом результатов будут получены новые сведения об изменениях белков, которые нужны и для расшифровки различных физиологических и патологических процессов, и для диагностики, и для поиска новых путей лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. O'Farrell P. H. — J. biol. Chem., 1975, v. 250, p. 4007—4021.
2. O'Farrell P. Z., Goodman H. M., O'Farrell P. H. — Cell, 1977, v. 12, p. 1133—1142.
3. Raymond S. V., Weintraub L. S. — Science, 1959, v. 130, p. 711.
4. Davis B. J. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964, v. 121, p. 404—427.
5. Майзель Дж. — В кн.: Методы вирусологии и молекулярной биологии. М., 1972, с. 267—293.
6. Маурер Г. Диск-электрофорез. М., 1971.
7. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование. М., 1981.
8. Kaltschmidt E., Wittmann H. G. — Analyt. Biochem., 1970, v. 36, p. 401—412.
9. Kaltschmidt E., Wittmann H. G. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1970, v. 67, p. 1276—1282.
10. Kaltschmidt E., Stöffler G., Dzionata M. et al. — Molec. gen. Genet., 1970 v. 109, p. 303—308.
11. Wittmann H. G., Stöffler S., Hindennach J. et al. — Ibid., 1971, v. 111, p. 327—333.
12. Westermann P., Bielka H. — Acta biol. med. germ., 1974, Bd 33, S. 531—537.
13. Sherton C. C., Wool I. G. — J. biol. Chem., 1972, v. 247, p. 4460—4467.
14. Cox R. A. — Progr. Biophys. molec. Biol., 1977, v. 32, p. 193—231.
15. Welfle H., Goerl M., Bielka H. — Molec. Gen. Genet., 1978, v. 163, p. 101—112.
16. Madjar J. J., Arpin M., Buisson M. et al. — Ibid., 1979, v. 171, p. 121—134.
17. Madjar J. J., Traut R. R. — Ibid., 1980, v. 179, p. 89—101.
18. Otake E., Osawa S. — Ibid., 1981, v. 181, p. 176—182.
19. Anderson N. G., Anderson N. L. — Analyt. Biochem., 1978, v. 85, p. 331—340.
20. Anderson N. L., Anderson N. L. — Ibid., p. 341—354.
21. Giometti C. S., Anderson N. G., Tollaksen S. L. et al. — Ibid., 1980, v. 102, p. 47—58.
22. Bloch P. L., Phillips T. A., Neidhardt F. C. — J. Bact., 1980, v. 141, p. 1409—1420.
23. Phillips T. A., Bloch P. L., Neidhardt F. C. — Ibid., v. 144, p. 1024—1033.
24. Lipkin L. E., Lemkin P. F. — Clin. Chem., 1980, v. 26, p. 1403—1412.
25. Garrels G. I., Schaubert D. — J. biol. Chem., 1979, v. 254, p. 7678—7985.
26. Garrels J. I. — Trends Biochem. Sci., 1980, v. 5, p. 281—283.
27. Garrels J. I. — J. biol. Chem., 1979, v. 254 p. 7961—7977.
28. Bossinger J., Miller M. J., Kiem-Prong Vo

- et al. — Ibid., p. 7986—7998.
29. Anderson N. G., Anderson N. L., Tollaksen S. L. — Clin. Chem., 1979, v. 25, p. 1199—1210.
 30. Wiegers K. J., Dernick R. — J. gen. Virol., 1981, v. 52, p. 61—69.
 31. Haar L., Marsden H. S. — Ibid., p. 77—92.
 32. Lester E. P., Lemkin P. F., Lipkin L. E. — Analyt. Chem., 1981, v. 53, p. 390A, 404A.
 33. Svensson H. — Acta chem. scand., 1962, v. 16, p. 456—466.
 34. Haglund H. — Sci. Tools., 1967, v. 14, p. 17—4.
 35. Righetti P., Dzysdale J. W. — Biochim. biophys. Acta, 1971, v. 236, p. 17—28.
 36. Piperno G., Huang B., Luck D. J. L. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, p. 1600—1604.
 37. Smith G. J. — Analyt. Biochem., 1981, v. 111, p. 97—104.
 38. Ferreira A., Eichinger D. — J. Immunol. Meth., 1981, v. 43, v. 291—299.
 39. Brackenridge C. J., Bacherlard H. S. — J. Chromatogr., 1969, v. 41, p. 242—249.
 40. Chrambach A. — Molec. cell. Biochem., 1980, v. 29, p. 23—46.
 41. Podusto J. F., Rodbard D. — Analyt. Biochem., 1980, v. 101, p. 394—406.
 42. Price K. M., Littler W. A., Cummins P. — Biochem. J., 1980, v. 191, p. 571—580.
 43. Anderson N. L., Anderson N. G. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, p. 5421—5425.
 44. Scheele G. — J. biol. Chem., 1975, v. 250, p. 5375—5385.
 45. Singer B. S., Morresett H., Gold L. — Analyt. Biochem., 1978, v. 85, p. 224—229.
 46. Shing Yuen W., Ruoho A. — Ibid., 1981, v. 110, p. 171—175.
 47. Finger J. M., Ghoo Kong H. — Biochem. J., 1981, v. 193, p. 371—374.
 48. Christopher A. R., Nagpal M. L., Carroll A. R. et al. — Analyt. Biochem., 1978, v. 85, p. 404—412.
 49. Jackowski G., Liew C. C. — Ibid., 1980, v. 102, p. 321—325.
 50. Merril C. R., Switzer R. C., Van Keuren M. J. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, p. 4335—4339.
 51. Merril C. R., Dunau M. L., Goldman D. — Analyt. Biochem., 1981, v. 110, p. 201—207.
 52. Anderson N. L., Hickman B. J. — Ibid., 1979, v. 93, p. 312—320.
 53. Heizmann C. W., Arnold E. M., Kuenzle C. C. — J. biol. Chem., 1980, v. 255, p. 11504—11511.
 54. Уотсон Дж. Д. Молекулярная биология гена. М., 1978.
 55. Wang T. Y., Kostrava N. C. — In: The Cell Nucleus. Ed. H. Busch. New York, 1978, v. 4, p. 289—317.
 56. Saffer J. D., Coleman J. E. — Biochemistry (Wash.), 1980, v. 19, p. 5874—5883.
 57. Man Nguyen Thi, Cole R. J., Morris C. E. — Exp. Cell. Res., 1980, v. 126, p. 375—382.
 58. Man Nguyen Thi, Morris G. E., Cole R. J. — Ibid., p. 383—390.
 59. Lester E. P., Lemkin P., Lipkin L. et al. — Clin. Chem., 1980, v. 26, p. 1392—1402.
 60. O'Farrell M. K., Dixon C. — Europ. J. cell. Biol., 1980, v. 22, p. 113.
 61. Stott D. I. — Biochim. biophys. Acta, 1980, v. 610, p. 371—383.
 62. Wu B. C., Spohn W. H., Busch H. — Cancer Res., 1981, v. 41, p. 336—342.
 63. Affara N. A., Daubas P., Weydert A. et al. — J. molec. Biol., 1980, v. 140, p. 459—470.
 64. Holland P. C., Cates G. A., Wenger B. S. et al. — Canad. Biochem., 1980, v. 58, p. 1156—1164.
 65. Scheele G., Bartelt D., Bieger W. — Gastroenterology, 1981, v. 80, p. 461—473.

Поступила 01.03.82

УДК 616.33-006.6-085.277.3.015.21:615.356.577.164.2 •033.1:616-006.6-008.939.633.2

М. П. Шлемкевич

ВЛИЯНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ВКЛЮЧЕНИЕ (6-³H)-5-ФТОРУРАЦИЛА В РНК ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ РАКА ЖЕЛУДКА, НЕИЗМЕНЕННУЮ СЛИЗИСТУЮ ЖЕЛУДКА И СЛИЗИСТУЮ ТОНКОЙ КИШКИ IN VITRO

Кафедра биохимии Львовского медицинского института

5-Фторурацил применяется при адьювантной химиотерапии больных, у которых удалены раковые опухоли желудка. Однако к 5-фторурацилу оказывается чувствительной только одна треть опухолей, остальные опухоли устойчивы к препарату, и применение 5-фторурацила у таких больных сопровождается углублением токсических проявлений. Предпринимаются попытки повышения эффективности действия 5-фторурацила у больных путем совместного применения препарата с инозином [1, 2] или тимидином [3, 4]. В литературе [5] имеются

данные о том, что аскорбиновая кислота значительно усиливает включение 5-фторурацила в культуру клеток нейробластомы человека in vitro и способствует более эффективному действию этого препарата на опухолевые клетки.

Настоящая работа посвящена изучению действия аскорбиновой кислоты на поступление меченого 5-фторурацила в кислоторастворимую фракцию (КРФ) и его включение в РНК препаратов раковых опухолей желудка, неизменной слизистой желудка и слизистой тонкой кишки.

Исследования проводили на препаратах раковых опухолей желудка (20 препаратов), неизменной слизистой желудка (12 препаратов) и слизистой тонкой кишки (8 препаратов), удаленных в хирургических стационарах. Интенсивность поступления меченого $[6\text{-}^3\text{H}]\text{-}5\text{-фторурацила}$ в КРФ и включения в РНК изучали в переживающих срезах раковых опухолей желудка и в культурах ткани слизистой в среде Игла. В контрольные пробы вносили по 100 мг переживающих срезов или по 50 мг культуры ткани слизистой при дозе $[6\text{-}^3\text{H}]\text{-}5\text{-фторурацила}$ (удельная активность 5,3 Ки/мМ, СССР) 1 мКи. В опытные пробы, кроме меченого 5-фторурацила, вносили по 20 мкг аскорбиновой кислоты, предварительно нейтрализованной щелочью. После 30 и 60 мин инкубации в ультратермостате при постоянном перемешивании опухолевые срезы и культуру ткани слизистой дважды промывали охлажденным 0,14 М NaCl и гомогенизировали в охлажденных фарфоровых чашках с кварцевым песком. Экстракцию КРФ, липидов и разделение РНК и ДНК проводили по методу Шмидта — Тангаузера [6]. Нуклеиновые кислоты определяли спектрофотометрически по Спирину [7]. Радиоактивность проб измеряли на жидкостном сцинтиляционном счетчике типа МАРК-Ш. Результаты обработаны методом вариационной статистики.

Результаты и обсуждение

Ранее нами было установлено [8, 9], что поступление меченого 5-фторурацила в КРФ и его включение в РНК раковых опухолей зависят от степени чувствительности этих опухолей к действию данного препарата: чувствительные к 5-фторурацилу опухоли интенсивно включали меченый препарат; с увеличением времени инкубации (с 30 до 60 мин) это включение заметно возрастало. В устойчивых к 5-фторурацилу опухолях включение метки было менее интенсивным, а с увеличением времени

инкубации интенсивность включения уменьшалась, что может свидетельствовать о нарушении транспорта 5-фторурацила в устойчивые к этому препарату опухоли. Установленные нами закономерности были использованы для определения индивидуальной чувствительности опухолей к действию 5-фторурацила.

В соответствии с этими данными исследуемые нами раковые опухоли желудка были разделены на чувствительные и устойчивые к действию 5-фторурацила (табл. 1).

У чувствительных к действию этого препарата раковых опухолей желудка под влиянием аскорбиновой кислоты поступление меченого препарата в КРФ увеличивалось примерно на 60%, а включение препарата в РНК — на 50—90 %; в устойчивых к препарату опухолях это увеличение было также заметным и составляло около 25 % в КРФ и около 50 % в РНК по сравнению с контрольными данными. Такой выраженный стимулирующий эффект аскорбиновой кислоты на включение 5-фторурацила в РНК даже в устойчивых опухолях желудка заслуживает внимания и должен быть использован при лечении больных с устойчивыми к 5-фторурацилу опухолями.

Поступление меченого 5-фторурацила в КРФ культуры слизистой желудка в первые 30 мин инкубации было высоким и составляло в среднем 288 нмоль/мин на единицу оптической плотности КРФ. В последующие 30 мин исследования поступление препарата в КРФ заметно снижалось. Кинетика поступления 5-фторурацила в КРФ напоминала тип поступления препарата в устойчивые к 5-фторурацилу опухоли. Та-

Таблица 1

Влияние аскорбиновой кислоты на включение $6\text{-}^3\text{H}\text{-}5$ в КРФ и РНК опухолевой ткани рака желудка ($M \pm m$)

Объект исследования	Тип опухоли	Число исследований	Без аскорбиновой кислоты		В присутствии аскорбиновой кислоты	
			продолжительность инкубации, мин			
			30	60	30	60
КРФ, нмоль/мин на ед. опт. пл.	Чувствительные к 5-фторурацилу Устойчивые к 5-фторурацилу	7	53,5±5,72	102±9,67	87,6±8,31	166±17,2
		13	23,2±2,71	31,4±3,31	29,2±3,72	39,2±4,33
РНК, нмоль/мин на 1 мг РНК	Чувствительные Устойчивые	7	2,03±0,27 1,58±0,18	3,77±0,42 1,73±0,25	3,82±0,37 2,31±0,22	5,57±0,61 2,58±0,27

Влияние аскорбиновой кислоты на включение 6-³H-5 в КРФ и РНК слизистой желудка и слизистой тонкой кишки ($M \pm m$)

Объект исследования	Ткань	Число исследований	Без аскорбиновой кислоты		В присутствии аскорбиновой кислоты	
			продолжительность инкубации, мин			
			30	60	30	60
КРФ, нмоль/мин на ед. опт. пл.	Слизистая желудка	12	28±29,2	196±20,1	385±37.4	28±28,3
	Слизистая тонкой кишки	8	253±27,3	321±35,6	322±35,6	376±40,9
РНК, нмоль/мин на 1 мг РНК	Слизистая желудка	12	4,5±0,39	3,6±0,37	4,9±0,52	4,1±0,37
	Слизистая тонкой кишки	8	5,7±0,64	7,1±0,87	7,1±0.60	8,3±0,97

кие же закономерности наблюдались и для включения 5-фторурацила в РНК культуры слизистой желудка (табл. 2).

Под влиянием аскорбиновой кислоты поступление 5-фторурацила в КРФ слизистой желудка увеличивалось в среднем на 35 %, а включение препарата в РНК возрастало незначительно — всего 8—13 % по сравнению с контрольными данными. В некоторых культурах ткани слизистой желудка стимулирующий эффект витамина С на включение 5-фторурацила в РНК не был установлен вообще.

Поступление 5-фторурацила в КРФ культуры ткани слизистой тонкой кишки составляло 253 нмоль/мин на единицу оптической плотности КРФ при 30 мин инкубации, в последующие 30 мин инкубации поступление препарата в КРФ увеличивалось примерно на 26 %. Такие же закономерности были выявлены и для включения препарата в РНК слизистой тонкой кишки.

Аскорбиновая кислота усиливала поступление меченого 5-фторурацила в КРФ примерно на 16—24 %, включение препарата в РНК также увеличивалось на 17—26% по сравнению с контрольными данными. Усиливающий эффект витамина С на включение 5-фторурацила в РНК слизистой тонкой кишки особенно был замечен в первые 30 мин инкубации.

Таким образом, при изучении поступления меченого 5-фторурацила в КРФ и включения препарата в РНК раковых опухолей желудка, культуры ткани слизистой желудка и тонкой кишки установлен выраженный стимулирующий эффект аскорбиновой кислоты на этот

процесс в раковых опухолях желудка, даже устойчивых к препарату, что указывает на избирательность действия витамина С на включение препарата в опухолевую ткань. Этот стимулирующий эффект был значительно меньше выражен в культуре ткани слизистой тонкой кишки и совсем незначителен в культуре ткани слизистой желудка.

Стимулирующий эффект аскорбиновой кислоты на включение меченого 5-фторурацила в РНК раковых опухолей желудка дает основание рекомендовать применение аскорбиновой кислоты при адъювантной химиотерапии с целью усиления действия 5-фторурацила у больных с устойчивыми к этому препарату опухолями.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cory J. G., Crumley J., Wilkinson D. S. — Proc. Am. Ass. Cancer Res., 1977, v. 18, p. 13.
2. Cory J. G., Breland J. S., Carter G. L. — Cancer Res., 1979, v. 39, p. 4905—4913.
3. Mortin D. S., Stolfi R. L., Sawyer A. C. et al. — Cancer (Philad), 1980, v. 45, N 5, Suppl., p. 1117—1128.
4. Woodcock Th. M., Martin D. S., Damin L. A. M. et al. — Ibid., p. 1135—1143.
5. Prasad K., Sinha P. K., Ramanugam M. et al. — Proc. nat Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, p. 829—832.
6. Schmidt G., Tangauer S. J. — J. biol. Chem., 1945, v. 161, p. 83—89.
7. Спирин А. С. — Биохимия, 1958, т. 23, № 5, с. 656—662.
8. Шлемкевич М. П., Гнатышак А. И., Шиян Д. Н. — Вопр. онкол., 1980, № 10, с. 36—40.
9. Шлемкевич М. П. — Экспер. онкол., 1981, № 1, с. 49—51.

Поступила 02.11.81

УДФ-КОФЕРМЕНТЫ В ТКАНИ ГЛИОМ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

Институт нейрохирургии им. акад. Н. Н. Бурденко АМН СССР, Москва

УДФ-сахара участвуют в биосинтезе многих углеводсодержащих соединений: гликолипидов, гликогена, мукополисахаридов и ряда других веществ. Являясь переносчиками углеводных групп, они таким образом выполняют роль коферментов в указанных процессах. УДФ-сахара содержатся в различных тканях организма [1, 2]. Однако, несмотря на важную метаболическую роль этих соединений, информация о них недостаточна полная. Это во многом объясняется отсутствием специфических методов выделения и определения этих веществ. Для выделения нуклеозиддифосфатсахаров преимущественно используются методы выделения свободных нуклеотидов, многие из которых не позволяют количественно выделить эти соединения, а также разделить УДФ-глюкозу (УДФГ) и УДФ-N-ацетилглюкозамин (УДФАГ). Поэтому у ряда авторов мы встречаем суммарные величины УДФ-коферментов, включающие УДФГ и УДФАГ. Различие методов определения УДФ-сахаров можно объяснить и разброс определяемых величин этих соединений в различных тканях по данным разных авторов.

Содержание и метаболические особенности УДФ-сахаров в ткани мозга изучены недостаточно, в частности мало данных по исследованию этих соединений в период развития организма, а также при различных функциональных и патологических состояниях [3—8]. Исследования УДФ-сахаров в опухолевых тканях ограничиваются в основном экспериментальными гепатомами, и результаты имеют неоднородный характер [3, 9]. Изучению этих соединений в опухолях мозга посвящены лишь единичные работы. В 1976 г. Мандел и соавт. в клеточных культурах 2 линий мышечных нейробластом нашли увеличение содержания УДФ-коферментов, а также всех уридиннуклеотидов [10].

Целью настоящей работы является исследование УДФ-коферментов в ткани глиом мозга человека.

Методика

В работе использована ткань глиальных опухолей мозга человека различной степени дедифференциации, полученная во время нейрохирургических операций. Исследованы олигодендроглиомы, астроцитомы, дедифференцирующиеся астроцитомы и глиобластомы. Для определения УДФ-сахаров использовали метод Живкова, который был специально разработан для определения свободных нуклеотидов с учетом УДФ-сахаров. Метод основан на сочетании адсорбции свободных нуклеотидов на угле с дальнейшим хроматографическим разделением на бумаге и позволяет обнаруживать малые количества УДФ-сахаров в небольшом количестве ткани, хотя и не исключает потерю исследуемых соединений [1, 2, 11, 12]. Полученную во время операции ткань помещали в жидкий азот. Растирали 1 г замороженной ткани в ступке с 8 мл охлажденного 0,3М раствора HClO_4 , затем центрифугировали при 5000 g в течение 10 мин. Центрифугат доводили раствором КОН до pH 5-6. Выпавший осадок KClO_4 отделяли центрифугированием. Свободные нуклеотиды выделяли из полученного центрифугата адсорбцией на активированном угле (норит А), для чего в каждую пробу добавляли 0,4 мл 10% суспензии угля в воде на холоду и перемешивали в течение 15 мин. Затем уголь отделяли центрифугированием, промывали водой. Далее адсорбированные нуклеотиды элюировали с угля 8 мл смеси, состоящей из 10% раствора (v/v) пиридина в 50% (v/v) этаноле при 37 °C в течение 2 ч. По истечении указанного времени уголь отделяли центрифугированием, а надосадочную жидкость, содержащую свободные нуклеотиды, упаривали в вакууме досуха при комнатной температуре. В ряде случаев, чтобы увеличить концентрацию исследуемых веществ объединяли пиридинспиртовые элюаты 2 параллельных проб и также упаривали. Остаток после упаривания растворяли в 0,5 мл воды и 0,1 мл этого раствора брали для хроматографирования на бумаге. Хроматографическое разделение свободных нуклеотидов проводили на бумаге Фильтрак № 4, предварительно промытой 1 н. раствором уксусной кислоты и водой. Проводилась двумерная нисходящая хроматография в первом направлении в системе, состоящей из изомасляной кислоты, воды и 25% аммиака в соотношениях 44:22:1 в течение 40 ч, во втором направлении — в системе, состоящей из 95% этанола и 1М ацетатаммонного буфера pH 3,8 при соотношении 7:3 (v/v) в течение 15 ч. После высушивания хроматограммы на воздухе пятна нуклеотидов обнаруживали в ультрафиолете с помощью ультрамикоскопа. Пятна нуклеотидов вырезали и элюировали 2,5 мл воды в течение ночи при комнатной температуре, после чего определяли их оптическую плотность в спектрофотометре «Спектромом» в кварцевых кюветах сечением 1 см.

УДФ-нуклеотиды идентифицировали по спектрам, снятым в воде, 0,1 н. HCl, 0,1 н. NaOH и после бромирования [13], а также по соотношению общего и кислотолабильного фосфора и с помощью свидетелей УДФ-глюкозы и УДФ-N-ацетилглюкозамина фирмы «Serva».

Кислотолабильный фосфор определяли в пробах после гидролиза 1 н. H₂SO₄; общий — сжиганием с 10% H₂SO₄ в присутствии пергидроля. Определение фосфора проводили по методу Хесс и Дерр (с малахитовым зеленым) [14]. Оптическую плотность измеряли в кварцевых 1-сантиметровых кюветах при 660 нм. Количество УДФ-сахаров определяли при 262 нм, соответствующей максимуму поглощения уридиннуклеотидов, и рассчитывали, используя коэффициент молярной экстинкции для уридиннуклеотидов $9,9 \times 10^3$. Количество УДФ-сахаров выражали в мкмольях на 100 г влажной ткани.

Результаты и обсуждение

Прежде всего нас интересовало общее количество УДФ-коферментов в глиальных опухолях различной степени дедифференциации, а также некоторых других опухолях мозга. Фракция УДФ-коферментов включает в основном УДФГ и УДФАГ. Кроме того, эта фракция может содержать небольшие количества УДФ галактозы и УДФ-N-ацетилгалактозамина (в тех же пятнах, что УДФГ и УДФАГ), которые обычно не отделяются на хроматограммах.

Установлено, что содержание УДФ-коферментов в олигодендроглиомах составляло $17,94 \pm 2,2$ мкмоль на 100 г влажной ткани, в астроцитомах — $23,89 \pm 5,7$ мкмоль/100 г, в дедифференцированных астроцитомах и глиобластомах — $33,2 \pm 5,0$ мкмоль/100 г.

Приведенные нами средние величины содержания УДФ-коферментов показывают, что содержание их меньше в доб-

Таблица 2
УДФ-коферменты в олигодендроглиомах (мкм на 100 г влажной ткани)

№ п/п	УДФГ	ДФАГ	УДФГ+УДФАГ	УДФАГ/УДФГ
1	9,37	9,37	18,74	1,00
2	7,15	9,86	17,01	1,38
3	9,91	15,22	25,13	1,53
4	3,95	5,09	9,04	1,29
5	9,97	11,30	21,27	1,13
6	7,09	9,38	16,47	1,32
$M \pm m$	$7,9 \pm 0,96$	$10,04 \pm 1,33$	$17,94 \pm 2,2$	$1,27 \pm 0,08$

рокачественных опухолях и больше в дедифференцированных глиальных опухолях. По нашим данным, содержание УДФ-коферментов в олигодендроглиомах близко к их содержанию в ткани мозга (табл. 1).

Однако, для того чтобы более полно выявить возможную зависимость содержания УДФ-коферментов от степени дедифференциации опухолевой ткани, необходимо более тщательно проанализировать полученный материал: рассмотреть отдельно содержание УДФГ и УДФАГ, а также соотношение этих компонентов. Эти данные представлены в табл. 2—4.

Нам кажется целесообразным рассмотреть не только средние данные, но и ряды величин, так как наблюдается большой разброс значений УДФ-коферментов. Разброс показателей был нами и ранее отмечен для других соединений в ткани глиом [15], а также наблюдался и другими авторами [16, 17].

Разброс полученных значений может быть обусловлен различием уровней об-

Таблица 1
УДФ-коферменты в ткани мозга (в мкмольях на 100 г влажной ткани)

Исследуемый объект	УДФГ	УДФАГ	УДФГ+УДФАГ	УДФАГ/УДФГ
Ткань мозга кролика	3,9	3,9	7,8	1,0
	3,03	3,5	6,53	1,15
	7,97	8,23	16,20	1,03
Ткань мозга человека	4,58	4,63	9,20	1,01
	7,9	8,23	16,13	1,04

Таблица 3
УДФ-коферменты в астроцитомах (в мкмольях на 100 г влажной ткани)

№ п/п	УДФГ	УДФАГ	УДФГ+УДФАГ	УДФАГ/УДФГ
1	4,27	4,05	8,32	0,95
2	4,37	3,98	8,35	0,91
3	5,79	5,30	11,09	0,92
4	15,30	19,10	34,40	1,24
5	16,65	17,55	34,20	1,05
6	23,75	23,37	47,12	0,99
7	12,00	11,80	23,80	0,98
$M \pm m$	$11,73 \pm 2,78$	$12,16 \pm 3,01$	$23,89 \pm 5,8$	$1,03 \pm 0,04$

Таблица 4

УДФ-коферменты в дедифференцирующихся астроцитах и глиобластомах

№ п/п	УДФГ	УДФАГ	УДФГ+УДФАГ	УДФАГ/УДФГ
1	13,00	35,77	48,77	2,75
2	19,12	54,00	73,12	2,82
3	17,50	38,25	55,75	2,18
4	8,20	21,20	29,40	2,59
5	7,20	22,50	29,70	3,12
6	6,55	13,87	20,42	2,12
7	7,27	22,29	29,56	3,07
8	7,90	22,00	29,90	2,78
9	6,96	22,84	29,80	3,28
10	4,59	10,97	15,56	2,39
11	5,70	14,54	10,24	2,33
12	3,82	12,59	16,41	3,29
$M \pm m$	$8,98 \pm 6,35$	$24,23 \pm 3,64$	$33,2 \pm 5,02$	$2,78 \pm 0,11$

мена как в разных опухолях одной гистологической природы, так и в разных участках одной и той же опухоли. Кроме того, в отдельных случаях, несмотря на гистологический контроль, полностью не исключена возможность попадания в опыт некротических участков, измененных в результате хирургического вмешательства, что может сказаться на полученных данных.

Наблюдаемые различия не могут так же быть результатом некоторой примеси крови в опухолевой ткани, так как в крови, взятой из сонной артерии опухолевых больных, эти соединения нами не были найдены при определении тем же методом.

В табл. 2 представлены данные для олигодендроглиом. Содержание УДФГ—7,9, УДФАГ— $10,04 \pm 1,33$. Отношение УДФАГ к УДФГ составляет от 1 до 1,53 (в среднем $1,27 \pm 0,08$). Аналогичные данные для доброкачественных астроцитов представлены в табл. 3.

Содержание УДФГ, УДФАГ составляет соответственно $11,73 \pm 2,78$ и $12,16 \pm 3,01$. Отношение УДФАГ к УДФГ равняется 1.

В этих 2 таблицах, в которых представлены данные по доброкачественным опухолям, привлекает внимание тот факт, что величины УДФГ и УДФАГ в каждом исследованном случае близки друг к другу, вследствие чего отношение УДФАГ к УДФГ является близким к единице во всех случаях, несмотря на различие величин УДФ-коферментов между отдельными случаями.

Далее были рассмотрены данные для дедифференцирующихся астроцитов и

глиобластом. Следует заметить, что по исследуемым показателям мы не нашли различий между дедифференцированными астроцитами и глиобластомами, поэтому данные по этим опухолям мы приводим вместе. Результаты представлены в табл. 4. Количество УДФ-коферментов в этой группе опухолей выше, чем в доброкачественных опухолях ($33,2 \pm 5,02$).

При анализе результатов табл. 4 интерес вызывает различие величин УДФГ и УДФАГ в каждом исследованном случае по сравнению с вышеприведенными данными для доброкачественных опухолей (см. табл. 3 и 4). Содержание УДФАГ в этих опухолях примерно вдвое выше, чем в доброкачественных. Следствием этого является увеличение отношения УДФАГ к УДФГ, которое составляет от 2,12 до 3,29 единиц. Хотя в этих опухолях в основном происходит увеличение содержания УДФАГ, количество УДФГ в них несколько ниже по сравнению с доброкачественными астроцитами.

С результатами, представленными в табл. 4, вполне согласуются данные, полученные для глиальной злокачественной опухоли эпендимобластомы, не относящейся к астроцитарному ряду. Отношение УДФАГ к УДФГ в этом случае составляет 3.

Анализируя результаты всех 3 таблиц (2—4), нам кажется, что наибольший интерес представляют не абсолютные величины УДФГ и УДФАГ, а их соотношение, которое в доброкачественных опухолях является близким к 1, а в дедифференцирующихся составляет от 2 до 3. Следует подчеркнуть, что отношение УДФАГ к УДФГ не зависит от уровня абсолютных величин этих компонентов.

Таким образом, полученные данные показывают, что по мере дедифференциации опухоли увеличивается отношение УДФАГ к УДФГ. В подтверждение этого можно привести случай, в котором одновременно определяли УДФ-коферменты в опухоли и перифокальной зоне.

Для опухоли величины УДФГ, УДФАГ составляют соответственно 4, 6, 11; их отношение — 2,4. В перифокальной, т. е. околоопухолевой зоне, эти величины составляли 3,8, 6,1, а отношение обоих компонентов было значительно ниже и равнялось 1,6.

Нам удалось исследовать УДФ-коферменты в ткани мозга человека, удален-

ной во время нейрохирургической операции. Количество УДФ-коферментов составляло в одном случае 9,2, в другом — 16,9 мкм на 100 г ткани, а отношение УДФАГ к УДФГ в обоих случаях было равно единице. Такое же соотношение обоих компонентов было получено и в ткани мозга кролика (см. табл. 1, 2). Полученные нами результаты для ткани мозга согласуются с имеющимися в литературе, согласно которым УДФГ и УДФАГ содержатся в ткани мозга в равных количествах [18].

На основании изложенного материала нам кажется, что увеличение отношения УДФАГ к УДФГ в дедифференцирующихся опухолях, по-видимому, может отражать характер опухолевого роста.

Однако мы пока не можем объяснить увеличение содержания УДФАГ при дедифференциации опухолевой ткани. Для этого необходимы специальные исследования.

Не исключено, что увеличение количества УДФАГ может быть в какой-то мере связано с увеличением содержания связанных с белками муколипидов в глияльных опухолях, о чем сообщалось ранее [19].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Zhiukov V., Tosheva R., Zhiukova Y.* — Comp. Biochem. Physiol., 1975, v. 51-B, p. 421—424.
2. *Zhiukov V.* — Ibid., 1971, v. 39-B, p. 701—703.
3. *Mandel P.* — In: Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. Ed. J. N. Davison, W. E. Cohn. New York, 1964, v. 3, p. 299—334.
4. *Kim Ping Wong, Sourkes T. L.* — J. Neurochem., 1968, v. 15, p. 201—203.
5. *Mandel P., Edel-Harth S.* — Ibid., 1966, v. 13, p. 591—595.
6. *Wegelin J., Manzel F. A.* — Ibid., 1967, v. 14, p. 1161.
7. *Piccoli F., Camarda R., Bonavata V.* — Ibid., 1969, v. 16, p. 159—169.
8. *Хачатрян Г. С., Суджан Ц. М.* — Труды Ереван. мед. ин-та, 1974, т. 15, с. 212—214.
9. *Mandel P., Wintzerith M., Klein-Pete N. et al.* — Nature, 1963, v. 198, p. 1000.
10. *Wintzerith M., Ciesielski-Treska J., Dietrich A. et al.* — J. Neurochem., 1976, v. 26, p. 315—317.
11. *Zhiukov V.* — Biochem. J., 1970, v. 120, p. 505—508.
12. *Живков В. И.* — Биохимия, 1965, т. 30, № 2, с. 255—259.
13. *Venkstern T. V., Baev A. A.* Spectra of Nucleic Acid Compounds. New York, 1968.
14. *Hess H. H., Derr J. E.* — Analyt. Biochem., 1975, v. 63, p. 607—613.
15. *Попова Г. М., Промыслов М. Ш.* — Укр. биохим. ж., 1970, № 4, с. 472—474.
16. *Low H. O., Clausen J., Bierring F.* — J. Neurochem., 1965, v. 12, p. 619—627.
17. *Lowry O. H., Berger S. J., Chi M. M. Y. et al.* — Ibid., 1977, v. 29, p. 959—977.
18. *Koransky W.* — Naunyn-Schmiedelberg's Arch. exp. Path. Pharmacol., 1958, Bd 234, S. 46—65.
19. *Промыслов М. Ш.* — В кн.: Проблемы нейрехимии. М. — Л., 1966, с. 118—123.

Поступила 10.05.82

УДК 612.018.577.175.859].015.36-06:612.112.91.015.1

Н. В. Лунина, С. Б. Коваль

ВЛИЯНИЕ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ НА СИНТЕЗ ПРОСТАГЛАНДИНОВ

Лаборатория возрастной и эволюционной физиологии Ворошиловградского педагогического института

В настоящее время проблема простагландинов, биологически активных веществ, широко изучается исследователями различного профиля. Практически во всех тканях животного организма выявлены ферментные системы как синтезирующие, так и метаболизирующие простагландины [1, 2]. Однако механизм высвобождения простагландинов из тканей остается спорным, а некоторые стороны его не выяснены [3]. Установлено, что повышению синтеза простагландинов предшествует активация калликреин-кининовой системы [4, 5], входящей наряду с системами свертывания фибринолиза и комплемента крови

в единую «полисистему», ключевая роль в которой принадлежит фактору Хагемана [6, 7].

Высказано аргументированное предположение о возможном участии ферментов лизосом нейтрофильных лейкоцитов в гуморальной регуляции функций организма, в частности опосредованно через фактор Хагемана [8].

Цель настоящей работы — изучение особенностей влияния лизосомальных ферментов нейтрофильных лейкоцитов на фактор Хагемана, а также выявление возможного непосредственного воздействия этих ферментов на биосинтез и выделение простагландинов.

Методика

Исследования проведены на 20 кроликах массой 2,5—3,0 кг, находящихся на обычном пищевом рационе.

Особенности влияния лизосомальных ферментов нейтрофильных лейкоцитов на фактор Хагемана изучены на 10 кроликах. У одного и того же животного использовали кровь, мозг, печень. Кровь получали из общей сонной артерии при свободном ее вытекании через полиэтиленовую канюлю, введенную под местным обезболиванием, до гибели животного. Кровь стабилизировали 0,027 М ЭДТА на 0,1 М фосфатном буфере рН 7,4 (в отношении 10:1) и выделяли из нее бестромбоцитную интактную плазму [9] и взвесь гранулоцитов [10]. Последнюю освобождали от тромбоцитов и эритроцитов [11], а затем центрифугировали до получения плотного осадка гранулоцитов. Разрушение эквивалентных количеств гранулоцитов, ткани мозга и печени проводили в микромомогенизаторах [12], получая в дальнейшем обогащенную лизосомальную фракцию [13] из каждого тканевого гомогената.

Для контроля специфичности выделяемых субклеточных фракций проводили идентификацию лизосом акридиновым оранжевым [14]. Выделенные фракции суспендировали в 0,7 М сахарозе рН 7,4 и воздействовали на них ультразвуком для лабильзации мембран лизосом [15]. О солюбилизации лизосомальных ферментов судили путем определения кислот фосфатазы [КФ, 3.1.3.2], используя в качестве субстрата β -глицерофосфат [16].

Изучали прямую активацию фактора Хагемана ферментами лизосом гранулоцитов, мозга, печени по времени свертывания бестромбоцитной интактной плазмы, а возможность воздействия лизосомальных ферментов на другие факторы свертывающей системы — по времени свертывания плазмы, предварительно активированной стеклянными шариками [9]. В контрольных опытах использовали 0,7 М сахарозу рН 7,4. Плазму рекальцифицировали 0,027 М раствором хлористого кальция.

Биологической моделью для изучения синтеза и высвобождения простагландинов служили тромбоциты, в которых из эндоперекисей наряду с тромбоксанами активно образуются простагландины [17, 18]. Тромбоцитную массу выделяли из 80—90 мл крови каждого из 10 кроликов [19]. Гранулоциты этой же крови использовали для получения лизосомальных ферментов. Тромбоциты после двукратного промывания физиологическим

раствором осторожным встряхиванием ресуспендировали в 2,25 мл 0,1 М фосфатного буфера рН 7,4, содержащего ЭДТА. Тромбоцитную взвесь разливали в 3 пробирки по 0,75 мл в каждую. Все манипуляции проводили при температуре не выше 4 °С. В 1-ю пробирку (опытную) добавляли 0,25 мл 0,7 М сахарозы, содержащей лизосомальные ферменты гранулоцитов, во 2-ю (контрольную) — 0,25 мл 0,7 М сахарозы. Содержимое пробирок инкубировали в течение 30 мин при 37 °С и постоянной аэрации. Реакцию останавливали добавлением смеси этилацетат — изопропанол — 2 н. муравьиная кислота (3:3:1), изменяя рН среды до 4,5. В 3-й пробирке (контрольной) тромбоцитную взвесь смешивали с 0,25 мл 0,7 М сахарозы, содержащей лизосомальные ферменты гранулоцитов, непосредственно перед добавлением смеси этилацетат — изопропанол — 2 н. муравьиная кислота. Разрушение тромбоцитов в смеси проводили ультразвуком. Дальнейшую экстракцию простагландинов осуществляли по методу фирмы «Calbiochem» [20]. Для выделения отдельных групп простагландинов использовали тонкослойную хроматографию [21] на пластинках с силикагелем в системе бензол:диоксан:уксусная кислота (20:20:1). Детектирование проводили методом с применением серной кислоты [22], биотестирование [23, 24] — на участках миометрия беременных крольчих. Полученные данные обработаны статистически.

Результаты и обсуждение

Установлено (табл. 1), что лизосомальные ферменты гранулоцитов, мозга и печени значительно укорачивают время свертывания интактной плазмы. При этом стимулирующее влияние на гемокоагуляцию лизосомальных ферментов гранулоцитов было более выражено, чем таковых мозга и печени ($P < 0,001$ соответственно). Предварительная контактная активация интактной плазмы стеклянными шариками предотвращала стимулирующее действие лизосомальных ферментов на скорость коагуляции. Следовательно, влияние лизосомальных ферментов опосредуется через фактор Хагемана, так как если бы их действие осуществлялось через другие звенья свер-

Таблица 1

Влияние лизосомальных ферментов на время свертывания интактной и активированной плазмы ($M \pm m$)

Вид плазмы	Время свертывания плазмы при различных условиях инкубации, с			
	сахароза (контроль)	лизосомальные ферменты		
		гранулоцитов	мозга	печени
Интактная	478,6 \pm 1,88	47,1 \pm 0,59*	72,7 \pm 0,94*	110,3 \pm 0,55*
Активированная	74,1 \pm 2,69	81,0 \pm 4,59	76,6 \pm 3,30	82,2 \pm 3,93

Примечание. Здесь и в табл. 2 звездочкой отмечены величины, достоверно отличающиеся от контрольных.

Таблица 2

Влияние лизосомальных ферментов гранулоцитов на синтез и высвобождение простагландинов тромбоцитами *in vitro* ($M \pm m$)

Условия эксперимента	Содержание простагландинов, пг/мл	
	ПГЕ	ПГФ
Тромбоциты+лизосомы (контроль)	$141 \pm 3,7$	$61 \pm 2,8$
Тромбоциты+инкубация (контроль)	$142 \pm 4,4$	$64 \pm 3,1$
Тромбоциты+лизосомы+инкубация	$698 \pm 7,9^*$	$136 \pm 5,6^*$

тывающей системы, то оно должно было бы суммироваться с действием контактной активации, поскольку каждый этап свертывания имеет свою константу скорости реакции.

Полученные нами данные позволяют по-новому интерпретировать феномен активного синтеза простагландинов при свертывании крови [25, 26] как опосредованный через активацию лизосомальными ферментами гранулоцитов фактора Хагемана и систему кининов.

Результаты исследований, приведенные в табл. 2, показывают, что тромбоциты, находящиеся в искусственной среде для исключения влияния плазматических субстанций, под влиянием лизосомальных ферментов гранулоцитов синтезируют и высвобождают простагландины. Биологическая активность водных растворов элюатов с зон R_f 0,62—0,64 и R_f 0,46—0,48 соответствует активности простагландинов E_2 (ПГЕ) и $F_{2\alpha}$ (ПГФ).

Образование простагландинов в контрольных опытах, возможно обусловлено гомогенизацией, на что указывают и другие авторы [27].

Представляется вероятным, что активация биосинтеза простагландинов определяется лизосомальной фосфолипазой A_2 гранулоцитов [28], действие которой проявляется в гидролитическом отщеплении арахидоновой кислоты от мембранных фосфолипидов тромбоцитов [29], а также участием пероксидазы лизосом гранулоцитов [30, 31], которая наряду с эндопероксидазомеразой превращает эндоперекиси в простагландины [32, 33].

Таким образом, лизосомальные ферменты гранулоцитов осуществляют как прямую активацию синтеза простаглан-

динов, так и опосредованную через систему кининов, активируя фактор Хагемана, который в свою очередь кроме кининов, активирует свертывание, фибринолиз и комплемент крови.

Участвием лизосомальных ферментов гранулоцитов в образовании биологически активных веществ, по нашему мнению, можно объяснить одну из сторон развития абсолютного нейтрофильного лейкоцитоза при формировании адаптационного синдрома.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gafdos A. *Medicine et biochemie*. Paris, 1971, p. 1—73.
2. Bartmann W. — *Angew. Chem.*, 1975, Bd 14, S. 337—344.
3. Damas N. J., Deby C. — *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 1974, v. 168, p. 375—378.
4. Thomas G., West C. B. — *J. Pharm. Pharmacol.*, 1973, v. 25, p. 747—749.
5. Ferreira S. H., Moncada S., Vane J. R. *Agents a. Actions*, 1973, v. 3, p. 385.
6. Чернух А. М., Гомазков О. А. — *Пат. физиол.*, 1976, № 1, с. 5—16.
7. Пасхина Т. С. — *Биохимия*, 1976, т. 41, № 8, с. 1347—1351.
8. Лунина Н. В., Козюк П. М. — *Пат. физиол.*, 1978, № 2, с. 76—78.
9. Зубаилов Д. М., Попова Л. Г. — *Казанск. мед. ж.*, 1967, № 6, с. 31—35.
10. Хейфец Л. Б., Алабакин В. А. — *Лаб. дело*, 1973, № 10, с. 579—581.
11. Maupin B. — *Sang*, 1955, v. 26, p. 328.
12. Осборн Н. *Микрохимический анализ нервной ткани*. М., 1978.
13. Покровский А. А., Тутельян В. А. — *Биохимия*, 1968, т. 33, № 4, с. 809—816.
14. Дингл Д., Баррет А. *Лизосомы. Методы исследования*. М., 1980, с. 330—333.
15. De Duve C. — In: *Sulcellular Particles*. Ed. T. Hayschi. New York, 1959, p. 128—136.
16. Третьяков А. В., Рязанов Е. М., Янушка А. Л. и др. — *Цитология*, 1974, № 10, с. 1262—1267.
17. Goldyne M. E. — *J. invest. Derm.*, 1975, v. 64, p. 377—385.
18. Smitg M. J. H., Ford-Hutchinson M. W., Elliott P. N. C. — *J. Pharm. Pharmacol.*, 1975, v. 27, p. 473—497.
19. Зыкова В. П., Бочкарева Е. В., Владимиров С. С. и др. — *Вопр. мед. химии*, 1978, № 4, с. 514—519.
20. Некрасова А. А., Левицкая Ю. В., Панфилов В. — *Лаб. дело*, 1977, № 4, с. 227—232.
21. Green K., Samuelsson B. — *J. Lipid. Res.*, 1964, v. 5, p. 117—120.
22. Tobias L., Paulsrud J. R. — *Prostaglandins*, 1975, v. 9, p. 57—60.
23. Кудрин А. Н., Персианинов Л. С., Короза Г. С. — *Акуш. и гин.*, 1973, № 11, с. 1—7.
24. Embrey M. P., Morrison D. L. — *J. Obstet. Gynaec. Brit. Comm.*, 1968, v. 75, p. 829—832.
25. Glenn E. M., Wilks J., Bournan B. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1972, v. 141, p. 879—884.

26. Silver M. I., Smith J. B.— Prostaglandins, 1972, v. 1, p. 429—439.
27. Эмбри М. Простагландины в репродуктивной функции человека. М., 1978, с. 104.
28. Francon R., Patriarea P., Elsbach P.— J. Lipid. Res., 1974, v. 15, p. 380—388.
29. Vincent J. E., Zijlstra F. J.— Prostaglandins, 1976, v. 12, p. 971—980.
30. Bainton D. F., Farguhar M. G.— J. Cell. Biol., 1966, v. 28, p. 277—301.
31. Baggiolini M., Breiz U., Gussus B.— Schweiz. med. Wschr., 1974, Bd 104, S. 129—132.
32. Lands W. E., Cook H. W., Rome L. H.— In: Advances in Prostaglandin and thromboxane Research. Ed. B. Samuelsson. R. Paopetti. New York, 1976, v. 1, p. 7—17.
33. Nugteren D. H., Hazelhof E.— Biochim. Biophys. Acta, 1973, v. 326, p. 448—461.

Поступила 19.10.81

EFFECT OF NEUTROPHIL LYOSOMAL ENZYMES ON SYNTHESIS OF PROSTAGLANDINS

N. V. Lunina, S. B. Koval

Laboratory of Age and Evolutional Physiology, Pedagogical Institute, Voroshilovgrad

Lysosomal enzymes of neutrophil leukocytes carried out both direct and indirect activation of prostaglandin synthesis via the kinin system, affecting the Hageman factor, which, except of kinins, activated blood coagulation, fibrinolysis and blood complement. Lysosomal enzymes participating in formation of biologically active substances may be among factors responsible for development of the absolute neutrophil leukocytosis in adaptation syndrome.

УДК 616-008.811.4-07:616-008.939.53-074

С. Н. Петрина, Л. В. Юшина

ФОСФОЛИПИДНЫЙ СОСТАВ РАЗЛИЧНЫХ ТКАНЕЙ КРЫС ПРИ ОБЕЗВОЖИВАНИИ ОРГАНИЗМА

ЦНИЛ Алма-Атинского института усовершенствования врачей

Биологическая роль фосфолипидов не исчерпывается их участием в построении структурных образований клетки, где они выполняют функцию посредников между гидрофильными веществами, растворенными в водной фазе разделенных мембранами отсеков, и гидрофобными структурами самих мембран. Фосфолипиды участвуют в самых разных звеньях обмена веществ, являясь обязательными компонентами и регуляторами многих ферментных систем [1]. Исходя из важной роли фосфолипидов в селективной проницаемости биологических мембран для различных веществ, в том числе для воды и ионов, мы изучили фосфолипидный состав тканей в условиях нарушения водно-электролитного обмена — при общей дегидратации организма.

Методы

В опытах использовано 40 белых крыс-самцов массой 150—200 г, из которых 10 служили контролем. Обезвоживания организма достигали путем лишения животных воды и жидкой пищи в течение 3, 6 и 9 сут. Экстракты липидов из сыворотки крови и гомогенатов тканей получали по Фолчу [2]. Фосфолипиды фракционировали на микропластинках в тонком слое силикагеля в системе растворителей хлороформ — метанол — аммиак. Пятна фосфолипидов идентифицировали с помощью свидетелей (лецитин) и цветных тестов [2]. Липидный фосфор определяли с реактивом малахитовым зеленым [3]. Распределение индивидуальных фосфолипидов в

порядке возрастания подвижности от старта было следующим: лизофосфатидилхолин, фосфатидилсерин, сфингомиелин, фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, полиглицерофосфатиды, фосфатидные кислоты. В состав суммарного липидного фосфора входит пятно, остающееся на старте, которое относят к глицерофосфату [3]. Полученный материал обработан статистически [4].

Результаты и обсуждение

Содержание крыс на сухом рационе привело к изменению содержания как суммарных фосфолипидов, так и их отдельных фракций (см. таблицу). Полученные данные позволяют сделать вывод об одинаковом характере изменения (снижении) содержания суммарных фосфолипидов практически во всех исследуемых тканях и некоторой специфичности изменения их состава в разных органах, что связано, по-видимому, с функциональными различиями этих органов и разной степени их участия в поддержании водно-солевого равновесия.

В почках — главном органе, участвующем в поддержании водно-электролитного гомеостаза, наиболее выраженным изменениям подвергалась фракция фосфатидилсерина. Так, на 3-и сутки обезвоживания ее содержание снижалось в 4 раза, а в последующие дни на хроматограммах отмечались лишь следы фосфатидилсерина. Известно, что фосфолипиды необходимы для проявления актив-

Содержание суммарных и индивидуальных фосфолипидов (в ммоль Р на 1 л сыворотки или 1 кг сухой массы ткани) в сыворотке крови и тканях белых крыс при дегидратации

Объект исследования	Длительность обезвоживания, сут	Суммарные фосфолипиды	Глицерофосфат	Лизофосфатидилхолин	Фосфатидилсерин	Сфингомиелин	Фосфатидилхолин	Фосфатидилэтаноламин	Полиглицерофосфатиды	Фосфатидные кислоты
Сыворотка крови	Контроль	2,25±0,12	0,10±0,02	0,17±0,04	0,62±0,03	0,32±0,03	0,91±0,04	0,09±0,01	0,04±0,01	0,04±0,01
	3	1,81±0,14*	0,11±0,02	0,18±0,04	0,39±0,04*	0,31±0,03	0,63±0,06*	0,03±0,01	0,06±0,02	0,04±0,01
	6	2,51±0,17	0,13±0,04	0,36±0,04*	0,60±0,03	0,41±0,07	0,72±0,08*	0,18±0,05	0,07±0,02	0,05±0,02
	9	2,24±0,15	0,08±0,01	0,14±0,01	0,42±0,05*	0,37±0,04	0,72±0,16	0,23±0,07*	0,15±0,05*	0,07±0,03
Печень	Контроль	132±19,0	4,10±0,58	2,76±0,70	8,20±1,79	20,52±2,45	45,05±3,32	29,84±1,70	14,03±1,69	4,50±1,13
	3	122±7,1	5,01±1,95	5,02±1,60	7,02±1,36	18,50±2,00	34,59±1,39*	29,33±2,51	14,23±1,12	3,63±0,39
	6	113±10,3	7,29±2,44	3,89±1,04	5,10±0,99	19,76±2,05	37,60±2,78	25,64±0,47*	11,80±1,78	3,27±0,96
	9	129±7,4	3,02±0,41	2,89±0,57	Следы	24,81±1,39	42,62±2,51	35,30±1,90*	14,03±0,81	3,60±0,54
Мозг	Контроль	314±12,5	11,4±1,25	9,16±2,00	13,0±3,38	60,8±3,13	94,4±6,61	91,0±6,00	21,9±2,70	9,44±2,11
	3	278±24,3	8,09±2,25	4,20±1,31*	9,07±4,45	58,0±8,95	90,5±9,04	77,5±3,20	19,7±4,00	11,4±4,34
	6	256±18,0*	8,07±1,61	4,52±0,99*	17,6±4,35	38,3±6,33*	77,8±6,39	91,0±5,05	16,0±1,86	4,42±0,28*
	9	222±15,9*	6,93±1,40	20,5±2,30*	18,2±2,24*	38,2±3,71*	70,9±6,21*	46,7±9,27*	12,3±3,19	13,2±3,61
Сердце	Контроль	162±7,61	6,78±1,65	4,55±0,67	8,76±1,90	19,1±3,10	47,4±3,42	38,6±3,34	25,6±2,40	5,66±0,44
	3	119±6,24*	5,80±0,96	6,00±1,45	Следы*	19,2±2,03	34,6±3,91*	30,0±2,55	15,9±2,35*	3,91±1,40
	6	118±6,7*	6,23±1,44	11,56±1,44*	12,2±3,83	17,0±2,44	33,3±2,93*	19,4±2,90*	12,7±1,81*	4,61±1,17
	9	137±11,9	3,14±0,49*	2,94±0,31*	18,8±1,38*	14,7±2,83	43,0±3,49	39,2±1,89	20,5±1,89	2,95±1,01
Легкие	Контроль	182±10,8	8,15±1,26	4,65±1,15	16,8±2,12	35,2±2,73	55,9±3,23	40,9±3,19	16,2±1,74	7,77±1,11
	3	122±4,6*	4,09±0,58*	2,38±0,54	5,06±0,89*	27,5±2,40*	40,5±2,53*	26,4±2,57*	5,85±0,89*	3,75±1,03*
	6	97,1±4,8*	3,27±0,82*	4,14±1,14	6,79±1,72*	21,8±1,74*	30,7±2,50*	19,3±0,83*	6,50±1,27*	3,16±0,40*
	9	131±5,3*	5,30±1,53	5,50±2,60	9,41±2,10*	27,4±1,50*	46,1±3,61*	29,2±3,30*	9,80±1,61*	1,55±0,44*
Почки	Контроль	186±7,1	8,42±1,18	6,21±1,04	20,0±4,64	30,3±4,28	49,1±2,93	44,5±3,30	21,3±2,04	6,23±2,06
	3	134±5,1*	3,56±0,55*	2,19±0,68*	4,76±1,50*	31,3±1,13	33,6±1,25*	26,9±1,20*	14,5±1,74*	5,60±1,45
	6	160±14,0	6,34±1,56	7,56±3,15	Следы*	29,8±2,43	40,8±3,83	33,6±5,29	16,4±1,38*	6,46±2,60
	9	161±10,2*	4,06±0,45*	6,65±1,61	Следы*	37,4±1,74*	45,8±2,50	37,6±2,87	19,4±2,87	4,50±0,72

Примечание. Звездочкой показана достоверность различий с контролем.

ности Na^+ , K^+ -АТФ-азы, участвующей в реабсорбции натрия в почечных канальцах. Наиболее эффективен в этом отношении фосфатидилсерин [1]. Согласно [5], при дегидратации у крыс наблюдается ряд морфологических изменений в ткани почек, которые наиболее выражены в сосочковой зоне и свидетельствуют о резком усилении реабсорбции воды. С этим вполне согласуются данные [6] о локализации Na^+ , K^+ -АТФ-азы в дистальных канальцах и восходящей петле Генле. Механизм активирования реабсорбции воды, в котором, по-видимому, участвуют фосфолипиды, можно рассматривать как компенсаторный, направленный на поддержание водного гомеостаза. Однако перенапряжение, которое испытывают при этом канальцы, приводит в последние дни эксперимента к тяжелым некробиотическим изменениям почечной ткани [7].

В состав экскреторной системы, участвующей в выведении воды из организма, входят легкие. По нашим данным, в этом органе наблюдались самые значительные изменения как суммарных фосфолипидов, так и их отдельных фракций. Количество фосфатидилхолина в легких было самым низким по сравнению с другими органами и составляло на 6-е сутки обезвоживания 55 % от исходного. Известно, что дипальмитилфосфатидилхолин составляет основу легочного сурфактанта [8, 9]. Синтез фосфатидилхолина в сурфактанте зависит от рН среды [10]. Развивающийся при обезвоживании ацидоз способствует снижению биосинтеза фосфатидилхолина. Нарушение фосфолипидного состава легких при дегидратации, в частности снижение содержания фосфатидилхолина, сказывается на сурфактантной системе легких, что может привести к изменению поверхностного натяжения альвеол. При обезвоживании организма у крыс в легких появляются очаги дистелектазов, клетки альвеолярной выстилки в участках дистелектазов дегенеративно изменены [7]. Можно полагать, что уменьшение дыхательной поверхности легких в первые дни дегидратации является защитной реакцией, направленной на уменьшение потерь воды легкими, однако выраженное уменьшение дыхательной поверхности легких усугубляет гипоксию, развивающуюся при обезвоживании в результате нарушений гемодинамики.

Помимо очевидной функции фосфолипидов как структурного материала мемб-

ран и активатора Na^+ , K^+ -АТФ-азы, они необходимы для работы ферментов переноса электронов на ряде этапов дыхательной цепи [1]. Особую роль в этих процессах играет кардиолипин, который является обязательным компонентом сопрягающих мембран [11]. Снижение уровня полиглицерофосфатидов, в состав которых входит кардиолипин, было выявлено нами во всех исследуемых органах, кроме печени, и оказалось наиболее заметным в легких и сердце. Это может иметь особое значение для ткани миокарда, характеризующейся высокой интенсивностью дыхания. Снижение содержания кардиолипина может привести к инактивации ферментных комплексов, существование которых зависит от присутствия в их составе этого фосфатида, таких, как цитохромоксидаза, сукцинатдегидрогеназа, НАД·Н-дегидрогеназа, АТФ-аза, чувствительная к олигомицину и следовательно, к нарушению транспорта электронов в дыхательной цепи и разобщению окислительного фосфорилирования.

В то же время количество полиглицерофосфатидов в сыворотке крови было повышено, особенно к концу эксперимента. Этот факт может иметь значение в усилении агрегации тромбоцитов, а также в высвобождении из кровяных пластинок серотонина [12].

Ускорение агрегации тромбоцитов и эритроцитов, а также гемолиз последних вызывает лизофосфатидилхолин [13, 14], который также накапливался в сыворотке крови крыс при дефиците воды. Не последнюю роль в увеличении содержания лизофосфатидилхолина в сыворотке крови могло сыграть повышение активности фермента лецитин-холестеринацилтрансферазы, которое мы наблюдали у подопытных крыс.

Агрегация клеток крови является важным фактором, способствующим увеличению вязкости крови [14].

Менее значительные изменения содержания как общих фосфолипидов, так и их фракций при обезвоживании происходили в ткани печени и мозга. Интересно отметить, что именно в этих органах потери воды практически не происходило до конца эксперимента [15].

Следует остановиться еще на одном аспекте изменения фосфолипидного состава тканей крыс при обезвоживании. Как известно, структура мембран является одним из факторов, определяющих скорость свободнорадикального окисле-

ния липидов. Согласно имеющимся данным [16], при усилении перекисного окисления липидов спектр фосфолипидов изменяется так, что мембраны обедняются легко окисляемыми фракциями — фосфатидилэтаноламином, фосфатидилсеринном и фосфатидилинозитом и обогащаются фосфатидилхолином и сфингомиелином, более устойчивыми к окислению. Нами выявлено, что изменения содержания индивидуальных фосфолипидов при дефиците воды соответствовали степени их подверженности перекисному окислению. В таких тканях, как почки, легкие, сердце, в ответ на дегидратацию наблюдалось более отчетливое снижение уровня легко окисляемых фракций — фосфатидилсерина, полиглицерофосфатидов, фосфатидилэтаноламина, в состав которых входит большое количество полиненасыщенных жирных кислот. Напротив, количество сфингомиелина наиболее насыщенного по жирнокислотному составу, в процессе обезвоживания существенно не менялось, а в ткани почек и печени даже имело тенденцию к увеличению. Эти данные свидетельствуют о возможности интенсификации реакций свободнорадикального окисления липидов при водном голодании.

Таким образом, перестройка соотношения индивидуальных фосфолипидов в тканях крыс при общей дегидратации организма является существенным фактором в нарушении барьерной и транспортной функций мембран.

ЛИТЕРАТУРА

1. Микельсаар Х., Северин И. И., Скулачев В. П. — Успехи совр. биол., 1974, т. 78, № 3 (6), с. 348—370.
2. Кейтс М. Техника липидологии. М., 1975, с. 74, 158.
3. Грибанов Г. А., Сергеев С. А., Алексеев А. С. — Лаб. дело, 1976, № 12, с. 724—727.

УДК 612.173.1.015.1.014.46:577.175.822

М. П. Даниленко, Э. А. Ким, Р. Д. Омарова, с. н. с. О. В. Есырев

ДЕЙСТВИЕ АЦЕТИЛХОЛИНА НА Na, K-АТФ-АЗНУЮ АКТИВНОСТЬ РАЗНЫХ ПРЕПАРАТОВ САРКОЛЕММЫ МИОКАРДА

Институт физиологии АН Казахской ССР, Алма-Ата

Известно, что ацетилхолин вызывает на сердце отрицательные хронотропный и инотропный эффекты [1], которые свя-

4. Монцевичюте-Эрингене Е. В. — Пат. физиол., 1964, № 4, с. 71—78.
5. Соболева А. Д. Реакция клеток и тканей на обезвоживание. Новосибирск, 1975.
6. Schmidt U., Habicht H. A. — В кн.: Мембраны и болезнь. М., 1980, с. 325—343.
7. Федорова О. Л., Зацелес А. Я., Златникова О. Я. и др. — В кн.: Клинико-биохимические и иммунологические аспекты патологии новорожденных и детей раннего возраста. Алма-Ата, 1980, с. 142—145.
8. Van Gold L. M. G. — Am. Rev. resp. Dis., 1976, v. 114, p. 977—1000.
9. Федосеев Г. Б., Лаврова Т. Р., Жухарев С. С. — В кн.: Клеточные и субклеточные механизмы защиты повреждения бронхов и легких. Л., 1980, с. 46—59.
10. Merritt T. A., Farrell P. M. — Pediatrics, 1976, v. 57, p. 32—40.
11. Krebs J. J. R., Hauser H., Carafolli E. — J. biol. Chem., 1979, v. 254, p. 5308—5316.
12. Ikeda Y., Kikuchi M., Toyama K. et al. — Thrombos. a. Haemost., 1979, v. 41, p. 779—786.
13. Shohet S. B. — В кн.: Мембраны и болезнь. М., 1980, с. 76—89.
14. Левин Г. Я., Шереметьева Ю. А. — Пат. физиол., 1980, № 2, с. 43—46.
15. Мысляева Т. Г., Шабанова Н. И. — В кн.: Избранные вопросы диагностики и лечения внутренних болезней. Алма-Ата, 1978, с. 158—161.
16. Бурлакова Е. Б. — В кн.: Липиды. Структура, биосинтез, превращения и функции. М., 1977, с. 16—26.

Поступила 19.10.81

PHOSPHOLIPID COMPOSITION OF VARIOUS TISSUES OF RATS IN DYNAMICS OF DYHYDRATION

S. N. Petrina, L. V. Yushina

Central Research Laboratory, Institute for Postgraduate Training of Physicians, Ministry of Public Health of the USSR, Alma-Ata

It was established that water deprivation led to dissimilar disturbances of phospholipid composition in rat blood serum and tissues. Content of individual phospholipids altered depending on their susceptibility to peroxidation. The role of the alterations observed in membrane destabilization, inactivation of membrane-bound enzymes, intensification of lipid peroxidation and other disorders are discussed.

го Ca^{2+} -тока [2, 3]. Вместе с тем имеются сведения, что малые концентрации ацетилхолина могут вызывать ускорительные реакции клеток водителя ритма (4), что согласуется с данными [5] об уменьшении проницаемости для K^+ та-кими дозами медиатора.

Поскольку одной из форм регуляции проницаемости мембран для ионов калия является их активный транспорт, осуществляемый Na, K-АТФ-азой, большой интерес представляет изучение влияния ацетилхолина на данный фермент. Целью настоящей работы было исследование эффектов медиатора на Na, K-АТФ-азную активность препаратов сарколеммы миокарда, полученных разными методами.

Методика

Препараты Na, K-АТФ-азы выделяли из миокарда желудочков сердца собаки 2 способами.

1. Ткань (2 г) гомогенизировали в 5 объемах среды выделения (СВ) следующего состава (в мМ): сахара — 250, ЭДТА — 1, трис- HCl — 20, pH 7,4 при 4 °C, используя гомогенизатор типа Polytron (3 раза по 20 с интервалами по 10 с). Гомогенат центрифугировали при 2800 g 15 мин, осадок ресуспендировали в СВ (гомогенизатор стекло — тефлон, 3000 об/мин, 5 тракций пестика) и трижды промывали в тех же условиях. Промытую фракцию суспендировали в 10 мл 0,9% NaCl и обрабатывали йодидом натрия в конечной концентрации 2,5 М в течение 60 мин по методу [6]. NaI-экстракт центрифугировали при 20 000 g 20 мин, осадок трижды промывали в СВ. Препарат, называемый далее «NaI-сарколемма», хранили в среде, содержащей 250 мМ сахарозу и 30 мМ гистидин, pH 7,2 при 4 °C.

2. Везикулярный препарат плазматических мембран (ПМ) получали модифицированным методом [7]. Обработку ПМ додецилсульфатом натрия (ДДС-Na) в концентрации 0,2 мг/мг белка проводили, как описано в этой же работе. Препарат хранили при -12 °C.

Общую АТФ-азную активность определяли по накоплению P_i [8] и pH-метрическим методом [9] в среде инкубации, содержащей (в мМ): NaCl — 100, KCl — 20, MgCl_2 — 5,

АТФ — 3, ЭДТА — 1, трис- HCl — 50 (в случае pH-метрии 5), pH 7,4 при 37 °C. При pH-метрическом определении АТФ-азной активности вместо ацетилхолина использовали его аналог карбохолин, не гидролизуемый холинэстеразой. Na, K-АТФ-азную активность рассчитывали по разности между общей и Mg-АТФ-азой, регистрируемой в среде инкубации без NaCl и KCl. Азидчувствительную АТФ-азу определяли в присутствии 5 мМ NaN_3 . За единицу удельной АТФ-азной активности принимали 1 мкмоль P_i , высвобожденного за 1 ч. Транспорт Ca^{2+} определяли как в работе [9]. Белок определяли биуретовым методом, предварительно разрушив мембраны 1% дезоксихолатом натрия. Эффекты ацетилхолина исследовали в первые 3 дня после выделения мембранных препаратов. Все измерения проводили в 3 повторностях. Результаты обрабатывали статистически.

Результаты и обсуждение

Ранее было показано, что ацетилхолин ингибирует Na, K-АТФ-азу сарколеммы сердца [10], однако степень торможения фермента зависела от способа выделения мембранных препаратов. Эффекты ацетилхолина на АТФ-азную активность препаратов, подобных использованным нами, не изучались.

Из табл. 1 видно, что NaI-сарколемма является менее очищенным источником Na, K-АТФ-азы, чем фракция ПМ, о чем свидетельствует его низкая Na, K-АТФ-азная активность и высокая митохондриальная азидчувствительная активность. Препарат ПМ представляет собой высокообогатленную фракцию сарколеммы, поскольку митохондриальная АТФ-аза в нем весьма незначительна, а транспорт Ca^{2+} в присутствии оксалата не наблюдался, что говорит об отсутствии примеси саркоплазматического ретикулула. Na, K-АТФ-азная активность препарата достаточно низка и только на 10% ингибируется убаином. При хранении препарата активность прогрессивно возрастала (рис. 1). Эти факты указывают на то, что фракция ПМ

Т а б л и ц а 1

Активность препаратов Na, K-АТФ-азы (в мкмоль/ч на 1 мг белка)

Препарат	Na, K-АТФ-аза	Mg-АТФ-аза	Азидчувствительная АТФ-аза	Na, K-АТФ-аза, чувствительная к убаину (0,5 мМ)
«NaI-сарколемма»	6,4±1,2 (20)	3,2±0,8 (20)	1,5±0,5 (10)	6,4±1,2 (10)
Препарат ПМ	5,1±1,4 (12)	12,2±2,0 (12)	0,5±0,1 (6)	0,5±0,1 (10)
Препарат ПМ + ДДС	70,0±7,5 (7)	0 (7)	0 (6)	70±7,5 (8)

П р и м е ч а н и е. В скобках — число измерений.

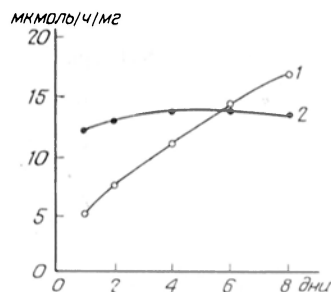


Рис. 1. Изменение АТФ-азной активности препарата ПМ при хранении.

1 — Na, К-АТФ-аза; 2 — Mg-АТФ-аза. Препарат подвергали оттаиванию и замораживанию 1 раз в сутки.

образована замкнутыми везикулами различной ориентации, в результате чего затрудняется доступ лигандов к активным центрам фермента. Обработка ПМ низкими концентрациями ДДС-Na в целях демаскирования латентной Na, К-АТФ-азы приводила к резкому увеличению ферментативной активности (см. табл. 1).

Зависимость удельной активности Na, К-АТФ-азы NaI-сарколеммы от I_g концентрации ацетилхолина представлена на рис. 2, а. Как видно, с увеличением концентрации агента ингибирование усиливается, что отличается от данных авторов [10, 11], наблюдавших «подъем» кривой в области высоких концентраций ацетилхолина. Максимальное торможение Na, К-АТФ-азы, показанное обоими методами регистрации ферментативной активности составляло в среднем $96,8 \pm 2,5\%$, причем более чем в половине случаев было отмечено полное ингибирование Na, К-АТФ-азы. K_i , рассчитанная по 50% торможению ферментативной активности, составляла 14 ± 2 мкМ. Эта величина лежит в ряду между константами ингибирования, найденными для денервированной скелетной (5 мкМ) и сердечной мышцы (50 мкМ) [10, 11].

На рис. 2, б показана типичная зависимость активности Na, К-АТФ-азы фракции ПМ от концентрации ацетилхолина. В этом случае малые дозы медиатора ($1 \cdot 10^{-6}$ — $1 \cdot 10^{-5}$ М) активировали фермент, средние ($5 \cdot 10^{-5}$ — $5 \cdot 10^{-4}$ М) вызывали резкое ингибирование, а высокие ($1 \cdot 10^{-3}$ — $1 \cdot 10^{-2}$ М) — меньшее ингибирование (иногда наблюдался «подъем» кривой). Обработка везикул детергентом приводила к исчезновению активирующего эффекта низких концентраций ацетилхолина, тогда как тормозя-

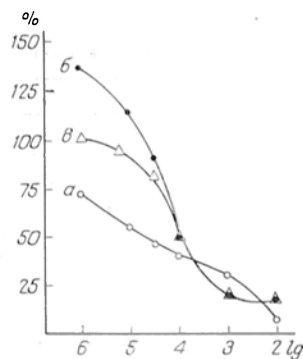


Рис. 2. Зависимость Na, К-АТФ-азной активности препаратов сарколеммы от логарифма концентрации ацетилхолина.

а — NaI-сарколемма; б — препарат ПМ; в — препарат ПМ+ДДС.

щий эффект высоких концентраций практически не изменялся (рис. 2, в).

Действие ацетилхолина и карбохолина на Na, К-АТФ-азу обоих препаратов было высокоспецифично, поскольку в исследованном ряду концентраций они не вызывали изменения убаин-нечувствительной АТФ-азы, а холин (до 20 мМ) не влиял ни на Na-, К-, ни на убаин-нечувствительную активность.

Никотиновый антагонист d-тубокурарин ($1 \cdot 10^{-6}$ — $1 \cdot 10^{-4}$ М) не действовал на Na, К-АТФ-азу и не изменял эффектов ацетилхолина, тогда как блокатор мускариновых холинорецепторов (м-ХР) атропин в концентрациях $1 \cdot 10^{-10}$ — 1×10^{-4} М специфически тормозил Na, К-АТФ-азу и препятствовал проявлению ингибирующего эффекта ацетилхолина (табл. 2).

Таким образом, из анализа эффектов ацетилхолина на различные препараты сарколеммы миокарда вытекает следующее. Используемый нами метод, включающий экстракцию йодидом натрия, позволяет получить препараты Na, К-АТФ-азы сердца с более высокой чувствительностью к ингибирующему действию медиатора, чем описанные в литературе [10]. Вероятно, воздействие NaI на сарколемму сердечной мышцы, в отличие от LiBr, применявшегося в подобных исследованиях [10, 11], приводит к качественно иным последствиям. Поскольку йодид натрия экстрагирует большинство периферических белков мембран, уместно предположить, что местом действия ацетилхолина являются интегральные белки. В пользу этого предположения говорит и тот факт, что обработка препарата ПМ сильным ионным

Эффект атропина на ингибирование Na, K-АТФ-азы ацетилхолином («NaI-сарколемма»)

Ацетилхолин, М	Na, K-АТФ-азная активность, мкмоль/ч на 1 мг белка		
	контроль	атропин, $1 \cdot 10^{-10}$ М	атропин, $1 \cdot 10^{-4}$ М
Контроль	6,04 (0)	5,8 (16)	3,20 (50)
$1 \cdot 10^{-4}$	1,82 (70)	3,86 (36)	3,01 (50)
$1 \cdot 10^{-2}$	0,00 (100)	1,85 (70)	2,92 (52)

Примечание. В скобках — % ингибирования по отношению к контролю.

детергентом ДДС-Na не снижала ингибирующего эффекта ацетилхолина. При этом выяснилось, что в процентном отношении действие медиатора не зависит от активности фермента, т. е. число участников действия ацетилхолина, повидимому, коррелирует с числом молекул, Na, K-АТФ-азы. Это согласуется с данными [12], полученными на синапсоматомах головного мозга, что экстракция 3М NaI параллельно активации Na, K-АТФ-азы повышает ее чувствительность к ацетилхолину. Блокада эффектов медиатора и ингибирование Na, K-АТФ-азы атропином указывает на то, что интегральными белками-акцепторами ацетилхолина могут являться либо сама Na, K-АТФ-аза, имеющая участок, сходный по структуре с м-ХР, как предполагалось [11], либо истинный м-ХР. Показано, что чувствительность Na, K-АТФ-азы к ацетилхолину коррелирует с плотностью мускариновых холинорецепторов на мембранах мышц [11]. Поэтому не исключена возможность прямого взаимодействия этих систем в результате или генерализованных перестроек в мембране, вызванных связыванием лиганда с холинорецептором [13], или пространственной близости молекул рецептора и Na, K-АТФ-азы и, наконец, в результате существования общей субъединицы для этих молекул. В таком случае любое конформационное изменение рецептора (например, при связывании атропина) должно повлечь соответствующее изменение активности фермента.

Обнаружение значительного активирующего влияния малых концентраций ацетилхолина на Na, K-АТФ-азу «интактного» препарата ПМ, полученного без применения каких-либо детергентов и хаотропных агентов, указывает на сложность путей регуляции Na, K-АТФ-азы ацетилхолином в нативной сарколемме миокарда. Исчезновение стимуляции фермента после обработки ДДС-Na означает, что фактором, обуславливаю-

щим активирующий эффект ацетилхолина, может являться периферический белок, хотя возможно, что детергент (а в случае NaI-сарколеммы — хаотропный агент) нарушает белок-липидные или другие взаимодействия в мембране, что приводит к нарушению регуляторных свойств Na, K-АТФ-азы.

В литературе имеются сообщения о том, что в нативной сарколемме сердца малые дозы убаина активируют натриевый насос [14], тогда как известно, что на очищенные препараты Na, K-АТФ-азы те же концентрации гликозида действуют противоположным образом. Повидимому, изучение влияния биологически активных веществ на Na, K-АТФ-азу неповрежденной мембраны может дать больше информации об их сложном действии на уровне клетки. В частности, обнаруженная в данной работе активация фермента низкими концентрациями ацетилхолина может служить одним из объяснений уменьшения проницаемости мембран для K^+ , обнаруженного в физиологических экспериментах [5].

Авторы выражают благодарность А. А. Болдыреву и В. А. Ткачуку (кафедра биохимии МГУ им. М. В. Ломоносова) за ценные замечания, сделанные при обсуждении данной работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Katz A. M. Physiology of the Heart. New York, 1977.
2. Lipsius S. L., Vassalle M. — J. Pharmacol exp. Ther., 1977, v. 201, p. 669—677.
3. Филиппов А. К., Поротиков В. И., Лазарев А. В. — Биофизика, 1980, т. 25, с. 284—288.
4. Бочкина Г. И., Сухова Г. М., Удельнов М. Г. и др. — Бюлл. exper. бюлл., 1981, т. 91, № 3, с. 259—260.
5. Musso E., Vassalle M. — Cardiovasc. Res., 1975, v. 9, p. 490.

К ст. А. Н. Клейменова и соавт.

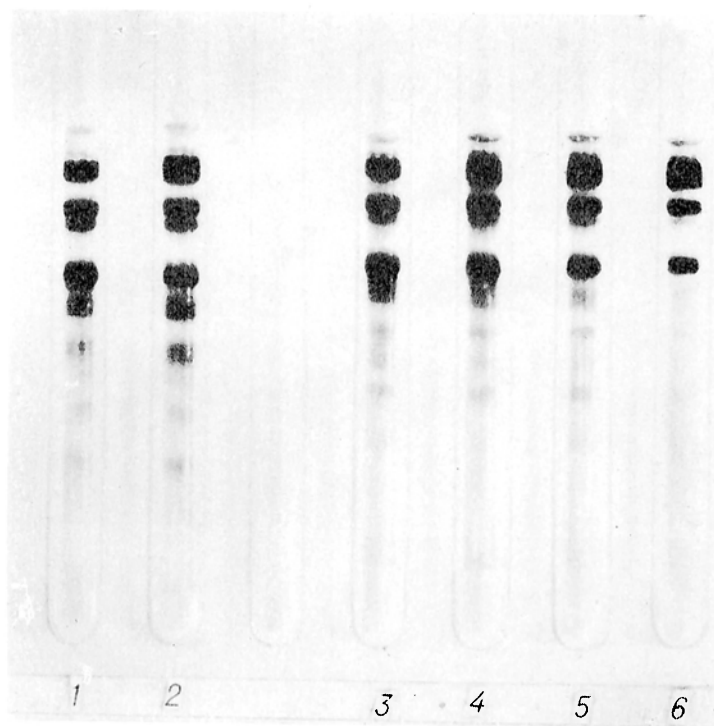


Рис. 2. Электрофореграммы продуктов деградации ФГ и ФН.
1 — ФГ без АО; 2 — ФГ в присутствии АО в концентрации $3 \cdot 10^{-2}$ М; 3 — ФН без АО; 4 — 5 — ФН в присутствии АО в концентрациях соответственно $0,75 \cdot 10^{-2}$, $1,5 \cdot 10^{-2}$ и $3 \cdot 10^{-2}$ М.

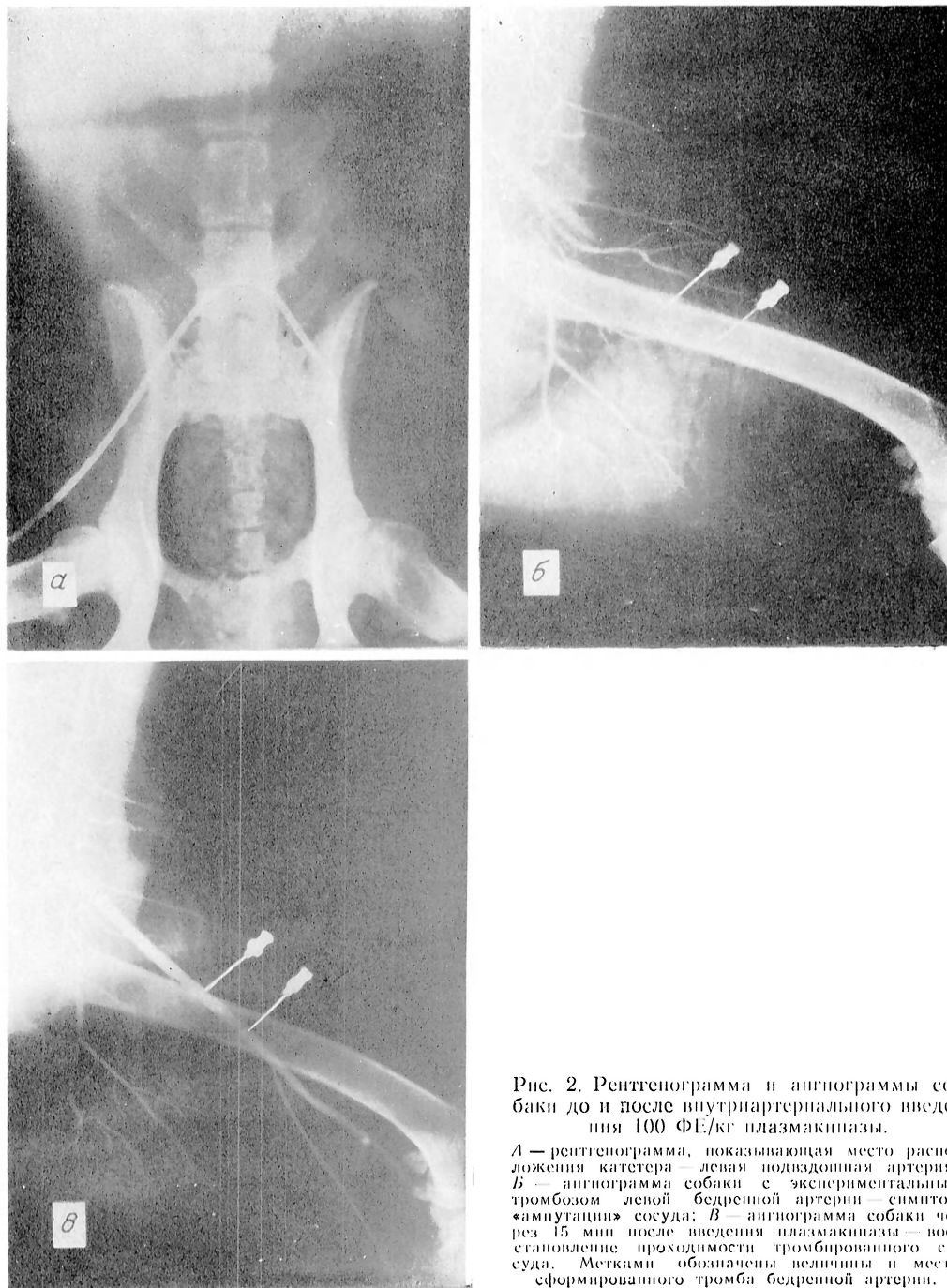


Рис. 2. Рентгенограмма и ангиограммы собаки до и после внутриартериального введения 100 ФЕ/кг плазминазы.

А — рентгенограмма, показывающая место расположения катетера — левая подмышечная артерия; Б — ангиограмма собаки с экспериментальным тромбозом левой бедренной артерии — симптом «ампутации» сосуда; Б' — ангиограмма собаки через 15 мин после введения плазминазы — восстановление проходимости тромбированного сосуда. Метками обозначены величина и место сформированного тромба бедренной артерии.

6. Nakao T., Tashima Y., Nagano K. et al.— Biochem. biophys. Res. Commun., 1965, v. 19, p. 755—758.
7. Pitts B. J. R.— J. biol. Chem., 1979, v. 254, p. 6232—6235.
8. Rathbun W. B., Bethlash M. V.— Analyt. Biochem., 1969, v. 28, p. 436—445.
9. Ритов В. Б.— Биохимия, 1971, т. 36, с. 393—400.
10. Ткачук В. А., Успанова Ж. К., Попова И. А.— Докл. АН СССР, 1973, т. 211, с. 989—992.
11. Ткачук В. А., Лопина О. Д., Болдырев А. А.— Биохимия, 1974, т. 40, с. 1032—1038.
12. Логун Г. Ш., Кометиани З. П.— Сообщ. АН ГССР, 1970, т. 60, с. 709—712.
13. Конев С. В., Аксентьев С. Л.— Биохимия, 1977, т. 42, с. 187—197.
14. Ghysel-Burton J., Godfraind T.— Brit. J. Pharmacol., 1979, v. 66, p. 175—184.

Поступила 28.01.82

EFFECT OF ACETYLCHOLINE ON THE Na⁺,K⁺-ATPASE ACTIVITY IN DIFFERENT PREPARATIONS OF MYOCARDIAL SARCOLEMMA

M. P. Danilenko, E. A. Kim, R. D. Omarova,
O. V. Esyrev

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

Dose-dependent inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase by acetylcholine was found in dog heart sarcolemma obtained after treatment with NaI. The enzyme was completely inhibited at $1 \cdot 10^{-2}$ M concentration of acetylcholine ($K_i = 14 \pm 2$ mM). Low concentrations of acetylcholine ($1 \cdot 10^{-6}$ — $1 \cdot 10^{-5}$ M) increased the Na⁺, K⁺-ATPase activity, the intermediate (5×10^{-5} — $5 \cdot 10^{-4}$ M) and high ($1 \cdot 10^{-3}$ — $1 \cdot 10^{-2}$ M) concentrations decreased the activity in the preparations enriched with sarcoplasmic vesicles. Sodium dodecylsulfate enhanced the activating effect but did not affect the inhibition. Atropine ($1 \cdot 10^{-6}$ — 1×10^{-4} M) decreased the Na⁺, K⁺-ATPase activity and protected the enzyme against the inhibitory effect of acetylcholine. The data obtained suggest that interaction of acetylcholine with integral membrane proteins (Na⁺, K⁺-ATPase and/or muscarinic acetylcholine receptors) is apparently responsible for the neurotransmitter inhibitory effect.

УДК 612.115.014.46:615.272.2.015.42:612.26

А. Н. Клейменов, М. А. Розенфельд, Е. Б. Бурлакова, Ю. В. Зенков,
А. А. Шведова, Л. Д. Смирнов

ВЛИЯНИЕ АНТИОКСИДАНТА ОП-6 НА НЕКОТОРЫЕ МОДЕЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ СИСТЕМЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

Институт химической физики АН СССР

Антиоксидант (АО) из класса 3-оксипиридина обладает широким спектром биологического действия [1—3], в том числе ярко выраженным профилактическим и терапевтическим эффектами при развитии внутриглазных кровоизлияний у кроликов, вызываемых с помощью аргонного лазера [4]. В литературе имеются также данные, указывающие на то, что синтетические АО, такие, как дибунол, ОП-6, несмотря на различные методы введения дибунола экспериментальным животным, была выявлена общая закономерность в изменениях показателей свертывания крови. Так, время свертывания, время рекальцификации и толерантность плазмы к гепарину увеличивались, протромбиновый индекс и фибринолитическая активность снижались. Интерпретация полученных эффектов наталкивается на значительные трудности в связи с проведением исследований на уровне целостного организма.

Целью настоящей работы явилось изучение возможных молекулярных механизмов действия антиоксиданта ОП-6 из класса 3-оксипиридина на процессы образования и лизиса фибринового сгустка в модельных системах в условиях, приближенных к физиологическим.

Методика

Исследования влияния антиоксиданта ОП-6 на процессы фибринообразования и лизиса фибринового сгустка в условиях, близких к физиологическим (рН 7,2; $\mu = 0,15$), проводили на препаратах бычьего фибриногена (ФГ) и тромбина (ТР), выпускаемых Каунасским предприятием по производству бактериальных препаратов. ФГ подвергали предварительной очистке по методу [7].

Исходным материалом для изучения воздействия АО на процессы полимеризации и агрегации фибрин-мономера (ФМ) служил высокоочищенный раствор последнего, получаемый по модифицированному нами методу В. А. Белицера [8]. Иницирование перехода ФМ в фибрин-полимер (ФП) осуществляли путем снижения в растворе ФМ

концентрации мочевины добавлением фосфатного буфера. Влияние АО на исследуемый процесс исследовали и методом вискозиметрии, а значения характеристической вязкости рассчитывали по методу А. А. Берлина [9]. Измерения проводили на вискозиметрах Освальда с термостатируемой рубашкой при 25 °С. Исследуемые образцы перед измерением выдерживали в термостате при 25 °С в течение 3 ч для приведения системы в равновесие. Все опыты данной серии проводили в среде 2,2 М мочевины при концентрации белка 1 мг/мл. Данный раствор ФМ титровали АО, молярная концентрация которого превышала таковую ФМ в 50, 100, 500, 1000, 5000, 10 000 раз.

Влияние АО на скорость процесса фибринолиза оценивали по изменению светорассеяния исследуемого раствора в односантиметровых кюветах при $\lambda=380$ нм. Контрольный раствор содержал ФГ в концентрации 1 мг/мл, а активность пламина (ПЛ) и ТР составляли соответственно 0,4 каз. ед/мл и 0,3 усл. ед/мл. Пламиноген выделяли из плазмы донорской крови методом афинной хроматографии [10]. Затем пламиноген осаждали сульфатом аммония и растворяли в фосфатном буфере pH 7,2. Активацию пламиногена в ПЛ осуществляли преинкубацией пламиногена со стрептазой фирмы «Behringwerke AG» (100 ед. на 1 мг пламиногена) в течение 5 мин. Активность ПЛ находили казеинолитическим методом [11]. При добавлении к раствору ФГ смеси ТР+ФЛ сначала происходит увеличение светорассеяния за счет образования фибринового сгустка, затем его снижение в результате лизиса сгустка. Время, за которое уровень светорассеяния возвращался к исходной величине, было принято за контрольное. В опыте исходный раствор титровали возрастающими концентрациями АО, аналогично с вискозиметрическими измерениями.

Для выяснения степени деградации фибринового сгустка под действием ПЛ в присутствии возрастающих концентраций АО был проведен электрофорез конечных продуктов деградации в 5% полиакриламидном геле с 0,1% додецилсульфатом натрия без меркаптоэтанолa [12].

Для изучения возможности взаимодействия гепарина с АО были проведены спектрофотометрические исследования в видимой области по метакроматическому сдвигу спектра красителя метиленового голубого [13] на приборе Пай Уникам модели SP-8000. Кроме того, были осуществлены спектрофотометрические исследования в ИК-области с помощью прибора Перкин-Елмер модели 577. В опытах был использован гепарин фирмы «Спофа» (ЧССР). Образцы, полученные высушиванием смеси растворов гепарина и АО, запрессовывали в таблетки с КВг. Сравнение проводили со спектрами чистых препаратов гепарина, АО и их механической смеси.

Результаты и обсуждение

В результате вискозиметрических исследований было установлено, что последовательное увеличение концентрации АО в пробе приводит к уменьшению характеристической вязкости ФП (рис. 1). Как видно из графика, при увеличении

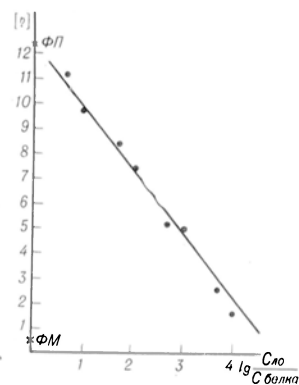


Рис. 1. Зависимость характеристической вязкости раствора ФП в 2,2 М мочевины от логарифма концентрации АО.

концентрации АО наблюдается возрастание эффекта ингибирования реакции полимеризации ФМ.

Изучение влияния АО на процесс фибринолиза показало, что увеличение концентрации АО приводит к значительному замедлению скорости лизиса. Так, при концентрациях АО в пробе $0, 1,5 \times 10^{-4}, 3 \cdot 10^{-4}, 1,5 \cdot 10^{-3}, 3 \cdot 10^{-3}, 1,5 \cdot 10^{-2}$ и $3 \cdot 10^{-2}$ моль/л, время лизиса составляет соответственно 100, 109, 114, 125, 132, 147 и 156 мин. Из приведенного выше видно, что если время полного лизиса фибринового сгустка в отсутствие АО составляет 100 мин, то по мере увеличения концентрации АО оно увеличивается и достигает 156 мин при молярном соотношении $\text{ФМ} : \text{АО} = 1 : 10\,000$.

Электрофоретические исследования продуктов деградации фибринового сгустка, образованных в результате плазминового гидролиза, показали, что добавление АО приводит к ингибированию фибринолиза, что выражается увеличением в лизате доли ранних продуктов деградации (рис. 2, см. вклейку).

Согласно современным представлениям, плазминовый гидролиз молекул ФН осуществляется в 3 ступени с появлением продуктов деградации, обозначаемых как X, Y, D, E, относительные концентрации которых указывают на глубину превращения. Как видно из результатов электрофореза, в контроле имеется 4 четких полосы, характеризующих продукты деградации нестабилизированного фибрина — X, Y, D, E. В присутствии АО наблюдается увеличение интенсивности полосы, ответственной за наличие фрагмента X и соот-

ветственно уменьшение интенсивности полос, ответственных за присутствие фрагментов Y, D и E. С увеличением концентрации АО в пробе наблюдается расширение полосы фрагмента X, что указывает на появление молекул с различными молекулярными массами в диапазоне 270—240 тыс. дальтон (т. е. фракция фрагментов X становится более гетерогенной). В то же время происходит сужение полос фрагментов Y и D. Таким образом, с увеличением концентрации АО степень деградации фибрина уменьшается.

Спектрофотометрическими исследованиями в видимой области методом метахромазии было установлено наличие комплекса гепарин — АО по восстановлению спектра красителя. Добавление гепарина к красителю приводит к метахроматическому сдвигу спектра последнего вследствие образования комплекса краситель — гепарин. При последующем добавлении АО в увеличивающихся концентрациях происходит восстановление спектра красителя до исходного состояния (рис. 3). Это свидетельствует о вытеснении гепарина из комплекса краситель — гепарин антиоксидантом и об образовании нового комплекса гепарин — АО. Наличие этого комплекса было подтверждено при сопоставлении ИК-спектров чистых гепарина, АО, их механической смеси со спектром продукта, получающегося взаимодействием гепарина и АО в растворе (рис. 4). В спектре механической смеси проявляются линии поглощения как гепарина, так и АО без каких-либо изменений их положения и интенсивности. Однако

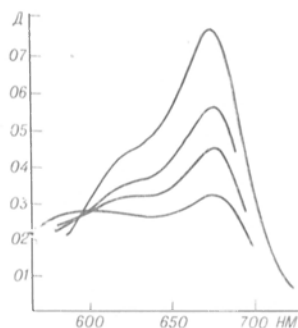


Рис. 3. Кривые восстановления спектра метиленового голубого при добавлении в смесь МГ+гепарин АО в различных концентрациях.

1 — спектр МГ; 2 — спектр комплекса МГ — гепарин, 3 и 4 — спектр смеси МГ — гепарин и АО при соотношениях гепарин: АО — 1 : 2500 и 1 : 5000 соответственно.

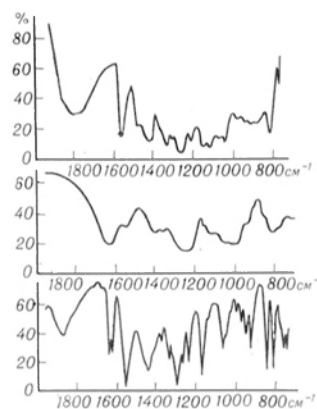


Рис. 4. ИК-спектры комплекса гепарин — АО (1), гепарина (2), и АО (3).

в спектре продукта часть линий, характеризующих колебания пиридинового кольца АО, были смещены в длинноволновую область. Так, полосы, характеризующие характеристические колебания $\nu_{C=S}$ и $\nu_{C=N}$ со значениями частот соответственно 1630 и 1620 см^{-1} (дублет) и 1550 см^{-1} сместились в длинноволновую область и приняли значения 1560 см^{-1} и 1550 см^{-1} (дублет) и 1475 см^{-1} . Аналогично в длинноволновую область сместилась полоса со значением частоты 1870 см^{-1} до величины 1780 см^{-1} . Произошли изменения и в спектре гепарина. Полоса, соответствующая симметричным валентным колебаниям сульфогруппы гепарина, изменила свое значение с 1000 см^{-1} до 910 см^{-1} . Обнаруженные изменения в спектрах указывают на то, что между атомом азота пиридинового кольца молекулы АО и сульфогруппой молекулы гепарина происходит взаимодействие, приводящее к образованию комплекса гепарин — АО.

Как установлено в работе, АО обладает ярко выраженной физиологической активностью, влияя на функциональное состояние системы свертывания крови. Анализ вискозиметрических данных дает возможность констатировать тот факт, что данный препарат непосредственно взаимодействует с молекулами ФМ, вызывая смещение равновесия системы $\text{мономер} \rightleftharpoons \text{полимер} \rightleftharpoons \text{агрегат}$ в сторону мономера. Такое явление приводит к укорочению полимерных цепей фибрина и уменьшению числа разветвлений. В физико-химическом отношении это выражается в снижении характеристической вязкости. Способность АО взаимодействовать с молекулами ФМ, как это следует из развитых ранее представлений

Розенфельда и соавт. [14, 15], должна вызывать нарушения как в сетчатой структуре фибрина, так и в некоторых его физиологических свойствах, в частности в устойчивости фибринового сгустка к воздействию протеолитического фермента — ПЛ. Теоретически можно было предположить, что в присутствии АО при фиксированной активности ПЛ скорость фибринолитического процесса должна увеличиваться. Однако в действительности спектрофотометрические данные свидетельствуют о противоположной картине. Скорость фибринолиза уменьшалась, и этот эффект количественно коррелировал с выбранной концентрацией препарата. Биохимический анализ продуктов деградации также показал, что АО обладает ингибирующим действием на фибринолиз. Как можно объяснить возникающие противоречия между вискозиметрическими данными, моделью фибринообразования, с одной стороны, и спектрофотометрическими и электрофоретическими данными — с другой? В процессе анализа выше перечисленных данных возникло дополнительное предположение о том, что АО обладает антифибринолитической активностью. Такое предположение автоматически снимает противоречие между полученными экспериментальными результатами. Для доказательства выдвинутого предположения были проведены дополнительные исследования по фибриногенолизу, которые позволили заключить, что скорость расщепления ФГ в присутствии АО действительно замедляется (см. рис. 2). При этом наблюдается увеличение содержания фрагмента X с различной степенью деградации и уменьшается концентрация фрагмента D. Электрофоретические данные не позволяют сделать однозначного вывода относительно механизма ингибирования плазминового гидролиза антиоксидантом. Вполне вероятно, что АО взаимодействует с молекулой субстрата и затрудняет при этом доступ фермента к белковой молекуле. Возможно также непосредственное взаимодействие АО с ПЛ.

Таким образом, из проведенных исследований вытекает, что антиоксидант ОП-6 обладает широким спектром действия на систему свертывания крови. Он выступает как ингибитор фибринообразования за счет присущей ему антиполимеризационной активности. Повидимому, препарат ОП-6 связывает гепарин, не блокируя при этом анти-

коагулянтной активности последнего. Это можно предположить, основываясь на результатах многочисленных работ, проведенных в целях выявления свойств гепарина взаимодействовать с белковыми и небелковыми компонентами, в том числе с естественным антиоксидантом — серотонином [16, 17]. Антиоксидант ОП-6 является также ингибитором процессов фибринолиза и фибриногенолиза. Подобные эффекты, установленные на основании исследований, проведенных на модельных системах, хорошо согласуются с характером воздействия препарата ОП-6 на физиологическое состояние системы свертывания крови у экспериментальных животных [5, 6]. Тем не менее это не исчерпывает всех возможных механизмов влияния антиоксиданта на регуляцию жидкого состояния крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дюмаев К. М., Смирнов Л. Д. — Успехи химии, 1975, № 10, с. 1788—1804.
2. Цыпин А. Б., Смирнов Л. Д., Кургузян Р. М. — Пат. физиол., 1978, № 5, с. 22.
3. Обухова Л. К., Цыпин А. Б., Кузьмин В. И. и др. — Изв. АН СССР, Серия биол., 1979, № 4, с. 548.
4. Эмануэль Н. М., Кацнельсон Л. А., Шведова А. А. и др. — Сов. мед., 1981, № 4, с. 16—17.
5. Гольденберг Ю. М. — Физиол. ж., 1980, № 5, с. 695—697.
6. Мищенко В. П., Гольденберг Ю. М., Новосельцева Т. В. — Вopr. мед. химии, 1980, № 6, с. 763—767.
7. Mossesson M. W. — Biochim. biophys. Acta, 1962, v. 57, p. 204—213.
8. Belitser V. A., Varetskaja T. V., Malneva G. V. — Ibid., 1968, v. 154, p. 367—375.
9. Берлин Ал. Ал. — Высокомолек. соединения, 1966, № 8, с. 1366.
10. Deutsch D., Mertz E. — Science, 1970, v. 170, p. 1095—1096.
11. Robbins K. C., Summaria L. — Meth. Enzymol., 1970, v. 19, p. 184.
12. Pizzo S. V., Schwartz M. L., Hill R. L. — J. biol. Chem., 1973, v. 52, p. 4574—4583.
13. Ehrlich G., Stivala S. S. — J. pharm. Sci., 1973, v. 62, p. 517.
14. Розенфельд М. А., Клейменов А. Н., Пирузян Л. А. — Докл. АН СССР, 1977, т. 235, № 4, с. 953—956.
15. Розенфельд М. А. — Докл. АН СССР, 1978, т. 239, № 6, с. 207—210.
16. Кудряшов Б. А., Калишевская Т. М., Ляпина Л. А. — Вopr. мед. химии, 1973, № 3, с. 269.
17. Кудряшов Б. А. Биологические проблемы регуляции жидкого состояния крови и ее свертывания. М., 1975.

Поступила 28.01.82

EFFECT OF THE ANTIOXIDANT OP-6 ON SOME REACTIONS OF BLOOD COAGULATION SYSTEM

A. N. Kleymenov, M. A. Rosenfeld,
E. B. Burlakova, Yu. V. Zenkov, A. A. Shvedova, L. D. Smirnov

Institute of Chemical Physics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Formation and lysis of fibrin clot were studied in model systems containing antioxidant OP-6, which is concerned with substances of

3-hydroxypyridine class, using viscosimetry, UV- and IR-spectroscopy. The antioxidant was shown to react with fibrin-monomer molecules shifting an equilibrium of the monomer/polymer/aggregate system towards monomer. OP-6 was able to bind heparin reversibly with formation of the dissociation complex. As shown by biochemical analysis of fibrinogen and fibrin degradation products the antioxidant OP-6 was responsible for inhibition of fibrinolysis and fibrinogenolysis. These data obtained in the model system correlated well with the specific effects of the antioxidant on physiological state of blood coagulation in experimental animals.

УДК 612.681-08:[612.123+612.124]-088.1(479.22×575.2)

В. Ф. Трюфанов, А. Д. Денисенко, И. А. Олейник, В. Т. Лозовский

ЛИПОПРОТЕИДЫ, АПОЛИПОПРОТЕИНЫ И ЛИПИДЫ ПЛАЗМЫ КРОВИ У ЛИЦ СТАРЧЕСКОГО ВОЗРАСТА И ДОЛГОЖИТЕЛЕЙ ГРУЗИИ И КИРГИЗИИ

Институт экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

Имеются данные, что у долгожителей и лиц старческого возраста заблуждения сердечно-сосудистой системы, обусловленные атеросклерозом, встречаются реже, а соотношение концентраций холестерина отдельных классов липопротеидов такое, при котором снижается вероятность развития атеросклероза (1—3). В последние годы получены убедительные доказательства, что увеличение концентрации холестерина липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) и уменьшение концентрации холестерина липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) отражают благоприятные изменения в уровне этих классов липопротеидов, которые препятствуют развитию атеросклероза и тем самым способствуют продлению жизни людей. Ряд авторов [4] даже считают возможным рассматривать уровень холестерина ЛПВП (более точно, уровень самих ЛПВП), как фактор долголетия. Предполагается, что главной функцией ЛПВП в крови являются захват и выведение холестерина из мембран клеток и транспорт его в печень [5, 6]. Увеличение концентрации холестерина ЛПВП рассматривается как один из главных факторов в предупреждении атеросклероза и связанной с ним ишемической болезни сердца [6—8]. Функция выведения холестерина из периферических тканей, осуществляемая ЛПВП, и транспорт его в печень тесно связаны с активностью лецитин-холестерин-ацетилтра и сферазы

(ЛХАТ), катализирующей эстрификации фосфолипидов холестерина крови. К факторам ЛХАТ является аполипротеин (апо) А-I, который входит в состав ЛПВП. Основными белковыми компонентами ЛПВП являются апо-A-I, апо-A-II и апо-E. Их масса составляет около 95% всех белков ЛПВП человека, основная доля среди которых (75%) принадлежит апо-A-I [9].

В работе представлены результаты исследований уровня холестерина плазмы крови и его распределения по фракциям отдельных классов липопротеидов, а также содержания в плазме крови апо-A-I, апо-A-II и E у мужчин и женщин старческого возраста и долгожителей Батуми и у мужчин киргизов такого же возраста, проживающих в предгорных и высокогорных районах Киргизии. Последнее исследование было предпринято с целью выяснения вопроса о возможном влиянии на уровень липидов крови долгожителей одной и той же национальности условий их проживания в различных географических зонах (предгорный и высокогорный районы).

Методика

Обследовано 120 человек (60 мужчин и 60 женщин) в возрасте от 75 до 105 лет, проживающих в Батуми. Распределение обследованных по возрасту представлено в табл. 1. Возраст долгожителей устанавливали по паспортам, свидетельствам о рождении, спискам избирателей в местных Советах и

Таблица 1

Уровень липидов в плазме крови и содержание холестерина ЛПВП по отношению к общему холестерину крови у мужчин и женщин старческого возраста и долгожителей Батуми

Возраст, годы	Число обследованных	Холестерин, мг/100 мл				% холестерина ЛПВП от общего	Триглицериды, мг/100 мл	Холестериновый коэффициент атерогенности
		общий	ЛПВП	ЛПВП	ЛПОНП			
М у ж ч и н ы								
75—89	24	182±5,6	52,0±3,7	102±6,9	27,1±1,8	28,4	136±8,9	2,5
90—105	36	184±3,5	58,3±3,1	102±4,5	27,0±1,6	31,7	131±7,0	2,1
В целом по группе	60	183±3,3	55,7±2,3	102±3,7	27,0±1,2	30,4	133±5,4	2,3
Ж е н щ и н ы								
75—89	28	218±5,8	61,0±4,0	127±5,7	30,4±2,2	27,9	154±11,2	2,6
90—105	32	204±6,2	64,6±3,4	110±6,2	29,2±1,9	31,6	145±9,4	2,1
В целом по группе	60	210±4,4	62,9±2,5	122±4,2	29,7±1,4	29,9	149±7,1	2,3

$$\begin{array}{lll}
 P_{1-4} < 0,01 & P_{1-4} < 0,01 & P_{1-4} < 0,02 \\
 P_{2-5} < 0,01 & P_{2-5} < 0,2 & P_{2-5} < 0,3 \\
 P_{3-6} < 0,01 & P_{3-6} < 0,05 & P_{3-6} < 0,01 \\
 & P_{1-2} < 0,2 & P_{4-5} < 0,1 \\
 & & P_{1-2} > 0,05
 \end{array}$$

уточняли в личной беседе с обследуемыми или их родственниками. Те лица, которые имели выраженные изменения сердечно-сосудистой системы, резко ограничивающие их подвижность, в обследование не включались.

В Киргизской ССР обследовано 25 мужчин старческого возраста из них 20 проживают в предгорных поселках Кок-Жар (высота около 1000 м над уровнем моря) и 5 — в высокогорном поселке Мургаб (высота около 4000 м над уровнем моря). Из 14 обследованных долгожителей-киргизов 2 мужчин живут в поселке Мургаб, 4 — в г. Фрунзе и 8 — в поселке Кок-Жар Наукатского района.

Кровь для анализа брали из локтевой вены утром натощак. В качестве антикоагулянта использовали ЭДТА из расчета 1 мг на 1 мл крови. Общий холестерин и триглицериды плазмы крови экстрагировали изотропным спиртом в соотношении 1:20. Холестерин ЛПВП экстрагировали изопропиловым спиртом из надосадочной жидкости после осаждения из плазмы крови ЛПОНП и ЛПНП гепарином в присутствии ионов марганца [10, 11]. Экстракты хранили в холодильнике в герметически закрытой посуде не более 3 нед и доставляли в Ленинград для определения холестерина и триглицеридов на автоанализаторе АА-11 фирмы «Техникон». Методы обработки крови и анализа липидов с применением постоянной международной программы стандартизации подробно описаны ранее [12]. Уровень холестерина ЛПОНП рассчитывали по формуле [13], а концентрацию холестерина ЛПНП определяли по разности между содержанием общего холестерина и холестерина ЛПВП и ЛПОНП. Холестериновый коэффициент атерогенности рассчитывали описанным методом [6, 14]. Наибольшие объемы плазмы крови всех обследуемых замораживали в рефрижераторе и в замороженном состоянии доставляли в Ленинград, для определения концент-

рации апо-А-I, апо-А-II и апо-Е методом ракетного иммуноэлектрофореза в агарозном геле, содержащем кроличью иммунную моноспецифическую сыворотку против человеческих апо-А-I, апо-А-II и апо-Е [15, 16].

Кровь от 4 долгожителей, проживающих в г. Фрунзе, в день взятия была доставлена в Ленинград самолетом в ледяной бане и подвергнута аналитическому ультрацентрифугированию для изучения концентрации отдельных подклассов липопротеидов высокой плотности по методу [17], осуществленному с учетом всех особенностей, оговоренных в работе [18] на аналитической центрифуге «Beckman» модель Е, со стандартной оптической системой при положении фазовращающей пластины 55°. Методические особенности аналитического ультрацентрифугирования подробно описаны в статье А. Д. Денисенко и соавт. [19].

Результаты и обсуждение

При рассмотрении результатов исследований содержания общего холестерина и холестерина отдельных классов липопротеидов в плазме крови лиц старческого возраста и долгожителей, представленных в табл. 1, прежде всего обращает на себя внимание относительно низкая концентрация общего холестерина и холестерина ЛПНП у мужчин обеих возрастных групп. Концентрации этих показателей оказались существенно ниже, чем у мужчин более молодого возраста (40—59 лет), про-

живающих в Ленинграде и Москве [20]. Ввиду отсутствия популяционных данных о содержании липидов в мужской популяции Грузинской ССР пока трудно объяснить, с чем связаны указанные выше различия — с возрастом или с другими факторами (географическими, этнографическими, генетическими, диетическими и т. д.). Можно лишь отметить, что в предыдущем нашем исследовании было также обнаружено низкое содержание как общего холестерина, так и холестерина ЛПНП в плазме крови долгожителей, проживающих в предгорном районе Абхазской АССР Грузии [2]. При низкой концентрации общего холестерина плазмы крови и холестерина ЛПНП концентрация холестерина ЛПВП у мужчин старческого возраста и долгожителей была близкой к той, которая определена у мужчин 40—59 лет, проживающих в Москве и Ленинграде [20]. Вместе с тем важно подчеркнуть, что доля холестерина ЛПВП в общем пуле холестерина плазмы крови у долгожителей оказалась выше, а холестерин-

вый коэффициент атерогенности — ниже, чем у мужчин упомянутого возраста Москвы и Ленинграда.

У женщин с увеличением возраста отмечалось небольшое (на 6,5%) снижение уровня общего холестерина крови, уменьшение холестерина ЛПНП почти на 20% и увеличение холестерина ЛПВП на 6%.

Приведенные данные позволяют предположить, что с увеличением возраста у женщин наблюдается более выраженные изменения распределения холестерина среди различных классов липопротеидов, чем у мужчин. Подобные результаты были получены и в исследованиях других авторов [21]. Из приведенных в табл. 1 данных следует также, что у женщин старческого возраста и женщин-долгожителей абсолютное общее содержание холестерина ЛПВП выше, чем у мужчин соответствующего возраста. Однако холестерин-коэффициент атерогенности оказался практически одинаковым у обследованных обоих пола. Как видно из данных табл. 1, уровень триглицеридов крови лиц

Таблица 2

Концентрация липидов плазмы крови у мужчин старческого возраста, проживающих в Наукатском районе и в высокогорном поселке Мургаб Киргизской ССР

Возраст, годы	Холестерин, мг/100 мл				% холестерина ЛПВП от общего	Коэффициент атерогенности	Триглицериды, мг/100 мл
	общий	ЛПВП	ЛПНП	ЛПОНП			
75	186	37	124	25	19,9	4,0	123
75	177	39	115	23	22,0	3,5	115
75*	137	36	83	18	26,3	2,8	80
75	160	89	52	19	55,6	0,8	94
76*	145	47	75	23	32,4	2,0	117
76	169	43	106	20	25,4	2,9	100
77	169	49	103	17	29,0	2,4	87
77	149	49	82	18	32,9	2,0	89
77	167	54	101	12	32,3	2,1	62
78	133	43	80	10	32,3	2,1	50
78*	148	53	66	29	35,8	1,8	143
78	161	43	103	15	26,7	2,7	74
78	179	65	92	22	29,9	1,7	109
79*	157	47	87	23	29,9	2,3	117
79	171	57	97	17	33,3	2,0	83
81	192	59	100	33	30,7	2,2	168
82	138	46	82	10	33,3	2,0	48
83	187	70	98	19	37,4	1,6	93
83	172	76	74	22	44,2	1,2	109
83*	155	48	88	19	30,9	2,2	95
85	138	45	67	26	32,6	2,0	130
85	147	34	102	11	23,1	3,3	58
85	165	38	55	17	23,0	3,3	87
86	132	36	76	20	27,2	2,6	98
89	141	46	77	18	32,6	2,0	79
В среднем по группе	159±3,5	50±2,6	86,7±3,5	19,4±1,1	31,2	2,3	96,3±5,6

* Обследованные мужчины проживают в высокогорном поселке Мургаб.

Таблица 3

Концентрация липидов плазмы крови у мужчин-долгожителей, проживающих в Киргизской ССР

Возраст, годы	Место жительства	Холестерин, мг/100 мл				% холестерина	Коэффициент атерогенности	Триглицериды, мг/100 мл
		общий	ЛПВП	ЛПНП	ЛПОНП			
90	Наукат	128	39	78	11	30,5	2,3	56
91	»	178	46	117	15	25,8	2,8	73
91	г. Фрунзе	218	60	136	22	27,5	2,6	111
93	Мургаб	163	49	100	14	30,0	2,3	100
96	Наукат	198	64	118	16	32,3	2,1	81
96	г. Фрунзе	205	48	134	23	23,4	3,3	114
98	Мургаб	159	51	94	14	32,0	1,9	69
98	Наукат	153	43	95	15	28,1	2,5	76
98	»	163	61	86	16	37,4	1,7	78
99	»	187	79	92	16	42,2	1,3	79
103	»	169	45	103	21	26,6	2,7	107
103	г. Фрунзе	217	53	140	24	24,4	3,1	119
104	»	165	45	137	27	27,3	2,7	93
105	Наукат	132	60	51	21	45,4	1,2	104
В среднем по группе		174±23,5	53,5±2,5	100±6,0	18,6±1,2	30,9±31	2,3	93,1±6,2

престарелого возраста и долгожителей в отличие от общего холестерина крови не подвержен снижению. Он соответствует или даже несколько превышает представленные в литературе данные о содержании триглицеридов в крови мужчин и женщин 40—59 лет [20].

При обследовании мужчин, проживающих в предгорных и горных районах Киргизской ССР (табл. 2, 3) установлено еще более низкое, чем у жителей Батуми, содержание общего холестерина, холестерина ЛПНП (особенно у долгожителей), холестерина ЛПОНП и холестерина ЛПВП.

Относительно высокие концентрации холестерина ЛПВП у людей старческого возраста и особенно у долгожителей, где на его долю приходится почти $\frac{1}{3}$ от общего холестерина крови, явились основанием для изучения аполиппротеинового состава крови этих людей. Кроме того, плазма от нескольких долгожителей была исследована на содержание ЛПВП и их подклассов — ЛПВП₂ и ЛПВП₃ с помощью аналитического ультрацентрифугирования. Результаты этих исследований представлены в табл. 4 и 5.

При определении концентрации аполиппротеинов у лиц обоего пола старческого возраста и долгожителей, проживающих в Батуми, обнаружено, что содержание апо-А-I в крови мужчин в возрасте 75—89 лет было ниже, чем у

женщин того же возраста. Содержание апо-А-I и апо-А-II в крови мужчин обеих возрастных групп было также ниже, чем у лиц более молодого возраста, проживающих в Ленинграде и имеющих нормальный уровень холестерина ЛПВП. В целом концентрация всех измеренных апопротеинов не изменялась статистически достоверно с возрастом. Обращает на себя внимание также тот факт, что отношение ХС ЛПВП/апо-А-I и особенно ХС ЛПВП/апо-А-II у лиц старше 75 лет было выше, чем у лиц более молодого возраста с нормоальфапопротеидемией, проживающих в Ленинграде, но не достигало такового у лиц с гиперальфапопротеидемией. Это свидетельствует о том, что у долгожителей указанные апопротеины переносят (связывают) большие количества холестерина, чем у более молодых лиц.

Из данных, представленных в табл. 5 видно, что аналитическое ультрацентрифугирование ЛПВП, выделенных из 4 образцов плазмы крови долгожителей г. Фрунзе, не позволило выявить определенных закономерностей в распределении основных подклассов. У 2 долгожителей содержание ЛПВП₂ преобладало над содержанием ЛПВП₃, а у 2 других наоборот. При этом отношение ЛПВП₂/ЛПВП₃ также значительно колебалось (от 0,59 до 1,39).

Таким образом, результаты исследо-

Таблица 4

Концентрация апо-А-I, апо-А-II, апо-Е и липидов плазмы крови у мужчин и женщин старческого возраста и долгожителей г. Батуми

Концентрация apo-A-I, apo-A-II, apo-E и липидов плазмы крови										
Возраст, годы	Число обследуемых	Аполипопротеины, мг/100 мл				Холестерин, мг/100 мл		Триглицериды, мг/100 мл	Холестерин ЛПВП/апо-А-I	Холестерин ЛПВП/апо-А-II
		apo-A-I	apo-A-II	apo-E	общий	ЛПВП				
М у ж ч и н ы										
40—59*	42	136±3,6	63,9±1,7	10±0,4	194±5,2	54,8±1,5	95,4±9,7	0,41±0,01	0,86±0,02	
40—59*	21	173±5,5	71,0±3,8	8,3±0,8	211±7,3	99,7±5,4	58,9±5,5	0,58±0,02	1,45±0,08	
75—89	24	121±6,00	49,6±2,0	9,2±0,6	182±5,6	52,0±3,7	136±8,9	0,44±0,03	1,07±0,07	
90—105	33	129±5,6	54,2±2,6	10±2,6	184±3,6	56,4±3,1	131±7,0	0,43±0,03	1,06±0,08	
75—105	57	125±4,1	52,1±1,7	9,7±0,4	183±4,5	54,2±3,4	133±8,3	0,44±0,02	1,06±0,07	
Ж е н щ и н ы										
75—89	22	143±5,4	52,4±1,3	11,1±1,1	206±5,3	62,1±4,9	164±13,7	0,44±0,04	1,18±0,09	
90—105	20	130±7,1	54,4±2,1	9,2±0,6	202±4,8	64,4±4,1	147±12,3	0,51±0,04	1,20±0,08	
75—105	42	136±5,9	53,3±1,7	10,3±0,8	204±5,1	63,4±4,5	155±12,8	0,47±0,03	1,19±0,07	

* Мужчины с нормальным уровнем (38—75 мг/100 мл) холестерина ЛПВП в крови.

** Мужчины с высоким уровнем (выше 75 мг/100 мл) холестерина ЛПВП в крови.

Таблица 5

Содержание подклассов ЛПВП (мг/100 мл) в плазме крови мужчин-долгожителей

Возраст, годы	ЛПВП ₁ , мг/100 мл	ЛПВП ₂ , мг/100 мл	ЛПВП ₂ /ЛПВП ₁
20—59 (n=44)*	123,8	176,5	0,74
91	202,2	162,2	1,25
96	122	208	0,59
103	137	197	0,69
104	146	105	1,39

* Данные А. Д. Денисенко и соавт. [19].

ваний показали, что наиболее характерной особенностью состава липидов крови, обнаруженной у лиц обоего пола старческого возраста и долгожителей разных национальностей и проживающих в различных районах СССР, является низкое абсолютное содержание общего холестерина крови и холестерина ЛПНП, при высоком относительном (но не абсолютном) содержании холестерина ЛПВП. Такой «благоприятный» состав липидов крови у людей старше 75 лет может служить одной из причин меньшей их заболеваемости ишемической болезнью сердца и увеличенной продолжительности жизни. Некоторые авторы [1, 21] предполагают, что низкие концентрации холестерина ЛПНП у людей старше 80 лет обнаруживаются потому, что в указанную возрастную группу не смогли попасть люди, у которых эти значения были более высокими и они ранее умерли от коронарного атеросклероза. Мы не имеем возможности сказать, какой уровень общего холестерина крови и холестерина отдельных классов липопротеидов был у обследованных в более молодом возрасте.

ЛИТЕРАТУРА

1. Климов А. И. — Вестн. АМН СССР, 1980, № 3, с. 45—49.
2. Хечинашвили Г. Г., Терюкова Н. П., Трюфанов В. Ф. и др. — Кардиология, 1978, № 12, с. 14—20.
3. Glueck C. J., Gartside P. S., Faltal R. W. et al. — J. Lab. clin. Med., 1976, v. 88, p. 941.
4. Glueck C. J., Gartside P. S., Steiner P. M. et al. — Atherosclerosis, 1977, v. 27, p. 387.
5. Климов А. И. — В кн.: Биохимические основы патогенеза атеросклероза. Л., 1980, с. 3—45.

6. Климов А. Н.— В кн.: Превентивная кардиология. Под ред. Г. И. Косицкого. М., 1977, с. 260—321.
7. Miller G. J., Miller N. F.— Lancet, 1975, v. 1, p. 16—19.
8. Stein Y., Stein O., Goven R.— In: High Density Lipoproteins and Atherosclerosis. Ed. A. M. Gotto. Amsterdam, 1978, p. 37—49.
9. Феногипирование гиперлипопротеидемий (Метод. рекомендации). Под ред. Климова А. Н., Ганелиной И. Е. М., 1975.
10. Manual of Laboratory Operations: Lipid Research Clinics Program. Washington, 1975, v. 1, p. 56.
11. Трюфанов В. Ф., Сучкова С. Н.— В кн.: Дислипипротендемии и ишемическая болезнь сердца. Под ред. Е. И. Чазова, А. Н. Климова. М., 1980, с. 151—167.
12. Rifkind B.— Atherosclerosis, 1970, v. 11, p. 545.
13. Сучкова С. Н., Тимов В. Н., Курчатова С. А. и др.— Кардиология, 1978, № 6, с. 29—36.
14. Alaupovic P., Carry M. D., McConaty W. J. et al.— In: International Conference on Atherosclerosis. Ed. L. A. Carlson et al. New York, 1978, p. 109—115.
15. Carry M. D., Alaupovic P., Suenram C. A.— Clin. Chem., 1976, v. 22, p. 315.
16. Lindgren F. T.— In: Analysis of Lipids and Lipoproteins. Ed. E. G. Perkins. Champaign, 1975, p. 204.
17. Ewing A. M., Freeman N. K., Lindgren F. T.— Advanc. Lipid Res., 1965, v. 3, p. 25.
18. Денисенко А. Д., Усатенко М. С., Лозовский В. Т. и др.— Вопр. мед. химии, 1981, № 2, с. 272—280.
19. Климов А. Н., Герасимова Е. Н., Шестов Д. Б. и др.— Кардиология, 1979, № 4, с. 61—67.
20. Michelson J., Gartside P. S., Siegel M. et al.— Metabolism, 1979, v. 28, v. 1, p. 5.
21. Усатенко М. С., Олейник И. А., Денисенко А. Д.— Кардиология, 1980, № 8, с. 20.

Поступила 28.10.81

LIPOPROTEINS, APOLIPOPROTEINS AND BLOOD PLASMA LIPIDS IN SENILE AGE AND LONGEVITY IN MEN AND WOMEN FROM GEORGIA AND KIRGHIZIA

V. F. Tryufanov, A. D. Denisenko, I. A. Oleynik, V. T. Losovsky

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

In men with increase of age from senile to longevity content of total cholesterol was practically unaltered (182 and 184 mg/100 ml), concentration of cholesterol in LPHD was increased from 52 mg up to 58.3 mg/100 ml simultaneously with unaltered content of LPLD cholesterol (102 mg/100 ml) and of LPVLD cholesterol (27.1 and 27 mg/100 ml). Triglycerides decreased from 136 mg down to 101 mg/100 ml. In women content of total blood cholesterol was about 218 mg/100 ml in senile age and 204 mg/100 ml in longevity and concentration of LPHD cholesterol — 61 mg and 64.6 mg/100 ml, respectively. Contrary to men, in women a distinct decrease in content of LPLD cholesterol (from 127 mg to 110 mg/100 ml) as well as of triglycerides (from 154 to 145 mg/100 ml) were found on transition from senile age to longevity. Concentration of the apolipoproteins studied was unaltered in men on transition from senile age to longevity and in women concentration of apolipoprotein A-I decreased from 143 mg to 130 mg/100 ml and of apo-E from 11.1 mg to 9.2 mg/100 ml. The decrease in LPLD cholesterol content and increase of LPHD cholesterol, simultaneously with relatively low content of total blood cholesterol, appear to be considered among the reasons responsible for longevity and lesser risk of heart ischemic disease.

УДК 616.36-07:616.153.96-074

Д. Д. Петрунин, М. Н. Молоденков, А. С. Благодослов, В. Н. Кузнецов,
Г. А. Олефиренко, С. И. Репина

КОМПЛЕКСНОЕ ИММУНОХИМИЧЕСКОЕ ОБСЛЕДОВАНИЕ БОЛЬНЫХ С НЕКОТОРЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПЕЧЕНИ

Кафедра оперативной хирургии и топографической анатомии и Проблемная лаборатория гемосорбции II ММИ им. Н. И. Пирогова, Москва

Основная масса белков сыворотки крови синтезируется в печени. При заболеваниях этого органа синтетическая функция печени нарушается, что выражается, в частности, в диспротеинемии [1, 2]. Традиционная оценка диспротеинемии с помощью проб на коллоидоустойчивость и электрофоретических протеинограмм в последнее время все больше уступает место иммунохимическому определению индивиду-

альных белков, что более точно отражает конкретные нарушения метаболизма [3]. В то же время не уделяется должного внимания комплексному иммунохимическому обследованию больных на широких системах индивидуальных сывороточных белков.

Целью настоящего исследования явилась оценка диспротеинемии путем иммунохимического определения значительной группы индивидуальных сы-

вороточных белков, а также тестирования тканевых антигенов печени и α -фетопротеина.

Методика

Обследовано 42 больных с различными заболеваниями печени и 16 практически здоровых людей. Индивидуальные белки сыворотки крови исследовали методом двойной иммунодиффузии в агаре с помощью моноспецифических стандартных тест-систем [4] и методом радиальной иммунодиффузии [5]. Моноспецифические антисыворотки, как правило, приготавливали в нашей лаборатории с использованием для иммунизации кроликов препаратов соответствующих белков и последующего адекватного истощения под контролем иммунодиффузионного анализа с эталонными антисыворотками фирмы «Berhingwerke». Получение поливалентных антисывороток к тканевым антигенам печени и α -фетопротеину описано нами ранее [6]. Для определения печеночных антигенов применяли иммунодиффузионное титрование с поливалентной антисывороткой к тканевым белкам.

Результаты и обсуждение

В таблице представлены результаты иммунохимического определения некоторых белков в сыворотке крови больных с различными заболеваниями печени. Во всех случаях по сравнению с контрольной группой отмечается выраженная в той или иной степени диспротеинемия.

При желтухах, развивающихся как осложнение желчнокаменной болезни, отмечается статистически достоверное понижение уровня α_1 -липопротеидов (в 5 раз) и β_2 -гликопротеина I, а также определенное повышение уровня β -липопротеидов, в то время как концентрация иммуноглобулинов (Ig) и компонентов комплемента в среднем остается в пределах нормы. Обращает на себя внимание появление в сыворотке крови более чем в половине случаев тканевых антигенов печени, что свидетельствует о наличии деструктивных процессов в паренхиме этого органа.

В случаях первичного билиарного цирроза наиболее существенные изменения претерпевают уровни в сыворотке крови IgM (повышается в 5 раз) и α_1 -липопротеидов (понижается в 8 раз). Кроме того, при этом заболевании достоверно понижаются уровни β_2 -гликопротеина I и C_4 -компонента комплемента при повышении содержания β -липопротеидов. Выявление в некоторых случаях тканевых антигенов характери-

Показатели комплексного иммунохимического обследования больных с некоторыми заболеваниями печени (в мг/100 мл; $M \pm m$)

Диагноз	Число обследованных	α_1 -Липо-протеид	* β -Липо-протеид	β_2 -Глико-протеин-I	IgG	IgA	IgM	Фибриноген	C_3 -компл-мент	C_4 -компл-мент	Тканевые антигены печени	α -фето-протеин
Здоровые (контроль)	16	310 \pm 28	440 \pm 56	24 \pm 2	1100 \pm 120	190 \pm 22	130 \pm 18	270 \pm 28	110 \pm 12	40 \pm 5	—	—
Подпеченочный холестаз	14	64 \pm 14*	580 \pm 120*	14 \pm 3*	1180 \pm 190	180 \pm 23	140 \pm 16	230 \pm 24	100 \pm 14	36 \pm 5	8 (57%)	—
Цирроз печени	8	60 \pm 9*	520 \pm 61	10 \pm 2	1240 \pm 110	310 \pm 16*	150 \pm 16	190 \pm 17*	120 \pm 14	50 \pm 9	4 (50%)	—
Первичный билиарный цирроз печени	6	42 \pm 8*	710 \pm 110*	16 \pm 3*	1300 \pm 210	220 \pm 20	600 \pm 96*	220 \pm 32	70 \pm 9	24 \pm 4*	2 (33%)	—
Первичный рак печени	12	72 \pm 9*	450 \pm 62	11 \pm 2*	1280 \pm 120	340 \pm 31*	135 \pm 14	290 \pm 33	130 \pm 16	48 \pm 6	8 (66%)	8 (66%)
Системная красная волчанка с поражением печени	2	330	520	20	1200	200	220	410	26	1	2 (100%)	—

* Изменения по сравнению с показателями контрольной группы статистически достоверны ($P < 0,05$).

зуге напряженность деструктивных процессов в печени.

При циррозах печени имеет место статистически достоверное понижение уровней фибриногена, α_1 -липопротеида, β_2 -гликопротеина I и повышение концентрации в сыворотке крови IgG, IgA и IgM, однако лишь повышение содержания IgA у обследованных больных было статистически достоверным ($p < 0,05$). В то же время имеются сообщения [7] о том, что при циррозах в 2—3 раза повышается содержание иммуноглобулинов всех 3 указанных классов. У больных циррозами выход тканевых белков печени в кровь отмечался в половине случаев, что, по-видимому, связано с волнообразным течением деструктивных и регенеративных процессов.

В двух случаях системной красной волчанки с признаками гепатита наиболее характерным изменением в протеинограмме было резкое понижение уровня C_4 и C_3 -компонентов комплемента — в 40 и в 4 раза соответственно. В этих же случаях отмечался довольно интенсивный выход тканевых белков печени в кровь, что может служить лабораторным тестом на вовлеченность в патологический процесс печени.

При первичном раке печени в $2/3$ случаев в сыворотке крови определялись раковоэмбриональный антиген — α -фетопротейн — и тканевые белки печени. Кроме того, наблюдалось статистически достоверное понижение уровней α_1 -липопротеида (в 4 раза) и β_2 -гликопротеина I (в 2 раза), а также почти в 2 раза было повышено содержание IgA. Следует отметить, что протеинограммы при первичном раке печени и циррозе очень похожи и в значительной части случаев могут быть дифференцированы лишь с помощью теста на α -фетопротейн.

Таким образом, в исследованиях на уровне индивидуальных белков у больных с различными заболеваниями печени отмечалась выраженная в различной степени диспротеинемия. По-видимому, ряд изменений в белковой формуле крови носит неспецифический характер и связан с общим нарушением функции печени. Некоторые авторы [8] считают, что изменения в сывороточном составе липопротеидов при различных патологических воздействиях на печень имеют неспецифический характер и заключаются в понижении уровня α -

липопротеидов и увеличении содержания β -липопротеидов. В нашей работе это положение подтверждено с использованием иммунохимического метода анализа.

Обращают на себя внимание существенные колебания уровней отдельных сывороточных белков даже в пределах контрольной группы, что в значительной мере может девальвировать клиническое значение отдельных тестов в плане оценки функционального состояния печени. В то же время комплексный иммунохимический тест на систему сывороточных белков позволяет значительно более надежно решать эту задачу. Представляется важным включать в такое комплексное обследование тест на наличие тканевых белков печени в сыворотке крови, который может служить объективной характеристикой деструктивных тенденций в этом органе. Для дифференциальной диагностики первичного рака печени весьма эффективен тест на α -фетопротейн [6], который также представляется целесообразным включить в комплексное иммунохимическое обследование больных.

Тем не менее следует отметить, что даже при тяжелых заболеваниях печени изменения в протеинограмме могут не носить особенно резкого характера. Это связано с тем обстоятельством, что печень, особенно у молодых больных, обладает большими компенсаторными возможностями в плане регенерации: вновь образованные гепатоциты быстро берут на себя функцию пораженных, позволяя в определенных пределах поддерживать белковый гомеостаз крови.

Представляется необходимым подчеркнуть наиболее резкие изменения на уровне индивидуальных белков при заболеваниях печени, которые в определенном смысле приближаются к патогномичным признакам: появление в сыворотке крови α -фетопротейна при развитии первичного рака печени; резкое (пятикратное) повышение уровня IgM при первичном билиарном циррозе; резкое (в 40 раз) понижение уровня C_4 -компонента комплемента при волчаночном гепатите; необычайно сильное (в 5—8 раз) понижение уровня α_1 -липопротеидов при явлениях холестаза при циррозе. Эти моменты должны в первую очередь учитываться при соответствующей лабораторной дифференциальной диагностике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Основы гепатологии. Под ред. А. Р. Блюгера. Рига, 1975.
2. Левин Г. С. Иммунология поражений печени. Ташкент, 1972.
3. Вапцаров И., Йомтов М., Савов С. и др. Диспротеинемия, София, 1978.
4. Храмкова Н. И., Абелев Г. И. — Бюлл. exper. биол., 1961, № 12, с. 107—111.
5. Mancini G., Vderman J.-P., Carbonara A. O. et al. — In: Protides of the Biological Fluids. Amsterdam, 1964, p. 370—373.
6. Татаринев Ю. С. — Вопр. мед. химии, 1964, № 1, с. 90—91.
7. Белозеров Е. С., Сагандыков Б. Б., Шабалин В. В. — Клин. мед., 1979, № 3, с. 63—65.
8. Лабановская Ж. Л., Силонова Г. И., Селипер И. С. — Там же, 1980, № 3, с. 56—62.

Поступила 16.11.81

COMPLEX IMMUNOCHEMICAL EXAMINATION OF PATIENTS WITH SOME LIVER DISORDERS

D. D. Petrunin, M. N. Molodenkov, A. S. Blagosklonov, V. N. Kuznetsov, G. A. Olefirenko, S. I. Repina

N. I. Pirogov II Medical School, Moscow

Complex differential-diagnostic immunodiffusion test for a number of blood plasma proteins, antigens of liver tissue and α -fetoprotein was used to evaluate the liver tissue functional state. The test characterized more distinctly the liver tissue function as compared with estimation of individual proteins and was more informative in diagnosis of liver tissue disorders.

УДК 615.361.61.014.413.015.44:612.46.014.2-06:612.592

Н. П. Суббота, А. М. Белоус

ВЛИЯНИЕ МЕДЛЕННЫХ СКОРОСТЕЙ ЗАМОРАЖИВАНИЯ НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ РАЗНЫХ ТИПОВ ТКАНЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ КОРЫ ПОЧКИ

Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, Харьков

Создание банков органов, в которых нуждается практическая медицина, требует разработки совершенных методов их длительного хранения при низкой температуре. Согласно современным данным [1, 2], большинство биоматериалов замораживают с использованием медленных скоростей замораживания, когда максимально уменьшаются возможности внутриклеточной кристаллизации, являющейся летальным фактором для клетки [3]. Вместе с тем медленные скорости замораживания также способны оказать разрушающее действие на клеточные структуры за счет «эффектов растворов» [4], включающих комплекс таких физико-химических факторов, как изменение ионной силы растворов, дегидратацию, гиперконцентрацию солей и т. д. [5].

Целью данной работы явилось выяснение характера криоповреждений митохондрий при медленном замораживании различных типов тканевых препаратов коры почки (изолированные митохондрии, гомогенаты, срезы).

Методика

Опыты проводили на 65 беспородных белых крысах (самцы и самки) массой 150—180 г. Гомогенат получали на холоду (2—

4 °С) в среде выделения (в мМ): сахара — 300; версен — 0,2; Φ_n — 2; pH 7,4 при соотношении ткань — среда выделения 1:2. Срезы получали по методу Умбрейта [6]. Концентрацию цитохромов в гомогенатах определяли, как описано [7]. Дыхательную активность митохондрий гомогенатов регистрировали полярографически [8]. Гомогенаты и срезы замораживали со скоростью 1—2 ° в 1 мин до —5°, —12°, —21°, —30 °С. Отогрев производили при 37 °С до 2—4 °С с начальной скоростью отогрева, равной 300° в 1 мин. Белок определяли по методу Лоури в каждой исследованной пробе.

Результаты и обсуждение

Из табл. 1 видно, что при замораживании гомогенатов до температуры —5 °С и последующего быстрого отогрева дыхательная активность во 2-м и 3-м метаболических состояниях при окислении митохондриями сукцината и α -кетоглутарата не изменялась. Таким образом, охлаждение биоматериала в составе гомогената в интервале температур от 0° до —5 °С, что соответствует вымораживанию свободной воды суспензии, не сопровождается существенными изменениями параметров дыхания и окислительного фосфорилирования. Дыхательная активность митохондрий, замороженных в составе

Таблица 1

Функциональное состояние митохондрий после оттаивания гомогенатов из различных температурных точек кривой термограммы медленного замораживания ($n=7$)

Измеряемый параметр	Температура, °C			
	2—4	—5	—12	—21
Сукцинат				
Состояние 2	$4,00 \pm 0,50$	$4,13 \pm 0,17$ $P > 0,1$	$6,55 \pm 0,65$ $P < 0,02$	$7,07 \pm 0,3$ $P < 0,001$
Состояние 3	$7,10 \pm 0,70$	$7,00 \pm 0,02$ $P > 0,1$	$7,86 \pm 0,45$ $P > 0,1$	$7,00 \pm 0,60$ $P > 0,1$
α -Кетоглутарат				
Состояние 2	$3,30 \pm 0,30$	$3,17 \pm 0,10$ $P > 0,1$	$4,55 \pm 0,17$ $P < 0,01$	$4,50 \pm 0,21$ $P < 0,01$
Состояние 3	$5,20 \pm 0,60$	$5,00 \pm 0,40$ $P > 0,1$	$4,40 \pm 0,21$ $P < 0,01$	$3,90 \pm 0,23$ $P < 0,01$

срезов, охлажденных с аналогичной скоростью до той же температуры, также не изменяется (табл. 2).

При охлаждении гомогенатов до -12°C их дыхательная активность во 2-м метаболическом состоянии увеличивается, причем при окислении сукцината — на 164 %, а при окислении α -кетоглутарата — на 236 %. При окислении α -кетоглутарата дыхательная активность гомогенатов в 3-м метаболическом состоянии резко снижается, составляя 34,6 % от исходной, а дыхательный контроль (ДК) — отсутствует.

Исследование дыхательной активности митохондрий после медленного замораживания — отогрева срезов показало, что изменение этих параметров выражено только после замораживания до -12°C . При этом скорость окисления сукцината увеличивалась на

171 % по сравнению с контролем, а α -кетоглутарата — на 165 % (см. табл. 2). Это особенно наглядно иллюстрируется изменением ДК митохондрий при окислении α -кетоглутарата заморожено-отогретыми срезами (рис. 1). Необходимо отметить, что если дыхательная активность митохондрий срезов в этом случае в 3-м метаболическом состоянии после охлаждения до -12°C практически не изменялась при окислении сукцината, то при окислении α -кетоглутарата она снижалась на 19 %, что также несколько ниже величины, полученной при отогреве гомогенатов.

При дальнейшем медленном снижении температуры до -21°C особых изменений параметров дыхания и окислительного фосфорилирования в митохондриях по сравнению с температурным интервалом -12°C практически не наблюдалось (см. табл. 1 и 2).

Таблица 2

Функциональное состояние митохондрий после медленного замораживания—отогрева срезов коры почки из различных температурных точек ($n=7$)

Измеряемый параметр	Температура, °C			
	2—4	—5	—12	—21
Сукцинат				
Состояние 2	$4,00 \pm 0,16$	$4,05 \pm 0,36$ $P > 0,1$	$5,85 \pm 0,20$ $P < 0,001$	$7,03 \pm 0,21$ $P < 0,001$
Состояние 3	$7,75 \pm 0,45$	$7,80 \pm 0,64$ $P > 0,1$	$7,50 \pm 0,43$ $P > 0,1$	$7,00 \pm 0,17$ $P > 0,1$
α -Кетоглутарат				
Состояние 2	$2,40 \pm 0,22$	$2,10 \pm 0,07$ $P > 0,1$	$3,95 \pm 0,37$ $P < 0,02$	$3,99 \pm 0,21$ $P < 0,01$
Состояние 3	$5,16 \pm 0,41$	$5,13 \pm 0,32$ $P > 0,1$	$3,81 \pm 0,22$ $P < 0,05$	$3,50 \pm 0,17$ $P < 0,01$

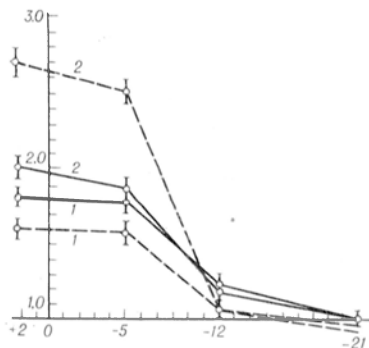


Рис. 1. Дыхательный контроль митохондрий после медленного замораживания гомогенатов (1) и срезов (2) коры почки при окислении сукцината (сплошная линия) и α -кетоглутарата (пунктирная линия) в инкубационной среде, содержащей в мМ: сахарозы — 300; трис-НСI — 20,0; рН 7,4

По оси ординат — дыхательный контроль по Ларди, по оси абсцисс — температура замораживания (в °C).

Изменение скорости проникновения НАД·Н через внутреннюю мембрану митохондрий при медленном замораживании гомогенатов и срезов коры почки до -21°C представлено на рис. 2. Как видно, скорость окисления добавленного НАД·Н увеличивается довольно значительно, т. е. внутренняя мембрана теряет свою интактность и становится проницаемой для НАД·Н, что более выражено при замораживании митохондрий в составе срезов, чем гомогенатов.

Уровень цитохромов при медленном охлаждении гомогенатов и срезов коры почки до -5°C не изменялся, однако при охлаждении до более низких температур (-12°C) содержание цитохрома *a* после отогрева гомогенатов снижалось на 13% ($P < 0,05$), а цитохромов *c+c₁* — на 21% ($P < 0,02$). Основные соотношения этих параметров в различных температурных точках медленного замораживания представлены на рис. 3. Как видно на этом рисунке, со-

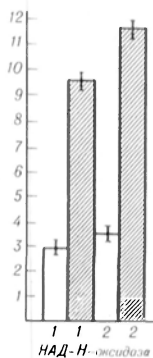


Рис. 2. НАД·Н-оксидазная активность митохондрий после медленного замораживания гомогенатов (1) и срезов (2) коры почки до -21°C инкубационная среда, содержащая в мМ: сахарозы — 300; трис-НСI — 20; рН 7,4. По вертикали — скорость окисления НАД·Н (в $\mu\text{MOL}_2/\text{мгм} \times \text{белка}/\text{мин}$).

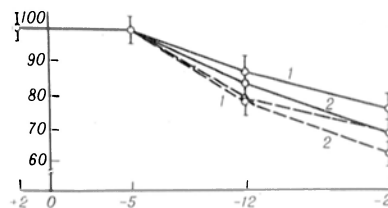


Рис. 3. Измерение концентрации цитохромов при отогреве гомогенатов (1) и срезов (2) коры почки из различных температурных точек.

Среда: 240 мМ ДНФ; 0,4 мМ НАД·Н; цитохромы восстанавливали 3 мМ цианида, окисляли — 4,8 мМ амиталя. Сплошная линия — цитохром *a*, пунктирная — *c+c₁*. По оси ординат — концентрация цитохромов (в % от контроля); по оси абсцисс — температура отогрева (в °C).

держание цитохрома *a* при отогреве гомогенатов снижалось менее значительно, чем цитохромов *c+c₁* во всех температурных диапазонах.

В случае замораживания срезов основные изменения со стороны цитохромов также происходили в температурном интервале от -5 до -12°C .

Как при охлаждении гомогенатов, так и срезов тканей наиболее выраженные изменения были отмечены при измерении концентраций цитохромов *c+c₁* (рис. 4) во всех температурных диапазонах.

Так как, по-видимому, основным методом криоконсервации почки (либо другого органа) является медленное охлаждение, то анализ влияния на ткани медленных скоростей замораживания разных типов тканевых препаратов коры почки представляет существенный интерес. Это связано с особенностями кристаллизации жидкой фазы и необходимостью адаптации органа к холодному воздействию, что должно сопровождаться постепенной дегидратацией тканей и клеток почки, перестройке структуры мембран и метаболизма. Поэтому мы считали, что анализ влияния отдельных этапов медленного замораживания на структурно-функциональное состояние митохондрий может явиться целесообразным для понимания некоторых сторон механизмов криоповреждений, имеющих место при таком способе охлаждения.

Как видно из приведенных данных, повреждения митохондрий наблюдались как в диапазоне температур от -5°C до -12°C , так и, особенно, при эвтектических температурах, т. е. на

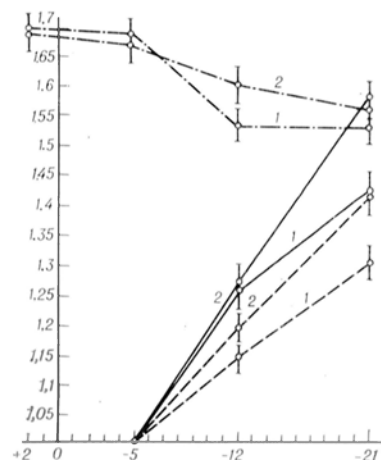


Рис. 4. Динамика соотношений концентраций дыхательных ферментов при отогреве гомогенатов (1) и срезов (2) коры почки из различных температурных точек.

a_n — концентрация цитохрома a в контроле, a_o — концентрация цитохрома a в опыте. Отношения концентраций цитохромов: $\frac{a_n}{a_o}$ (пунктирная линия), $\frac{c+c_1}{a}$ (пунктирная линия с точкой), $\frac{(c+c_1)_k}{(c+c_1)_o}$ (сплошная линия). По оси ординат — отношение концентраций цитохромов; по оси абсцисс — температура отогрева (в °C).

По оси ординат — отношение концентраций цитохромов; по оси абсцисс — температура отогрева (в °C).

фоне льдообразования в системе, когда на мембраны клеток влияют «эффекты растворов» [9]. Последние оказывают отрицательное воздействие на структуры митохондрий, функциональные системы которых, как известно, отличаются высокой чувствительностью к явлениям дегидратации [10], изменению ионной силы раствора [11], pH и концентрации солей [12].

Необходимо отметить, что, хотя митохондрии выделяли в сахарозной среде, которая является для них структурным криопротектором, присутствие сахарозы в среде замораживания не обеспечивало сохранения структурно-функциональных параметров митохондрий. Это происходило, очевидно, в результате того, что при вымораживании воды суспензии концентрация сахарозы в окружающей среде и внешнем пространстве митохондрий резко увеличивается, вызывая их дегидратацию. Следовательно, дегидратация митохондрий происходит не только за счет вымораживания воды в лед, но и в результате увеличения концентрации сахарозы. Резкое обезвоживание митохондрий приводит к пространственному сближению их структур, в норме отдаленных друг от друга. Следова-

тельно, одной из возможных причин угнетения активности дыхательной цепи митохондрий в 3-м метаболическом состоянии при окислении сукцината после замораживания до температуры -12°C может быть повреждение целостности мембран за счет структурно-фазовых перестроек липидов и их латеральная сепарация в бислое на почве ее дегидратации, поскольку окисление сукцината связано именно с внутренней мембраной митохондрий и определяется ее структурно-функциональной целостностью.

Следует иметь в виду также тот факт, что содержание солей в митохондриях почки крысы довольно высокое, поэтому можно ожидать, что при замораживании их концентрация в клетках почки сильно увеличивается. Такое увеличение концентрации солей вблизи мембраны может вызвать дезорганизацию структуры воды и изменение ионного и электрического поля, нарушая гидрофобные свойства липидов мембраны этих органелл [13]. Поэтому не исключено, что угнетение электротранспортной цепи митохондрий при окислении сукцината может быть связано с повышением ионной силы раствора внутреннего пространства митохондрий, куда сахара не проникает, а также фазово-структурными переходами липидов бислоя. Возможной причиной угнетения активности дыхательной цепи митохондрий при окислении сукцината может быть повреждение энерготранспортной цепи митохондрий, что было показано нами ранее [14]. При этом промежуточные высокоэнергетические соединения, очевидно, не расходуются на образование АТФ из АДФ и Φ_n .

Одним из важных факторов, ведущих к криповреждениям митохондрий, является изменение физико-химического состояния липидов. Способность липидов кристаллизоваться при низких температурах, а также при дегидратации [15] является тем обстоятельством, которое может иметь отношение к нарушению структурно-функциональной целостности митохондриальных мембран. Известно, что при температуре ниже 0°C подавляющее большинство липидов различных типов биологических мембран находится в состоянии геля [16], что сказывается на кинетических параметрах ферментативной активности. В связи с этим факт из-

менения фазового состояния липидов в процессе замораживания митохондрий приобретает существенное значение, поскольку они могут не только изменять проницаемость мембраны для ионов, но и для метаболитов, структурных белков и ферментов [15]. В связи с этим можно предположить, что уменьшение концентрации цитохромов в митохондриях медленно замороженных гомогенатов и срезов коры почки может быть следствием пространственной транслокации цитохромов, сопровождающейся потерей их активности либо их элиминированием из состава мембраны. Однако эти предпосылки нуждаются в экспериментальной проверке.

Таким образом, совокупность полученных данных показывает, что по мере усложнения биологической организации материала увеличивается степень криоповреждений митохондрий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abbott W. M.— Cryobiology, 1971, v. 7, p. 113—133.
2. Pegg D. E., Farrant J.— Ibid., 1969, v. 6, p. 200—210.
3. Meryman H. T., Kafig E.— Proc. Soc. a. Med., 1975, v. 90, p. 587.
4. Mazur P.— Science, 1970, v. 168, p. 939—948.
5. Privitera C. A., Greiff D., Stronga D. R.— J. biol. Chem., 1958, v. 233, p. 524—527.
6. Умбрейт В. В., Буррис Р. Х., Штауффер Дж. Ф. Манометрические методы изучения тканевого обмена. М., 1951, с. 153.
7. Евдотиенко Ю. В., Мохова Е. Н.— В кн.: Механизмы дыхания, фотосинтеза и фиксации азота. М., 1967, с. 35.
8. Мохова Е. Н.— В кн.: Руководство по изучению биологического окисления полнореграфическим методом. М., 1973, с. 175—189.

9. Meryman H. T. Cryobiology. London, 1966.
10. Cunarro C., Wein W.— Biochim. biophys. Acta, 1975, v. 387, p. 234—240.
11. Clegg E. D.— ASMRAE J., 1975, v. 17, p. 23—27.
12. Deshpande P. J., Jacob S. W.— Surg. Forum, 1963, v. 14, p. 176—177.
13. Кащевская Л. А.— В кн.: Всесоюзная конф. по пересадке тканей и органов. 3-я. Тезисы докладов. Ереван, 1963, с. 132.
14. Суббота Н. П. Функциональное состояние митохондрий после замораживания коркового слоя почек. Автореф. дис. канд. Харьков, 1980.
15. Mohnight R. C., Hunter F. E., Ochler W. H.— J. biol. Chem., 1965, v. 240, p. 3439—3446.
16. Levitt J.— In: Protoplasmatologia. Wien, 1959, Bd 8, S. 87.

Поступила 15.04.82

EFFECT OF SLOW FREEZING ON THE FUNCTIONAL STATE OF MITOCHONDRIA FROM VARIOUS PREPARATIONS OF KIDNEY CORTEX

N. P. Subbota, A. M. Belous

Institute on Problems of Cryobiology and Cryomedicine, Kharkov

Changes in functional activity of mitochondria, in concentration of respiration enzymes and the state of internal membrane after slow freezing down to -5° , -12° , -21° and -30° of various tissue preparations of renal cortex (homogenates, slices, etc) were studied. The following phenomena were found: an increase in the rate of mitochondrial respiration at the second metabolic state, inhibition of electron transport most distinct during mitochondrial oxidation of α -ketoglutarate, a decrease in concentration of cytochromes, an increase in the internal membrane permeability. Considerable damage of mitochondria was observed at temperatures between -5° and -12° but the most pronounced impairment of the organelles occurred at -10° — -20° , i. e. at the freezing point of free water in the suspension and at eutectic temperatures.

УДК 612.351.11.015.1:577.152.14].014.46:547.94

И. Г. Савин, Г. И. Бачманова, И. И. Карузина, Е. Д. Скоцеляс,
Г. Н. Антонова, Г. Ф. Жирнов, А. В. Карякин, А. Н. Арипов,
А. И. Арчаков

ВЛИЯНИЕ ГЕЛИОТРИНА НА СИСТЕМУ МИКРОСОМАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ПЕЧЕНИ КРЫС

Узбекский НИИ педиатрии, II ММИ им. Н. И. Пирогова, Институт химической физики АН СССР, Москва

Гелиотрин является алкалоидом гелиотропа опушенноплодного (*Heliotropium Lasiocarpaut*) — сорняка, произрастающего в республиках Средней Азии. Попадая вместе с зерном хлебных злаков в пищу человека и животных.

он вызывает тяжелые общие отравления и поражения отдельных органов и систем, особенно печени [1]. В экспериментах на животных было установлено, что введение гелиотрина сопровождается развитием у них токсического ге-

патита, а при хроническом отравлении — цирроза печени [1]. Следует отметить, что к настоящему времени достаточно хорошо исследованы патоморфология повреждения печени и основные показатели белкового, углеводного и жирового обмена при данной патологии [1]. Однако до сих пор остается неясным, каков молекулярный механизм повреждающего действия гелиотрина, какие именно мембранные системы гепатоцитов повреждаются при его действии. В связи с этим нами было проведено исследование действия гелиотрина на микросомальную монооксигеназную систему печени крыс.

Методика

Работа выполнена на белых беспородных крысах-самцах массой 100—150 г. Гелиотрин вводили животным в дозе 30 мг на 100 г массы тела. Микросомальную фракцию печени получали по методу, описанному ранее [2]. Содержание цитохромов P-450, b_5 , активность НАДФ·Н- и НАДН·Н-специфичных редуктаз, скорость реакций деметилирования диметиланилина (ДМА), аминопиррина, гидроксилирования анилина, О-деалкилирования *л*-нитроанизола, НАДФ·Н- и аскорбатзависимого перекисного окисления липидов в микросомах определяли, как описано ранее [3—6]. Скорость окисления гелиотрина микросомами в присутствии НАДФ·Н исследовали полярографическим методом на полярографе LP-7 со стационарным платиновым электродом закрытого типа [7]. Спектры связывания гелиотрина с цитохромом P-450 регистрировали на спектрофотометре «Аминко-DW2» [8]. Белок в микросомах измеряли по методу Лоури [9]. Определяли средние величины, полученные на 4—8 препаратах микросом. Каждый препарат объединял материал от 2—4 животных.

Результаты и обсуждение

В связи с тем что исследования по воздействию данного соединения на систему микросомального окисления проводились впервые, необходимо было изучить динамику изменения содержания компонентов этой системы: цитохромов P-450 и b_5 , при различных сроках отравления крыс. Гелиотрин вводили животным подкожно в дозе 30 мг на 100 г массы и через 3, 6, 12, 24, 48 и 72 ч определяли содержание гемопротеинов в препаратах микросом. Известно, что цитохром P-450 является лабильным ферментом и его содержание в мембранах микросом резко снижается при различных повреждающих воздействиях на мембрану [10, 11].

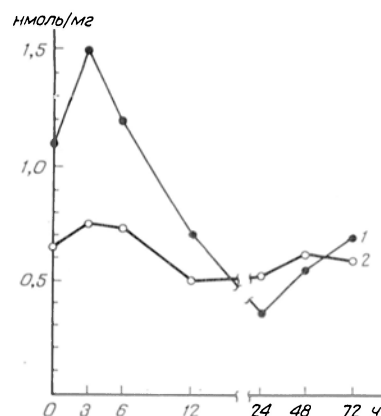


Рис. 1. Содержание цитохромов P-450 и b_5 в микросомах печени крыс после введения гелиотрина в дозе 30 мг на 100 г массы тела. Дифференциальные спектры цитохромов P-450 и b_5 регистрировали на спектрофотометре «Хитачи-356». Инкубационная смесь содержала 0,8—1 мг микросомального белка в 1 мл 100 мМ трис-HCl-буфера, pH 7,5. 1 — цитохром P-450; 2 — цитохром b_5 .

Введение гелиотрина приводит к резкому снижению содержания цитохрома P-450 в микросомах печени крыс в сроки 12—72 ч (рис. 1). Особенно значительным (в 3 раза по сравнению с контролем) было снижение уровня цитохрома P-450 в препаратах микросом, выделенных из печени крыс через 24 ч после отравления. Обращает на себя внимание увеличение удельного содержания другого, более стабильного фермента, цитохрома b_5 . В первые часы

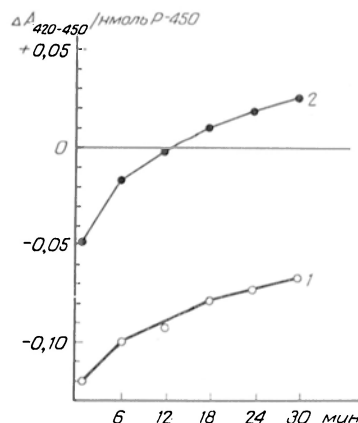


Рис. 2. Инактивация цитохрома P-450 в микросомах печени крыс после введения гелиотрина.

Дифференциальные спектры цитохрома P-450 регистрировали на спектрофотометре «Хитачи-356» в течение 30 мин при 37 °C: инкубационная смесь содержала 1 нмоль цитохрома P-450 в 100 мМ трис-HCl-буфере, pH 7,5. 1 — контрольные микросомы; 2 — микросомы печени крыс через 24 ч после введения гелиотрина в дозе 30 мг/100 г.

Таблица 1

Скорость НАДФ·Н-зависимого окисления (в нмоль продукта/мин/нмоль Р-450) ДМА, аминопирина, *n*-нитроанизола и анилина в микросомах печени крыс при введении гелиотрина в дозе 30 мг на 100 г массы тела (микросомы выделены через 24 ч после введения)

Условия опыта	ДМА	Амино- пирин	<i>n</i> -Нитро- анизол	Ани- лин
Контроль	6,5	6,3	1,1	0,8
Введение гелиотрина	6,3	5,7	0,56	0,4

после введения гелиотрина уровень содержания этого гемопротейда в микросомах возрастает на 15—20 %, затем происходит незначительное снижение его содержания и на более поздних сроках (48—72 ч) оно становится таким же, как и в контрольных препаратах.

Исследование скорости инактивации восстановленного цитохрома Р-450 показало, что в микросомах печени крыс, которым вводился гелиотрин, наблюдается гораздо более высокая скорость инактивации данного гемопротейда (рис. 2). Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что введение гелиотрина вызывает повреждение одного из ключевых ферментов системы микросомального окисления — цитохрома Р-450.

Эти факты послужили поводом для исследования активности других компонентов данной системы. Во всех дальнейших экспериментах гелиотрин вводили в дозе 30 мг на 100 г массы и животных забивали через 24 ч. Введение гелиотрина вызывало снижение ак-

Таблица 2

Скорость НАДФ·Н- и аскорбатзависимого перекисного окисления липидов (в нмоль малонового диальдегида/мг/мин) в печени крыс при введении гелиотрина

Условия опыта	НАДФ·Н-зависимое перекисное окисление	Аскорбатзависимое перекисное окисление
Контроль	0,31	0,44
Введение гелиотрина	0,64	1,3

Таблица 3

Влияние ДМА и гелиотрина на скорость потребления кислорода микросомами (в нмоль О₂/мг/мин) в присутствии НАДФ·Н

Условия опыта	Контроль	Введение гелиотрина
1 мМ НАДФ·Н	6,2	4,6
1 мМ НАДФ·Н + 6 мМ ДМА	8,7	5,6
1 мМ НАДФ·Н + 0,15 мМ гелиотрина	8,2	5,3

тивности НАДФ·Н-цитохром с- и НАД·Н-феррицианид редуктаз (т. е. НАДФ·Н- и НАД·Н-специфичных флавопротеидов) в среднем на 25—30 %.

При определении НАДФ·Н-зависимой скорости окисления, ДМА, аминопирина, *n*-нитроанизола и анилина (табл. 1) в опытных препаратах микросом наблюдалось снижение О-деалкилазной и *n*-гидроксилазной активностей цитохрома Р-450: скорость окисления *n*-нитроанизола и анилина составляла 50% от контроля. В то же время скорость окисления ДМА и аминопирина не изменялась. Эти данные можно объяснить, предположив, что гелиотрин вызывает инактивацию определенных подфракций цитохрома Р-450, ответственных за О-деалкилазную и *n*-гидроксилазную реакции.

Исследование системы перекисного окисления липидов мембран микросом показало, что введение гелиотрина вызывает резкое увеличение активности как НАДФ·Н-, так и аскорбатзависимого перекисного окисления (табл. 2). Скорость накопления продукта перекисного окисления липидов — малонового диальдегида, увеличивалась в опытных препаратах микросом в 2—3 раза. Стимуляция гелиотрином перекисного окисления липидов мембран может быть одним из механизмов повреждения мембран эндоплазматического ретикулума и локализованной в них системы микросомального окисления, как это происходит, например в случае отравления СС₄ [12].

Как видно из табл. 3, добавление гелиотрина *in vitro* оказывает стимулирующее действие на скорость свободного окисления НАДФ·Н в микросомах, как и типичный субстрат гидроксирования ДМА, что указывает на возможность окисления гелиотрина в микросомах. Определение спектров свя-

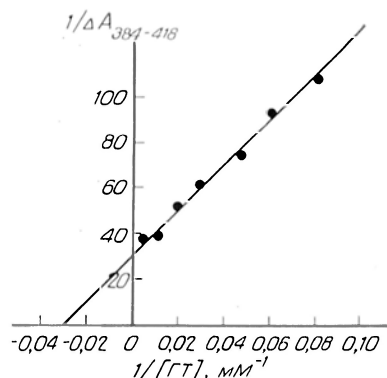


Рис. 3. Зависимость величины спектральных изменений при связывании цитохрома Р-450 с гелиотрином

Спектры связывания цитохрома Р-450 с гелиотрином регистрировали на спектрофотометре «Амико DW-2» по дифференциальной схеме; инкубационная смесь содержала 0,8–1 мг белка микросом в 1 мл 100 мМ трис-НCl-буфера, рН 7,5.

зывания гелиотрина с цитохромом Р-450 показало, что гелиотрин обладает очень высоким сродством к гемопротейду, K_s составила 35 мкМ (рис. 3), что сравнимо с константами для других типичных субстратов гидроксирования. Образование комплексов цитохрома Р-450 с гелиотрином сопровождается появлением спектров с характеристиками, типичными для субстратов I типа: максимумом поглощения при 384 нм и минимумом при 418 нм.

Таким образом, полученные результаты позволяют выдвинуть предположение, что гелиотрин взаимодействует с одной из подфракций цитохрома Р-450. Продукты его окисления способны стимулировать реакции перекисного окисления, что в свою очередь сопровождается повреждением мембран эндоплазматического ретикулума и инактивацией цитохрома Р-450.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алиментарно-токсические повреждения печени. Абдуллаев Н. Х., Азимов Р. К., Мухамедов Т. М. и др. Ташкент, 1978, с. 7–85.
2. Арчаков А. И., Девицкий В. М., Ка-

- рузина И. И. и др.— Биохимия, 1968, т. 33, с. 479.
3. Omura T., Sato R.— J. biol. Chem. 1964, v. 239, p. 2370.
4. Archakov A. I., Bachmanova G. I., Devichensky V. M. et al.— Biochem. J., 1974, v. 144, p. 1.
5. Арчаков А. И., Карузина И. И., Тверитинов В. Н. и др.— Биохимия, 1975, т. 40, с. 32.
6. Richter C., Azzi A., Weser U. et al.— J. biol. Chem., 1977, v. 252, p. 5061.
7. Сергеев П. В., Халилов Э. М., Арчаков А. И. и др.— Бюлл. exper. биол., 1976, № 3, с. 299.
8. Archakov A. I., Karuzina I. I., Tveritinov V. N. et al.— Biochem. Pharmacol., 1974, v. 23, p. 1053.
9. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. et al.— J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265.
10. Yamano T., Ichikawa Y.— Pharmacol. Ther., 1978, v. 2, p. 673.
11. Cytochrome P-450. EdS. R. Sato, T. Omura. Tokyo, 1978, p. 54–62.
12. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. М., 1975.

Поступила 18.11.81

THE INFLUENCE OF HELIOTRIN ON THE RAT LIVER MICROSOMAL OXIGENASE SYSTEM

I. G. Savin, G. I. Bachmanova, I. I. Karuzina, E. D. Skotselyas, G. N. Antonova, G. F. Zhirnov, A. V. Karyakin, A. N. Aripov, A. I. Archakov

Uzbek Institute of Pediatrics, Tashkent, N. I. Pirogov II Medical School, Institute of Chemical Physics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Content and functional activity of rat liver microsomal haemoproteins were studied after injection of heliotrin (HT). Heliotrin, at a dose of 30 mg/100 g, decreased distinctly cytochrome P-450 concentration in microsomes and increased the rate of inactivation of the enzyme reduced form. Decrease in the NADPH and NADH-dependent flavoprotein activities, decrease in O-dealkilating and p-hydroxylating activities and a distinct increase in NADPH- and ascorbate-dependent peroxidation of membrane lipids were found in rat liver microsomes treated with HT. As shown by polarographic analyses HT influenced the increase in the rate of NADPH oxidation similar to the effects caused by typical substrate of hydroxylation dimethylaniline. When the binding spectra were estimated, HT proved to have high affinity to cytochrome P-450. The data obtained suggest that HT appears to interact with the microsomal monooxygenase liver tissue system.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТРОМБОЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПЛАЗМАКИНАЗЫ

НИИ скорой помощи им. Н. В. Склифосовского, Москва

Современная консервативная терапия тромбозомболических заболеваний включает использование антикоагулянтных, дезагрегатных и фибринолитических препаратов [1—3]. Основой тромболитического действия является создание повышенной фибринолитической активности в крови больного. С этой целью используются препараты активаторного (стрептокиназа, урокиназа, фибринолитически активная плазма) и прямого фибринолитического действия (фибринолизин, тромболитин, окраз, бриназа, террилитин). Эти средства значительно различаются по механизму действия и влиянию на систему гемостаза [4, 5]. В настоящее время ведется поиск новых, эффективных, естественных для человека фибринолитических препаратов. В этой связи обращает на себя внимание использование физиологического плазменного активатора плазминогена человека, присутствующего в больших количествах в плазме крови при внезапной смерти [6, 7]. В НИИ скорой помощи им. Н. В. Склифосовского разработан и апробирован в полупроизводственных условиях метод получения «концентрата активированных ферментов фибринолиза», основанный на фракционировании фибринолитически активной плазмы посмертной крови этанолом при заданных температуре и pH [8]. Получен стерильный апиrogenный, лиофилизированный препарат, который назван нами плазмакиназой, исследованы его физико-химические свойства [9].

Настоящая работа посвящена оценке тромболитической эффективности плазмакиназы и влиянию ее на систему гемостаза в эксперименте на животных.

Методика

26 серий препарата плазмакиназы получены в полупроизводственных условиях экспериментально-производственной лаборатории (зав. — канд. мед. наук В. М. Русанов) ЦНИИ гематологии и переливания крови из плазмы крови внезапно умерших людей. Специфическую активность препарата исследовали фибринолитическим методом [10]

и выражали в фибринолитических единицах (ФЕ) на 1 мл раствора или 1 мг белка. 1 ФЕ соответствует такому количеству фермента, которое вызывает лизис 1 мг фибринового сгустка из плазмы донорской крови за 30 мин при 37 °C. 1 ФЕ плазмакиназы по тромболитической активности *in vitro* эквивалентна 250 МЕ стрептазы или 50 ед. Пилоуга урокиназы [11].

Экспериментальное исследование проведено на 50 белых крысах-самцах массой 220—250 г, кроликах-самцах породы шиншилла массой 2—2,5 кг, 17 беспородных собаках массой 15—20 кг. Для наркоза использовали 1% раствор гексенала или тиопентала натрия. Животные были разделены на 3 группы: 1-я — интактные, получавшие плазмакиназу, 2-я и 3-я — животные с экспериментальным тромбозом, получавшие соответственно 0,85% NaCl и плазмакиназу. Препараты вводили внутривенно (крысам, кроликам по 3—5 мл) и внутриаrтериально (собакам по 50—70 мл) со скоростью 1—5 мл/мин. Доза плазмакиназы для собак и крыс составляла 100 и 200 ФЕ/кг, для кроликов — 300 ± ФЕ/кг.

Тромбоз яремной вены крыс и кроликов и бедренной артерии собак вызывали согласно рекомендациям [12, 13]. У животных под наркозом обнажали яремную вену или бедренную артерию; на изолированный сегмент сосуда (0,9—1,2 см для вены и 2—3 см для артерии) накладывали специальные металлические зажимы или лигатуры. В сегмент вводили раствор тромбина (15 ед/мл). Через 60 мин зажимы снимали, отсутствие кровотока в проксимальной части вены или дистальной части артерии регистрировали визуально или ангиографически. Через 2—3 ч после тромбообразования опытным животным вводили плазмакиназу, а контрольным — 0,85% NaCl.

Кровь для анализа забирали из яремной вены кроликов и крыс и бедренной вены собак и стабилизировали 3,8% раствором цитрата натрия в отношении 4:1. Исследовали: время рекальцификации, протромбиновый индекс, свободный гепарин, проводили тромбоэластографический анализ [14]. Активность плазмينا, плазминогена, антипротеиназ определяли казеинолитическим методом [15] и выражали соответственно в казеинолитических (КЕ) и ингибиторных (ИЕ) единицах. 1 КЕ соответствует такому количеству фермента, которое высвобождает 450 мкг эквивалента кислоторастворимого тирозина за 1 час при 37 °C. 1 ИЕ эквивалентна 1 КЕ. Активность и содержание α_2 -макробулина (α_2 -МГ), α_1 -антитрипсина исследовали по степени подавления активности трипсина при использовании в качестве субстрата N-бензоил-D,L-аргинин-паранитроанилида (БАПНА) и выражали в миллиединицах (мЕ) активности и миллиграмм на 100 мл. 1000 мЕ = 1 Е α_2 -МГ соответствует активности трипсина, катализирующего расщепление 1 мкмоль

БАПНА за 1 мин при 37 °С [16]. Количество активатора плазминогена человека, плазминогена, продуктов деградации фибриногена и фибрина определяли иммунохимическими методами [17] как в плазме, так и в экстрактах органов и тканей животных. Представленные показатели гемостаза оценивали у интактных животных до и через 10, 30, 60, 120 и 180 мин после введения плазмакиназы; у животных с экспериментальным тромбозом — до, через 2—3 ч после тромбообразования и через 10, 60, 120 и 180 мин после введения 0,85% NaCl или плазмакиназы.

Для оценки эффективности тромболитического действия плазмакиназы у крыс проводили морфологическое исследование участка тромбированной вены.

Результаты и обсуждение

Плазмакиназа представляет собой фракцию плазмы крови, обогащенную в 5—9 раз β -глобулинами с удельной фибринолитической активностью 0,7—1,3 ФЕ/кг. Активность плазмакиназы на 90—95% обусловлена активатором плазминогена (гликопротеид с молекулярной массой 70 000 дальтон, изоэлектрической точкой при pH 6,2) и на 5—10% — плазмином. Содержание ингибиторов фибринолиза в препарате не превышает 2%. В опытах *in vitro* показано выраженное фибринолитическое действие плазмакиназы, эквивалентное препаратам стрептазы и урокиназы. Ингибиторами литического действия плазмакиназы является ϵ -аминокапроновая кислота, препараты контрикала и α_2 -МГ человека.

Данные о влиянии плазмакиназы на состояние гемостаза у экспериментальных животных представлены в табл. 1 и 2. Внутривенное введение интактным крысам 100 ФЕ/кг плазмакиназы приводит уже через 10 мин к повышению фибринолитической активности крови в среднем в 18,6 раза по сравнению с исходным уровнем. В течение 60—120 мин фибринолитическая активность сохраняется повышенной, постепенно снижаясь до исходного уровня к 180-й минуте. Энзиматически и иммунохимически исследована скорость инактивации и элиминации плазмакиназы (50 и 200 ФЕ/кг) из крови крыс (рис. 1). Период полувыведения препарата в зависимости от дозы составляет в среднем соответственно 75,6 и 226,2 мин, тогда как для урокиназы он не превышает 11—16 мин [4]. Согласно расчетам скорость элиминации плазмакиназы из крови колеблется от 19,6 до

26,5 мг/кг/час. Скорость инактивации препарата в 1,7—2,4 раза превышает скорость выведения, составляя 32,8—62,3 ФЕ/кг/час, что согласуется с данными о различиях времени инактивации и элиминации препаратов трипси-на и стрептокиназы [4, 18].

Иммунохимический анализ распределения препарата по органам и тканям крыс через 5 ч после введения показал, что активатор плазминогена человека в основном накапливается в печени (в зависимости от дозы 377 и 1600 мкг на 1 г сырой ткани), селезенке (249 и 670 мкг/г), легких (229 и 906 мкг/г), сердце (185 и 500 мкг/г). В головном мозге он практически отсутствует. В моче выявляется 190—463 мкг/мл плазмакиназы, что, вероятно, связано с выведением фрагментов активатора плазминогена, содержащих иммунохимические детерминанты.

В венозном кровотоке крыс уже через 10 мин после введения плазмакиназы выявлено удлинение временных показателей R и K тромбозаграммы (ТЭГ) соответственно на 36 и 22%, снижение МА ТЭГ на 15%, фибриногена — на 22—26% по сравнению с исходным уровнем (см. табл. 1). Состояние гипокоагуляции сохраняется в течение 60—120 мин, проявляя тенденцию к нормализации через 180 мин. Отметим, что с увеличением дозы препарата (200 ФЕ/кг) состояние гипокоагуляции и активация фибринолитической системы крови крыс усиливались.

У собак введение плазмакиназы вызывало аналогичные изменения гемостаза, однако гипокоагуляция и повышенная фибринолитическая активность сохранялись более длительное время после инъекции (см. табл. 1).

Введение плазмакиназы кроликам приводило к фазным изменениям состояния гемостаза. В течение 1-го часа отмечались выраженные явления гипокоагуляции, выражающиеся в удлинении R и K ТЭГ соответственно на 26—73 и 100—392%, уменьшении МА ТЭГ и концентрации фибриногена соответственно на 25—37 и 7—19% по сравнению с исходным уровнем. Со 2-го часа явления гипокоагуляции сменялись гиперкоагуляцией, выражающейся к 3-му часу в укорочении R и K ТЭГ соответственно на 32 и 56%, увеличении МА ТЭГ и содержания фибриногена соответственно на 16 и 70%, сниже-

Т а б л и ц а 1

Состояние свертывающей системы венозной крови интактных животных после введения плазминазы

Время после введения плаз- киназы	ТЭГ			Фибриноген, мг/100 мл	Фибринолитическая активность, мм*
	Р, мин	К, мин	мА, мм		
Крысы (n=12)					
Исходный уровень	1,4±0,1 (100)	2,2±0,2 (100)	51,3±2,1 (100)	210±10 (100)	4,3±0,5 (100)
10 мин	1,9±0,2* (136)	2,7±0,2 (122)	43,6±3,2* (85)	200±11 (95)	80,1±9,4* (1863)
60 »	1,9±0,2* (136)	2,8±0,2* (127)	38,5±3,5* (75)	165±15* (78)	34,7±4,1* (807)
120 »	1,9±0,2* (136)	2,7±0,1* (122)	35,9±6,0* (70)	155±12* (74)	16,7±3,9* (388)
180 »	1,5±0,1 (107)	2,1±0,2 (95)	41,6±4,1* (81)	166±13* (79)	4,5±0,7 (105)
Кролики (n=7)					
Исходный уровень	3,4±0,3 (100)	2,7±0,2 (100)	56,2±2,1 (100)	295±12 (100)	2,0±0,3 (100)
10 мин	5,9±0,5* (173)	5,4±0,4* (200)	42,1±1,9* (75)	274±13 (93)	3,4±0,7 (170)
60 »	4,3±0,3* (126)	13,3±1,7* (492)	35,2±1,6* (63)	240±18* (81)	2,4±0,4 (120)
120 »	3,3±0,2 (97)	2,2±0,2 (81)	53,1±1,7 (94)	330±20 (112)	1,9±0,2 (95)
180 »	2,3±0,2* (68)	1,2±0,1* (44)	65,1±2,8* (116)	503±28* (170)	0,9±0,3* (45)
Собаки (n=6)					
Исходный уровень	1,3±0,1 (100)	2,3±0,2 (100)	49,3±1,4 (100)	322±27 (100)	9,2±1,8 (100)
10 мин	1,6±0,2 (123)	3,0±0,3 (130)	39,6±1,7* (80)	312±30 (97)	82,3±10,1* (894)
30 »	1,8±0,2* (138)	3,7±0,3* (161)	36,7±2,1* (74)	290±25* (90)	64,8±5,9* (704)
60 »	2,2±0,2* (169)	4,4±0,5* (191)	36,0±2,9* (73)	187±19* (58)	49,3±3,9* (536)
120 »	3,2±0,3* (246)	4,2±0,4* (183)	33,4±2,5* (68)	184±19* (57)	23,8±2,1* (258)
180 »	1,8±0,2* (138)	2,8±0,2 (122)	37,3±2,9* (76)	200±17* (62)	16,4±3,0* (178)
240 »	1,2±0,2 (92)	2,6±0,2 (113)	42,8±2,9* (87)	250±20* (78)	10,3±1,4 (112)

П р и м е ч а н и е. Звездочка — $P < 0,05$; доза плазминазы для собак, крыс — 100 ФЕ/кг, для кроликов — 300 ФЕ/кг. Здесь и в табл. 2: в скобках процент.

Таблица 2
Некоторые показатели гемостаза в венозном кровотоке у крыс с экспериментальным тромбозом яремной вены после введения плазминазы

Показатель	Группа	Исходные данные	Время после введения препарата, мин			
			2 ч после тромбоза	10	60	120
ТЭГ: R, мин	Контрольная	1,4±0,1	1,5±0,1 (107)	1,6±0,1 (114)	1,4±0,1 (100)	1,6±0,2 (114)
	Опытная	1,4±0,1	1,5±0,1 (107)	1,9±0,2 (136)	2,2±0,2 (157)	2,0±0,2 (143)
K, мин	Контрольная	2,2±0,1	2,3±0,2 (104)	2,2±0,2 (100)	2,4±0,1 (109)	2,5±0,2 (114)
	Опытная	2,2±0,1	2,3±0,2 (104)	2,9±0,2 (132)	5,3±0,2 (241)	4,4±0,2 (200)
МА, мм	Контрольная	51,1±1,9	49,5±0,2 (97)	50,2±1,9 (98)	48,6±2,0 (95)	50,0±2,0 (98)
	Опытная	51,1±1,9	49,5±2,0 (97)	42,0±3,0 (82)	35,1±2,7 (69)	38,5±2,3 (75)
Фибриноген, мг на 100 мл	Контрольная	205±9	198±10 (97)	205±12 (100)	184±9 (90)	200±10 (98)
	Опытная	205±9	198±10 (97)	146±13 (71)	131±9 (64)	134±11 (65)
Фибринолитическая активность, мм ²	Контрольная	4,8±0,7	5,2±0,9 (121)	4,3±0,6 (89)	5,0±0,8 (104)	4,1±0,6 (85)
	Опытная	4,8±0,7	5,2±0,9 (121)	68,0±4,0 (1417)	40,2±3,2 (837)	30,1±3,0 (627)

Примечание. Контрольной группе животных (10) вводили 0,85% NaCl, опытной группе (12) — плазминазу.

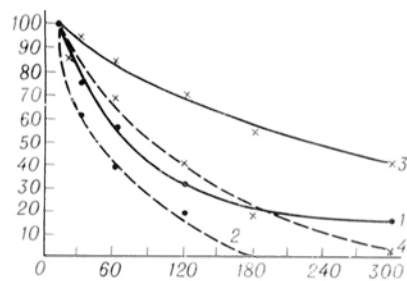


Рис. 1. Энзиматический и иммунохимический анализ скорости инактивации и элиминации плазминазы из крови интактных крыс. По оси абсцисс — время после введения плазминазы (в мин), по оси ординат — содержание плазминазы в плазме крови (в %). 1 — иммунохимический, 2 — энзиматический анализ после введения 50 ФЕ/кг плазминазы; 3 — иммунохимический, 4 — энзиматический анализ после введения 200 ФЕ/кг плазминазы. Стрелкой указан момент внутривенного введения препарата.

нии фибринолитической активности на 55% по сравнению с исходными параметрами (см. табл. 1). В течение периода наблюдения не удалось выявить статистически значимого увеличения фибринолитической активности крови кроликов, что, вероятно, связано со специфической реакцией свертывающей системы этого вида животных на плазминазу. Эти данные согласуются с результатами оценки *in vitro* тромболитической активности фибринолитически активных фракций из плазмы крови внезапно умерших. Набольшая активность выявлялась на сгустках крови человека, наименьшая — кролика, что, вероятно, связано с относительной видовой специфичностью действия плазминазы [19].

У крыс в течение 2 ч после тромбоза существенных изменений в системе гемостаза в венозном кровотоке выявлено не было (см. табл. 2). Введение 0,85% NaCl не приводило к восстановлению кровотока в тромбированном сосуде в течение 6 ч наблюдения. Гистологическое исследование серийных срезов поперечного сечения тромбированной вены показало, что в зоне травмы стенки иглой локализуется основание тромба, представленное скоплением тромбоцитов с нитями фибрина между ними. Красная часть тромба представлена тромбоцитарно-фибриновыми агрегатами и скоплением эритроцитов с нежными нитями фибрина. Тромб полностью перекрывает просвет сосуда.

После внутривенного введения 100 ФЕ/кг плазминазы крысам с экспериментальным венозным тромбозом

визуально через 10—30 мин отмечали частичное, а через 40—60 мин полное восстановление кровотока в тромбированном сосуде. Биохимические исследования показали, что тромболитиз происходит на фоне гипокоагуляции, выражающейся в удлинении временных показателей R и K ТЭГ, снижении МА ТЭГ и концентрации фибриногена, и активации фибринолитической системы, проявляющейся в 7—15-кратном увеличении фибринолитической активности крови, вызванных препаратом (см. табл. 2). Морфологически спустя 2 ч после введения плазминазы отмечено значительное уменьшение размеров тромба. Красная часть сохраняется в виде небольших участков вокруг основания тромба (белая часть), которое мало изменяется, что вероятно, связано с низким содержанием фибрина и плазминогена, адсорбированного на его поверхности. Фибрин утраивает фибриллярное строение и распадается на отдельные глобулярные массы, что приводит к нарушению его связи с мембранами тромбоцитов и эритроцитов. Клетки вымываются в кровоток, за счет чего происходит уменьшение размеров тромба и создается возможность восстановления проходимости сосуда.

У кроликов в течение 2 ч после тромбоза выявлено усиление коагуляционных свойств крови и снижение фибринолитической активности. Введение плазминазы не приводило к восстановлению кровотока в тромбированной вене в течение 4—6 ч наблюдения. Эти результаты согласуются с данными о слабой активации фибринолитической системы интактных кроликов под действием 300 ФЕ/кг плазминазы.

У собак в течение 3 ч после тромбоза и в последующие 3 ч после введения 0,85% NaCl статистически значимых изменений коагуляционных и фибринолитических свойств крови в венозном кровотоке обнаружено не было. Инъекция 0,85% NaCl не вызывала восстановления кровотока в тромбированной артерии в течение 6 ч наблюдения.

Внутриартериальное введение 100 ФЕ/кг плазминазы в непосредственной близости от тромба приводило к ангиографически регистрируемому восстановлению кровотока в тромбированном сосуде через 10—15 мин после инъекции (рис. 2, см. вклейку). Анализ

состояния гемостаза проведен в динамике в течение 3 ч после введения препарата. Тромболитиз происходит при 2—9-кратном увеличении фибринолитической активности крови и на фоне гипокоагуляции, выражающейся в удлинении времени рекальцификации, показателей R и K ТЭГ соответственно на 32—70, 45—76 и 74—280%, уменьшении протромбинового индекса, МА ТЭГ, концентрации фибриногена соответственно на 9—24, 13—36 и 8—50% по сравнению с этими показателями до введения плазминазы и у контрольных животных (0,85% NaCl). Повышенная фибринолитическая активность на фоне сниженной антипротеиназной активности способствует проходимости тромбированной артерии у собак (рис. 3). В течение 3 ч после введения плазминазы энзиматически и иммунохимически выявлено снижение на 17—31% ($P < 0,05$) уровня плазминогена, что подтверждает механизм активаторного тромболитического действия препарата. В этот период в сыворотке и моче обнаружены продукты распада фибриногена и фиб-

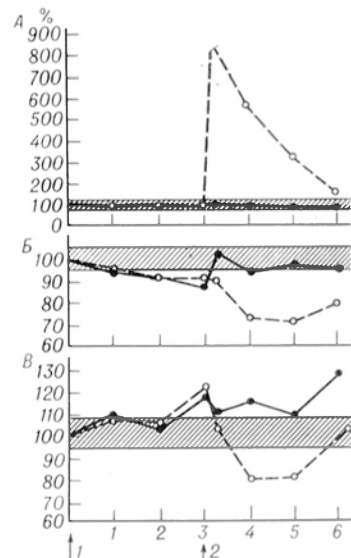


Рис. 3. Изменения некоторых показателей гемостаза в венозном кровотоке собак с экспериментальным тромбозом бедренной артерии.

По оси абсцисс — время исследования (в ч), по оси ординат — фибринолитическая активность (А), плазминоген (В), антипротеиназная активность (В; в %). Сплошная линия — контрольная группа животных (введение 0,85% NaCl), пунктирная линия — опытная группа животных (введение 100 ФЕ/кг плазминазы). Заштрихованные зоны — физиологические параметры исследованных показателей гемостаза. Стрелками обозначены время тромбообразования (1) и введения препаратов (2).

рина (60—200 мкг/мл). Введение плазмакиназы приводило к снижению антипротеиназного потенциала крови собак за счет уменьшения активности α_1 -АТ и α_2 -МГ соответственно на 16—29 и 8—16% ($P < 0,05$). Эти данные подтверждают значение основных ингибиторов протеиназы крови в регуляции фибринолитического потенциала.

Более быструю скорость тромболиза под действием плазмакиназы при артериальном тромбозе по сравнению с венозным тромбозом, вероятно, можно объяснить местным подведением препарата в первом случае [4, 20, 21].

Представленные данные показывают эффективность лечения тромбозов плазмакиназой, что согласуется с клиническими результатами терапии тромбозомболических заболеваний фибринолитически активной плазмой [5, 6, 22]. Все вышесказанное позволяет заключить, что полученный препарат обладает способностью активировать фибринолитическую систему крови реципиента, вызывать гипокоагуляционные изменения и проявляет выраженное тромболитическое действие. Это открывает перспективы клинического использования плазмакиназы при лечении тромбозов и эмболий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чазов Е. И., Лакин К. М. Антикоагулянты и фибринолитические средства. М., 1977.
2. Комаров Ф. И., Бокарев И. Н. — Клип. мед., 1980, № 7, с. 18—25.
3. Актуальные проблемы гомеостазиологии. Молекулярно-биологические и физиологические аспекты. М., 1981.
4. Андреев Г. В. Фибринолиз (Биохимия, физиология, патология). М., 1979.
5. Шестаков В. А. Система гемостаза при тромбозах магистральных вен. Дис. докт. М., 1979.
6. Пафомов Г. А. Биологическая характеристика крови внезапно умерших и ее использование в хирургической практике. Дис. докт. М., 1971.
7. Маркова О. А. Активатор плазминогена человека из плазмы крови внезапно умерших: выделение, очистка и свойства. Автореф. Дис. канд. М., 1980.
8. Хватов В. Б., Платонова Т. К., Русанов В. М. — Открытия, 1979, № 35, с. 24.
9. Пафомов Г. А., Хватов В. Б., Русанов В. М. и др. — В кн.: Лечебные препараты белков плазмы. М., 1981, с. 90—99.
10. Зыкова К. И. — Прикладная биохимия, 1966, № 5, с. 600—604.
11. Струкова С. М., Андреев Г. В. — Арх. пат., 1965, № 4, с. 23—29.
12. Хватов В. Б., Платонова Т. К., Шестаков В. А. Ускоренный метод определения тромболитической активности препаратов фибринолитического действия. Метод. рекомендации. М., 1980.
13. Андреев С. В., Рябова О. С., Денисов Л. А. — В кн.: Моделирование заболеваний. М., 1973, с. 157—163.
14. Шестаков В. А., Ильин В. Н. Методы исследования гемостаза у хирургических больных. Метод. рекомендации. М., 1976.
15. Хватов В. Б., Петренко О. А. — Пробл. гематол., 1975, № 6, с. 58—60.
16. Хватов В. Б., Белова Т. А. Ускоренный метод определения основных ингибиторов протеиназы в плазме крови человека. Метод. рекомендации. М., 1981.
17. Аксельсен Н., Крелль И., Вееке Б. Руководство по количественному иммуноэлектрофорезу. Методы и применение. М., 1977.
18. Ферменты в оториноларингологии. Под ред. К. Н. Веремеенко. Киев, 1980.
19. Платонова Т. К. Биохимические обоснования к получению фибринолитического препарата из плазмы крови внезапно умерших людей. Автореф. дис. канд. М., 1980.
20. Чазов Е. И., Матвеева Л. С., Мазеев А. В. и др. — Тер. арх., 1976, № 4, с. 8—19.
21. Бессолина Л. А., Мазеев А. В., Маркосян Р. А. и др. — Булл. экспер. биол., 1980, № 1, с. 16—18.
22. Левин Г. Я. Гемокоагуляционные свойства и клиническое применение плазмы и тромбоцитов каверной крови. Автореф. дис. докт. М., 1978.

Поступила 07.12.81

УДК 616.831-008.931:577.152.34]•02:616.15-097.5-02:[616.832-004.2+616.895.8

Г. А. Вилков, И. Б. Вовченко, А. М. Менджерский, Р. А. Трапезонцева

АКТИВАЦИЯ КИСЛОЙ ПРОТЕИНАЗЫ МОЗГА КРЫС СЫВОРОТКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАССЕЯНЫМ СКЛЕРОЗОМ И ШИЗОФРЕНИЕЙ В ОПЫТАХ IN VITRO

Центральная научно-исследовательская лаборатория Ростовского-на-Дону медицинского института

В патогенезе ряда нервно-психических заболеваний, в частности рассеянного склероза и шизофрении, важное значение придается нейроаллергическому компоненту [1]. Решение во-

проса о значении антител к основному белку миелина в патогенезе нейроаллергических состояний связано с совершенствованием методов их выявления. Используемые для этой цели реакция

связывания комплемента и реакция пассивной гемагглютинации не обладают достаточной чувствительностью и позволяют выявить антитела к основному белку миелина при рассеянном склерозе и шизофрении только в 30—40% случаев [2].

Известно, что развитие демиелинизации при рассеянном склерозе и экспериментальном аллергическом энцефаломиелите (ЭАЭ) связано с повышением активности кислой протеиназы [3], причем этот фермент расщепляет основной белок миелина — главный антиген демиелинизации [4].

Ранее было установлено, что при внутрицестеральном введении собакам фракции иммуноглобулинов G, содержащей антитела к основному белку миелина, происходит резкое увеличение активности кислой протеиназы мозга наряду с развитием клинических и морфологических признаков ЭАЭ [5].

В настоящей работе приведены результаты изучения влияния сывороток крови больных с некоторыми нервно-психическими заболеваниями и сывороток крови собак и кроликов, иммунизированных основным белком миелина на активность кислой протеиназы мозга в опытах *in vitro*. В качестве контроля при клинических исследованиях использована сыворотка крови доноров и больных псориазом, в экспериментальных исследованиях — сыворотка крови интактных животных.

Методика

Исследование проведено с сывороткой крови 29 больных рассеянным склерозом (в том числе 11 в стадии экзacerbации, 18 в период ремиссии) и 32 больных шизофренией. В качестве контроля использовали сыворотки крови 7 доноров и 6 больных псориазом. В эксперименте были исследованы сыворотки крови 5 кроликов и 5 собак, иммунизированных белым веществом головного и спинного мозга, и 5 кроликов, иммунизированных основным белком миелина. Кроме того, использовали сыворотки крови собак и кроликов, иммунизированных белым веществом мозга, после их истощения тканью мозга. Действие сывороток больных или подопытных животных определяли по степени изменения активности кислой протеиназы мозга крыс до и после их инкубации с гомогенатом мозга интактного животного. С этой целью 1 мл сыворотки с 0,1 мл комплемента добавляли к 1 мл 20% гомогената мозга крысы, приготовленного на физиологическом растворе. Отбирали половину смеси, центрифугировали и в надосадочной жидкости определяли активность кислой протеиназы. Оставшуюся часть смеси инкубировали в течение 18—20 ч при 8—12°C, затем центрифугировали и в надосадочной

жидкости определяли активность этого же фермента. Принимая исходную активность фермента на 100%, рассчитывали изменение активности в процентах. Активность кислой протеиназы (КФ 3.4.23) определяли, используя в качестве субстрата гемоглобин, и выражали в микрограммах тирозина на 100 мг ткани мозга в час [6].

Результаты и их обсуждение

При инкубации сыворотки крови собак, иммунизированных белым веществом головного и спинного мозга с гомогенатом мозга крыс, активность кислой протеиназы возрастала на 43%. Сыворотка крови кроликов, иммунизированных подобным же образом, активировала исследуемый фермент на 37,5%. В случае иммунизации кроликов основным белком миелина эффект активации составлял 34,7%. Одинаковая степень активации кислой протеиназы мозга сывороткой крови животных, иммунизированных как белым веществом, так и основным белком миелина, свидетельствует о том, что главным антигеном в белом веществе, ответственным за активацию исследуемого фермента, является основной белок миелина.

С целью доказательства роли противомозговых антител в эффекте активации протеолиза сыворотку крови кроликов и собак, иммунизированных белым веществом мозга, истощали тканью мозга, а затем подвергали аналогичному исследованию. Установлено отсутствие активирующего действия предварительно истощенной сыворотки на кислую протеиназу мозга.

Инкубация сыворотки крови интактных собак, кроликов, сыворотки крови доноров с мозгом крысы также не приводила к активации исследуемого фермента. Это свидетельствует об отсутствии в крови интактных животных и доноров к основному белку миелина.

Исследование сыворотки крови больных рассеянным склерозом показало четкое различие эффекта активации в зависимости от фазы болезни. У больных рассеянным склерозом в стадии экзacerbации сыворотка крови обладала более выраженной способностью повышать активность кислой протеиназы. В среднем активация фермента составляла $87,3 \pm 2,3\%$. Очевидно, что в сыворотке крови больных данной группы существует определенное единообразие в количестве и свойствах анти-

тел к основному белку миелина. Значительный активирующий эффект сыворотки, по-видимому, отражает высокий уровень циркулирующих антител и их цитотоксичность.

При обследовании больных рассеянным склерозом в стадии ремиссии было найдено увеличение активности фермента в среднем на 28,6%. Следует отметить, что в этой группе больных примерно в половине случаев наблюдается низкий уровень активации фермента. В то же время у некоторых больных в стадии ремиссии при внешнем благополучии установлена высокая способность сыворотки активировать кислую протеиназу мозга. Можно предположить, что наличие значительной активации протеиназы мозга сывороткой крови больных рассеянным склерозом на стадии ремиссии может служить прогностическим тестом, свидетельствующим о приближении обострения. Это предположение будет предметом наших дальнейших исследований, в связи с имеющимися данными о более высоком уровне антител к основным белкам миелина у больных рассеянным склерозом в стадии обострения по сравнению с таковым в период ремиссии [7].

Нами обследованы также 32 больных шизофренией. Сыворотка крови этих больных также обладала способностью активировать кислую протеиназу мозга. В среднем активация кислой протеиназы мозга сывороткой крови больных шизофренией составила 62%. Истощение сыворотки крови больных шизофренией тканью мозга практически снижало эффект активации (3,2%).

Исследование в качестве дополнительного контроля сыворотки крови больных псориазом не выявило активирующего протеолиз эффекта (3,5%). Данный патологический процесс был выбран в связи с его аутоиммунной природой, в то же время не связанный с нарушением метаболизма мозга.

Таким образом, сыворотка крови, содержащая антитела к основному белку миелина, обладает способностью активировать протеолиз в мозге. Очевидно, что эффект обусловлен действием антител, поскольку, как уже отмечалось, истощение сыворотки тканью мозга устраняло эффект активации кислой протеиназы.

Существенным также является то, что подобный эффект дает сыворотка крови

животных, иммунизированных как тканью мозга, так и основным белком миелина.

Повышение активности лизосомальных протеиназ при различных патологических состояниях описано многократно. Причинами повышения активности в большей части случаев считаются увеличение интенсивности перекисного окисления в мембранах, изменение pH среды или другие факторы. В нашей работе показано, что подобное действие могут оказывать антитела к белкам мозга. Особенно существенно то, что такой эффект дают антитела к специфическому для нервной ткани основному белку миелина. Предположение о том, что в основе активации кислой протеиназы лежит лабилизация лизосомального аппарата ткани мозга, подтверждается электронно-микроскопическими исследованиями. После интрацеребрального введения антисывороток к мозгу и основному белку миелина установлено увеличение числа лизосом в цитоплазме олигодендроцитов [8].

Полученные результаты могут быть использованы в целях диагностики нейроаллергического компонента первично-психических заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Семенов С. Ф., Глебов В. С., Чуприков А. П. — Вестн. АМН СССР, 1969, № 4, с. 63—66.
2. Семенов С. Ф., Назаров К. Н., Чуприков А. П. Аутоиммунные процессы при врожденных энцефалопатиях, эпилепсии и шизофрении. М., 1973.
3. Einstein E. R., Dalal K. B., Csefley J. — J. neurol. Sci., 1970, v. 11, p. 109—114.
4. Rauch H. E., Einstein E. R., Csefley J. — Neurobiology, 1973, v. 3, p. 195—205.
5. Менджеричкий А. М., Вовченко И. Б. — Укр. біохім ж., 1978, № 5, с. 586—589.
6. Anson M. L. — J. gen. Physiol., 1938, v. 22, p. 79—81.
7. Марков А. Д., Леонович А. П. Рассеянный склероз. М., 1976.
8. Вовченко И. Б., Вилков Г. А., Менджеричкий А. М. и др. — В кн.: Структура и функции лизосом. Новосибирск, 1980, с. 43—44.

Поступила 11.12.81

IN VITRO ACTIVATION OF ACID PROTEINASE FROM RAT BRAIN IN PRESENCE OF BLOOD SERUM FROM PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS AND SCHIZOPHRENIA

G. A. Vilkov, I. B. Vovchenko, A. M. Mendzheritsky, R. A. Trapezontseva

Central Research Laboratory, Medical School, Rostov-on-Don

Distinct activation of rat brain acid proteinase was found, if blood serum from patients with some neuropsychical diseases or blood

serum from the animals immunized by the patient brain tissue as well as by main protein of myelin were added into the incubation mixture; this demonstrates the labilizing ef-

fect of antibrain antibodies on lysosomes. The enzymatic activation might serve as a diagnostic test for estimation of antibrain antibodies in blood serum.

УДК 616.379-008.64-092.9-07:616.36-008.931-092.18

Х. Аззамов, К. Т. Алматов, М. М. Рахимов, Я. Х. Туракулов

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ ПРИ АЛЛОКСАНОВОМ ДИАБЕТЕ

НИИ краевой медицины Минздрава Узбекской ССР, Ташкент

Снижение продукции инсулина при диабете сопровождается снижением содержания в тканях всех кислот трикарбонового цикла [1, 2], уменьшением редокс-потенциала в митохондриальной системе окисления НАД·Н [3], повышением общего содержания КоА [4] и нарушением эффективности окислительного фосфорилирования [5—8]. В то же время сведений об изменении активности НАД·Н-оксидазы, сукцинатоксидазы и цитохром с-оксидазы дыхательной цепи мембран митохондрий при диабете в литературе нет. Неизвестно также, каким образом меняются активность и стабильность полиферментных систем мембран митохондрий печени при легкой, средней и тяжелой степени диабета. Выяснение этого вопроса актуально, поскольку митохондрии являются первичной мишенью для действия аллоксана [9]. При введении последнего происходит набухание, увеличение объема, изменение формы, а затем и разрушение митохондрий. Эти структурные изменения связаны с действием аллоксана на механизм ионного транспорта, в первую очередь транспорта неорганического фосфата в митохондриях, а следовательно, и с активацией эндогенных фосфолипаз [10]. Надежную информацию о степени поражения митохондрий и об образовании скрытых повреждений в мембранах митохондрий может дать исследование действия деградирующих факторов (тепло, протеазы, фосфолипазы, изменение условий среды и др.) [11].

В настоящем сообщении приводятся результаты изучения функционирования полиферментных систем мембран митохондрий печени крыс в норме и с аллоксановым диабетом в зависимости от уровня сахара в крови, т. е. от тяжести течения патологического процесса.

Методика

Опыты проводили на крысах-самцах массой тела 180—200 г. Диабет вызывали однократным внутрибрюшинным введением аллоксангидрата («Chemapol» — Чехословакия) из расчета 15 мг на 100 г массы тела. Крысы поступали в опыт через 4 сут после введения аллоксана. Сахар крови определяли ортотолуидиновым методом. Митохондрии получали из печени [12], используя в качестве среды выделения 10 мМ трис-НСl, рН 7,4, содержащей 0,25 М сахарозу. Скорость дыхания митохондрий в различных метаболических состояниях (V_3 — в присутствии АДФ, V_4 — после исчерпания АДФ, $V_{ДНФ}$ — разобщенного окисления с 2,4-динитрофенолом) регистрировали полярографическим методом с помощью вращающегося платинового электрода в стандартных условиях в ячейке полярографа объемом 1 мл при 25 °С в среде следующего состава: сахароза — 150 мМ, KH_2PO_4 — 5 мМ, трис-буфер — 5 мМ, рН 7,4. Субстраты окисления: сукцинат, α -кетоглутарат, глутамат, малат, цитрат и пируват по 10 мМ, рН 7,4. Реакцию начинали добавлением в ячейку полярографа суспензии митохондрий. Количество АДФ составляло 200 мкМ: ДНФ — $5 \cdot 10^{-5}$ М.

Часть митохондрий замораживали и после оттаивания измеряли активность НАД·Н-сукцинат-, цитохром с-оксидазных систем [13]. Действие фосфолипазы A_2 (0,004 мкг/мг) или трипсина (90 мкг/мг) на активность и стабильность полиферментных систем митохондрий изучали при 20 °С в 0,01 М трис-буфере, рН 7,4, содержащем 0,25 М сахарозу. Среда измерения: 0,66 М сахароза, содержащая 0,05 М трис-НСl и 0,005 М гистидин, рН 7,4. При определении активности НАД·Н-оксидазы в ячейку объемом 1 мл добавляли 3 мкмоль НАД·Н, для измерения активности сукцинатоксидазы — 10 мкмоль сукцината, а для цитохром с-оксидазы — 20 мкмоль аскорбата и 1,0 мг цитохрома с. При необходимости в ходе окисления НАД·Н или сукцината добавляли 0,5 мг цитохрома с. Все ферментативные активности выражали в наноатомах кислорода, потребляемого за 1 мин при 25 °С в расчете на 1 мг белка митохондрий. Цифровой материал представлен в виде средних арифметических величин. На экспериментальную точку использовали от 6 до 10 крыс.

Результаты и обсуждение

Известно, что при аллоксановом диабете уровень сахара в крови коррелирует со степенью тяжести патологического процесса. В связи с этим мы исследовали функциональное состояние митохондрий, выделенных из печени крыс при различном содержании сахара в крови. 1-ю группу составляли контрольные животные. Во 2-й группе митохондрии выделяли из печени крыс, у которых уровень сахара составлял 200 ± 30 мг/100 мл, в 3-й — 400 ± 50 мг/100 мл, в 4-й группе — 600 ± 80 мг/100 мл и в 5-й группе — 800 ± 100 мг/100 мл. Результаты исследования параметров окислительного фосфорилирования с различными субстратами цикла трикарбоновых кислот приведены на рис. 1 и в таблице.

Видно, что при концентрации сахара в крови 200 ± 30 мг/100 мл скорость окисления субстратов в различных метаболических состояниях митохондрий уже понижается. Особенно резкое уменьшение скорости дыхания в состоянии V_4 приводит к повышению дыхатель-

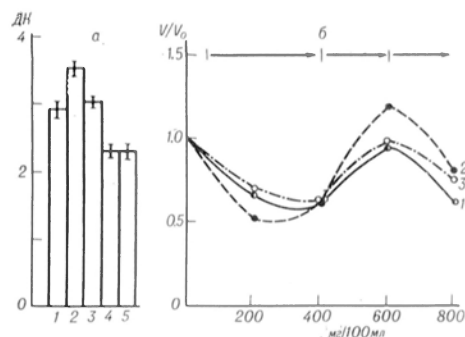


Рис. 1. Величина дыхательного контроля (а) и скорость окисления сукцината (б) в митохондриях печени крыс при аллоксановом диабете.

На рис. а: 1—5 — группы животных, на рис. б: 1 — V_3 , 2 — V_4 , 3 — $V_{ДНФ}$; по оси абсцисс — уровень сахара крови; стрелками наверху показаны этапы снижения скорости окисления, разобщения и ингибирования.

ного контроля (ДК). С повышением уровня сахара в крови до 400 ± 50 мг/100 мл скорость фосфорилирующего окисления (V_3) существенно не изменяется по сравнению с таковой при легкой степени диабета, но повышается скорость окисления в состоя-

Скорость потребления кислорода и окислительное фосфорилирование в митохондриях печени крыс при аллоксановом диабете ($M \pm m$)

Уровень сахара крови, мг/100 мл	Субстрат окисления	Параметры окислительного фосфорилирования			
		V_3	V_4	$V_{ДНФ}$	ДК
Контроль	Сукцинат	95 ± 8	33 ± 3	134 ± 13	2.9 ± 0.11
	α -Кетоглутарат	60 ± 7	20 ± 2	51 ± 6	3.0 ± 0.09
	Глутамат	57 ± 6	19 ± 2	59 ± 7	3.0 ± 0.07
	Цитрат	42 ± 4	16 ± 1	45 ± 5	2.6 ± 0.07
	Малат	44 ± 5	17 ± 2	40 ± 4	2.6 ± 0.07
200 ± 30	Пируват	42 ± 4	16 ± 2	45 ± 4	2.6 ± 0.08
	Сукцинат	63 ± 7	18 ± 2	90 ± 7	3.5 ± 0.09
	α -Кетоглутарат	34 ± 3	10 ± 1	38 ± 5	3.4 ± 0.08
	Глутамат	31 ± 3	8 ± 1	44 ± 6	3.9 ± 0.05
	Цитрат	23 ± 3	8 ± 1	19 ± 3	2.9 ± 0.06
400 ± 50	Малат	23 ± 2	8 ± 1	16 ± 2	2.8 ± 0.07
	Пируват	23 ± 2	8 ± 1	19 ± 3	2.9 ± 0.05
	Сукцинат	60 ± 6	21 ± 3	86 ± 7	3.0 ± 0.08
	α -Кетоглутарат	31 ± 3	11 ± 1	28 ± 3	2.9 ± 0.12
	Глутамат	29 ± 3	10 ± 1	28 ± 3	2.9 ± 0.12
600 ± 80	Цитрат	23 ± 3	9 ± 2	15 ± 3	2.5 ± 0.12
	Малат	25 ± 3	11 ± 1	15 ± 2	2.3 ± 0.05
	Пируват	23 ± 3	9 ± 1	15 ± 3	2.5 ± 0.06
	Сукцинат	89 ± 10	39 ± 5	115 ± 15	2.3 ± 0.09
	α -Кетоглутарат	44 ± 5	24 ± 3	50 ± 7	1.8 ± 0.14
800 ± 100	Глутамат	42 ± 5	21 ± 3	55 ± 8	2.0 ± 0.05
	Цитрат	26 ± 4	11 ± 1	25 ± 5	2.4 ± 0.05
	Малат	32 ± 5	20 ± 2	39 ± 5	1.6 ± 0.09
	Пируват	26 ± 5	11 ± 2	25 ± 4	2.4 ± 0.11
	Сукцинат	60 ± 5	26 ± 3	105 ± 10	2.3 ± 0.12
	α -Кетоглутарат	31 ± 4	13 ± 2	33 ± 5	2.4 ± 0.15
	Глутамат	23 ± 2	11 ± 1	28 ± 3	2.1 ± 0.04
	Цитрат	15 ± 2	10 ± 1	17 ± 2	1.5 ± 0.05
	Малат	16 ± 2	11 ± 1	13 ± 2	1.5 ± 0.04
	Пируват	15 ± 3	10 ± 1	17 ± 3	1.5 ± 0.12

нии V_4 , в результате чего уменьшаются значения ДК. Одновременно уменьшается скорость ДНФ-стимулируемого окисления по НАД-зависимому пути дыхательной цепи митохондрий. При тяжелой форме диабета ($600 \pm \pm 80$ мг/100 мл) обнаружено повышение скорости окисления субстратов в различных метаболических состояниях митохондрий по сравнению с таковой при легкой и средней степенях тяжести диабета. Повышение скорости окисления субстратов в состоянии V_4 приводит к уменьшению коэффициента ДК, что особенно хорошо проявляется с α -кетоглутаратом, глутаматом, малатом и согласуется с данными других работ [6—8]. При коматозном состоянии животных (концентрация сахара крови 800 ± 100 мг/100 мл) уменьшается скорость окисления и фосфорилирования. Значения ДК меняются особенно резко в случае цитрата и пирувата.

Таким образом, независимо от вида используемого субстрата можно выделить 3 фазы развития диабета. На I стадии (небольшое увеличение сахара крови) происходит снижение скорости окисления субстратов, возможно, из-за недостатка кофакторов (КоQ, цитохром с), как это происходит и при других патологических процессах [14, 15], но повышается значение ДК. Иными словами на этой стадии, несмотря на снижение скорости переноса электронов, степень сопряжения сохраняется или даже несколько улучшается, в результате чего практически не нарушаются синтез АТФ и его стационарная концентрация. На II стадии происходит разобщение окисления и фосфорилирования — значение ДК резко уменьшается, скорость переноса электронов по дыхательной цепи вследствие этого начинает повышаться, доходя до 150—200%. Наконец, на III стадии (тяжелые формы аллоксанового диабета) фосфорилирования почти нет, скорость переноса электронов резко падает, начинается деградация всей системы окислительного фосфорилирования, наблюдается резкое снижение скорости образования АТФ, практически до нулевого уровня, а скорости окисления снижаются. На этой стадии наиболее выражено ингибирование процесса переноса электронов. Наблюдается снижение активности полиферментных систем, осуществляющих окисление НАД \times Н, сукцината и цитохрома с, изме-

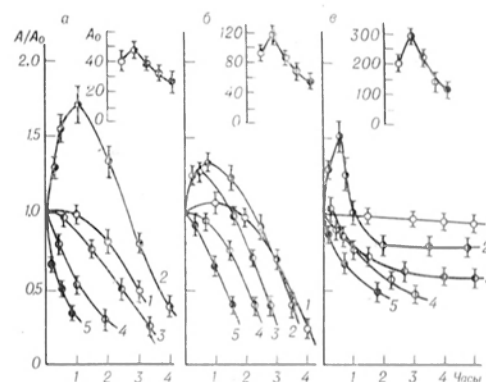


Рис. 2. Термостабильность (36°C) полиферментных систем митохондрий печени при диабете.

а — НАД \cdot Н-оксидаза; б — сукцинатоксидаза; в — цитохром с-оксидаза; 1 — контроль; 2 — 5-диабет (сахар крови: 2 — 200 ± 30 , 3 — 400 ± 50 , 4 — 600 ± 80 , 5 — 800 ± 100 мг/100 мл). Наверху приведены значения ферментативной активности митохондрий (A_0), не подвергавшихся тепловой инкубации; A/A_0 — относительная активность.

ренных после однократного замораживания и оттаивания митохондрий.

Из рис. 2 видно, что величины НАД \times Н-, сукцинат- и цитохром с-оксидазной активности при диабете существенно отличаются от таковых у контрольных животных. При легкой форме диабета полиферментные системы в некоторой степени активируются, при средней и более тяжелых степенях активность полиферментных систем начинает снижаться, причем, чем выше уровень сахара крови, тем значительнее снижение скорости реакций, катализируемых этими полиферментными системами. При тяжелых степенях диабета преобладают деградационные процессы, приводящие к инактивации полиферментных систем. Эти наблюдения согласуются с данными, полученными при изучении других патологических процессов; при легких степенях патологии обычно наблюдалось повышение скорости окисления субстратов, связанное с улучшением диффузии субстратов к активным центрам соответствующих полиферментных систем в результате образования обратимых скрытых повреждений в структуре мембран митохондрий. При более глубоких степенях патологии процессы активации переходили в процессы инактивации, что связано с необратимой деградацией мембран [11—13].

Дополнительные сведения о дыхательной цепи митохондрий получены при их инкубации при 36°C с последующим измерением НАД \cdot Н-, сукци-

нат- и цитохром с-оксидазной активности (см. рис. 2). Видно, что в этих условиях в контрольной группе НАД·Н-оксидазная система инактивируется быстрее, чем сукцинатоксидазная, а самой устойчивой является цитохром с-оксидаза. Кривые, полученные в аналогичных условиях для митохондрий из печени крыс с аллоксановым диабетом, отличаются от контрольных. В этом случае при легких степенях диабета по мере выдерживания митохондрий при 36 °С наблюдается активация изучаемых полиферментных систем. В дальнейшем термодегградация полиферментных систем при тепловой обработке митохондрий подопытных животных протекает с большей скоростью (судя по наклону кривой на участках, где активность уменьшается). Время полуинактивации $t_{50\%}$ НАД·Н-оксидазной системы митохондрий из печени животных 2-й группы составляет 210, 150, 60 и 25 мин соответственно. Аналогичные закономерности наблюдаются для сукцинатоксидажной и цитохром с-оксидажной систем митохондрий. Из представленных данных можно сделать заключение, что при аллоксановом диабете развивается два вида нарушений в структуре митохондрий печени: первое проявляется в изменении структурного сопряжения между отдельными участками дыхательной цепи, второе обусловлено деградацией всей дыхательной цепи, в том числе и более устойчивой к действию температуры цитохром с-оксидазы. Известно, что одной из причин пониженной стабильности полиферментных систем мембран митохондрий к внешним воздействиям являются нарушения в структурном сопряжении между белками и фосфолипидами мембран, что обычно выражается в их большей доступности энзиматической атаке при действии на них контролируемых количеств фосфолипаз и протеаз. Аналогичные нарушения выявлены и при аллоксановом диабете. Об этом свидетельствуют результаты, полученные в опытах с трипсином и фосфолипазой A_2 при их действии на изолированные митохондрии из печени контрольных и подопытных животных. Действительно, активность НАД·Н-оксидазы (рис. 3, а) и цитохром с-оксидазы (рис. 3, б) при инкубации митохондрий из печени диабетических крыс с трипсином за одно и то же время снижается больше, чем в контроле. Аналогичный

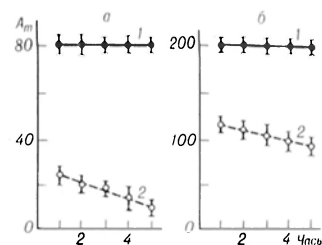


Рис. 3. Влияние трипсина на активность НАД·Н-оксидажной (а) и цитохром с-оксидажной (б) систем мембран митохондрий при диабете.

1 — контроль; 2 — диабет. Трипсин — 90 мкг/мг белка.

вывод следует и из представленных на рис. 4 данных о действии фосфолипазы на НАД·Н-оксидажную и сукцинатоксидажную активность.

Другим фактом, свидетельствующим об изменении компактности мембран митохондрий при аллоксановом диабете, является изменение проницаемости мембран митохондрий для экзогенного цитохрома. Как представлено на рис. 5, добавленный извне цитохром с активирует НАД·Н- и сукцинатоксидазные системы. В случае митохондрий, выделенных из печени крыс с легкой и средней формой аллоксанового диабета, прирост их НАД·Н-оксидажной и сукцинатоксидажной активности под влиянием цитохрома с был более значительным, чем в контроле. При тяжелой степени аллоксанового диабета увеличение активности, обусловленное включением цитохрома с в мембрану митохондрий для обеих полиферментных систем, становится небольшим. Это можно объяснить тем, что на начальных стадиях аллоксанового диабета разрыхление мембран митохондрий сопровождается улучшением диффузии

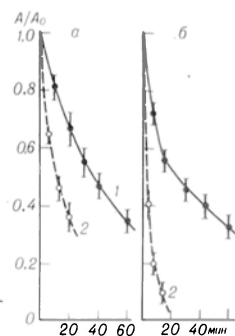


Рис. 4. Действие фосфолипазы A_2 (0,004 мкг/мл белка) на НАД·Н-оксидазу (а) и сукцинатоксидазу (б).

1 — контроль; 2 — диабет.

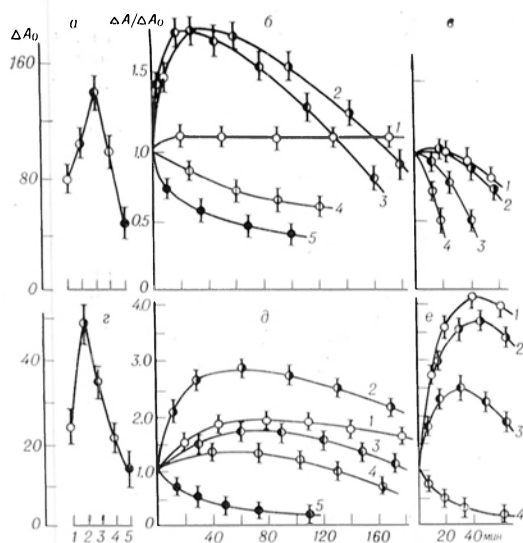


Рис. 5. Влияние тепла (20 и 36° С) на активацию НАД·Н-оксидазы и сукцинатоксидазы митохондрий печени цитохромом с. а—в — НАД·Н-оксидаза; г—е — сукцинатоксидаза; 1 — контроль; 2—5 — диабет; б, д — 20° С; в, е, — 36° С; а, г — прирост активности полиферментных систем митохондрий (A_0), не подвергавшихся тепловой инкубации.

цитохрома с в мембраны, а при более тяжелых степенях патологии скрытые повреждения уже настолько глубоки, что нарушается целостность фосфолипидного состава мембран и участки, связывающие цитохром с, подвергаются деградации.

При сравнении эффектов, полученных при 20 и 36° С, видно, что с повышением температуры эффект активации при легких степенях уже не заметен, что также свидетельствует в пользу сделанного предположения.

Из рис. 6 видно, что белки, ответственные за включение экзогенного цитохрома с в мембраны митохондрий.

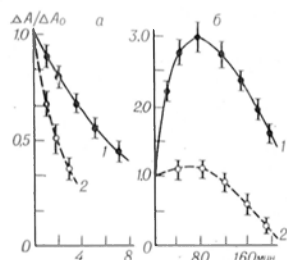


Рис. 6. Действие фосфолипазы A_2 и трипсина на включение экзогенного цитохрома с в мембраны митохондрий.

а — прирост НАД·Н-оксидазной системы при добавлении цитохрома с к митохондриям, обработанным фосфолипазой A_2 ; б — прирост сукцинатоксидазной системы при добавлении цитохрома с к митохондриям, обработанным трипсином. 1 — контроль; 2 — диабет.

хрома с в мембраны митохондрий, выделенные из печени крыс с диабетом, более подвержены действию трипсина.

Таким образом, можно полагать, что изменения в митохондриях при диабете как и при других патологических процессах, обусловлены появлением скрытых повреждений, выражающихся в нарушении взаимодействия между фосфолипидами и белками мембран. Глубина и характер этих изменений коррелируют с тяжестью патологического процесса. При легких и средних степенях тяжести диабета митохондрии сохраняют способность к синтезу АТФ, но уменьшается скорость окисления субстратов. В дальнейшем улучшается доступ НАД·Н-сукцината и цитохрома с к соответствующим участкам мембран митохондрий. При тяжелых степенях диабета в митохондриях уменьшается синтез АТФ, активность полиферментных систем резко падает, нарушается процесс включения экзогенного цитохрома с в мембраны митохондрий, а также уменьшается их стабильность к действию факторов (литических ферментов и нагревания), приводящих к деградации митохондрий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Frohman C. E., Orten I. M., Smith A. H. — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 803—806.
2. Гулый М. Ф. — В кн.: Новое о гормонах и механизме их действия. Киев, 1977, с. 260—274.
3. Hohorst H. T., Stratman D., Bartels H. — Klin. Wschr., 1964, Bd 42, S. 245—249.
4. Smith C. M., Cono M., Linn P. J. — J. Nutr., 1978, v. 108, p. 854—862.
5. Hall I. G., Sardahl L. A., Stefko P. L. — J. biol. Chem., 1960, v. 235, p. 1536—1539.
6. Malsybara T., Tachino Y. — J. Biochem., 1969, v. 66, p. 397—404.
7. Katsumoto K., Ozawa T. — Nagoya J. med. Sci., 1969, v. 32, p. 45—53.
8. Ozawa K., Kamiyama Y., Kimura K. et al. — J. Lab. clin. Med., 1977, v. 89, p. 937—945.
9. Boquist L., Nelson L. — Acta endocr. (Kbh.), 1980, v. 94, p. 237.
10. Мадъяров Ш. Р., Муратова У. З., Ахмеджанов Р. и др. — В кн.: Липиды биологических мембран. Ташкент, 1980, с. 84—85.
11. Алматов К. Т., Агзамов Х., Рахимов М. М. и др. — Узб. биол. ж., 1981, № 2, с. 3—7.
12. Schneider W. C., Hogeboom G. H. — Cancer Res., 1951, v. 11, p. 1—3.
13. Рахимов М. М., Алматов К. Т. — Биохимия, 1977, т. 42, № 10, с. 1852—1861.
14. Покровский А. А., Панченко Л. Ф., Иванов Н. Н. и др. — В кн.: Митохондрии. Ферментные процессы и их регуляция. М., 1968, с. 97—99.

15. Генкин А. М., Глотов Н. А., Маевский Б. И. — В кн.: Митохондрии. Биохимия и ультраструктура. М., 1973. с. 82—84.

Поступила 11.12.81

FUNCTION OF LIVER MITOCHONDRIA IN ALLOXANE DIABETES

Kh. Agzamov, K. T. Almatov, M. M. Rakhimov, Ya. Kh. Turakulov

Institute of Regional Medicine, Ministry of Public Health of the Uzbek SSR, Tashkent

State of liver mitochondria from rats with alloxane diabetes and the organelles polyen-

zyme systems were studied in correlation with glucose content in blood. At the initial and middle steps of the diabetes liver mitochondria were able to synthesize ATP but the rate of substrates oxidation was decreased. In severe forms of the diabetes latent impairments were developed in mitochondrial membranes. The phenomenon was accompanied by a decrease in activity of NADH-, succinate- and cytochrome c oxidizing systems as well as by a distinct decrease in the rate of ATP synthesis. Incorporation of exogenous cytochrome c into mitochondrial membranes was impaired and the mitochondria became more susceptible to the effect of heating and of hydrolytic enzymes degrading the organelles.

▼ДК 616.132-008.931:577.152.311]-02:547.931

И. М. Карманский

ВЛИЯНИЕ ДЕТЕРГЕНТОВ НА НЕЙТРАЛЬНУЮ ХОЛЕСТЕРИНЭСТЕРАЗУ АОРТЫ СВИНЕЙ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

При определении активности холинэстераз часто добавляют детергенты, обладающие способностью разрушать тканевые и клеточные структуры, солюбилизировать и повышать выход ферментов [1, 2]. Однако механизм действия детергентов на систему фермент — субстрат изучен недостаточно, поскольку неизвестно, действует ли детергент на фермент или на субстрат. Подобного рода данные получены лишь при исследовании действия холата Na на холинэстеразу панкреатического сока. Активирующее действие детергента в данном случае объясняется олигомеризацией фермента [3].

В связи с этим мы и предприняли изучение действия холата Na, таурохолата Na, тритона X-100, дигитонина и цетилпиридиний-хлорида на нейтральную холинэстеразу аорты свиней, очевидно, играющую важную роль в патогенезе атеросклероза [4]. Ее активность мы измеряли по расщеплению холинэстеразы-¹⁴C-олеата в составе мицелл из яичного фосфатидилхолина.

Методика

Аорту свиней, полученную сразу же после забоя животных, очищали от поверхностной жировой ткани и адвентиции и измельчали или помещали в холодильник при -20 °C до использования (обычно в течение недели). Измельчение проводили вначале с помощью ножиц, а затем гомогенизатором типа «Политрон» в 0,01 М К-фосфатном буфере, pH 7,3 с 0,25 М сахарозой и 0,001 М ЭДТА в течение 1 мин при 4 °C при соотношении ткань/буфер, равном 1:3 (масса на объем). После этого

гомогенат перемешивали при 4 °C в течение 1 ч, а затем центрифугировали при 2000 об/мин при 4 °C в течение 20 мин в бакет-роторе центрифуги K-70 (ГДР). Надосадочную жидкость фильтровали через бумажный фильтр для удаления хлопьев флотировавшего липидного материала и использовали в качестве ферментного препарата.

Об активности холинэстеразы судили по расщеплению холинэстеразы-¹⁴C-олеата. Мицеллярный субстрат, приготовленный по описанным методам [4, 5], содержал холинэстеразы-¹⁴C-олеат («Amersham») с удельной радиоактивностью 25,7 мкКи/мкмоль и не содержал нерадиоактивного эфира холинэстеразы.

Инкубационная проба состояла из 0,1 мл субстрата и 0,5 мл препарата фермента (последний в особо оговариваемых случаях содержал детергенты или другие добавки). Инкубацию проводили при 37 °C в течение 4—16 ч. Экстракцию отщепленной ¹⁴C-олеиновой кислоты и определение ее радиоактивности проводили как указано ранее [6].

Хроматографию аортального экстракта проводили на колонке K16/100 («Pharmacia»), заполненной биогелем A-1,5m, 100—200 меш («BIO — RAD»), уравновешенным с помощью перистальтического насоса P-3 («Pharmacia») 0,01 М К-фосфатным буфером, pH 7,1 с 0,9% NaCl и 0,04% ЭДТА. Оптическую плотность при 280 нм в элюате регистрировали с помощью проточного денситометра Uvicord II (LKB). Элюцию проводили со скоростью около 10 мл/ч. Сбор фракций (по 30 мин) осуществляли с помощью коллектора Redigac (LKB). Для оценки молекулярных масс фракций по элюционным параметрам использовали калибровочные графики в проспекте фирмы «BIO—RAD».

Результаты и обсуждение

Предварительными опытами было подтверждено отмечаемое в литературе [5] наличие в аортальном экстракте хо-

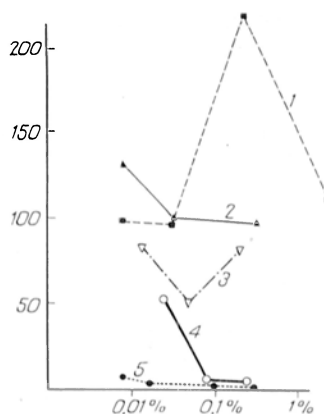


Рис. 1. Активность холинэстеразы в экстракте аорты (за 100 % принят исходный уровень) в присутствии различных детергентов.

По оси абсцисс — конечная концентрация детергентов (в логарифмической шкале) в инкубационной среде, по оси ординат — активность фермента (в %); 1 — тритон X-100; 2 — холат Na; 3 — таурохолат Na; 4 — дигитонин; 5 — цетилпиридиний Cl.

холинэстеразной активности в кислой и нейтральной областях с оптимумами pH при 4,5 и в интервале от 7,0 до 7,5. Наши исследования мы ограничили изучением свойств лишь нейтрального фермента.

На рис. 1 показана зависимость активности холинэстеразы в экстракте аорты от концентрации различных детергентов. Как это видно, хлорид цетилпиридиния, дигитонин и таурохолат Na угнетают ферментативную активность, холат Na незначительно повышает активность в концентрации около 0,1%, а тритон X-100 существенно увеличивает скорость расщепления холестерилолеата в довольно широком диапазоне концентраций.

В связи с тем что значительное активирующее действие было выражено лишь у тритона X-100, мы предприняли более подробные исследования действия этого детергента.

Вначале мы сравнили влияние тритона X-100 на расщепление холестерилолеата в экстракте аорты (его получали центрифугированием гомогената при 2000 об/мин в течение 20 мин) и в 100 000 g — надосадке (его получали центрифугированием экстракта в роторе 40.3 ультрацентрифуги Бекман L 2-65B при 37 000 об/мин в течение 3 ч при 4 °C). Оказалось, что тритон X-100 в концентрации 0,5% значительно повышает активность не только экстракта (это было видно и на рис. 1), но и 100 000 g — надосадка. Следовательно, можно было

предположить, что объектом воздействия тритона X-100 являются как крупные тканевые фрагменты, присутствующие в экстракте, так и солибилизированные молекулы фермента. Для проверки этого предположения мы подвергли гель-фильтрации экстракт на колонке с биогелем A-1,5m (интервал фракционирования от 10 000 до 1 500 000 дальтон) и определили активность полученных фракций в присутствии и в отсутствие детергента.

На рис. 2, а, дана элюиционная кривая, полученная при хроматографии аортального экстракта на колонке с биогелем A-1,5m и показана холинэстеразная активность. Видно, что при определении ферментативной активности без добавления тритона X-100 обнаруживается лишь один пик активности. Элюиционный объем этой фракции соответствует молекулярной массе, превышающей эксклюзионный предел для биогеля A-1,5m, равный 1 500 000 дальтон. Видно также, что при добавлении тритона X-100 к пробам после хроматографии (до конечной концентрации 0,5 %) выявляется дополнительный активный компонент, который не обнаруживается при отсутствии в инкубационной среде тритона X-100. Судя по величине отношения V_e/V_0 (где V_e — объем элюции, а V_0 — внешний объем), материал указанного дополнительного активного компонента имеет молекулярную массу около 200 000.

На рис. 2, б, приведена элюиционная кривая, полученная в опыте по гель-фильтрации экстракта, обработанного 0,5% тритоном X-100. В этом опыте использовался биогель A-1,5m, уравновешенный буферным раствором с 0,5% тритона X-100. На рисунке видно, что обработка тритоном снижает концентрацию фракции с молекулярной массой свыше 1 500 000 и ведет к исчезновению в ней активности холинэстеразы. Ферментативная активность обнаруживалась теперь только во фракциях, содержащих молекулы меньшего размера. Максимум активности приходился на фракцию № 28, соответствующую, судя по величине элюиционного объема, молекулярной массе около 200 000.

На рис. 2, в, приведена элюиционная кривая, полученная при хроматографии аортального экстракта, обработанного в течение 30 мин при 4 °C дигитонином (конечная концентрация 0,4%) с целью солибилизации холинэстеразы.

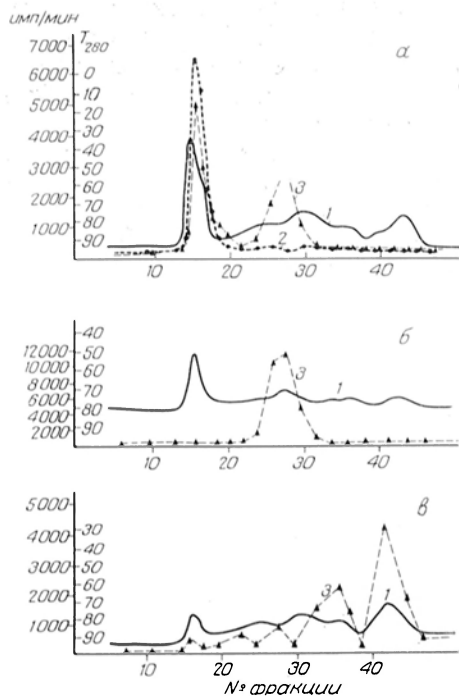


Рис. 2. Хроматография экстракта аорты свиней на биогеле А-1,5 м.

а — разделение экстракта без каких-либо добавок; б — экстракт, обработанный 0,5 % тритоном X-100; в — экстракт, обработанный 0,4 % дигитонином. 1 — оптическая плотность при 280 нм; 2 — активность во фракциях без добавления тритона X-100; 3 — активность во фракциях в присутствии тритона X-100.

В этом опыте колонка была уравновешена буферным раствором, не содержащим детергентов. Изображенная на графике активность определялась в присутствии 0,5% тритона X-100. Видно, что обработка дигитонином уменьшает содержание материала с молекулярной массой свыше 1 500 000. Ферментативная активность в этой фракции очень низка. Заметная холестеринэстеразная активность обнаруживалась во фракции № 36 и максимальная — во фракции № 42. При определении ферментативной активности во фракциях № 28, 36 и 42 в присутствии и в отсутствие тритона X-100 было обнаружено, что этот детергент повышает активность только во фракции № 42.

На основании полученных данных можно сказать, что в экстракте аорты холестеринэстеразная активность присутствует в нескольких фракциях. Обработка дигитонином и тритоном X-100 экстракта или высокомолекулярных фракций, содержащих агрегаты холестеринэстеразы или комплексы фермента с фрагментами мембран, ведет к появ-

лению холестеринэстеразной активности в низкомолекулярных фракциях.

Активность холестеринэстеразы в некоторых фракциях (№ 28 на рис. 2, а, и № 42 на рис. 2, в) значительно увеличивается под влиянием тритона X-100. В связи с тем что во фракции № 42 (см. рис. 2, в) содержится материал, молекулярная масса которого, судя по величине V_e/V_o , равна около 20 000, можно считать, что увеличение его активности под влиянием тритона X-100 нельзя объяснить диссоциацией агрегатов молекул фермента или его комплексов с мембранными фрагментами.

Что касается механизма действия тритона X-100, то можно предположить, что он защищает фермент от ингибитора, присутствующего не во всех хроматографических фракциях; выполняет функции утраченного по какой-либо причине активатора; защищает холестеринэстеразу от действия сопутствующей протеиназы (хотя нам не удалось обнаружить примесей протеиназы при использовании в качестве субстрата меченых ^3H белков куриных эмбрионов); облегчает связывание фермента с субстратом.

Выражаю благодарность профессору В. О. Шпикитеру за помощь при обсуждении результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brown W. J., Sgoutas D. S.— *Biochim. biophys. Acta*, 1980, v. 617, p. 305—317.
2. Kolhari H. V., Kritchevsky D.— *Atherosclerosis*, 1978, v. 31, p. 371—375.
3. Hyun J., Treadwell C. R., Vahouny G. V.— *Arch. Biochem.*, 1972, v. 152, p. 233—241.
4. Haley N. J., Fowler S., de Duve C.— *J. Lipid Res.*, 1980, v. 21, p. 961—969.
5. Sewerson D. L., Fletcher T.— *Atherosclerosis*, 1978, v. 31, p. 21—32.
6. Карманский И. М., Пичугин А. Л., Юсупова Г. И. и др.— *Бюлл. экспер. биол.*, 1981, № 3, с. 330—332.

Поступила 18.12.81

EFFECTS OF DETERGENTS ON NEUTRAL CHOLESTEROLESTERASE FROM PORCINE AORTA

I. M. Karmansky

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

Effects of detergents on hydrolysis of cholesteryl- ^{14}C -oleate by porcine aorta extracts were studied. Digitonin, cetyl pyridinium chloride and sodium taurocholate inhibited the activity of cholesteryl- ^{14}C -oleate. Sodium cholate enhanced slightly the hydrolysis and Triton X-100 exhibited a considerable stimu-

lating effect. After chromatography of aorta extracts on Bio-Gel A-1.5 m two cholesterol esterase fractions were obtained with molecular weight of about 200,000 and above 1 500 000, respectively; the first fraction was active only in presence of Triton X-100 and the second — hydrolysed cholesteryl-¹⁴C-oleate both in presence and absence of the detergent. As a result of treatment of aorta extracts with

digitonin (0.4%), the Triton-dependent low molecular fraction of cholesterol esterase was obtained. Since the molecular weight of the enzyme fraction was about 20,000 (as shown by elution profiles), the activating effect of Triton on cholesterol esterase appears to be not due to disaggregation of the enzyme or to destruction of the membrane-enzyme complexes.

УДК 612.111.7.015.32:547.455.6

С. А. Макаров, А. И. Колотилова

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ГЕКСОЗОФОСФАТОВ В ЭКСТРАКТАХ КРОВЯНЫХ ПЛАСТИНОК ЧЕЛОВЕКА

Ленинградский университет им. А. А. Жданова

В результате метаболизма глюкозо-6-фосфата (Г-6-Ф) по пентозсфосфатному пути (ПФП) образуется ряд продуктов, характерных для гликолитического пути обмена углеводов. Так, в ходе неокислительных реакций ПФП, помимо специфических продуктов — седогептулозо-7-фосфата (С-7-Ф), эритрозо-4-фосфата (Э-4-Ф) и др., образуются глицеральдегид-3-фосфат, диоксиацетонфосфат и фруктозо-6-фосфат — Ф-6-Ф [1—3]. Биологический смысл подобных точек соприкосновения субстратов двух альтернативных путей метаболизма глюкозы заключается, по-видимому, в возможности обратимого переключения потока метаболитов с ПФП обмена углеводов на гликолитический, что позволяет быстро и надежно обеспечивать потребности организма в энергетическом и пластическом материале [4].

Дальнейшее исследование химизма ферментативных реакций неокислительной части ПФП показало, что некоторые его метаболиты (семи- и восьмиуглеродные сахара) могут синтезироваться и разрушаться под действием гликолитических ферментов [5—7].

При нарушении целостности тромбоцитов нормальное включение монофосфата фруктозы в гликолитический процесс нарушено [8, 9] и Ф-6-Ф, образующийся в ходе реакций ПФП, не может метаболизировать до молочной кислоты. Однако при добавлении Ф-6-Ф к экстракту тромбоцитов крупного рогатого скота происходит быстрое снижение его содержания, что указывает на другие пути утилизации Ф-6-Ф, отличные от гликолитического [9, 10].

Изучение особенностей обменных реакций гексозофосфатов в кровяных пластинках человека и явилось целью настоящей работы.

Методика

Методика

Кровяные пластинки получали из консервированной крови человека методом дифференциального центрифугирования [11]. Осадок тромбоцитов лизировали дистиллированной водой и центрифугировали, как описано ранее [12]. Полученный водный экстракт кровяных пластинок использовали в экспериментах.

Метаболизм фруктозофосфатов и продуктов их обмена исследовали в пробах (общий объем 2,5 мл) следующего состава: 0,4—20,0 мкмоль Ф-6-Ф (или, в зависимости от задач исследования, 2,0—30,0 мкмоль фруктозо-1,6-дифосфата), 100 мкмоль трис-буфера, pH 7,6; 0,5—1,0 мг белка экстракта тромбоцитов. Пробы инкубировали от 1 до 120 мин при 37 °C. Реакцию останавливали добавлением 0,5 мл 20% хлорной кислоты. Денатурированные белки отделяли центрифугированием и к надосадочной жидкости добавляли 1 мл 2 н. КОН. Осадок KClO₄ удаляли фильтрованием.

В фильтрате определяли содержание Ф-6-Ф и Г-6-Ф с применением препаратов глюкозо-6-фосфат-изомеразы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [13]; молочной кислоты — с использованием препарата ЛДГ [13]. В работе были использованы ферментные препараты фирмы «Reanal». Содержание фруктозо-1,6-дифосфата (Ф-1,6-ДФ) определяли с применением ферментного препарата, представляющего собой аммонийно-сульфатную фракцию 50—72% насыщения, полученную нами из мышц кролика и содержащую фруктозодифосфатальдозу, триозофосфатизомеразу и глицерол-3-фосфатдегидрогеназу [14]. В фильтрате также контролировали изменение содержания рибозо-5-фосфата (Р-5-Ф) орциновым методом [15] и С-7-Ф — кистейновым методом [16]. Концентрацию белка измеряли микробиуретовым способом [14]. Данные, представляющие средние результаты 5—7 опытов, обработаны статистически [17].

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены результаты определения зависимости скорости превращений Ф-6-Ф и Ф-1,6-дФ от их исходной концентрации в экстракте тромбоцитов. Из рис. 1 следует, что с увеличением содержания Ф-6-Ф в пробах усиливается метаболизм этого монофосфата и накопление Г-6-Ф. В то же время в пределах исследованных концентраций Ф-6-Ф не обнаружено образования молочной кислоты.

Как известно, кровяные пластинки представляют собой клетки с лабильной метаболической активностью. Интактные тромбоциты характеризуются высокой скоростью гликолитического процесса, большими запасами гликогена [18—21]. Однако при инкубации разрушенных тромбоцитов вследствие нарушения гексокиназной и фосфофруктокиназной реакций из-за дефицита АТФ не наблюдается образования молочной кислоты из гликогена, глюкозы, а также из монофосфорных эфиров глюкозы и фруктозы. Процесс образования молочной кислоты в пробах, содержащих Г-6-Ф и Ф-6-Ф, обнаруживается лишь при добавлении АТФ [8, 9]. В то же время Ф-1,6-дФ метаболизирует по гликолитическому пути, что сопровождается заметным накоплением лактата (см. рис. 1).

Таким образом, изменения уровня экзогенного Ф-6-Ф в экстрактах тромбоцитов человека нельзя объяснить участием этого монофосфата фруктозы в гликолитическом процессе. Однако высокая скорость образования Г-6-Ф в пробах с добавлением Ф-6-Ф позволяет связать убыль последнего с активностью глюкозофосфатизомеразы (D-глюкозо-6-фосфат кетолизомеразы; КФ.5.3.1.9).

Из рис. 2 следует, что с увеличением времени инкубации убыль Ф-6-Ф и прирост Г-6-Ф возрастают, причем эта зависимость носит гиперболический характер и, по-видимому, характеризует процесс установления равновесия между этими двумя формами гексозомонофосфатов.

При добавлении в инкубационную среду пробы 5 мкмоль НАДФ за первые 60 мин инкубации не происходит заметного усиления убыли Ф-6-Ф. Удлинение сроков инкубации приводит к интенсификации в пробах снижения содержания Ф-6-Ф (см. рис. 2). Более резко выраженная картина наблюдается

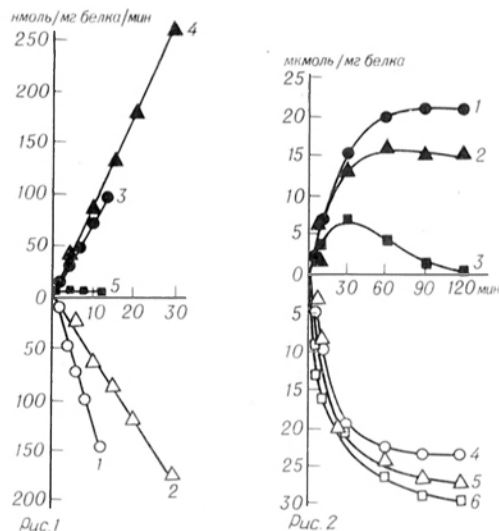


Рис. 1. Зависимость убыли Ф-6-Ф, Ф-1,6-дФ, накопления Г-6-Ф и молочной кислоты от концентрации фосфорных эфиров фруктозы в экстрактах кровяных пластинок человека при двухчасовой инкубации.

1 — убыль Ф-6-Ф; 2 — Ф-1,6-дФ; 3 — прирост Г-6-Ф; 4 — накопление лактата из Ф-1,6-дФ; 5 — накопление лактата из Ф-6-Ф. По оси абсцисс — содержание Ф-6-Ф и Ф-1,6-дФ, мкмоль в пробе.

Рис. 2. Зависимость убыли Ф-6-Ф и прироста Г-6-Ф от концентрации НАДФ и времени инкубации экстрактов в кровяных пластинок человека.

1 — прирост Г-6-Ф в пробах без добавления НАДФ; 2 — прирост Г-6-Ф в пробах при добавлении в пробу 5 мкмоль НАДФ; 3 — прирост Г-6-Ф в пробах при добавлении в пробу 10 мкмоль НАДФ; 4 — убыль Ф-6-Ф в пробах без добавления НАДФ; 5 — убыль Ф-6-Ф в пробах при добавлении в пробу 5 мкмоль НАДФ; 6 — убыль Ф-6-Ф в пробах при добавлении в пробу 10 мкмоль НАДФ.

при введении в инкубационную среду 10 мкмоль НАДФ. Так, уже за первую минуту инкубации величина превращения Ф-6-Ф, в процентах от исходного его содержания, возрастает в 3,5 раза, по сравнению с пробами, не содержащими окисленной формы этого кофермента. При более длительных сроках инкубации наблюдается практически полное включение монофосфата фруктозы в глюкозофосфатизомеразную реакцию (90—97% от исходного уровня). В то же время количество синтезированного Г-6-Ф к 60 мин инкубации резко снижается, очевидно, за счет включения этого фосфорного эфира глюкозы в окислительные реакции ПФП. Усиление убыли Ф-6-Ф при высокой концентрации НАДФ можно объяснить сдвигом равновесия глюкозофосфатизомеразной реакции в сторону образования Г-6-Ф вследствие его дальнейших окислительных превращений в процессе ПФП. Интересно отметить, что образующийся при добавле-

нии НАДФ 6-фосфоглюконат может выполнять регуляторную роль, активируя фосфофруктокиназу и тем самым способствовать превращению Ф-6-Ф по гликолитическому пути [22].

Одним из путей метаболизма Ф-6-Ф может являться вовлечение этого монофосфата фруктозы в реакции синтеза интермедиатов неокислительной части ПФП [4, 23]. Однако в условиях наших экспериментов — при инкубации Ф-6-Ф с экстрактом кровяных пластинок — не было обнаружено достоверных сдвигов увеличения содержания Р-5-Ф и С-7-Ф. Тем не менее на основании полученных нами данных нельзя полностью исключить предположение о Ф-6-Ф как источнике неокислительных интермедиатов ПФП, так как имеются данные о возможности транскетолазной реакции между Ф-6-Ф и Г-6-Ф с образованием октулозо-8-фосфата и Э-4-Ф (7) — мощного регулятора неокислительной части ПФП [24] и ингибитора глюкозофосфатизомеразы [25].

Таким образом, в экстрактах кровяных пластинок человека глюкозофосфатизомеразная реакция, по-видимому, играет значительную роль в метаболизме Ф-6-Ф, превращая его в субстрат для окислительных реакций ПФП. Согласно имеющимся данным, при инкубации кровяных пластинок наблюдается возрастание внутриклеточного содержания НАДФ и снижение концентрации НАД, причем некоторые агрегирующие агенты (АДФ) интенсифицируют этот процесс [26]. Повышение содержания НАДФ в интактных клетках, по-видимому, будет усиливать вероятность включения Ф-6-Ф через глюкозофосфатизомеразную реакцию в пентозофосфатный цикл.

ЛИТЕРАТУРА

1. Horecker B. L.— J. clin. Path., 1962, v. 47, p. 271—278.
2. Williams J. F., Clark M. G.— Search., 1971, v. 2, p. 80—88.
3. Williams J. F., Blackmore P. F., Clark M. G.— Biochem. J., 1978, v. 176, p. 257—282.
4. Головацкий И. Д.— В кн.: Пентозофосфатный путь, его химизм и регуляция. Л., 1977, с. 6—7.
5. Paoletti F., Williams J. F., Horecker B. L.— Arch. Biochem., 1979, v. 198, p. 614—619.
6. Paoletti F., Williams J. F., Horecker B. L.— Ibid., p. 620—626.

7. Степанова Н. Г., Северин С. Е.— Докл. АН СССР, 1980, т. 251, с. 1271—1274.
8. Черняк Н. Б. Процессы образования и использования энергии в кровяных пластинках человека. Автореф. дис. докт. М., 1967.
9. Макаров С. А. Автореф. дис., 1978, Л., с. 21.
10. Макаров С. А.— Вестн. Ленинград. ун-та, 1977, № 9, с. 79—84.
11. Евлентьева Н. Е., Черняк Н. Б. и др.— Пробл. гематол., 1979, № 10, с. 54—56.
12. Макаров С. А.— Вестн. Ленинград. ун-та, 1976, № 21, с. 155—157.
13. Асатиани В. С. Новые методы биохимической фотометрии. М., 1965.
14. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. М., 1971.
15. Horecker B. L.— Meth. Enzymol., 1957, v. 3, p. 105—107.
16. Brownstone J. S., Denstedt O. F.— Canad. Biochem. Physiol., 1961, v. 39, p. 527—532.
17. Ашмарин И. П., Васильев Н. Н., Амбросов В. А. Быстрые методы статистической обработки и планирования экспериментов. Л., 1975.
18. Луганова Н. С., Сейц И. Ф., Тесоборович В. И.— Докл. АН СССР, 1958, т. 118, с. 537—539.
19. Waller H. D., Lohr G. W., Grignani F. et al.— Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttg.), 1960, Bd 3, S. 520—547.
20. Gross R.— In: Blood Platelets. Boston, 1961, p. 407—421.
21. Егорова В. А., Блинова А. И., Сейц И. Ф.— Вопр. мед. химии, 1965, № 1, с. 35—41.
22. Sommercorn J., Freedland R. A.— Biochem. biophys. Res. Commun., 1981, v. 99, p. 563—568.
23. Johnson R., Krasna A. I., Rittenberg D.— Biochemistry (Wash.), 1973, v. 12, p. 1069—1077.
24. Северин С. Е., Степанова Н. Г.— Изв. АН СССР, Серия биол., 1974, № 3, с. 416—424.
25. Grazi E., De Flora A., Pontremoli S.— Biochem. biophys. Res. Commun., 1960, v. 2, p. 121—125.
26. Евлентьева Н. Е., Черняк Н. Б.— Вопр. мед. химии, 1977, № 4, с. 449—453.

Поступила 16.12.81

SOME PATTERNS OF HEXOSEPHOSPHATES METABOLISM IN EXTRACTS OF HUMAN BLOOD PLATELETS

S. A. Makarov, A. I. Kolotilova

A. A. Zhdanov State University, Leningrad

Glucose phosphate isomerase reaction was shown to be important in turnover of fructose-6-phosphate in extracts of human thrombocytes as a result of deterioration of glycolytic process. Effect of fructose-6-phosphate concentration on its consumption and on formation of glucose-6-phosphate was studied. Alterations in content of fructose-6-phosphate and glucose-6-phosphate in presence of various NADP concentrations were estimated.

Ю. А. Князев, Т. И. Туркина, Э. А. Юрьева

ДЕЙСТВИЕ КСИДИФОНА И ВИТАМИНА Е НА ПОКАЗАТЕЛИ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА ПРИ ДИСЛИПИДЕМИИ, ИНДУЦИРОВАННОЙ ХОЛЕСТЕРИНОВОЙ НАГРУЗКОЙ

ИИ ММИ им. Н. И. Пирогова

В связи с широким распространением заболеваний, сопровождающихся нарушением липидного обмена, актуальной является проблема его лекарственной регуляции. В этом плане представляют интерес дифосфонаты, в частности ксидифон (оксизетилидендифосфоновая кислота), для которых характерно наличие двухфосфорноуглеродных связей (P—C—P).

В экспериментальных условиях дифосфонаты предупреждают кальцификацию мягких тканей, эффективны при подкожном и пероральном применении и практически не разрушаются в организме [1, 2]. Анализ биохимических показателей крови и мочи у животных с экспериментальным нефрокальцинозом показал, что дифосфонаты дают благоприятный эффект, стабилизируя мембранные фосфолипиды, удерживающие кальций в мембране. Дифосфонаты не проникают внутрь клетки, а адсорбируются на поверхностной мембране [1]. Показано, что введение оксизетилидендифосфоновой кислоты угнетает фосфолипазы, разрушающие фосфолипидный компонент мембранных структур [3]. При использовании дифосфонатов, обладающих естественной способностью стабилизировать перекисные соединения (ингибирование Fe-зависимой каталазы), имеющиеся в поврежденной ткани, необходимо применение антиоксидантов для предотвращения сопутствующего повреждению мембран токсического влияния накапливающихся перекисных соединений [1]. В качестве антиоксиданта используется витамин Е.

Целью настоящей работы было изучение влияния ксидифона в сочетании с витамином Е на измененный метаболизм при дислипидемии, индуцированной холестериновой нагрузкой, а также изучение влияния одного витамина Е, применявшегося в тех же дозах, для сравнения лечебного эффекта.

Методика

Работа выполнена на половозрелых белых крысах-самцах с исходной массой тела 170—

200 г; в опыте было 4 группы животных (по 10 в каждой группе).

1-ю группу составили животные, содержащиеся на стандартном полноценном рационе вивария. Эта группа служила контролем. Животных 2, 3 и 4-й групп содержали на атерогенном рационе в течение 3 нед. Алиментарную атерогенную нагрузку проводили следующим образом: дополнительно к обычному виварному рациону крысы получали 1,5 г холестерина, 10 г маргарина и 0,3 г холевой кислоты из расчета на 1 кг массы тела. Животным 3-й группы ежедневно перорально вводили физиологические дозы витамина Е (α -токоферол-ацетата) в виде 5% масляного раствора из расчета 0,2 мг на 1 кг массы тела в течение последних 2 нед. Животные 4-й группы ежедневно получали с питьем ксидифон (отечественный препарат) в количестве 75 мг на 1 кг массы тела (15 мг по фосфору) и витамин Е (0,2 мг на 1 кг массы тела) также в течение последних 2 нед. Животные были забиты спустя 3 нед от начала эксперимента через 12—16 ч после последнего приема пищи. Для доказательства терапевтического эффекта ксидифона и витамина Е в сыворотке крови исследовали спектр липидов и липопротеидов (ЛП), в эритроцитах определяли спектр фосфолипидов (ФЛ). Липидный спектр сыворотки крови изучали методом тонкослойной хроматографии на закрепленном слое силикагеля [4]. Количественную оценку липидных фракций производили путем прямой денситометрии на микрофотометре МФ-2. При этом выделяли следующие фракции липидов: ФЛ, свободный холестерин (СХ), неэтерифицированные жирные кислоты (НЭЖК), триглицериды (ТГ), эфиры холестерина (ЭХ). Спектр ЛП определяли методом высоковольтного диск-электрофореза в полиакриламидном геле [5] с последующей денситометрией фракций ЛП на приборе ER1-65 фирмы «Карл — Цейс — Йена» (ЧССР). Выявляли следующие фракции ЛП: пре- β -ЛП, β -ЛП, α -ЛП. Спектр ФЛ мембран эритроцитов изучали методом двумерной микротонкослойной хроматографии на закрепленном слое силикагеля с последующей денситометрией полученных фракций на микрофотометре МФ-2. При этом выделяли следующие фракции: лизофосфатидилхолин (ЛФТХ), фосфатидилхолин (ФТХ), фосфатидилсерин (ФТС), фосфатидилэтаноламин (ФТЭА), сфингомиелин (СФМ). Полученные данные обработаны методом вариационной статистики [6].

Результаты и обсуждение

Атерогенный рацион вызвал достоверное повышение содержания всех фракций общих липидов крови (см.

Влияние ксидифона и витамина Е на спектр липидов (в г/л), ЛП (в усл. ед.) сыворотки крови, на спектр ФЛ мембран эритроцитов (в %) у крыс с дислипидемией, индуцированной холестериновой нагрузкой ($M \pm m$)

Группа животных	Спектр липидов крови						Транспортные формы липидов	
	ФЛ	СХ	НЭЖК	ТГ	ЭХ	ОЛ	пре-β-ЛП	ремнанты
1-я — интактные	1,00±0,08	0,37±0,01	0,37±0,01	0,61±0,16	1,66±0,16	4,01±0,18	8,04±2,06	—
2-я — холестериновая нагрузка P_{1-2}	1,35±0,07 <0,05	0,60±0,04 <0,001	0,69±0,07 <0,001	1,26±0,16 <0,01	2,04±0,17 >0,05	5,95±0,46 <0,01	30,8±0,66 <0,001	78,3±10,15 <0,001
3-я — холестериновая нагрузка+ксидифон P_{2-3}	1,28±0,07 >0,05	0,53±0,02 >0,05	0,64±0,07 >0,05	1,03±0,05 >0,05	1,90±0,06 >0,05	5,54±0,13 >0,05	23,0±3,73 >0,05	58,0±9,81 >0,05
4-я — холестериновая нагрузка+витамин Е P_{2-4}	1,30±0,04 >0,05	0,52±0,02 >0,05	0,56±0,06 >0,05	0,98±0,07 >0,05	1,85±0,07 >0,05	5,21±0,15 >0,05	26,3±5,78 >0,05	59,8±10,89 >0,05
5-я — холестериновая нагрузка+витамин Е+ксидифон P_{2-5}	1,32±0,09 >0,05	0,48±0,04 >0,05	0,47±0,04 <0,05	0,85±0,04 <0,05	1,80±0,09 >0,05	4,92±0,02 >0,05	16,30±3,03 <0,001	38,2±3,58 <0,001

Продолжение

Группа животных	Транспортные формы липидов		ЛФТХ	Спектр фосфолипидов мембран эритроцитов			
	β-ЛП	α-ЛП		ФТС	СФМ	ФТХ	ФТЭА
1-я — интактные	101,9±5,23	221,3±7,11	2,08±0,29	11,50±0,86	18,0±1,18	38,61±0,87	29,81±0,95
2-я — холестериновая нагрузка P_{1-2}	215,3±3,4 <0,001	46,7±9,56 <0,001	5,06±0,32 <0,001	8,19±0,75 <0,01	23,8±1,83 <0,05	46,80±1,20 <0,001	16,00±0,70 <0,001
3-я — холестериновая нагрузка+ксидифон P_{2-3}	200,0±7,39 >0,05	151,5±11,55 >0,05	4,30±0,26 >0,05	9,40±0,63 >0,05	22,5±0,78 >0,05	43,6±1,07 >0,05	20,20±0,47 <0,001
4-я — холестериновая нагрузка+витамин Е P_{2-4}	213,8±6,80 >0,05	49,0±5,72 >0,05	3,70±0,28 <0,01	9,20±0,73 >0,05	23,1±1,34 >0,05	45,30±0,82 >0,05	18,70±0,57 <0,001
5-я — холестериновая нагрузка+витамин Е+ксидифон P_{2-5}	180,0±5,34 <0,001	164,4±13,59 >0,05	2,80±0,59 <0,01	11,00±1,61 >0,05	20,4±2,06 >0,05	40,40±0,83 <0,01	25,30±0,75 <0,001

таблицу). Характерные изменения произошли и в составе ЛП: повысилось содержание атерогенных фракций ЛП: пре- β -ЛП, β -ЛП, появилась патологическая фракция ЛП-ремнанты, достоверно уменьшилось количество антиатерогенной фракции α -ЛП ($P < 0,001$). Атерогенный рацион приводил к резким изменениям показателей спектра ФЛ мембран эритроцитов. Наиболее значительно снизился уровень ФТЭА ($P < 0,001$) и ФТС ($P < 0,01$). Резко возрос уровень ЛФТХ ($P < 0,001$) и СФМ ($P < 0,001$) по сравнению с соответствующими показателями у интактных животных. Изменились корреляционные отношения между ЛФТХ и антиатерогенной фракцией ЛП — α -ЛП: при холестериновой нагрузке корреляция стала незначительной, что обуславливает снижение уровня α -ЛП в сыворотке крови при одновременном умеренном повышении уровня ЛФТХ (в норме $r = -0,69$; $P < 0,05$). Увеличение содержания СФМ в эритроцитах, по мнению Финеана [7], Дэмэла [8], Шмидта [9], также придает мембранам жесткость за счет образования областей с повышенной вязкостью, что увеличивает их осмотическую и механическую устойчивость. Нами установлено, что атерогенная нагрузка приводит к достоверному увеличению уровня холестерина в крови, причем устанавливается достоверная положительная корреляция между показателями СФМ, СХ и этерифицированного холестерина (соответственно $r = +0,7$; $r = +0,69$; $P < 0,05$; $P < 0,05$), отсутствующая в норме.

В группах животных, получавших отдельно ксидифон и физиологические дозы витамина Е, почти не выявлено терапевтического эффекта: оставался повышенным уровень общих липидов в сыворотке крови при сохранении повышенного содержания практически всех фракций сывороточных липидов (см. таблицу). Однако несколько повысилось процентное содержание ФЛ по сравнению с таковым у нелеченых животных, что может свидетельствовать об улучшении энергетических процессов в клетках, в том числе и в печени. Остается значительным превышение процента ТГ и снижение процента ЭХ.

Определяя фракции ЛП сыворотки крови у крыс этих же групп, выявили сохранение патологических изменений, вызванных холестериновой нагрузкой: остались значительными повышение со-

держания атерогенных фракций ЛП, снижение антиатерогенной фракции, а также резко сниженное соотношение α/β ЛП (соответственно $\alpha/\beta = 0,76$; $0,70$; $P < 0,001$).

При сравнении действия ксидифона и витамина Е на фосфолипидную структуру клеточных мембран у животных с гиперхолестеринемией выявлено, что ксидифон и физиологические дозы витамина Е также практически не меняют патологические сдвиги в составе ФЛ мембран эритроцитов по сравнению с таковым у животных, находившихся на атерогенном рационе: остается значительно повышенным уровень ФТХ, СФМ при снижении содержания ФТС, достоверно уменьшился лишь уровень ЛФТХ ($P < 0,01$) и увеличилось содержание ФТЭА ($P < 0,001$). Таким образом, раздельное добавление ксидифона и витамина Е в физиологических дозах почти не давало терапевтического эффекта при лечении алиментарной гиперхолестеринемии.

Применение ксидифона в сочетании с физиологическими дозами витамина Е оказало положительное влияние на спектр общих липидов и ЛП сыворотки крови у крыс с дислипидемией, индуцированной холестериновой нагрузкой (см. таблицу). В группе животных, получавших ксидифон и витамин Е, выявлено снижение уровня общих липидов сыворотки крови и статистически достоверное уменьшение содержания НЭЖК и ТГ по сравнению с соответствующими показателями у нелеченых животных ($P < 0,05$, $P > 0,05$). Появилась тенденция к снижению концентрации СХ.

В этой же группе животных значительно изменился состав ЛП сыворотки крови: снизилось содержание всех атерогенных фракций ЛП-ремнант, пре- β -ЛП, β -ЛП (соответственно $P < 0,001$; $P < 0,001$; $P < 0,001$) при нарастании уровня α -ЛП. Поскольку эти изменения происходят на фоне тенденции к уменьшению содержания общих липидов, можно предположить, что препарат облегчает переход ремнантов в α -ЛП. Это подтверждает и установившаяся высокая степень положительной корреляции между содержанием этих фракций ЛП ($r = +0,63$; $P < 0,05$). Выявлена отрицательная корреляция между показателями свободных и этерифицированных фракций холестерина, что отражает усиление этерификации холестерина

под влиянием ксидифона ($r = -0,62$; $P < 0,05$).

Под влиянием ксидифона в комплексе с витамином Е нормализуется и фосфолипидный состав клеточных мембран: статистически достоверно снижается содержание фракций ЛФТХ, ФТХ (соответственно $P < 0,01$; $P < 0,001$) и повышается уровень ФТЭА ($P < 0,001$) в отличие от содержания этой фракции у животных, находившихся на атерогенном рационе. Относительное содержание ФТС имело тенденцию к нормализации. Уменьшение концентрации СФМ в эритроцитах при назначении экспериментальным животным ксидифона в сочетании с витамином Е обусловлено, видимо, повышением активности сфингомиелиназы, которая снижает содержание СФМ в эритроцитах. Реализация эффекта осуществляется также на уровне метилтрансфераз. Известно, что инкубация клеток с меченым аденозилметионином увеличивает включение метильных групп в лецитин и СФМ [10]. Метилтрансфераза, локализованная в эритроцитах, вероятно, угнетается при назначении крысам с гиперхолестеринемией ксидифона с витамином Е. Об этом свидетельствует накопление ФТЭА в эритроцитах. Устанавливается высокодостоверная обратная корреляция между уровнем ФТЭА и СФМ ($r = -0,77$; $P < 0,01$), отсутствующая у контрольных животных.

Таким образом выявлено, что ксидифон в сочетании с физиологическими дозами витамина Е в условиях нарушения липидного обмена, вызванного атерогенной нагрузкой, снижает уровень НЭЖК и ТГ в крови, атерогенных фракций ЛП, нормализует фосфолипидный состав мембран эритроцитов. Достоверно уменьшается содержание всех липидных фракций на фоне высокого коэффициента НЭЖК/ТГ, что свидетельствует о повышенной интенсивности липолитических процессов. Тот факт, что снижение уровня НЭЖК сопровождается уменьшением концентрации всех фракций липидов сыворотки крови, позволяет предполагать, что ксидифон в сочетании с витамином Е способствует окислению НЭЖК. По-видимому, ксидифон в сочетании с витамином Е обладает гиполипидемическим свойством.

Полученные данные подтверждают высказанную ранее мысль об улучшении

метаболизма клетки мембраностабилизирующими средствами при патологических процессах, обусловленных дезорганизацией структурных компонентов цитомембран. Применение фосфоновых соединений в комплексном лечении алиментарной гиперхолестеринемии представляется патогенетически оправданным. Эти данные можно рассматривать в связи с теми принципами комплексного лечения дислипидемий, которые применяются в клинике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вельтищев Ю. Е., Юрьева Э. А., Архипова О. Г. — *Вопр. мед. химии*, 1975, № 5, с. 3—11.
2. King W. R., Francis M. D., Michael W. R. *Clin. Orthop.*, 1971, v. 78, p. 251—270.
3. Fleish H., Russell R., Bisar S. — In: *Hard Tissue Growth Repair and Remineralization*. Amsterdam, 1973, p. 331—358.
4. Шмаль Э. *Хроматография в тонких слоях*. М., 1965.
5. Магачева Е. Я. — *Вопр. мед. химии*, 1973, № 6, с. 652—655.
6. Венчиков А. И., Венчиков В. А. Основные приемы статистической обработки результатов наблюдений в области физиологии. М., 1974.
7. Финеан Д. Мембраны и их функции в клетке. М., 1977.
8. Demel R., Kruyff B. — *Biochim. biophys. Acta*, 1976, v. 457, p. 109—132.
9. Schmidt C., Barenholz G. — *Biochemistry (Wash.)*, 1977, v. 16, p. 2649—2656.
10. Севастьянов А. Н., Лукашик Н. К. — *Здравоохран. Белоруссии*, 1978, № 11, с. 26—28.

Поступила 15.12.81

EFFECT OF XIDIPHONE AND VITAMIN E ON LIPID METABOLISM PATTERNS IN DISLIPIDEMIA INDUCED BY CHOLESTEROL

Yu. A. Knyazev, T. I. Turkina, E. A. Yur'eva

N. I. Pirogov II Medical School, Moscow

Spectrum of lipids, their transport forms in blood serum and phospholipid composition in erythrocyte membranes were studied under conditions of dislipidemia induced by cholesterol loading after treatment with a mixture containing diphosphonate (xidiphone) and vitamin E as well as with the only vitamin E. Lypolytic reactions of metabolims were activated during simultaneous treatment with xidiphone and vitamin E: content of NEFA and triglycerides as well as of lipoprotein atherogenous fractions was decreased in blood, at the same time, decrease of lysophosphatidylcholine and phosphatidylcholine and in-

crease of phosphatidylethanolamine were found in erythrocyte membranes. The data obtained are in agreement with the hypothesis that mem-

brane-stabilizing drugs improve cell metabolism in pathological conditions related to deterioration of cytomembrane structure components.

УДК 612.112.94.017.4.014.46 : 615.356:577.161.1

А. В. Сергеев, Г. И. Самохвалов, В. Р. Еникеев, И. М. Яковлева,
Л. А. Вакулова, Л. Н. Поляченко, Л. П. Давыдова

ВЛИЯНИЕ ПРИРОДНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ВИТАМИНА А И ИХ 4-ОКСОПРОИЗВОДНЫХ НА ОБРАЗОВАНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ЦИТОЛИТИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ

Всесоюзный онкологический научный центр АМН СССР, Научно-производственное объединение «Витамины», Москва

Способность витамина А и его синтетических аналогов (ретиноидов) тормозить рост химически индуцированных и некоторых перевивных опухолей хорошо освещена в литературе [1, 2]. Хотя механизм противоопухолевого действия ретиноидов еще неясен, предполагается, что по крайней мере отчасти он может быть связан со стимулирующей противоопухолевого иммунитета [3]. В экспериментальных работах было показано, что витамин А и его производные активируют гуморальный и клеточный иммунные ответы [4, 5]. Однако адьювантные свойства витамина А проявляются на фоне выраженной токсичности и прежде всего к клеткам лимфоидной системы [4]. В связи с этим становится очевидна необходимость поиска новых, менее токсичных синтетических ретиноидов, способных как непосредственно действовать на опухоль, так и стимулировать иммунную систему. Одним из возможных подходов к решению данной проблемы может быть поиск новых эффективных препаратов среди аналогов природных метаболитов витамина А, которые частично лишены токсичности витамина. Недавно показано, что превращения витамина А в процессе окислительного метаболизма, а именно окисление циклогексанового кольца в 4-м положении и изомеризация концевой двойной связи, могут быть первой ступенью детоксикации молекулы витамина А [6].

Специфическим цитолитическим Т-лимфоцитам, по современным представлениям, отводится ключевая роль в противоопухолевом иммунитете. В связи с этим представлялось целесообразным провести сравнительное изучение иммуностимулирующих свойств 6 ретиноидов, природных метаболитов вита-

мина А и их аналогов в смешанной культуре лимфоцитов (MLC) на модели образования специфических Т-киллеров.

Методика

3 - Метил - (2,6 - диметил - 6 - этоксикарбонил - 3 - оксо - 1 - циклогексен - 1 - ил) - 2,4-пентадиен-1-овая кислота, этиловый эфир (I, ретиноид C_{15} -диэфир), 15-этоксикарбонил - 9,13 - диметил - 7 - (1,5 - диметил - 1 - этоксикарбонил - 4 - оксо - 5 - циклогексен - 6-ил)-7,9,11,13-октатетраен (II, ретиноид C_{20} -диэфир), 15-ацетокси - 9,13 - диметил - 7 - (1,5-диметил - 1 - этоксикарбонил - 4 - оксо - 5 - циклогексен - 6 - ил)-7,9,11,13-нонотетраен, (III, ретиноид C_{20} -ацетат), целиком *транс*-метилретиноат (IV), 11-*цис* - гамма - метоксикарбонилметилретиноат (V), 13 - *цис*-метилретиноат (VI) синтезированы в лаборатории химии полиеновых соединений НПО «Витамины» по ранее описанному методу [7]. Целиком *транс*-ретиносовая кислота фирмы «Sigma» (США). В работе использовали мышей-самок массой 20—22 г BALB/c и СЗН, полученных из питомника «Столбовая» АМН СССР. Животных содержали на обычной виварной диете. С целью получения цитолитических лимфоцитов селезенки мышей BALB/c и СЗН извлекали асептически, осторожно гомогенизировали в стеклянных гомогенизаторах Поттера в среде RPMI 1640, фильтровали через несколько слоев марли и подсчитывали с помощью эозин-трипанового синего количество живых клеток. Стимуляцию *in vitro* проводили по описанному нами ранее методу [8] с некоторой модификацией. В качестве реагирующих клеток использовали лимфоциты мышей BALB/c ($H-2^d$) в концентрации 5×10^6 в 1 мл, в качестве стимулирующих — клетки селезенки мышей СЗН ($H-2^k$), облученных перед инкубацией в дозе 1000 Р. Соотношение реагирующих и стимулирующих клеток в большинстве опытов составляло 5:1. Контролем служили монокультуры лимфоцитов BALB/c или облученные лимфоциты мышей СЗН. Культуральная среда содержала 100 мл среды DMEM, 20% инактивированной телячьей эмбриональной сыворотки (ТЭС), 2×10^{-3} М L-глутамина, 5×10^{-3} М ХЕПЕС, 3×10^{-5} М 2-меркаптоэтанол, пенициллина и стрептомицина по 100 ЕД на 1 мл среды. Инкубацию проводили

в 24-луночных плоскодонных платах 76—03 (Linbro Flow Lab.) в термостате «Нарко» при 5% содержании CO_2 в течение 5 сут. Все ретиноиды растворяли в 96% этиловом спирте, хранили при -85°C и вносили в культуру в объеме 10 мкл на 0—2-е сутки. Каждую серию опытов повторяли не менее 3 раз. В конце инкубации подсчитывали количество живых клеток путем окраски эозин-трипановым синим, а также под фазовым контрастом с помощью окуляр-микрометра определяли пропорцию лимфоцитов, которые условно разделяли на малые (5—7 нм), средние (7—9 нм), большие (больше 9 нм). Для определения активности образовавшихся в MLC специфических Т-киллеров лимфоциты инкубировали с клетками-мишенями в соотношениях 0,2:1; 1:1; 5:1; 20:1 в 0,2 мл среды RPMI 1640 с 5% ТЭС в 96-луночных плоскодонных платах 3040 (Falcon) в течение 18 ч при 37°C . В качестве мишеней использовали монослой L-клеток (H—2^b), которые накануне опыта инкубировали со 100 мкКи $\text{Na}_2\text{Cr}^{51}\text{O}_4$ в количестве 10^7 клеток в 1 мл среды RPMI 1640 с 5% ТЭС в течение 1 ч при 37°C . Затем клетки трижды отмывали средой 199 и суспензию разливали в лунки микроплат 3040 в количестве 10^4 клеток на лунку. Каждое определение (одно соотношение лимфоцит:клетка-мишень) проводили в 6 параллельных пробах. Для определения спонтанного лизиса L-клетки инкубировали с той же средой без лимфоцитов. В наших опытах спонтанный лизис, как правило, равнялся 15—20%. После окончания инкубации на счет отбирали из каждой лунки по 0,1 мл надосадочной жидкости, которую переносили в пластиковые пробирки. Радиометрию образцов проводили на γ -счетчике фирмы «Nucleac Chicago» (США). Процент специфического цитолиза определяли по формуле:

$$\text{Специфический цитолиз} = \frac{\text{Выход } \text{Cr}^{51} \text{ в опыте} - \text{спонтанный выход } \text{Cr}^{51} \times 100}{\text{Максимальный выход } \text{Cr}^{51} - \text{спонтанный выход } \text{Cr}^{51}},$$

где максимальное освобождение Cr^{51} учитывали по выходу изотопа в надосадочную жидкость после обработки L-клеток 2% раствором динатриевой соли сульфата Na в 0,05 М растворе боратного буфера, pH 9,9. Для определения скорости пролиферации лимфоцитов в культуру клеток добавляли ^3H -тимидин из расчета 1 мкКи на 1 мл среды (удельная радиоактивность 10 мкКи/мл) для MLC на 3-й день инкубации и для лимфоцитов, стимулированных фитогемагглютинином (ФГА) или конканавалином А (ConA), на 2-й день инкубации. Клетки собирали на фильтры с помощью мультихарвестера (Flow Lab.) через 18 ч и радиометрию образцов проводили на β -счетчике «Ин-тертекник». Отношение числа импульсов в 1 мин в опыте к числу импульсов в контроле (монокультура) условно принимали за индекс стимуляции (ИС).

Результаты и обсуждение

Для экспериментального изучения были выбраны ретиноиды с различными длиной и строением боковой цепи, степенью окисления циклогексанового кольца и положением изомерной двой-

ной связи (табл. 1, I—VI). Среди них целиком *транс*-ретиноевая кислота и ее 13-*цис*-изомер представляют собой природные метаболиты витамина А, а соединения с окисленным циклогексановым кольцом являются ретиноидами, структурно близкими фекальным метаболитам витамина А [6]. Большинство из изученных нами ретиноидов оказывали токсическое действие на культуру лимфоцитов в концентрации выше 10^{-5}M . Наблюдалось резкое сокращение общего количества клеток в MLC (см. табл. 1) и полное отсутствие больших и средних лимфоцитов. Природные метаболиты витамина А и их аналоги в концентрации ниже 10^{-6}M практически не влияли на количество клеток и соотношение лимфоцитов в культуре. Токсическое действие ретиноидов в высоких дозах описано для различных культур клеток [5] и зависит от концентрации препарата, длительности инкубации и линии клеток. Ретиноевая кислота в концентрации выше 10^{-5}M тормозила пролиферацию лимфоцитов в смешанной культуре с опухолевыми клетками S 194 [4]. Инкубация клеток линии НЕр-2 с ретинолом в концентрации $6,6 \times 10^{-5}\text{M}$ в течение нескольких часов уже приводила к разрушению клеточных мембран, а жизнеспособность линии ретинобластомы человека У-72 уменьшалась приблизительно наполовину после 24-часовой экспозиции с ретинолом в концентрации 10^{-5}M [5]. В отличие от этого некоторые линии человеческих и мышиных фибробластов пролиферировали в культуре при концентрации ретинола выше 10^{-5}M [5]. Повреждающее действие ретиноидов на клетки связывают с лабилизацией лизосомальных мембран, активацией неспецифических лизосомальных гидролаз и последующим разрушением поверхностных мембран клеток. Следует отметить, что клетки лимфоидной системы наиболее чувствительны к токсическому действию ретиноидов. Ретиноевая кислота при введении мышам в дозе 300 мкг на животное вызывала истощение лимфоидных компонентов тимуса и селезенки, однако не повреждала клеток костного мозга [4].

Образование специфических Т-киллеров в культуре лимфоцитов селезенки мышей BALB/c, стимулированных *in vitro* облученными клетками селезенки мышей С3Н, увеличивалось в среднем в 2—2,5 раза в присутствии целиком

Влияние ретиноидов на пролиферацию лимфоцитов в смешанной культуре

№	Химическая структура	Название **	Концентрация		Количество клеток в МЛС $\times 10^4$ *	Соотношение лимфоцитов в культуре, %		
			мкг/мл	М		большие	средние	малые
I		Ретиноид C ₁₅ - диэфир	0,1	$3 \cdot 10^{-7}$	2,4	6	30	64
			1,0	$3 \cdot 10^{-6}$	1,5	8	32	60
			10,0	$3 \cdot 10^{-5}$	0,05	0	0	100
II		Ретиноид C ₂₀ - диэфир	0,1	$2,5 \cdot 10^{-7}$	1,16	3	29	67
			1,0	$2,5 \cdot 10^{-6}$	1,0	8	30	62
			10,0	$2,5 \cdot 10^{-5}$	0,28	0	0	100
III		Ретиноид C ₂₀ - ацетат	0,1	$2,5 \cdot 10^{-7}$	2,2	7	32	61
			1,0	$2,5 \cdot 10^{-6}$	2,02	7	28	65
			10,0	$2,5 \cdot 10^{-5}$	0,16	0	0	100
IV		Транс-метилре- тиноат	0,1	$3,2 \cdot 10^{-7}$	1,78	4	20	75
			1,0	$3,2 \cdot 10^{-6}$	1,6	3	40	58
			10,0	$3,2 \cdot 10^{-5}$	0,8	8	8	84
V		11-цис-метокси- карбонил-ме- тилретиноат	0,1	$2,7 \cdot 10^{-7}$	1,52	1	28	71
			1,0	$2,7 \cdot 10^{-6}$	1,46	7	29	64
			10,0	$2,7 \cdot 10^{-5}$	0,16	0	0	100
VI		13-цис-метил- ретиноат	0,1	$3,2 \cdot 10^{-7}$	1,46	8	23	68
			1,0	$3,2 \cdot 10^{-6}$	1,5	8	32	60
			10,0	$3,2 \cdot 10^{-5}$	0,024	0	17	83
VII		Ретиноевая кислота фирмы «Sigma»	0,1	$3,3 \cdot 10^{-7}$	1,96	3	22	74
			1,0	$3,3 \cdot 10^{-6}$	1,46	1	12	86
			10,0	$3,2 \cdot 10^{-5}$	0,35	0	20	83
—	Контроль	Без спирта	—	—	1,8	6	20	74
		Со спиртом	—	—	1,77	5	23	72

* Количество клеток подсчитывалось на 5-й день инкубации культуры; приведены результаты одного из 3 параллельных опытов.

** Приведено сокращенное название ретиноида; полное химическое название соединения см. в разделе «Методика».

транс-метилретиноата, C₁₅-, C₂₀-ретиноидов в концентрации 10^{-6} — 10^{-7} М (рис. 1, А, Б). Ретиноевая кислота, 13-цис-ретиноевая кислота (VI) и γ -метоксикарбонилметилретиноат (V) в концентрации 10^{-6} — 10^{-7} М вызывали аналогичное усиление образования цитолитических лимфоцитов в МЛС (рис. 2, А, Б). Добавление ретиноидов к L-клеткам вместе с эффекторными лимфоцитами из контрольных культур не влияло на величину цитолиза клеток-мишеней Т-киллерами. Однократное введение препаратов в МЛС приводило к незначительной стимуляции; наибольший эффект наблюдался при трехкратном добавлении препаратов на 0—2-е сутки инкубации.

Все изученные ретиноиды в концентрации выше 10^{-5} М резко тормозили образование Т-киллеров (см. рис. 1, 2, В), что, по-видимому, связано с токсическим действием препарата на культуру (табл. 1). Таким образом, высокие дозы ретиноидов отменяют иммунный ответ в МЛС, тогда как низкие концентрации препаратов сильно стимулируют образование специфических Т-киллеров. Стимулирующий эффект был выражен более заметно, если соотношение реагирующих и стимулирующих клеток в МЛС равнялось 5 : 1. При оптимальном соотношении реагирующих и стимулирующих лимфоцитов (2 : 1), когда наблюдается максимальное образование

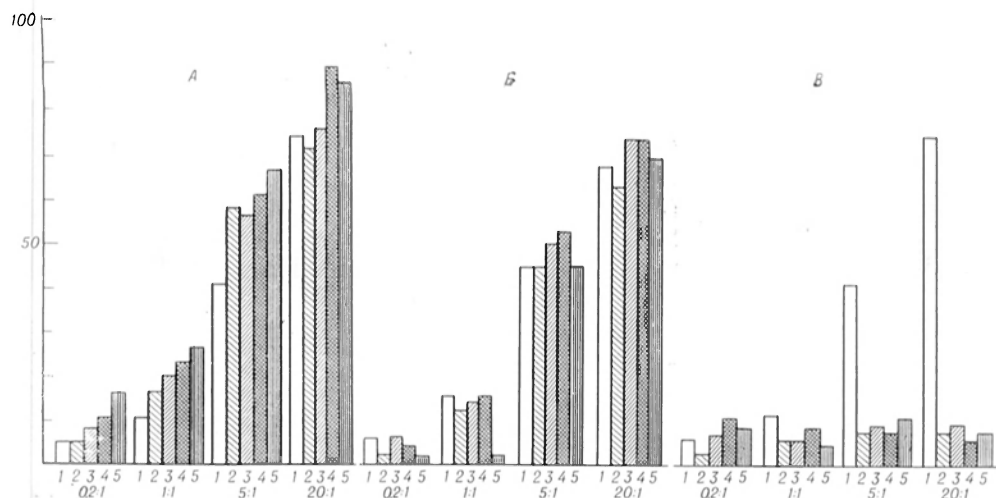


Рис. 1. Влияние C_{15} -, C_{20} -ретиноидов на образование специфических Т-киллеров в MLC. Здесь и на рис. 2, 3: по оси абсцисс — отношение лимфоцит : клетка-мишень; по оси ординат — специфический лизис, %; 1, 2, 3, 4, 5 — соответственно контрольная MLC (IV, III, II, I) и при добавлении ретиноидов; А, Б, В — препараты добавлены в культуру в концентрации соответственно 0,1; 1,0 и 10,0 мкг/мл на 0—2-е сутки инкубации. Соотношение реагирующих и стимулирующих клеток в MLC равнялось 5 : 1. Приведены результаты одного из 3 параллельных экспериментов.

специфических Т-киллеров в культуре. мы не отмечали стимулирующего влияния препаратов. Ретиновая кислота также не влияла на индукцию Т-киллеров при стимуляции лимфоцитов опухолевыми клетками S194 в оптимальных соотношениях [4], что, как предполагают авторы, связано с максимальной реализацией иммунного ответа в MLC. В случае если соотношение реагирующих и стимулирующих клеток в наших опытах равнялось 20 : 1, ретиноиды усиливали образование Т-киллеров очень незначительно, не более чем на 20—30% (рис. 3, А и Б). Мы не наблюдали

также образования Т-киллеров в присутствии ретиноидов, если в системе отсутствовали стимулирующие аллогенные клетки. Таким образом, все ретиноиды стимулировали образование специфических Т-киллеров только в присутствии аллоантигена в субоптимальной или лимитирующей концентрации. Модификация ретиновой кислоты по боковой цепи и окисление циклогексанового кольца в 4-м положении полностью сохраняют иммуностимулирующую активность ретиноидов. Ретиновая кислота и ее аналоги не стимулировали пролиферацию лимфоцитов в монокультуре, т. е. не

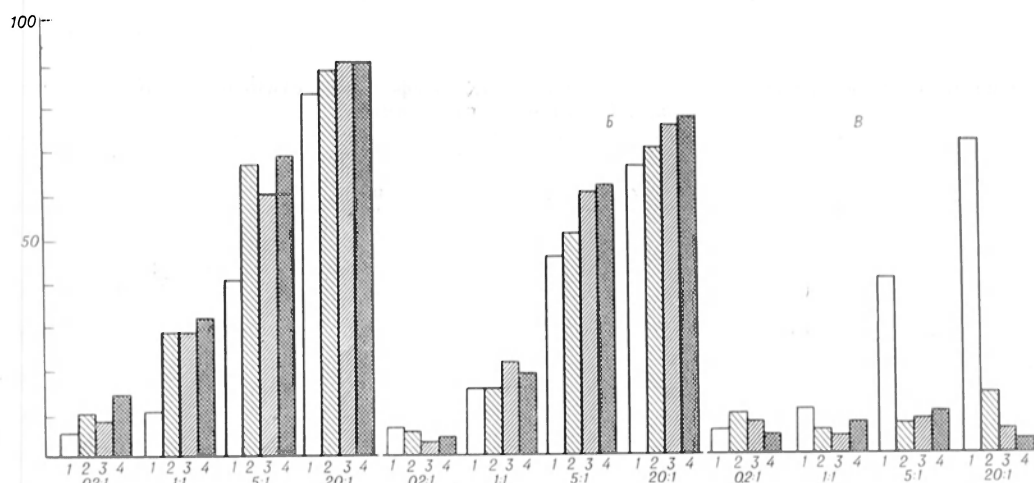


Рис. 2. Влияние ретиновой кислоты и ее аналогов на образование специфических Т-киллеров в MLC.
1, 2, 3, 4 — соответственно контрольная MLC (VII, VI, V).

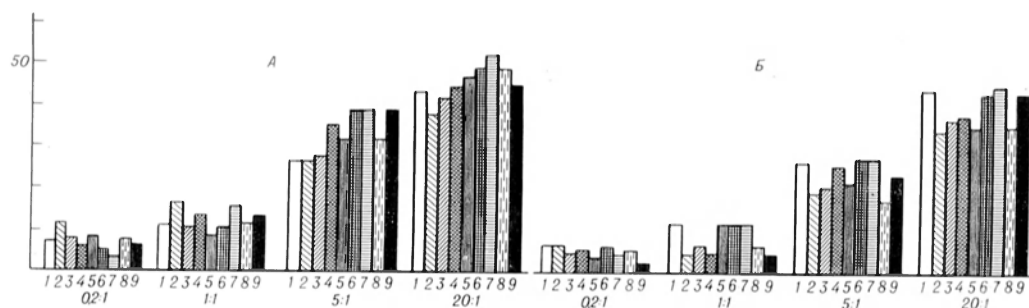


Рис. 3. Образование Т-киллеров в МЛС при соотношении реагирующих и стимулирующих клеток 20:1 в присутствии аналогов ретиноевой кислоты.

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 - соответственно контрольная МЛС и при добавлении ретиноидов (VII, VI, V, IV, III, II, I); А, Б — препараты добавлены в культуру в концентрации 0,1 и 1,0 мкг/мл на 0—2-е сутки инкубации.

обладали митогенными свойствами (табл. 2). Ретиноиды также не ускоряли пролиферацию лимфоцитов, стимулированных митогенами ФГА и СопА (см. табл. 2). Аналогичные результаты были получены другими исследователями [4]. Ранее было показано, что ретиноевая кислота усиливает образование специфических Т-киллеров в смешанной культуре лимфоцитов и опухолевых клеток S194 в 8—10 раз [4]. Поскольку в указанной работе была также использована ретиноевая кислота фирмы «Sigma» (США), можно предположить, что существенные различия в степени индукции цитолитических лимфоцитов по сравнению с нашими данными объясняются неодинаковыми экспериментальными моделями. Ретиноевая кислота и ее аналоги стимулировали также образование специфических Т-киллеров при иммунизации мышей субоптимальными дозами аллогенных и сингенных

опухолевых клеток [3, 9]. Таким образом, производные витамина А способны усиливать иммунный ответ не только против трансплантационных, но и против специфических опухолевых антигенов. Механизм иммуностимулирующего действия ретиноидов на лимфоциты остается невыясненным. Предполагают, что ретиноевая кислота индуцирует переход предшественников Т-киллеров в зрелые эффекторные лимфоциты [5]. Поскольку производные витамина А участвуют в биосинтезе глюкозаминоглюканов и гликопротеидов клеточных мембран [10], не исключена также возможность изменения иммуногенности стимулирующих клеток в присутствии ретиноидов. В настоящее время считается установленным, что противоопухолевая активность ретиноевой кислоты и ее аналогов в значительной мере связана с иммуностимулирующими свойствами ретиноидов [5]. Противоопу-

Таблица 2

Влияние ретиноидов на включение ^3H -тимидина в ДНК лимфоцитов, стимулированных аллоантигенами (МЛС) или митогенами

Препарат *	Монокультура **	МЛС		ФГА		СопА	
		имп/мин	ИС	имп/мин	ИС	имп/мин	ИС
Ретиноевая кислота	570±83	2541±460	4,5	2963±308	5,2	46 463±5111	81,5
C ₁₅ -ретиноид	667±74	3302±377	4,9	3496±316	5,2	54 876±4318	82,2
C ₂₀ -ретиноид диэфир	515±104	3438±325	6,6	3284±254	6,3	51 967±4128	100
13-цис-метилретиноат	599±67	2651±384	4,4	3166±344	5,3	53 613±5265	89,5
Контроль	633±72	3274±481	5,2	3452±261	5,4	52 288±4836	82,6

* Все испытуемые препараты вносили в культуру в концентрации 1 мкг/мл на 0—2-е сутки инкубации.

** Приведены средние величины из 3—4 параллельных экспериментов.

холевое действие ретиноевой кислоты не проявляется у животных с удаленным тимусом [11]. Поскольку специфические Т-киллеры играют существенную роль в противоопухолевом иммунитете, можно предположить, что обнаруженная ранее противоопухолевая активность природных метаболитов витамина А и 4-оксипроизводных ретиноевой кислоты непосредственно связана с их иммуностимулирующими свойствами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Труфанов А. В. — *Вопр. мед. химии*, 1979, № 2, с. 115.
2. Bollag H. — *Cancer Chem. Pharm.*, 1979, v. 3, p. 207.
3. Dennert G., Crowley C., Kouba J. et al. — *J. nat. Cancer Inst. (Wash.)*, 1978, v. 62, p. 89.
4. Dennert G., Lotan P. — *Europ. J. Immunol.*, 1978, v. 8, p. 23.
5. Lotan P. — *Biochim. biophys. Acta*, 1980, v. 605, p. 33.
6. Roberts A. B., Frolik C. A. — *Fed. Proc.*, 1979, v. 38, p. 2524.
7. Яковлева И. М., Вакулова Л. А., Филиппова Т. М. и др. — *Ж. орг. химии*, 1980, т. 26, с. 2289.
8. Sergeev A. V., Bykovskaja S. N., Luchanskaja L. M. et al. — *Cell. Immunol.*, 1978, v. 38, p. 187.
9. Lotan R., Dennert G. — *Cancer Res.*, 1979, v. 39, p. 55.
10. De Luca L., Juspa S. H. — *Exp. Cell Res.*, 1974, v. 86, p. 106.

11. Paten P. Q., Collins J. L., Yogeewaran G. et al. — *Europ. J. Cancer*, 1979, v. 24, p. 624.

Поступила 29.12.81

EFFECT OF NATIVE VITAMIN A METABOLITES AND THEIR 4-OXODERIVATIVES ON FORMATION OF SPECIFIC CYTOLYTIC T LYMPHOCYTES

A. V. Sergeev, G. I. Samokhvalov, V. R. Enikeev, I. M. Yakovleva, L. A. Vakulova, L. N. Polyachenko, L. P. Davydova

All-Union Oncological Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Scientific-Industrial Association «Vitamins», Moscow

Immunomodulating effect of some structural derivatives of retinoic acid (RA) on formation of specific cytolytic T lymphocytes (T killers) was studied in mixed cell culture of spleen lymphocytes from allogenic mice. Native vitamin A metabolites (RA, 13-cis-RA) and the structure-like substances (C_{15} , C_{20} -retinoids and others) at 10^{-6} – 10^{-7} M concentrations increased 2–2.5-fold the formation of T killers in vitro after stimulation of the lymphocytes by suboptimal doses of allogenic X-ray irradiated cells, the lymphocyte proliferation was inhibited in the mixed culture at 10^{-5} M and higher concentrations of the substances. Optimal concentrations of retinoids did not increase the 3H -thymidine incorporation into DNA of lymphocytes stimulated by alloantigens or mutagens. The data obtained suggest that the previously found antitumoral efficiency of the compounds studied may be due to stimulation of specific cellular immunity.

154

УДК 616.36-002.2-099-092.9-07:616.36-008.922.1

Л. Н. Юлдашева, Р. Г. Султанов

СОСТОЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ГЕЛИОТРИННОМ ГЕПАТИТЕ

Кафедра биохимии Среднеазиатского медицинского педиатрического института, Ташкент

Печень играет центральную роль в обеспечении динамического равновесия различных физиологически важных веществ, в том числе и микроэлементов. Патологические изменения печени сопровождаются нарушением их обмена [1], что, по-видимому, и приводит к изменению активности ряда важных окислительно-восстановительных ферментов [2, 3]. Нами исследовано влияние комплексного соединения меди купир на окислительные процессы в печени у экспериментальных животных с хроническим токсическим гепатитом.

Методика

Экспериментальную модель хронического гепатита воспроизводили на 130 белых кры-

сах стадного разведения массой 120–140 г, затравленных пирролизидиновым алкалоидом — гелиотрином в течение 25 дней [4]. Для коррекции биохимических изменений использовали комплексное соединение меди — купир, синтезированное проф. М. А. Азизовым в Ташкентском фармацевтическом институте. Купир вводили внутримышечно в дозе 1 мг/кг, начиная с 50-го дня от начала эксперимента ежедневно в течение 20 дней. Двум другим группам животных, затравленных гелиотрином (без лечения), и контрольным животным вводили физиологический раствор. Крыс декапитировали на 50, 70 и 90-й дни опыта, так как в эти сроки в группе нелеченных затравленных животных были наиболее выражены явления хронического активного гепатита и формирующегося цирроза печени.

Митохондрии (МХ) изолировали из печени крыс общепринятым методом в среде, содержащей 0,25М сахаразы в 0,01 М трис-HCl

буфере рН 7,2 [5, 6]. Поглощение кислорода регистрировали при 26 °С полярографически [7]. Среда инкубации содержала 0,12М КСl, 0,0025М KH_2PO_4 , 0,01М трис-НСl рН 7,4. МХ добавляли из расчета 2,5—3,5 мг белка на 1 мл среды. Дыхание стимулировали введением 200 мкМ АДФ. Белок определяли по Лоури [8]. Субстратами окисления служили сукцинат, глутамат и α -кетоглутарат в концентрации 8 мМ. Скорость дыхания выражали в наноатомах O_2 в 1 с на 1 мг белка МХ. Общую активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и малатдегидрогеназы (МДГ) определяли в сыворотке крови, гомогенатах тканей, митохондриях и постмитохондриальном супернатанте оптическим тестом Варбурга на спектрофотометре СФ-26 при 340 нм. Активность выражали в единицах Вроблевского в 1 мин на 1 мг белка [9, 10]. Изоферменты ЛДГ и МДГ разделяли электрофоретически в 7,5% полиакриламидном геле [11, 12]. После разделения изоферментов их проявляли непосредственно в геле тетразолиевым методом и количественно определяли денситометрически [13]. Результаты обработаны статистически с использованием критерия Стьюдента. В тексте приводятся только статистически достоверные результаты.

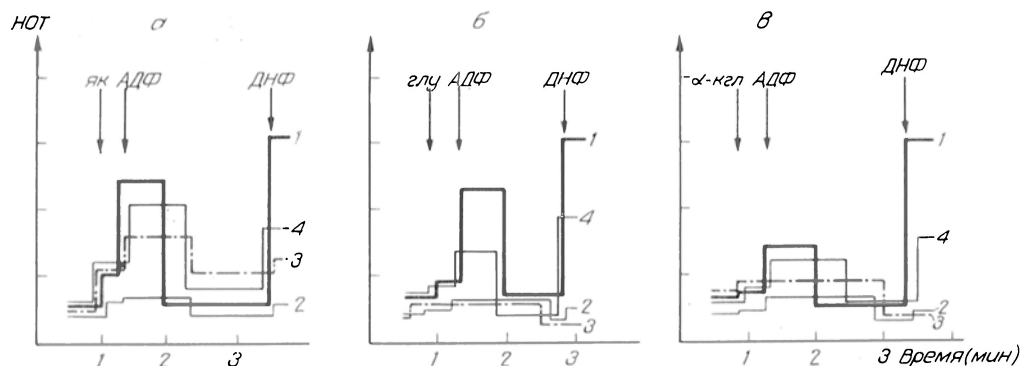
Результаты и обсуждение

Известно, что при хроническом гелиотринном гепатите структура МХ изменена [14]. Полученные нами данные свидетельствуют также о значительном нарушении их функционального состояния. На рисунке приводятся результаты экспериментов, в которых полярографически изучено дыхание МХ контрольных крыс и больных гепатитом животных. У крыс с 50-дневным сроком от начала интоксикации гелиотринном наблюдается резкое снижение функциональных показателей МХ, что выражается в подавлении скорости дыхания в состоянии 3 и 4 (см. рисунок) и в

снижении уровня дыхательного контроля. При этом изменение скорости окисления выражено в большей степени, чем дыхательного контроля. Такая картина характерна как для сукцината, так и для глутамата и α -кетоглутарата. По-видимому, изучаемый патологический агент, аккумулирующийся в печени и подвергающийся метаболизму, влияет главным образом на окислительно-восстановительные процессы, связанные с переносом электронов, а также вызывает частичное разобщение окислительного фосфорилирования путем структурного повреждения мембраны МХ.

К 70-му дню у выживших животных наблюдается некоторое улучшение дыхания МХ на янтарной кислоте (см. рисунок), однако на НАД-зависимых субстратах обнаруживается все еще резкое угнетение митохондриального окисления. В этот срок МХ, дышащие на глутамате и на α -кетоглутарате, не отвечают на добавку АДФ и ДНФ, т. е. находятся в состоянии глубокого ингибирования как дыхания, так и фосфорилирования, что согласуется с имеющимися в литературе сведениями [15]. Сукцинатдегидрогеназная ветвь цепи биологического окисления в этих условиях частично позволяет синтезировать АТФ (см. рисунок), дефицит которого в печени при данном виде патологии показан рядом авторов [16].

После 20-дневного введения купира происходит некоторое улучшение процессов окислительного фосфорилирования. Если судить только по относительным показателям (дыхательный контроль, стимуляция дыхания), то нормализация почти полная. Учет скоростей



Дыхание митохондрий печени крыс при хроническом гелиотринном гепатите.

А — сукцинат; Б — глутамат; В — α -кетоглутарат (все в концентрации 8 мМ). Добавки: АДФ — 200 мкМ; ДНФ — 40 мкМ. 1 — контрольные животные; 2 — гепатит, нелеченый, 50 дней; 3 — гепатит, нелеченый, 70 дней; 4 — гепатит, 70 дней + купир. Глу — глутамат, α -кгл — α -кетоглутарат, ян — янтарная кислота. По оси ординат — скорость дыхания (в наноатомах O_2 в 1 с на 1 мг), по оси абсцисс — время (в мин).

Влияние купира на общую активность и МДГ некоторых тканей крыс с хроническим гелиотринным гепатитом ($M \pm m$)

Группа животных	Сыворотка крови	Гомогенат		Печень	
		почка	селезенка	митохондрии	постмитохондриальный супернатант
Л Д Г					
Контроль (14)	272±5,1	381,4±22,1	360,4±15,6	266,9±4,3	300,8±35,1
Гепатит нелеченый, 70 дней (14)	486,2±16,5	193,4±8,6	173,3±9,0	162,7±9,1	147,9±7,4
Гепатит, 70 дней + купир (10)	339,2±7,6	311,6±10,9	360,2±11,2	291,1±10,9	243,3±31,1
Гепатит нелеченый, 90 дней (12)	527,2±31,6	162,7±7,2	173,3±10,9	108,8±7,8	104,7±4,8
Гепатит, 90 дней + купир (10)	281,3±4,3	389,8±11,5	336,8±7,3	229,9±27,7	303,3±18,2
М Д Г					
Контроль (14)	202,5±6,0	506,4±15,4	281,1±11,4	427,8±9,4	679,4±16,8
Гепатит нелеченый, 70 дней (14)	794,7±53,9	221,2±8,3	113,5±4,8	147,5±8,5	124,8±6,7
Гепатит 70 дней + купир (10)	497,0±38,7	403,9±4,5	280,2±4,7	282,2±29,9	574,4±46,6
Гепатит нелеченый, 90 дней (12)	794,7±53,9	416,1±14,5	113,5±4,8	103,5±7,0	285,8±9,4
Гепатит 90 дней + купир (10)	220,0±11,0	544,9±12,6	259,2±8,5	423,3±11,9	553,8±10,3

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

дыхания дает более точное представление о лечебном влиянии купира при хронической гелиотринной интоксикации (см. рисунок).

Для определения тяжести поражения печени и контроля эффективности лечения мы использовали вспомогательный ферментный тест — определение общей активности и изоферментного спектра ЛДГ и МДГ. Известно, что их изменения довольно однотипны при заболеваниях печени различной этиологии [17, 18]. В сыворотке крови наблюдается повышение их общей активности и относительное увеличение ЛДГ₅, МДГ₃ и МДГ₄. Нами показано, что в сыворотке животных, затравленных гелиотрином к 70-му дню, особенно к 90-му дню опыта, значительно повышается уровень общей ЛДГ-активности, тогда как в тканях наблюдается ее снижение. Введение купира приводит этот показатель к норме (табл. 1). Результаты исследования изоферментного спектра ЛДГ сыворотки крови крыс с изучаемой патологией печени показывают увеличение доли ЛДГ М-типа. Противоположные изменения наблюдали в постмитохондриальном супернатанте печени крыс с хроническим гелиотринным гепатитом (табл. 2). Изменения общей активности и изоферментного спектра МДГ после затравки животных гелиотрином и по-

следующем введении купира аналогичны наблюдаемым для ЛДГ (см. табл. 1 и 2).

Мы считаем, что ухудшение процессов окислительного фосфорилирования в митохондриях печени и выход цитоплазматических ферментов в кровь при длительном введении гелиотрина могут быть связаны прежде всего с нарушением трофической функции вегетативной нервной системы и с нарушением иннервации микрососудов органов [19]. Известно, что при отравлении гелиотрином наблюдаются нарушения микроциркуляции во многих органах — желудке, толстом и тонком кишках, печени [20]. По-видимому, причину развития дистрофий и воспалительно-дегенеративных изменений в печени и других органах системы пищеварения следует искать в нарушении нейрогуморальных регуляторных влияний, играющих важную роль в интеграции клеточного метаболизма. Возможно, блокирование гелиотрином периферических холинорецепторов, сродство к которым он имеет [21], приводит к увеличению адренергической фазы [22] в ответной реакции организма на введение алкалоида. Печень страдает более всего, так как в ней накапливается наибольшее количество гелиотрина [23] по сравнению с другими органами. Определенная роль в усугублении поражения печени отводится продуктам

Влияние купира на соотношение (в %) изоферментов ЛДГ и МДГ в сыворотке крови (А) и постмитохондриальном (Б) супернатанте печени крыс с токсическим гелиотринным гепатитом ($M \pm m$)

Группа животных	ЛДГ ₁		ЛДГ ₅		МДГ ₁		МДГ ₂		МДГ ₃	
	А	Б	А	Б	А	Б	А	Б	А	Б
Контроль (14)	35,1 ± 1,9	1,2 ± 0,7	3,5 ± 1,7	51,9 ± 2,9	28,3 ± 4,1	26,2 ± 1,8	47,2 ± 2,2	32,5 ± 1,8	23,1 ± 2,2	41,3 ± 2,9
Гепатит нечетеный, 70 дней (14)	9,1 ± 0,9	8,4 ± 0,8	30,5 ± 1,4	21,3 ± 1,3	20,1 ± 1,4	32,2 ± 1,3	28,5 ± 1,8	42,2 ± 1,5	51,8 ± 2,9	26,0 ± 1,9
Гепатит 70 дней + купир (10)	21,9 ± 0,9	1,4 ± 0,7	19,5 ± 1,8	34,0 ± 3,0	30,1 ± 1,9	50,6 ± 1,9	40,3 ± 1,2	22,6 ± 1,4	29,5 ± 2,9	26,8 ± 3,2
Гепатит нечетеный, 90 дней (12)	12,4 ± 1,9	14,5 ± 1,3	25,8 ± 2,1	8,4 ± 2,9	23,1 ± 3,3	42,2 ± 2,8	33,8 ± 4,6	37,4 ± 2,6	43,6 ± 2,9	20,1 ± 3,4
Гепатит, 90 дней + купир (10)	27,3 ± 2,5	1,5 ± 0,8	5,4 ± 1,5	49,2 ± 2,4	20,9 ± 2,9	34,9 ± 1,6	60,4 ± 2,9	33,1 ± 2,3	18,6 ± 1,7	31,7 ± 2,1

распада гелиотрина — так называемым метаболическим пирролам [24]. Нормализующее действие купира на обменные процессы в гепатоцитах, по-видимому, связано с улучшением антитоксической функции печени [25], а также со способностью этого препарата стимулировать белоксинтезирующую систему печени [26].

ЛИТЕРАТУРА

1. Манкус Т. Г., Хафизова С. Ф. — В кн.: Механизмы патологических процессов. Ташкент, 1978, вып. 3, с. 129—133.
2. Арикийнц М. С. Активность некоторых ферментов в сыворотке крови и ткани печени при холецистите. Автореф. дис. канд. Киев, 1973.
3. Мальцев В. М. — Пат. физиол., 1971, № 2, с. 53—58.
4. Белявская Р. И. Морфологическая характеристика экспериментального гепатита и цирроза печени при различных путях стимуляции репаративно-регенеративного процесса. Автореф. дис. канд. Ташкент, 1974.
5. Hogeboom G. H., Schneider W. C., Pallade G. E. — J. biol. Chem., 1948, v. 172, p. 619.
6. Мосолова И. М., Горская И. А. и др. — В кн.: Методы современной биохимии. М., 1975, с. 45—47.
7. Кондрашева М. Н., Николаева Л. В. и др. — В кн.: Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. М., 1973, с. 50—58.
8. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al. — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265—275.
9. Пытков Л. М., Соколова Т. А., Малкина И. И. — Лаб. дело, 1970, № 9, с. 540—542.
10. Kuromitsu H. K. — J. biol. Chem., 1968, v. 243, p. 1016.
11. Dietz A. A., Lubrano T. — Analyt. Biochem., 1967, v. 20, p. 246—257.
12. Thorne C. G. R., Grossman L. I., Kaplan N. O. — Biochim. biophys. Acta, 1963, v. 73, p. 193.
13. Thorling E., Gensen K. — Acta path. microbiol. scand., 1966, v. 66, p. 426.
14. Расулов Н. И. — В кн.: Механизмы патологических процессов. Ташкент, 1978, вып. 3, с. 73—76.
15. Манкус Т. Г. Экспериментальный гепатит и цирроз печени. Вопросы патогенеза и коррекции печеночного кровообращения. Автореф. дис. докт. Ташкент, 1975.
16. Туракулов Я. Х., Пазырова В. Е., Баширова Н. С. — Докл. АН УзССР, 1972, № 10, с. 38—39.
17. Подильчак Э. М. — Тер. арх., 1972, № 7, с. 46.
18. Турсунов Э. А., Пулатов У. Ф., Султанов Р. Г. — В кн.: Гигиенические и биологические аспекты применения пестицидов в условиях Средней Азии и Казахстана. Душанбе, 1978, с. 212—213.
19. Элькин А. А. — В кн.: Вопросы красной патологии. Ташкент, 1956, с. 93—98.
20. Каримов Х. Я., Файзуллаев Ф. — В кн.: Механизмы повреждения резистентности,

- адаптации и компенсации. Ташкент, 1976, т. 1, с. 153.
21. Юлдашева Л. Н., Красильников О. В. — Докл. АН УзССР, 1981, № 1, с. 52—54.
 22. Кожмякин Л. А., Коростовцев Д. С. — В кн.: Циклазная система и ее роль в регуляции клеточного обмена. Ташкент, 1978, с. 26—28.
 23. Мирахмедов М. М., Рахматуллаев М., Икрамов А. Т. — В кн.: Узбекская юбилейная респ. науч. конф. фармацевтов, посвящ. 50-летию образования СССР. Материалы. Ташкент, 1972, с. 121—123.
 24. Matlocks A. R. — Nature, 1968, v. 217, p. 723—728.
 25. Адизов Ю. — В кн.: Важнейшие кишечные инфекционные заболевания в Узбекистане. Ташкент, 1976, вып. 3, с. 51—52.
 26. Мусабаев И. К., Ташпулатов А. А., Адизов Ю. — Там же, с. 49—51.

Поступила 07.01.82

OXIDATIVE REACTIONS IN RAT LIVER TISSUE UNDER CONDITIONS OF CHRONIC HELIOTRINE HEPATITIS

L. N. Yuldasheva, R. G. Sultanov

Chair of Biochemistry, Middle Asian Medical Pediatric School, Tashkent

Parameters of oxidative phosphorylation, the rate of respiration in various metabolic states of rat liver mitochondria as well as activity of lactate and malate dehydrogenases in blood serum were altered in rats with chronic heliotrine hepatitis. Cupir (copper containing complex substance) normalized the enzymatic activity and improved all the energy reactions studied in mitochondria.

УДК 616-006-092.9-07:[616-008.931:616-008.93:577.161.11]-074

Р. В. Требухина

АКТИВНОСТЬ ТРАНСКЕТОЛАЗЫ И ТДФ-ЭФФЕКТ В ТКАНЯХ ЖИВОТНЫХ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМИ ОПУХОЛЯМИ

Отдел регуляции обмена веществ АН БССР, Гродно

Характер взаимоотношений активности транскетолазы и ТДФ-эффекта в разных тканях служит объектом тщательного изучения и споров как клиницистов [1, 2], так и экспериментаторов [3, 4]. Внимание к этому вопросу объясняется известным фактом увеличения ТДФ-эффекта и снижения активности транскетолазы в крови животных в процессе прогрессирования авитаминоза В₁. В отношении тканей вопрос о наличии свободной апотранскетолазы остается спорным, так как одни авторы находят ТДФ-эффект [2, 5], а другие его полностью отрицают [6]. Известно, что некоторым заболеваниям, этиологически не связанными с недостатком витамина В₁, сопутствует развитие вторичного гиповитаминоза. К числу таких заболеваний относится рак, при различных локализациях которого отмечено развитие недостаточности витамина В₁ [7—9]. Недостаток тиамина у больных со злокачественными заболеваниями может усиливаться в результате лечения различными цитостатиками [10], лучевой терапии [11]. Изучение взаимоотношений между холоферментом (активность транскетолазы) и свободным апоферментом (наличие ТДФ-эффекта) в различных тканях предположительно может выявить глубину развивающейся витаминной недостаточности при

раковой патологии, которую необходимо учитывать при витаминотерапии. Целью настоящей работы было изучение активности транскетолазы и ТДФ-эффекта в тканях мышей с асцитной карциносаркомой Эрлиха (АКЭ) и у крыс с саркомой 45, содержащихся на синтетической диете со всеми витаминами или без витамина В₁.

Методика

Опыты выполнены на белых беспородных мышках (20—22 г) и белых беспородных крысах (120—150 г). Животных содержали на синтетическом рационе следующего состава: казеин, отмытый от витаминов, — 18%, кукурузный крахмал — 68%, целлюлоза — 1,5%, подсолнечное масло — 5%. Солевая смесь и все витамины из расчета на 1 кг диеты добавляли по рекомендации [12].

В I серии опытов мышей содержали на описанной выше синтетической диете без витамина В₁. Животных декапитировали на 5, 10, 14-е сутки развития гиповитаминоза. Во II серии опытов мышам, находившимся на полноценном рационе, была перевита карциносаркома Эрлиха в дозе 1,5·10⁶ клеток внутривенно от мыши-донора на 8-е сутки роста опухоли. Средняя продолжительность жизни мышей с АКЭ — 25 дней. Мышей забивали на 10-й и 13-й день после перевивки опухоли. Часть животных за 3 дня до декапитации была переведена на синтетическую диету без витамина В₁. Этим животным забивали на 10-й день после перевивки АКЭ. Таким образом, они находились 7 дней на синтетической диете со всеми витаминами и

3 дня — без витамина В₁. III серия опытов выполнена на белых беспородных крысах, содержащихся на синтетической диете со всеми витаминами. Этим животным перевивали саркому 45 в виде измельченной с физиологическим раствором опухолевой ткани (1:10) в дозе 1,0 мл подкожно в паховую область от крысы-донора на 15-е сутки роста опухоли. Средняя продолжительность жизни крыс с саркомой 45 составила 41 день. Часть животных через 9 дней после перевивки саркомы 45 была переведена на синтетическую диету без витамина В₁, которую они получали в течение 7 дней. Крыс забивали на 16-й день после перевивки саркомы 45.

Кровь и асцитную опухоль Эрлиха собирали в охлажденные пробирки с гепарином (0,05 мл). Печень быстро извлекали, промывали в охлажденном растворе 0,15 М КС1. Гомогенаты печени готовили на 0,15 М КС1 в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. Субклеточные фракции (гиалоплазму, микросомы) получали методом дифференциального центрифугирования (105 000 g в течение 1 ч). Опухолевые клетки отмывали от асцитической жидкости двукратно 0,15 М КС1. Были найдены оптимальные разведения: для гемолизатов крови — 1:10, лизатов опухолевых клеток (АКЭ, саркомы 45) — на 0,1% растворе тритона X-100 — 1:100, гиалоплазмы печени — 1:500. Осадок микросом растворяли в 0,1% растворе тритона X-100 в соотношении 1:2. Активность тран-

скетолазы в исследованных образцах определяли с добавлением ТДФ и без него по скорости образования седогептулозо-7-фосфата (С-7-Ф) при инкубации гомогенатов с рибозо-5-фосфатом [13]. ТДФ-эффект (в %) рассчитывали по следующей формуле:

$$\frac{\text{Активность транскетолазы (+ТДФ)} \times 100}{\text{Активность транскетолазы (—ТДФ)}} - 100.$$

Белок определяли по методу Лоури [14]. Активность транскетолазы рассчитывали в молях образующегося С-7-Ф на 1 кг белка в 1 с, а в крови — на 1 кг гемоглобина в 1 с (система СИ).

Результаты и обсуждение

В отличие от крыс, у которых клинические признаки авитаминоза В₁ (адинамия, выпадение волос, диарея) развиваются через 3—4 нед [2], у мышей симптомы В₁-недостаточности появляются на 13—15-й день содержания их на синтетической диете без тиаминa, а на 23—25-й день наступает смерть животных. Биохимическим показателем степени В₁-недостаточности служит активность ТДФ-зависимого фермента транскетолазы и ТДФ-эффекта (табл. 1).

Таблица 1

Активность транскетолазы (в молях С-7-Ф на 1 кг белка за 1 с) и ТДФ-эффект в тканях интактных мышей, содержащихся на диете без витамина В₁

Исследуемая ткань	Условия опыта	Транскетолаза			Р
		ТДФ (—)	ТДФ (+)	ТДФ-эффект, %	
Кровь	Контроль	13,2±0,11	13,9±0,07	—	—
	День гиповитаминоза:				
	5-й	10,6±0,12	13,9±0,17	30	<0,001
	10-й	9,17±0,14	12,22±0,12	32	<0,001
	14-й	6,67±0,15	10,0±0,21	50	<0,001
Печень (гиалоплазма)	Контроль	636±6,78	621±13,1	—	—
	День гиповитаминоза:				
	5-й	522±9,77	509±2,31	—	—
	10-й	534±6,55	571±12,25	7	<0,05
	14-й	370±4,50	394±5,88	7	<0,01
Печень (микросомы)	Контроль	66,7±1,88	74,2±2,0	11	<0,02
	День гиповитаминоза:				
	5-й	71,9±1,35	82,5±0,82	15	<0,001
	10-й	44,7±0,42	47,5±0,39	6	<0,01
	14-й	23,9±0,19	26,4±0,30	10	<0,01

Примечание. Приведены средние данные, полученные в каждом случае у 8 животных.

Активность транскетолазы крови в процессе развития В₁-авитаминоза постепенно снижается от 77% (5-е сутки) до 50% (14-е сутки), а ТДФ-эффект нарастает от 30 до 50%. Полученные результаты указывают на недостаточное насыщение транскетолазы коферментом в условиях В₁-гиповитаминоза и наличие в крови свободных форм апотранскетолазы.

В опытах на крысах показано, что исключение из пищи тиамин приводит к быстрому снижению уровня свободного ТДФ в крови, а связанный с ферментами ТДФ удерживается на постоянном уровне до 10 дней при сохранении активности транскетолазы. В более поздние сроки (15—20-й день) снижение содержания белковосвязанного ТДФ влечет за собой уменьшение активности транскетолазы [15]. У мышей «биохимические признаки» витаминной недостаточности выявляются в крови значительно раньше (5-е сутки). Обратная зависимость между активностью транскетолазы и ТДФ-эффектом в крови является характерным признаком недостаточности витамина В₁ [1, 4, 5]. Введение мышам с авитаминозом внутривентрально 2 мг тиамин постепенно восстанавливает активность транскетолазы и приводит к исчезновению ТДФ-эффекта. Характер взаимоотношений между холоферментом и апоферментом транскетолазы в печеночной ткани несколько иной. Исключение из пищи витамина В₁ вызывает одностороннее изменение активности транскетолазы независимо от того, определяется ли она в гомогенате [3], гиалоплазме или микросомальной фракции печени (см. табл. 1). Однако следует отметить, что в гиалоплазме активность транскетолазы снижается постепенно и к 14-му дню эксперимента составляет 60% контрольной величины. В микросомах на 5-е сутки активность транскетолазы не изменяется, а начиная с 10-го дня — резко понижается и к 14-му дню составляет только 25% начальной, контрольной, величины (см. табл. 1), ТДФ-эффект в гиалоплазме не определяется (5-е сутки) либо незначителен (7%).

Полученные результаты согласуются с литературными данными о том, что ТДФ-эффект меньше 10% не является диагностическим признаком В₁-гиповитаминоза [1, 4], а развитие более глубокой недостаточности не сопровождается простом свободной апотранс-

кетоллазы в гиалоплазме печени крыс [6]. Наиболее высокий ТДФ-эффект в микросомах печени определяется на 5-й день эксперимента, в последующие дни он понижается до 6—10% (см. табл. 1). Анализируя полученные нами и литературные данные, можно высказать предположение, что обнаруженный ранее ТДФ-эффект в гомогенате печени был связан с наличием в нем микросомальной фракции [5]. Отсутствие снижения активности транскетолазы и наиболее высокий ТДФ-эффект в микросомах печени на 5-е сутки можно расценивать как проявление компенсаторного синтеза апотранскетолазы при раннем В₁-гиповитаминозе. Исчезновение ТДФ-эффекта в микросомах и гомогенате печени [17], возможно, связано с тем, что в организме животных с авитаминозом (14-й день для мышей, 40-й день для крыс) наряду с витаминной недостаточностью развиваются глубокие нарушения в белковом обмене [16].

Развитие опухоли сопровождается обеднением организма витамином В₁ [7, 8, 11, 12], вследствие чего следовало ожидать понижения активности транскетолазы и повышения ТДФ-эффекта в крови. Однако активность транскетолазы в крови мышей с АКЭ на 13-е сутки после перевивки им опухоли не изменяется, а на 10-е сутки даже увеличивается на 12% (табл. 2), ТДФ-эффект постепенно нарастает с 7 до 29%, что указывает на присутствие в крови мышей-опухоленосителей свободной апотранскетолазы. Кажущееся несоответствие в изменении активности транскетолазы и ТДФ-эффекта по сравнению с интактными В₁-авитаминозными мышами связано с особенностями обмена веществ в эритроцитах животных-опухоленосителей. Сопряженные между собой окислительные и неокислительные реакции пентозофосфатного пути обмена углеводов обеспечивают функциональную активность и структурную целостность эритроцитов. Цельная популяция эритроцитов крови крыс с карциносаркомой Уокер 256, разделенная методом осмотического гемолиза, содержит на 40% больше «юных» по возрасту клеток, чем популяция эритроцитов контрольных животных [18]. Активность транскетолазы в ретикулоцитах крыс в 2—3 раза выше, чем в зрелых эритроцитах [19]. Высокая активность транскетолазы в крови мышей с АКЭ, вероятно, обусловлена, как и у

Активность транскетолазы (в молях С-7-Ф на 1 кг белка за 1 с) и ТДФ-эффект в тканях мышей с АКЭ

Исследуемая ткань	Условия опыта	Транскетолаза			Р
		ТДФ (—)	ТДФ (+)	ТДФ-эффект, %	
Кровь	Контроль (интактные мыши)	13,6±0,10	13,9±0,07	—	—
	Длительность АКЭ, дни				
	10	15,3±0,31	16,4±0,49	7	—
	13	13,3±0,27	17,2±0,57	29	<0,001
	10*	13,3±0,31	15,0±0,27	12	<0,001
Печень (гиалоплазма)	Контроль	789±23,8	771±17,6	—	—
	Длительность АКЭ, дни				
	10	749±8,77	698±8,19	—	—
	13	748±11,8	717±19,3	—	—
	10*	696±10,1	585±18,3	—	—
Печень (микросомы)	Контроль	81,4±0,47	90,6±2,15	11	<0,01
	Длительность АКЭ, дни				
	10	77,8±0,37	93,6±0,56	20	<0,001
	13	70,8±3,11	72,2±3,13	—	—
	10*	61,4±1,43	82,2±0,82	34	<0,001
Опухолевые клетки	Длительность АКЭ, дни				
	10	299±6,36	292±4,53	—	—
	13	216±22,02	202±20,13	—	—
	10*	242±7,00	266±7,61	10	<0,05

* В течение 3 дней до деканитации эта группа мышей с перевитой АКЭ содержалась на диете без витамина В₁.

крыс, изменением популяции эритроцитов в крови в сторону «омоложения», что можно рассматривать как механизм адаптации к гипоксии в условиях опухолевого роста. Таким образом, активность транскетолазы и ТДФ-эффект в крови характеризуют не только витаминную обеспеченность, но и степень усиления эритропоэза в условиях раковой патологии. Активность транскетолазы в гиалоплазме печени мышей с АКЭ незначительно отличается от контрольных величин, а ТДФ-эффект не определяется. В микросомах печени мышей с опухолью активность фермента постепенно снижается с 95 до 87%, а ТДФ-эффект на 10-е сутки роста опухоли равен 20%.

В опухолевых клетках активность транскетолазы составляет 30% от активности фермента в печени, но в

20 раз выше, чем в эритроцитах. ТДФ-эффект в опухолевых клетках не определяется. Высокая активность транскетолазы и отсутствие ТДФ-эффекта позволяют предположить, что содержание мышей на синтетическом рационе, в котором тиамин добавлен в количестве 2 мг на 1 кг диеты, обеспечивает рост и развитие опухолевых клеток, в то время как транскетолаза эритроцитов и микросом печени недостаточно насыщена коферментом. Для выявления более выраженных конкурентных взаимоотношений между тканями макроорганизма и опухолевыми клетками некоторые мыши с АКЭ получали 3 дня диету без витамина В₁. Исключение из пищи тиамина повысило ТДФ-эффект в крови до 12%, в опухолевых клетках — до 10%, а в микросомах печени — до 34%. Транскетолазная активность

Активность транскетолазы (в молях С-7-Ф на 1 кг белка в 1 с) и ТДФ-эффект в тканях крыс с саркомой 45, содержащихся на полноценной синтетической диете с добавлением всех витаминов или без витамина В₁

Исследуемая ткань	Условия опыта	Транскетолаза			Р
		ТДФ (—)	ТДФ (+)	ТДФ-эффект, %	
Кровь	Контроль	16,7±1,07	16,4±0,45	—	—
	Опыт 1	14,7±0,51	16,4±0,76	11	<0,05
	Опыт 2	11,9±0,88	15,0±0,96	27	<0,05
	Контроль	685±13,9	679±10,50	—	—
Печень (гиалоплазма)	Опыт 1	654±11,6	722±18,61	10	<0,01
	Опыт 2	632±32,4	621±28,97	—	—
	Контроль	70,6±3,91	71,1±3,42	—	—
Печень (микросомы)	Опыт 1	61,1±7,44	65,6±7,36	7	—
	Опыт 2	51,9±2,11	50,8±1,16	—	—
Опухоль	Опыт 1	317±11,7	311±12,1	—	—
	Опыт 2	263±13,5	303±12,5	15	<0,05

Примечание. Опыт 1 — крысы с саркомой 45 (16-й день роста опухоли), опыт 2 — крысы с саркомой 45 (16-й день роста опухоли), которые в течение 7 дней до декапитации содержались на диете без витамина В₁.

при этом в эритроцитах осталась без изменений, в гиалоплазме понизилась на 13%, в микросомах печени — на 30%, а в опухолевых клетках — на 23%. Таким образом, наиболее чувствительными к авитаминозу В₁ оказались микросомы печени. Данные эксперименты выполнены на мышах с двумя видами экспериментальной патологии (авитаминоз и развитие злокачественной опухоли), которые по срокам развития совпадают (20—25 дней). Возможно, именно поэтому конкурентные взаимоотношения между микросомами печени и опухолевыми клетками в захвате витамина В₁ выявляются у мышей уже через 3 дня после перевода их на синтетическую диету без тиамин (табл. 2). В табл. 3 представлены результаты опытов, выполненные на крысах, которым переносится медленно растущая саркома 45 (средняя продолжительность жизни 35—41 день), развитие которой соизмеримо по сроку с развитием В₁-авитаминоза у крыс (30—40 дней). Активность транскетолазы в тканях организма-хозяина понижена, а в опухолевой ткани составляет 55% от таковой в печени интактных крыс. ТДФ-эффект в микросомах печени составляет 7%, в гиалоплазме — 10%, в крови — 11% (см.

табл. 3). Исключение из пищи тиамин приводит к еще большему снижению активности фермента во всех исследуемых тканях и повышению ТДФ-эффекта в крови и опухолевых клетках.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что из субклеточных фракций печени мышей наиболее чувствительными к дефициту витамина В₁ являются микросомы, активность транскетолазы в которых при В₁-авитаминозе понижена на 75%. Снижение ТДФ-эффекта в микросомах печени с 15% (5-й день) до 10% (14-й день) может служить показателем наиболее глубокой, терминальной стадии авитаминоза В₁.

У мышей с АКЭ исключение из пищи витамина В₁ вызывает снижение активности транскетолазы на 30% и повышение ТДФ-эффекта на 34% в микросомах печени, а в опухолевых клетках — снижение активности фермента на 23% и повышение ТДФ-эффекта только на 10%.

У крыс с саркомой 45 в начальный период развития опухоли (15-й день) исключение из пищи тиамин вызывает наиболее глубокое снижение активности транскетолазы и возрастание ТДФ-эффекта в крови.

1. Chong Y. H. — Am. J. clin. Nutr., 1970, v. 23, p. 261—266.
2. Abe T., Okamoto E., Itokawa Y. — J. nutr. Sci. Vitaminol., 1979, v. 25, p. 375—383.
3. Vatji M. S. — Indian J. Biochem., 1973, v. 10, с. 290—291.
4. Бостон Л. Я. — Вопр. мед. химии, 1975, № 4, с. 339—343.
5. Nishino K., Itokawa J. — J. Nutr., 1977, v. 107, p. 775—782.
6. Виноградов В. В., Струмило С. А. Мандрик К. А. и др. — Вопр. мед. химии, 1978, № 3, с. 383—389.
7. Исмагулов Т. С., Погосов В. С., Спиричев В. Б. — Там же, 1971, № 1, с. 76—81.
8. Гудэ З. Ж., Ляпис М. А. — Врач. дело, 1970, № 4, с. 19—21.
9. Кицманюк З. Д., Дербина М. М., Телешова В. А. — Стоматология, 1973, № 3, с. 91—92.
10. Berndt H., Kutschke J. — Klin. Wschr., 1967, Bd 45, S. 845-849.
11. Дзюбко Н. Я. — Вопр. онкол., 1971, № 6, с. 67—69.
12. Дьячкова Л. В., Щамаев Е. М., Платонова Г. Н. и др. — Вопр. питания, 1972, № 2, с. 42—47.
13. Bruns F. H., Dunwald H., Noltmann E. — Biochem. Z., 1958, Bd 330, S. 497—508.
14. Lowry O. H., Rosefrough N. J., Lewis A. F. et al. — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265—275.
15. Воскобоев А. И., Островский Ю. М., Гриценко Э. А. и др. — Вопр. мед. химии, 1981, № 5, с. 690—694.
16. Спиричев В. Б. — В кн.: Молекулярные основы патологии. М., 1966, с. 220—260.
17. Takahashi K., Nakamura A., Nose Y. — J. Vitaminol., 1971, v. 17, p. 207—214.

18. Требухина Р. В., Туманов В. Н. — В кн.: Механизмы повреждения, адаптации и компенсации. Каунас, 1981, с. 182.
19. Спиричев В. Б., Иваева В. А. — Вопр. мед. химии, 1967, № 5, с. 544—545.

Поступила 27.01.82

ACTIVITY OF TRANSKETOLASE AND THE TDP-EFFECT IN TISSUES OF ANIMALS WITH EXPERIMENTAL TUMORS

R. V. Trebukhina

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

Activity of transketolase and the TDP-effect were studied in blood and liver subcellular fractions of mice with Erlich ascites carcinoma and of rats with sarcoma 45 which were maintained on a synthetic diet containing either all the vitamins or devoid of thiamine. As compared with other mice liver subcellular fractions the microsomal fraction proved to be the most sensitive to thiamine deficiency: inhibition of transketolase activity reached 75%. Decrease in TDP-effect found in microsomes might reflect the most distinct terminal steps of B₁ avitaminosis. As a result of vitamin B₁ deprivation of mice with Erlich ascites carcinoma activity of transketolase was decreased by 30% and the TDP-effect increased by 34% in the liver microsomal fraction; in the tumoral cells the enzymatic activity was decreased by 23% and the TDP-effect was increased by 10%. Thiamine-free ration of rats with sarcoma 45, at the initial steps of the tumor growth was responsible for the most distinct decrease in transketolase activity and an increase in the TDP-effect in blood.

УДК 616.36-005.4-092.9-07:[616.36-008.922.1+616.36-008.939.15]-02:615.356:577.161.3

Г. Г. Воронов, П. И. Лукиенко

ВЛИЯНИЕ α -ТОКОФЕРОЛА НА ГИДРОКСИЛИРУЮЩУЮ СИСТЕМУ И ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ МЕМБРАН ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА ИШЕМИЗИРОВАННОЙ ПЕЧЕНИ КРЫС

Отдел регуляции обмена веществ АН Белорусской ССР, Гродно

Предупреждение нарушений обезвреживающей функции печени при хирургических вмешательствах и патологических состояниях, сопровождающихся нарушением печеночного кровообращения, является одной из важных проблем практической медицины.

Детоксикация большинства веществ осуществляется ферментными системами эндоплазматической сети, которая, по данным морфологических исследований [1], весьма чувствительна к кислородной недостаточности. В патогенезе гипоксических повреждений биомембран важная роль придается интенсификации

перекисного окисления липидов [2, 3]. Поэтому в последнее время большое внимание уделяется препаратам, под влиянием которых понижается уровень липидной пероксидации при гипоксических состояниях [4—6].

Целью настоящей работы явилось изучение нарушений функции гидроксилирующей системы и перекисного окисления липидов мембран эндоплазматического ретикулума гепатоцитов при ишемии печени и возможности коррекции их при помощи природного антиоксиданта — α -токоферола.

Методика

Эксперименты проведены на 60 беспородных белых крысах-самцах массой 180—210 г, содержащихся на стандартном рационе вивария. Животным одной группы вводили в желудок α -токоферол в виде масляной эмульсии в дозе 50 мг/кг через каждые 12 ч в течение 2 сут до ишемии печени. Доза, лекарственная форма и интервал введения препарата выбраны на основании данных об оптимальном действии его как антиоксиданта в соответствующих дозах [7], лучшей абсорбции из кишечника в виде эмульсии [8] и максимальном уровне в тканях через 12 ч после перорального введения [9]. Крысам другой группы в течение того же периода также вводили масляную эмульсию, но не содержащую α -токоферол.

Ишемию печени у крыс обеих групп производили под эфирным наркозом путем наложения микрозажимов на сосудистую ножку левой боковой и срединной долей печени в течение 60 мин. По истечении срока ишемии животных декапитировали. Печень перфузировали через нижнюю полую вену охлажденным 1,15% раствором KCl [10]. Измельченную ткань печени гомогенизировали в таком же растворе в соотношении 1:3. Микросомы осаждали из постмитохондриальной фракции на центрифуге VAC-602 (ГДР) при 105 000 г в течение 1 ч. Все процедуры выполняли при 4 °С. В микросомах, ресуспендированных в 100 мМ трис-HCl-буфере, pH 7,4, определяли скорость N-деметилирования амидопирина (субстрат гидроксилирования I типа) [11] и *n*-гидроксилирования анилина (субстрат II типа) [12], содержание цитохромов P-450 и b_5 [13], активность NADPH (NADH)-оксидазы [14], функцию NADPH-специфического флавопротеида (NADPH-феррицитохром-С-оксидоредуктазы, КФ.1.6.2.4) и среднего компонента NADPH-специфической электрон-транспортной цепи, оцениваемых соответ-

ственно по NADPH-феррицианид калий и неотетразолий-редуктазным реакциям [15, 16]. Содержание цитохромов и активность оксидоредуктаз в препаратах микросом регистрировали на спектрофотометре «Specord UV VIS» (ГДР). Содержание белка в микросомах определяли по Лоури [17].

Активность системы перекисного окисления липидов определяли по количеству образовавшегося малонового диальдегида (МДА) [18].

В качестве контроля использовали микросомы печени ложнооперированных животных (лапаротомия под наркозом). Результаты экспериментов подвергнуты статистической обработке [19].

Результаты и обсуждение

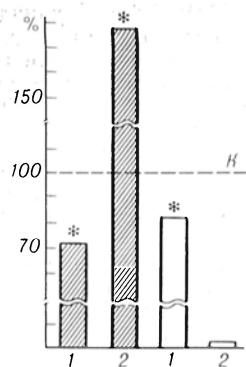
Из таблицы видно, что через 60 мин после прекращения печеночного кровообращения в мембранах эндоплазматического ретикулума гепатоцитов угнетается функция ферментов преимущественно NADPH-зависимой редокс-цепи. Активность NADPH-феррицианид- и неотетразолий-редуктаз, содержание цитохрома P-450, скорость окисления NADPH, N-деметилирования амидопирина и *n*-гидроксилирования анилина понижаются соответственно на 26,4; 20,5; 21,9; 27,8; 26,0 и 38,7%.

Введение α -токоферола предупреждает «ишемическое» нарушение метаболизма амидопирина и анилина. При этом редуктазная функция NADPH-специфического флавопротеида и NADPH-оксидазная реакция существенно не изменяются по сравнению с их уровнем у

Влияние α -токоферола на активность метаболизирующих ксенобиотики ферментов мембран эндоплазматического ретикулума гепатоцитов после 60-минутной ишемии печени крыс

Показатель	Контроль	Ишемия	Ишемия + α -токоферол
NADPH-феррицианид-редуктаза, ммоль·с ⁻¹ ·кг ⁻¹ белка	3,82±0,27	2,81±0,26 (73,6)*	2,92±0,20 (76,4)*
NADPH-неотетразолий-редуктаза, ммоль·с ⁻¹ ·кг ⁻¹ белка	0,39±0,036	0,31±0,02 (79,5)*	0,46±0,019 (118,0)*
NADPH-оксидаза, мкмоль·с ⁻¹ ·кг ⁻¹ белка	104±13,8	75,0±6,33 (72,2)*	51,2±9,5 (49,9)*
Цитохром P-450, ммоль·кг ⁻¹ белка	0,91±0,077	0,71±0,043 (78,1)*	0,81±0,04 (89,1)*
Амидопирин-N-деметилирование, мкмоль	80,2±8,17	59,3±3,67 (74,0)*	81,7±3,4* (102,0)
HCHO·с ⁻¹ ·кг ⁻¹ белка V ₁ /C	88,1	83,6	101
Анилин- <i>n</i> -гидроксилирование, мкмоль аминифенола· ×с ⁻¹ ·кг ⁻¹ белка	15,5±1,58	9,5±0,68 (61,3)*	16,5±0,65 (106)
V ₂ /C	17,0	13,4	20,37
NADH-оксидаза, мкмоль·с ⁻¹ ·кг ⁻¹ белка	74,7±7,5	67,2±8,83 (89,9)	69,7±1,33 (93,3)
Цитохром b_5 , ммоль·кг ⁻¹ белка	0,36±0,04	0,33±0,04 (91,7)	0,34±0,076 (94,4)

Примечание. В скобках — данные в процентах к контролю. V₁ и V₂ — скорости гидроксилирования амидопирина и анилина соответственно, C — ммоль цитохрома P-450; звездочкой отмечены показатели, достоверно отличающиеся от контроля ($P<0,05$).



Скорость образования малонового диальдегида в микросомах печени крыс через 60 мин ишемии (заштрихованные столбцы) и после предварительного введения α -токоферола (незаштрихованные столбцы) в процентах к контролю, принятому за 100 %.

1 — NADPH-зависимое перекисное окисление; 2 — аскорбат-зависимое перекисное окисление липидов; звездочкой обозначены показатели, достоверно отличающиеся от контроля ($P < 0,05$).

нелеченых животных; содержание же цитохрома P-450 увеличивается на 14,1%, хотя и не достигает контрольных значений.

После введения α -токоферола в микросомах ишемизированной печени электронтранспортная активность среднего компонента NADPH-редокс-цепи, определяемая по неотетразолий-редуктазной реакции, возрастает на 38,5%.

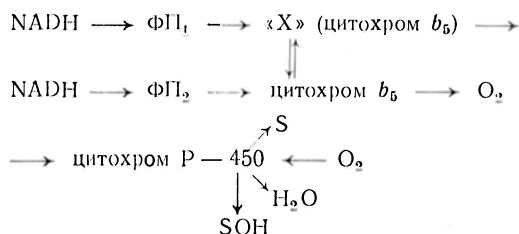
Функция NADH-редокс-цепи (окисление NADH, содержание цитохрома b_5) у леченых, и у нелеченых крыс по сравнению с контролем не изменяется.

Нормализация гидроксилирования амидопирина и анилина под влиянием α -токоферола, по-видимому, обусловлена возрастанием каталитической активности цитохрома P-450. Об этом свидетельствует увеличение числа прореагировавших молекул субстратов с единицу времени. Скорость N-деметилирования амидопирина и *n*-гидроксилирования анилина, рассчитанная на 1 ммоль цитохрома, возросла по сравнению со скоростью их метаболизма у нелеченых животных соответственно на 20,7 и 52,2 %.

Повышение каталитической активности цитохрома P-450 может быть обусловлено по крайней мере двумя факторами: увеличением поступления на гемопротеид электронов из NADPH-цепи и возрастанием его сродства к субстратам.

Поскольку электронтранспортная функция начального участка NADPH-

зависимой редокс-цепи у леченых крыс была заторможена (как и при ишемии), можно предположить, что в реакциях восстановления цитохрома P-450 принимает участие не затронутая при ишемии цепь окисления NADH. Имеющиеся в литературе данные [10] указывают на возможность при недонасыщенности цепи NADPH переброса электронов из NADH-редокс-цепи в цитохром P-450-гидроксилазную систему через общий участок от среднего компонента NADPH-цепи (подфракции цитохрома b_5 по [10]) до цитохрома P-450 по схеме:



В этой связи повышение оксидоредуктазной активности среднего звена NADPH-зависимой цепи под влиянием α -токоферола, вероятно, является одним из пусковых факторов, обеспечивающих переброс электронов в условиях ишемии с NADH-зависимой цепи на цитохром P-450 — гидроксилазную систему.

Многочисленные данные свидетельствуют, что в функционировании электронтранспортных компонентов мембранных редокс-цепей, а также в сродстве цитохрома P-450 к субстратам важная роль принадлежит фосфолипидам мембран эндоплазматического ретикулула [10, 20].

В связи с этим представляют интерес данные об уменьшении содержания фосфолипидов, в частности фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина, в мембранах эндоплазматической сети гепатоцитов при ишемии печени крыс [21].

Согласно данным литературы, одним из вероятных процессов, приводящих к деструкции липидного матрикса мембран, является активизация свободно-радикального окисления липидов [21, 22]. Однако в условиях наших опытов при ишемии наблюдалось повышение активности лишь аскорбат-зависимого перекисного окисления липидов. NADPH-зависимое липоперекисное окисление было даже снижено (см. рисунок). Аналогичные данные получены ранее [23]. По-видимому, нет основания ожидать усиления NADPH-зависимого пере-

кисного окисления липидов в период полного исключения печеночного кровотока, поскольку NADPH-специфическая электронтранспортная цепь в этих условиях значительно ингибирована. Возможность активации аскорбат-зависимой пероксидации липидов в определенной мере может быть обусловлена сохранением при ишемии функции NADH-зависимой редокс-цепи, участвующей в реакциях окисления — восстановления аскорбиновой кислоты [10].

В результате введения α -токоферола понижается активность аскорбат- и NADPH-зависимых реакций перекисного окисления мембран эндоплазматического ретикула.

Исходя из приведенных данных, по-видимому, нельзя целиком отнести нарушение гидроксилирующей функции эндоплазматической сети при ишемии печени за счет увеличения перекисного окисления мембранных липидов.

В литературе обсуждается также вопрос о возможности деструкции клеточных и субклеточных мембран при ишемии в результате интенсификации эндогенных фосфолипаз [21, 23, 24]. Вероятность указанного мембраноповреждающего фактора в условиях ишемии подтверждается большей поражаемостью NADPH-зависимой редокс-цепи, компоненты которой более чувствительны к воздействию фосфолипаз [10, 20, 25].

Защитное действие α -токоферола при ишемии, вероятно, можно объяснить не только его антиоксидантными свойствами, но и мембраностабилизирующим действием, обусловленным его способностью взаимодействовать с сульфидсодержащими белками и полиненасыщенными фосфолипидами [26]. В результате этого взаимодействия тормозится окислительное разрушение ненасыщенных жирных кислот, а также предотвращается гидролиз фосфолипидов фосфолипазами.

Таким образом, 60-минутная долевая ишемия печени у крыс вызывает в мембранах эндоплазматического ретикула понижение оксидоредуктазной активности ферментов NADPH-зависимой цепи, гидроксилирования амидопиррина и анилина, уменьшение содержания цитохрома P-450, а также повышение аскорбат-зависимого перекисного окисления липидов мембран. Предварительное введение α -токоферола

подавляет реакции липидного перекисления и препятствует ишемическому торможению метаболизма субстратов в гидроксилирующей системе за счет повышения каталитической активности цитохрома P-450.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лопухин Ю. М., Коган Э. М. Критерии жизнеспособности органов и тканей перед трансплантацией. М., 1975, с. 178—217.
2. Алесенко А. В., Биленко М. В., Шеленкова Л. Н. — В кн.: Свободнорадикальное окисление липидов в норме и патологии. М., 1976, с. 4—5.
3. Кудрин А. Н. — В кн.: Международный конгресс по патологической физиологии. 2-й. Материалы. М., 1975, с. 216.
4. Кудрин А. Н., Коган А. Х., Королев В. В. и др. — Кардиология, 1978, № 2, с. 115.
5. Яхнина Д. Н. — Вopr. мед. химии, 1980, № 1, с. 88—92.
6. Okamoto H., Isa I. — Jap. J. Anesth., 1975, v. 24, p. 468—471.
7. Yasuda M., Ejima T., Misunoya Y. — Chem. pharm. Bull., 1979, v. 27, p. 447—451.
8. Kelleher S., Davies T., Smith C. et al. — Int. J. Vitam. Nutr. Res., 1972, v. 42, p. 394—402.
9. Carpenter M. P. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1972, v. 203, p. 81—92.
10. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. М., 1975.
11. Nash T. — Biochem. J., 1953, v. 55, p. 416—421.
12. Kato R., Gillette J. — J. Pharmacol. exp. Ther., 1965, v. 150, p. 279—284.
13. Omura T., Sato R. — J. biol. Chem., 1964, v. 239, p. 2370—2378.
14. Gillette J. B., Brodie B. B., La Du B. N. — J. Pharmacol. exp. Ther., 1957, v. 119, p. 532—540.
15. Dallner G. — Acta path. microbiol. scand., 1963, Suppl. 166, p. 94.
16. Roering D. L., Mascaro L., Aust S. D. — Arch. biochem., 1972, v. 153, p. 475—479.
17. Lowry O. N., Rosenbrough N. S., Farr A. L. et al. — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265—275.
18. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972, с. 241—243.
19. Бельский М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Л., 1963, с. 1—32.
20. Ляхович В. В., Цырлов И. Б. Структурные аспекты биохимии монооксигеназ. Новосибирск, 1978.
21. Алесенко А. В., Андреева Л. Б., Слесарева Л. Д. и др. — В кн.: Структура, биосинтез и превращение липидов в организме животного и человека. Л., 1978, с. 19.
22. Велиханова Д. М., Биленко М. В., Коган В. Е. — Бюлл. экспер. биол., 1981, № 7, с. 50—51.
23. Островерхов Г. Е., Малюгин Э. Ф. — В кн.: Экспериментальные основы лечения

- печеночной недостаточности. М., 1975, с. 7—19.
24. Сейфулла Р. Д., Онищенко Н. А., Артамонов С. Д. и др. — Фармакол. и токсикол., 1979, № 2, с. 157—163.
25. Leibman K. C., Estabrook R. W. — *Molec. Pharmacol.*, 1971, p. 26—32.
26. Diplock A. T., Lucy J. A. — *FEBS Letters*, 1973, v. 29, p. 205—210.

Поступила 05.02.82

EFFECT OF α -TOCOPHEROL ON THE HYDROXYLATING SYSTEM AND LIPID PEROXIDATION IN MEMBRANES OF ENDOPLASMIC RETICULUM FROM ISCHEMIZED RAT LIVER TISSUE

G. G. Voronov, P. I. Lukienko

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

If 60 min long ischemia of a liver tissue lobe occurred after feeding of rats with oil emulsion of α -tocopherol at a dose of 50 mg/kg within 12 hrs during 2 days, the «ischemic» decrease in metabolism of amidopyrine and aniline, in content of cytochrome P-450 and activity of initial and middle steps of NADPH-dependent redox chain as well as intensifica-

tion of ascorbate-dependent peroxidation of membrane lipids were prevented in endoplasmic reticulum of hepatocytes. The protective effect of α -tocopherol on these xenobiotics metabolism is apparently related to an increase in catalytic activity of cytochrome P-450, to the enzyme antioxidant and membrane-stabilizing properties.

УДК 612.45.015.1:577.152.1]-06:612.45.015.31:[546.46+546.41+546.711

С. А. Струмило

ИРАЗЛИЧНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИОНОВ Mn^{2+} , Ca^{2+} И Mg^{2+} ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ПИРУВАТДЕГИДРОГЕНАЗНОГО КОМПЛЕКСА НАДПОЧЕЧНИКОВ С ТИАМИНПИРОФОСФАТОМ

Лаборатория биохимии эндокринных желез отдела регуляции обмена веществ АН БССР, Гродно

Ионы двухвалентных металлов необходимы для образования холоформы ряда тиаминовых ферментов [1]. Что касается пируватдегидрогеназного комплекса (ПДК), то при измерении его активности применяют в основном соли магния [2, 3]. Магний активирует пируватдегидрогеназный компонент комплексов из источников бактериального [4], растительного [5] и животного [3, 6, 7] происхождения. Причем для мышечной пируватдегидрогеназы отмечено существенно понижение константы диссоциации тиаминпирофосфата (ТПФ) в присутствии Mg^{2+} [7]. Наряду с этим показана более значительная активация пируватдегидрогеназы из сердца свиньи ионами Ca^{2+} , чем Mg^{2+} [4]. Последние данные получены, однако, в условиях насыщения фермента ТПФ, поэтому они не могут отражать сравнительную эффективность двухвалентных катионов в процессе взаимодействия пируватдегидрогеназы с коферментом.

Представилось интересным сравнить эффективность ионов Mg^{2+} , Ca^{2+} и Mn^{2+} при взаимодействии пируватдегидрогеназы, входящей в состав поли-

ферментного комплекса с ТПФ. В качестве объекта исследования использовали ПДК из надпочечников, свойства и регуляция которого представляют интерес вследствие его важной роли в метаболизме данных желез [8].

Методика

Выделение и очистку ПДК из митохондрий коры надпочечников быка проводили по методу, описанному ранее [9]. Среда для определения активности ПДК включала 50 мМ трис-НСI-буфер, рН 7, 5, 1 мМ дитиотреитол, 0,2 мМ КоА, 1 мМ НАД, 24—60 мкг ферментного препарата и различные концентрации ТПФ, хлористых солей магния, кальция и марганца, как это указано в подписях к рисункам. После преинкубации в течение 3 мин реакцию начинали добавлением 2 мкмоль пирувата в среду с общим объемом 1 мл. Кинетику реакции, катализируемой ПДК, регистрировали по восстановлению НАД при 340 нм и 30 °С на спектрофотометре «Specord UV VIS» (ГДР). Скорость реакции выражали в единицах, равных 1 нанокаталу [10].

Использовали КоА фирмы «Ferak Berlin» (Зап. Берлин), ТПФ фирмы «Fluka» (Швейцария), дитиотреитол фирмы «Sigma» (США), трис и НАД фирмы «Reanal» (Венгрия). Хлористые соли металлов марки х. ч. отечественного производства подвергали перекристаллизации перед применением.

Ранее нами показано, что высокоочищенные препараты ПДК из надпочечников быка содержат некоторое количество остаточного, эндогенного ТПФ [11]. Активность фермента с эндогенным ТПФ нарастает во времени после контакта с субстратом, т. е. наблюдается лаг-период. Возникновение лаг-периода, по всей вероятности, сопряжено с частичной диссоциацией кофермента, что получило определенное экспериментальное обоснование [12]. Используемый для данной работы ПДК также содержал остаточный, частично диссоциирующий ТПФ. Скорость реакции, катализируемой ПДК с эндогенным ТПФ, без добавления двухвалентных металлов достигала своего стационарного уровня лишь спустя 180 с после внесения в среду субстрата. К тому же скорость эта была весьма низкой — 0,24 ед. В присутствии двухвалентных катионов скорость реакции значительно увеличивается (рис. 1). Степень повышения скорости реакции зависит от природы и концентрации двухвалентного катиона, с которым преинкубировался ПДК. По эффективности активирующего влияния в диапазоне концентраций $1 \cdot 10^{-5}$ — $5 \cdot 10^{-4}$ М исследованные катионы располагаются в таком порядке: $Mn^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+}$. Наблюдаемая с марганцем самая высокая скорость реакции сопряжена с наиболее коротким лаг-периодом, после которого она развивается (рис. 2). Похоже, что представление о степени насыщения ПДК эндогенным ТПФ можно получить при регистрации v в присутствии марганца. Но это верно в том случае, если ионы Mn^{2+} , кроме участия во взаимодей-

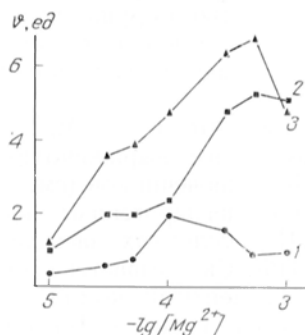


Рис. 1. Скорость реакции (v), катализируемой ПДК с эндогенным, остаточным ТПФ при разных концентрациях ионов Mg^{2+} (1), Ca^{2+} (2), Mn^{2+} (3).

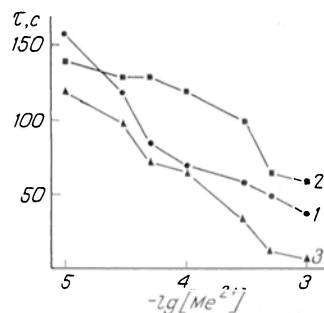


Рис. 2. Продолжительность лаг-периода (τ) реакции, катализируемой ПДК с эндогенным, остаточным ТПФ при разных концентрациях ионов Mg^{2+} (1), Ca^{2+} (2), Mn^{2+} (3).

вии ТПФ с пируватдегидрогеназой, не оказывают общего активирующего влияния на полиферментный комплекс.

Кинетическое исследование с различными концентрациями экзогенного ТПФ в присутствии ионов Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} (0,1 мМ) и без них свидетельствует о сравнительно небольшой разнице в активности ПДК при насыщении его коферментом (рис. 3). Вместе с тем эти различия весьма выражены при низких концентрациях ТПФ. Следовательно, есть основания утверждать, что ионы Mn^{2+} , Ca^{2+} и Mg^{2+} (по убывающей в данном ряду) повышают сродство ПДК к ТПФ. Концентрационный оптимум действия исследованных двухвалентных металлов неодинаков. На это указывает кинетика реакции ПДК как с эндогенным (см. рис. 1), так и с экзогенным ТПФ (см. рис. 3, 4). При 0,1 мМ концентрации катионов явным превосходством в обеспечении скорости реакции в условиях низкого уровня ТПФ обладает марганец. Однако, на порядок большая концентрация Mn^{2+} приводит уже к понижению активности ПДК, даже по

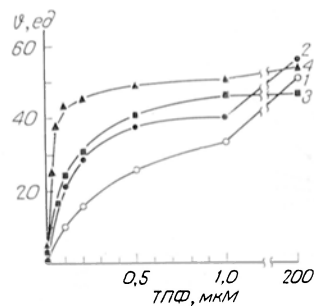


Рис. 3. Зависимость скорости реакции (v), катализируемой ПДК, от концентрации экзогенного ТПФ в отсутствие металлов (1) и в присутствии ионов Mg^{2+} (2), Ca^{2+} (3) и Mn^{2+} (4) в концентрации 0,1 мМ.

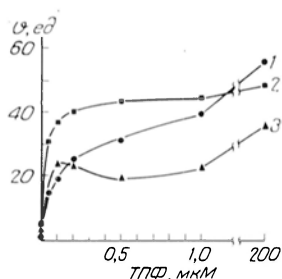


Рис. 4. Зависимость скорости реакции, катализируемой ПДК, от концентрации экзогенного ТПФ в присутствии ионов Mg^{2+} (1), Ca^{2+} (2) и Mn^{2+} (3) в концентрации 0,1 мМ.

сравнению с экспериментом, поставленным в отсутствие металлов. В то же время ионы Ca^{2+} наиболее эффективны в 1,0 мМ концентрации (см. рис. 3, 4). Необходимо отметить, что лаг-период при низких концентрациях экзогенного ТПФ наблюдался только при использовании Mg^{2+} и Ca^{2+} , причем во втором случае он был менее продолжителен. В присутствии Mn^{2+} , начиная с самых низких концентраций ТПФ, лаг-период не регистрировался. Все это указывает на преимущества марганца в процессе образования холофермента.

Если зависимость скорости реакции от концентрации ТПФ с вычетом скорости, наблюдаемой без экзогенного кофермента, представить в координатах Лайнуивера — Берка, то она удовлетворительно выражается прямой линией (рис. 5). Кажущиеся K_m для ТПФ при 0,1 мМ Mn^{2+} , 1,0 мМ Ca^{2+} , 0,1 мМ Mg^{2+} и без добавления металлов составляют соответственно 0,17, 0,029, 0,12 и 0,3 мМ. Как видно, в присутствии Ca^{2+} K_m примерно в 4 раза, а в присутствии Mn^{2+} — в 7 раз ниже, чем в сре-

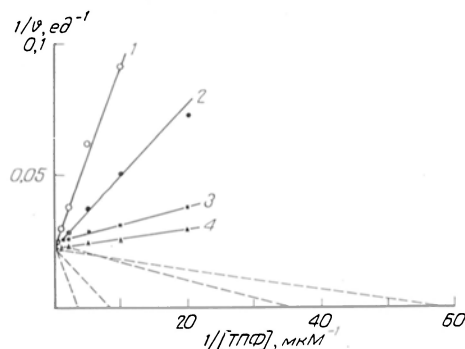


Рис. 5. Зависимость скорости реакции (v) от концентрации ТПФ в двойных обратных координатах: в отсутствие металлов (1), в присутствии Mg^{2+} 0,1 мМ (2), Ca^{2+} 1,0 мМ (3), Mn^{2+} 0,1 мМ (4).

де с ионами магния. В свою очередь Mg^{2+} в 2,5 раза снижает K_m по сравнению с показателем, полученным без добавления металлов. Примерно такое же понижение величины K_m для ТПФ ионами магния отмечено нами ранее, когда исследовали зависимость скорости реакции от концентрации ТПФ с использованием фосфатного буфера [11]. Следует заметить, что фосфатные анионы оказывают тормозящее влияние на взаимодействие ТПФ с ПДК. Так, в среде с фосфатным буфером K_m для ТПФ в отсутствие двухвалентных металлов составляет 2,3 мМ [11], что почти в 8 раз выше, чем в среде с трис-НСI-буфером (см. рис. 5), имеющим аналогичное значение pH. Влияние ионов фосфата, затрудняющее взаимодействие ТПФ с ПДК, вполне объяснимо, если принять во внимание важную роль пирофосфатного радикала кофермента в образовании холофермента [1, 13]. Закономерно, что еще более значительное ингибирование ПДК из сердца свиньи и надпочечников быка вызывает пирофосфат [11, 14].

Скорость реакции ПДК при насыщающей концентрации ТПФ не обнаруживает больших отличий в присутствии 3 разных катионов. Это особенно наглядно видно из отсекаемых по оси ординат отрезков на рис. 5. Данные экстраполяции указывают лишь на несколько более низкую скорость реакции в присутствии Ca^{2+} . Измерение активности ПДК с явно насыщающей концентрацией ТПФ при использовании двухвалентных катионов в довольно широком концентрационном диапазоне также подтверждает небольшое понижение скорости реакции ионами Ca^{2+} (см. таблицу). Несмотря на это, Ca^{2+} занимает промежуточное положение между Mn^{2+} и Mg^{2+} по эффективности влияния на сродство пируватдегидрогеназы к ТПФ. Mn^{2+} в концентрации 1,0 мМ начинает значительно ингибировать ПДК.

Интересно, что ионы Mg^{2+} и Mn^{2+} оказывают менее выраженную активацию ПДК надпочечников (см. таблицу), чем пируватдегидрогеназы из сердца свиньи [4] в условиях насыщения ферментов ТПФ. Складывается впечатление, что полиферментный комплекс адреналовых желез может эффективно взаимодействовать с ТПФ и осуществлять окислительное декарбоксилирование пирувата при высоком уровне ТПФ без двухвалентных металлов. Нельзя, од-

Активность пируватдегидрогеназного комплекса в условиях его насыщения ТПФ (200 мкМ) при различной концентрации двухвалентных катионов

Ионы металлов	Концентрация, мМ	Активность, ед.
Mg ²⁺	—	51
	0.01	51
	0.03	54
	0.1	56
	0.3	58
Ca ²⁺	1.0	56
	0.01	47
	0.03	48
	0.1	47
	0.3	47
Mn ²⁺	1.0	48
	0.01	54
	0.03	54
	0.1	54
	0.3	52
	1.0	36

нако, полностью исключить вероятность участия в ассоциации ТПФ тех катионов, которые могут быть прочно связанными с комплексом. К примеру, кальций и магний найдены в составе пируватдегидрогеназы из сердечной мышцы [4]. Все же предполагаемые эндогенные катионы не способны в полной мере обеспечить образование холоформы ПДК надпочечников при низкой концентрации ТПФ в среде. Для дрожжевой пируватдекарбоксилазы, имеющей некоторое функциональное сходство с первым компонентом ПДК, показана реконструкция стабильного, способного к катализу холофермента при обязательном участии Mg²⁺ [15]. Другие исследователи установили, что ионы Mn²⁺ сильнее по сравнению с Mg²⁺ понижают величину K_m для ТПФ дрожжевой апируватдекарбоксилазы [16]. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что и сродство ПДК из источника животного происхождения (кора надпочечников быка) к ТПФ является более высоким в присутствии Mn²⁺, а также Ca²⁺, чем в присутствии Mg²⁺. Действенность довольно невысоких, физиологических концентраций Mn²⁺ дает основания предполагать его важную роль в регуляции активности ПДК надпочечных желез.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кочетов Г. А. Тиаминовые ферменты. М., 1978, с. 88—105.

2. Roche T. E., Cate R. L. — Arch. Biochem., 1977, v. 183, p. 664—677.
3. Хайлова Л. С., Фейгина М. М., Северин С. Е. — В кн.: Структура и функция ферментов. М., 1973, вып. 2, с. 89—105.
4. Hayakawa T., Hirashima M., Hamada M. et al. — Biochim. biophys. Acta, 1966, v. 123, p. 574—576.
5. Reid E. E., Thompson P., Lyttle C. R. et al. — Plant Physiol., 1977, v. 59, p. 842—848.
6. Северин С. Е., Хайлова Л. С., Бернхардт Р. — Укр. біохім. ж., 1976, т. 48, № 4, с. 503—509.
7. Бернхардт Р. Изучение активного центра мышечной пируватдегидрогеназы. Автореф. дис. канд. М., 1976.
8. Meikle A. W., Wittek P. J., Klain C. J. — Endocrinology, 1972, v. 91, p. 1206—1212.
9. Струмило С. А., Сенкевич С. Б., Виноградов В. В. — Биохимия, 1980, т. 45, № 5, с. 883—888.
10. Номенклатура ферментов. М., 1979, с. 25.
11. Струмило С. А., Сенкевич С. Б., Забродская С. В. и др. — Укр. біохім. ж., 1981, т. 53, № 6, с. 65—68.
12. Струмило С. А., Сенкевич С. Б., Виноградов В. В. — Биохимия, 1981, т. 46, № 11, с. 1938—1944.
13. Островский Ю. М. Активные центры и группировки в молекуле тиамин. Минск, 1975.
14. Walsh D. A., Cooper R. H., Denton R. M. et al. — Biochem. J., 1976, v. 157, p. 41—67.
15. Schellenberger A., Hübner G. — Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 1967, Bd 348, S. 491—500.
16. Tomita I., Satou Y., Ozawa T. et al. — Chem. pharm. Bull., 1973, v. 21, p. 252—255.

Поступила 09.02.82

DIFFERENT EFFICIENCY OF Mn²⁺, Ca²⁺ AND Mg²⁺ IN REACTION OF PYRUVATE DEHYDROGENASE COMPLEX FROM ADRENAL GLANDS WITH THIAMINE PYROPHOSPHATE

S. A. Strumilo

Laboratory of Endocrine Gland Biochemistry, Department of Metabolic Regulation, Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Grodno

In systems with pyruvate dehydrogenase complex from bovine adrenal glands and endogenous residual thiamine pyrophosphate (TPP), Mn²⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ decreased the lag period and increased the rate of steady-state reaction. Relative efficiency of the cations was the following: Mn²⁺ > Ca²⁺ > Mg²⁺. The activating effect of these cations was also exhibited in presence of low content of exogenous TPP but it was not found under conditions of saturation of pyruvate dehydrogenase complex with the coenzyme. In the systems with the cations concentrations approaching the optimal ones, the apparent K_m value for TPP in the presence of calcium was about 4-fold and in presence of manganese about 7-fold lower as compared with the systems containing magnesium.

А. В. Третьяков, Э. А. Ратовицкий, А. С. Петров, В. А. Головатова

ДЕЙСТВИЕ АНТИЭСТРОГЕНОВ И АНТИАНДРОГЕНОВ ИЗ КЛАССА АЦИЛГИДРАЗИНОВ НА СВОЙСТВА НУКЛЕОЗИДТРИФОСФАТАЗ И НА СОДЕРЖАНИЕ АДЕНИЛОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ В ЯДРАХ НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Научно-исследовательский институт онкологии им. проф. Н. Н. Петрова Минздрава СССР, Ленинград

Нами ранее было показано, что производные ацилгидразинов (АГ): антиэстроген (*n*-аминобензгидразид — *n*-NH₂ (C₆H₄) CONHNH₂) и антиандроген (гидразид изомасляной кислоты — (CH₃)₂CHCONHNH₂), не обладая противоопухолевой активностью, потенцируют действие цитостатиков [1, 2]. С целью дальнейшего изучения механизма потенцирования в настоящей работе исследовали влияние АГ и их комбинации с тиофосфамидом на свойства (активность, изоферментный состав) нуклеотидтрифосфатаз (НТФ-аз) внутриядерного содержимого и ядерных мембран и на содержание адениловых нуклеотидов (АДФ, АТФ) в ядрах печени. Параллельно определяли вышеперечисленные показатели в ядрах печени интактных мышей после введения гомологичного ряда АГ¹, не проявивших антигормональной активности и эффекта потенцирования цитостатиков, половых гормонов и фенобарбитала. Кроме того, в специальных сериях опытов сопоставляли действие антиэстрогена, антиандрогена и половых гормонов на активность ряда микросомальных ферментов, включение ³H-ананина в белки микросом, фракционный состав цРНК, содержание и гибридные характеристики поли(А⁺)-РНК.

Методика

Работа проведена на 520 беспородных половозрелых самках и самцах мышей, полученных из питомника «Рапполово» АМН СССР. Ядра из печени и опухолей животных выделяли по методу [3], через 24 ч после инъекций АГ (60 мг/кг), половых гормонов (5 мг/кг) или фенобарбитала (200 мг/кг). Саркому 180 переливали подкожно, лечение начинали через 8—9 дней после трансплантации и продолжали

ли в течение 12—15 дней. В опытных группах было по 7—10 животных. Для курса лечения опухоли использовали комбинацию тиофосфамида в терапевтически неэффективной дозе (1 мг/кг) с гидразидом изомасляной кислоты (на самках) или *n*-аминобензгидразида (на самцах). Всего производили 5—7 инъекций. Выделенные ядра суспендировали в 3 мл 0,25 М сахарозы, приготовленной на 0,05 М трис-НСl-буфере pH 7,4 и замораживали при —20 °С. После размораживания для более полной агглютинации мембранных фрагментов к суспензии разрушенных органелл добавляли 0,04 мл 0,08 М MgCl₂ и центрифугировали при 30 000 g в течение 20 мин на холоде. Надосадочную жидкость сохраняли и использовали в опытах в качестве препарата НТФ-аз ядерного сока (ЯС). Осадок разрушенных ядер дважды пересаживали при 30 000 g в растворе 0,25 М сахарозы, суспендировали в 3 мл того же раствора, фильтровали через 3 слоя марли и обозначали как препарат НТФ-аз ядерных мембран (ЯМ). Активность НТФ-аз (КФ 3.6.1.3): аденозинтрифосфатазы (АТФ-азы), уридинтрифосфатазы (УТФ-азы) и гуанозинтрифосфатазы (ГТФ-азы) определяли в 1 мл инкубационной смеси, содержащем 2,6 мкмоль АТФ или УТФ или ГТФ, 1 мкмоль ацетата магния, 50 мкмоль трис-НСl-буфера pH 7,4 при 30 °С в течение 60 мин при содержании белка в пробе 500—700 мкг. Активность НТФ-аз выражали в микромолях неорганического фосфора (Ф_н) на 1 мг белка за время инкубации.

На предварительном этапе работы методом тонкослойной хроматографии на пластинках с ДЭАЭ-целлюлозой (9×12 см, растворитель 0,04 н. HCl) определялась чистота НТФ (фирмы «Реанал», «Сигма»). Использовали субстраты, содержащие не менее 80% основного вещества. Были установлены некоторые энзиматические характеристики АТФ-азы ЯС и ЯМ. Как следует из данных, представленных на рис. 1, свойства АТФ-азы ЯС и ЯМ раз-

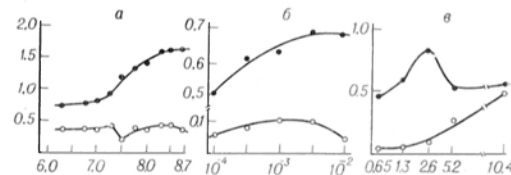


Рис. 1. Зависимость активности АТФ-азы ЯМ и ЯС печени мышей от pH (а), концентрации АТФ (б) и MgCl₂ (в).

Активность определяли при 30 °С в течение 60 мин при pH 7,4 (б, в), концентрации АТФ 2,4 мкмоль (а, в) и MgCl₂ 1 мкмоль (а, б). По оси ординат (а, б, в) — активность АТФ-азы (в мкмоль Ф_н/мг/60 мин).

¹ Были использованы АГ общей формулы: R₁—NH—N=R₂, где R₁=CH₃CO, CH₃CH₂CO, CH₃(CH₂)₂CO, (CH₃)₂CHCH₂, R₂=CHCH(C₆H₅)COOCH₃; CHCH₂CO(C₆H₅), синтезированные И. В. Зеровой, В. Н. Николаевым, С. И. Якимовичем (ЛГУ, химический факультет).

личаются по оптимуму pH, концентрации ионов магния и АТФ. Приведенные результаты свидетельствуют в первую очередь о том, что в избранных условиях получения ферментных препаратов не происходит существенной десорбции АТФ-азы с ЯМ. По растворимости, чувствительности к ионам магния и сродству к АТФ препарат АТФ-азы ЯС близок к АТФ-азе А ядер почек свиньи [4]. Зависимость активности УТФ-азы или ГТФ-азы ЯС и ЯМ от pH заметно не отличалась от таковой для АТФ-азы. Препараты ядер из клеток печени интактных мышей обладали активностью ДНФ-стимулируемой АТФ-азы (0,12 мкмоль Φ_n /мг/15 мин, pH 7,4) [ДНФ (α -2,4-динитрофенол) использован в концентрации 10^{-4} М], глюкозо-6-фосфатазы (0,08 мкмоль/мг/30 мин, pH 7,4) и активируемой 0,1 % тритоном X-100 *p*-нитрофенилфосфатазы (0,08 мкмоль *p*-нитрофенола/мг/30 мин, pH 5,0). Методы определения перечисленных ферментов опубликованы ранее [5]. Хроматографические исследования проводили на колонках (1×1 см) с ДЭАЭ-целлюлозой, на которую наносили 1 мл ЯС с содержанием белка 15—20 мг/мл. Колонку последовательно промывали при комнатной температуре растворами трис-буфера pH 7,4 повышающейся молярности — от 0,005 до 1 М (порциями по 10 мл). Активность АТФ-азы определяли в 1 мл, содержащем 0,1 мл элюата, 100 мкмоль трис-HCl-буфера (pH 7,4 или 8,5), 2,6 мкмоль АТФ, 1 мкмоль ацетата магния при 30 °С в течение 2 ч. Активность фермента выражали в микромолях Φ_n на 1 мл элюата. Адениловые нуклеотиды экстрагировали из ядер опухолевых клеток по методу [6], экстракт нейтрализовали 0,1 н. КОН и хроматографировали через колонку с дауэкс 1×10 (200—400 меш) по опубликованному методу [7]. АДФ элюировали 50 мл 2,5 н. муравьиной кислоты, а АТФ — при помощи 50 мл 1 М формиатного буфера. Фракции анализировали спектрофотометрически и вычисляли содержание нуклео-

тидов в 50 мл элюата, исходя из градуировочного графика, построенного для АМФ при λ 260 нм. График в диапазоне концентраций АМФ от 3 до 60 мкг/мл представлял прямую линию; оптическая плотность раствора, содержащего 60 мкг/мл, составляла около 1,4 ед.

Электрофорез цРНК проводили по методу [8]. Поли (A+)-РНК выделяли по методу [9] и метили радиоактивным йодом (125 I) [10]. 125 I-поли (A+)-РНК использовали для гибридизации с ДНК мышей в смеси, содержащей 3×SSC—40% формамид — 0,2% SDS в присутствии немеченого РНК-конкурента, при отношении немеченой РНК к меченой от 10 до 500 [11]. Для изучения влияния АГ или половых гормонов на включение 3 H-аланина в белки микросом меченую аминокислоту вводили в дозе 0,74 МБк на 1 мышь массой 20 г через 3 ч после инъекции препаратов и через 24 ч выделяли микросомы. Радиоактивность образцов просчитывали на бумажных фильтрах в толуоловом сцинтилляторе в жидкостном счетчике «Марк-11» и выражали в импульсах на 1 мг белка микросом.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 приведены результаты изучения действия АГ, половых гормонов и фенobarбитала на активность НТФ-аз ЯМ и ЯС клеток печени интактных самок и самцов мышей. Можно видеть, что все испытанные препараты приводят почти к двукратному возрастанию активности НТФ-аз ЯМ тканей самок мышей. На активность АТФ-азы ЯС тканей самок все препараты заметного действия не оказали, за исключением гидразида изомасляной кислоты, приводящего к увеличению активности это-

Таблица 1

Влияние ацилгидразинов, половых гормонов и фенobarбитала на активность нуклеозидтрифосфата ядерных мембран и ядерного сока печени интактных самок и самцов мышей (в % к контролю)

Препарат и его доза, мг/кг	ЯМ			ЯС	
	АТФ-аза	УТФ-аза	ГТФ-аза	АТФ-аза	УТФ-аза
Самки					
Гидразид изомасляной кислоты (60)	135*	200*	—	240*	110
$\text{CH}_3\text{CONHNH}_2$ (60)	260*	240*	—	140	110
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CONHNH}_2$ (60)	260*	220*	—	90	200*
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CONHNH}_2$ (60)	220*	220*	—	79	110
$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CONHNH}_2$ (60)	260*	210*	—	120	200*
	200*	180*	—	89	90
Диэтилстильбэстрол (5)	180*	230*	500	63	90
Фенobarбитал (200)	250*	180	—	100	200*
Самцы					
<i>p</i> -Аминобензгидразид (60)	55	90	—	145*	100
Тестостерон (5)	55	55	—	90	40
Фенobarбитал (200)	105	130	—	100	110

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 приведены средние результаты из 3—4 серий. Звездочкой отмечены величины, достоверно ($P \leq 0,05$) отличающиеся от контроля согласно критерию U.

Действие ацилгидразинов и половых гормонов на биохимические характеристики микросом и фракционный состав цРНК (в % к контролю)

Препарат и его доза, мг/кг	Пол мышей	Выход мик- росом из 1 г печени (по белку, мг)	Активность ферментов				Включение эН-аланина в белки мик- росом	Фракционный состав РНК					
			оксида- зы	глюкозо- 6-фосфа- таза	уридин- дифос- фатаза	28S		28S — 18S	18S	18S — 4S	4S	поли (A ⁺)	
Гидразид изо- масляной кислоты (60)	самки	127	225*	250*	134*	152*	101	133	107	130	100	115	
	самцы	96	60	105	52	90	100	110	100	116	100	126	
Диэтилстильб- эстрол (5)	самки	110	260*	—	130*	150*	97	120	107	120	95	150	
	самцы	90	40	—	55	90	100	107	100	135	100	142	
<i>n</i> -Аминобенз- гидразид (60)	самки	110	60	100	100	95	—	—	—	—	—	—	
	самцы	130	200*	100	100	100	101	101	108	108	95	116	
Тестостерон	самки	120	50	85	90	130*	—	—	—	—	—	—	
	самцы	115	240	100	98	96	103	108	108	105	95	128	

Примечание. Об активности оксидаз судили по длительности вероналового наркоза; ферментативная активность приведена в единицах, радиоактивность — в импульсах в 1 мин в расчете на белок фракции микросом. Цифры, полученные при изучении фракционного состава цРНК, — средние из 2 серий опытов.

го фермента почти на 250%. Вместе с тем фенобарбитал и АГ формулы $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CONHNH}_2$ и $(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_2)\text{CONHNH}_2$ приводили к заметному возрастанию активности УТФ-азы.

Самцы оказались менее чувствительны к действию испытанных соединений. Так, все препараты не приводили к изменениям в активности фермента в ЯМ и ЯС, за исключением *l*-аминобензгидразида, способствовавшего возрастанию активности АТФ-азы ЯС по сравнению с контролем почти на 150%. Приведенные результаты дают основание трактовать возрастание активности НТФ-аз, регистрируемое после введения АГ как следствие индукции, механизм которой, возможно, мало отличается от такового для половых гормонов или фенобарбитала.

В пользу этого предположения свидетельствует также то, что однократная инъекция самкам антиандрогена — гидразида изомасляной кислоты или самцам — антиэстрогена — *l*-аминобензгидразида имитирует экзогенную эстрогенизацию самок или андрогенизацию самцов соответственно. Об этом можно судить по некоторым метаболическим характеристикам микросом, фракционному составу цРНК, содержанию поли(A⁺)-РНК (табл. 2). Результаты гибридационного анализа поли(A⁺)-РНК с ядерной ДНК клеток печени также свидетельствуют о сходной тенденции к активации ядерного генома клеток печени мышей под действием диэтилстильбэстрола и гидразида изо-

масляной кислоты (рис. 2). Так, гомологичная немеченая поли(A⁺)-РНК печени мышей, получавших эстроген, практически полностью конкурировала с ¹²⁵I-поли(A⁺)-РНК тех же клеток (печень + эстроген). В то же время поли(A⁺)-РНК из клеток печени мышей, получавших АГ, конкурировала с ¹²⁵I-поли(A⁺)-РНК, выделенной из эстрогенизированных животных на 96—97%. При этом немеченая поли(A⁺)-РНК печени интактных мышей конкурировала с ¹²⁵I-поли(A⁺)-РНК (печень + эстроген) лишь на 89—91%. Все это позволяет сделать заключение, что в составе поли(A⁺)-РНК печени мышей, получавших антиандроген, и в еще большей степени в составе поли(A⁺)-РНК печени мышей, получавших эстроген, по сравнению с поли(A⁺)-РНК печени интактных мышей обнаруживаются новые клас-

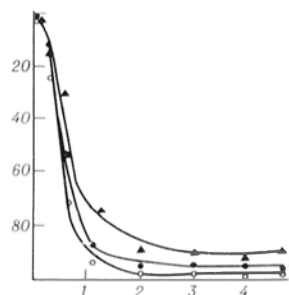


Рис. 2. Конкурентная гибридализация цРНК из печени мышей, получивших гидразид изомасляной кислоты (2) и диэтилстильбэстрол (3). По оси ординат — степень гомологии (в %); по оси абсцисс — избыток немеченой РНК ($\cdot 10^2$); 1 — контроль. Опыт через 24 ч после введения препаратов.

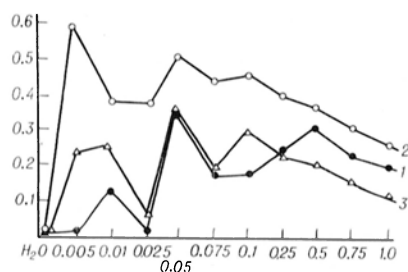


Рис. 3. Влияние гидразида изомасляной кислоты и диэтилстильбэстрола на фракционный состав АТФ-азы ЯС печени интактных самок-мышей.

1 — контроль; 2 — введение АГ; 3 — введение гормонов; по оси ординат — активность АТФ-азы (в мкмоль/мл); по оси абсцисс — обозначена молярность элюирующего буфера.

сы рибонуклеотидных последовательностей.

Обращает на себя внимание, что действие АГ на изучавшиеся показатели заметно не уступает таковому для половых гормонов, хотя последние вводили в заведомо нефизиологических дозах, а использованная доза АГ составляла всего около 1/10 ЛД₅₀.

Наряду с этим в действии гидразида изомасляной кислоты или *п*-аминобензгидразида имеются заметные отличия от половых гормонов или фенобарбитала. На это указывает в первую очередь возрастание активности АТФ-азы ЯС, тогда как ни половые гормоны, ни фенобарбитал к такому эффекту не приводили.

Изменения в изoferментном спектре АТФ-азы ЯС самок интактных мышей, наступающие при действии эстрогена или гидразида изомасляной кислоты, приведены на рис. 3. Можно видеть, что гид-

разид изомасляной кислоты вызывает практически равномерное увеличение всех изоформ АТФ-азы, а эстроген не оказывает заметного влияния на фракционный состав этого фермента. При этом интересно отметить, что индукция АТФ-азы ЯС под влиянием АГ затрагивает только фермент, проявляющий активность при pH 7,4, тогда как изоферментный спектр АТФ-азы, активной при pH 8,5, существенных изменений не претерпевает.

Однократная инъекция АГ мышам-опухоленосителям приводила, так же как и в случае с интактными животными, к увеличению активности АТФ-азы в ЯС, выделенной из опухолевых клеток (табл. 3). Необходимо подчеркнуть, что активность АТФ-азы ЯС или ЯМ, выделенных из опухолей животных, подвергнутых комбинированному лечению тиофосфамидом с АГ, была примерно такая же, как и в опухолевых клетках мышей, получавших только однократную инъекцию АГ (см. табл. 3). Эти наблюдения свидетельствуют о том, что алкилирующие препараты не модифицируют индуцирующий эффект АГ.

Возрастание активности НТФ-аз, в частности АТФ-азы ЯС опухолевых клеток после успешного противоопухолевого лечения, коррелировало с уменьшением содержания АТФ или АДФ в ядрах этих же клеток. Так, если содержание АДФ или АТФ в 1 г опухолевой ткани контрольных (нелеченых) мышей составляло 0,35 и 0,12 мкмоль соответственно, то после курса лечения, приводящего к почти 50% торможению опухолевого роста, содержание АДФ и

Таблица 3

Действие ацилгидразинов и их комбинации с тиофосфамидом на активность нуклеозидтрифосфатаз ядерных мембран и ядерного сока саркомы 180 (в % по отношению к контролю)

Препарат и его доза, мг/кг	ЯМ			ЯС		
	АТФ-аза	УТФ-аза	ГТФ-аза	АТФ-аза	УТФ-аза	ГТК-аза
Самки						
Гидразид изомасляной кислоты (60)	105	—	—	230*	—	—
Гидразид изомасляной кислоты (60) + + тиофосфамид (1)	100	112	155*	300*	140*	620*
Самцы						
<i>п</i> -Аминобензгидразид (60)	60	—	—	150*	—	—
<i>п</i> -Аминобензгидразид (60) + тиофосфа- мид (1)	310	800*	—	160*	150*	—

Примечание. Гидразид изомасляной кислоты и *п*-аминобензгидразид — однократное введение; гидразидизомасляной кислоты + тиофосфамид и *п*-аминобензгидразид + тиофосфамид — терапевтический курс.

АТФ составляло 0,03 и 0,01 мкмоль соответственно. Таким образом, возрастание активности внутриядерных НТФ-аз и снижение пула ядерной АТФ, по нашему мнению, — процессы тесно взаимосвязанные.

Совокупность полученных данных позволяет утверждать, что специфическое повышение активности внутриядерных НТФ-аз, в частности АТФ-азы, опухолевых клеток при действии АГ может иметь решающее значение для проявления противоопухолевой активности агента, алкилирующего ДНК, — тиофосфамида, примененного в заведомо неэффективной дозе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Третьяков А. В. — Докл. АН СССР, 1978, т. 243, № 2, с. 537.
2. Третьяков А. В. — Там же, 1981, т. 261, № 1, с. 247.
3. Windell C. C., Tata J. R. — Biochem. J., 1964, v. 92, p. 313.
4. Fischer F., Siebert J., Adloff E. — Biochem. Z., 1959, Bd 332, S. 131.
5. Третьяков А. В., Рязанов Е. М., Филлов В. А. — Вопр. онкол., 1977, № 3, с. 54.
6. Pressman B. C. — J. biol. Chem., 1958, v. 232, p. 967.
7. Herbert E., Potter V., Takagi I. — Ibid., 1955, v. 213, p. 926.
8. Loening U. — Biochem. J., 1969, v. 113, p. 131.
9. Shaposhnikov J. D., Ratovitski E. A. — Int. J. Cancer, 1978, v. 21, p. 395.

10. Шапошников Я. Д., Зеров Ю. П., Бобров Ю. Ф. и др. — Биоорг. химия, 1976, т. 2, № 10, с. 1351.
11. Шапошников Я. Д., Ратовицкий Э. А. — Цитология, 1977, № 8, с. 808.

Поступила 09.02.82

THE EFFECT OF ANTIESTROGEN AND ANTIANDROGEN DERIVATIVES OF ACYLHYDRAZINES ON PROPERTIES OF NUCLEOSIDE TRIPHOSPHATASES AND ADENILATE CONTENT IN NUCLEA OF NORMAL AND TUMORAL CELLS

A. V. Tret'yakov, E. A. Ratovitsky, A. S. Petrov, W. A. Golovatova

N. N. Petrov Institute of Oncology, Ministry of Public Health of the USSR, Leningrad

Influence of antiestrogen and antiandrogen derivatives of acylhydrazine, potentiating the antitumoral effect of cytostatics, on properties of nucleoside triphosphatases (NTPases), adenylate content in nuclea of normal and tumoral cells was studied. It was shown that acylhydrazines activated specifically the intranuclear NTPase of normal and tumoral cells. Activity of nuclear membrane-linked NTPases from liver cells was also increased after administration of acylhydrazines, sex hormones or phenobarbital. The increase in activity of intranuclear NTPase (namely ATPase) correlated with decrease of adenylates (ADP, ATP) in nuclea isolated from tumors after simultaneous treatment with acylhydrazines and thiophosphamide. Distinct increase in sensitivity of tumoral cell DNA to the effect of these alkylating preparations appear to be due to noncompensated decrease in content of ATP.

УДК 616.89-008.441.13-092.9-07: [616.831.5+616.831.41+616.831.32] 008.931

Н. А. Беляев, О. С. Брусов, Л. Ф. Панченко

ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ АЛКОГОЛЯ НА АКТИВНОСТЬ ЭНЦЕФАЛИНАЗЫ А В СТРИАТУМЕ, ГИПОТАЛАМУСЕ И СРЕДНЕМ МОЗГЕ КРЫС

Лаборатория нейрхимии алкоголизма Всесоюзного НИИ общей и судебной психиатрии им. В. П. Сербского Минздрава СССР, Москва

В настоящее время можно предполагать существование в нервной системе человека и позвоночных животных энкефалинергической и эндорфинергической опиатных систем, включающих в себя специфические опиатные рецепторы, эндогенные лиганды опиатных рецепторов (энкефалины и эндорфины), ферменты их синтеза и катаболизма и характеризующиеся морфофункциональным единством своих частей [1]. Вследствие этого изучение механизма физиологической инактивации энкефалинов и эндорфинов в синаптической щели явля-

ется одной из ключевых проблем в исследовании функционирования опиатных систем в норме и при патологии. Без выяснения данного вопроса остается открытым также вопрос о возможной медиаторной роли этих нейропептидов [2]. Первые сообщения о механизмах ферментной деградации энкефалинов тканями мозга показали, что в первую очередь происходит гидролиз тир-гли связи с образованием свободного тирозина и тетрапептида гли-гли-фен-мет (лей) [3]. При этом аналоги энкефалинов, в которых гли² замещали на D-ала², были

значительно более резистентны к подобной ферментной деградации и как следствие оказывали более длительное и сильное фармакологическое действие. На этом основании был сделан вывод о ведущей роли аминопептидазы в синаптической инактивации эндогенных энкефалинов [4].

Однако в 1978 г. Малфрой и соавт. [5] и Селливан и соавт. [6] сообщили о существовании в мембранной фракции клеток нервной ткани дипептидилкарбокسينпептидазной активности, характеризующейся высоким средством к энкефалинам. Было высказано предположение, что эта дипептидилкарбокسينпептидазная активность обусловлена ферментом, высокоспецифичным по отношению к энкефалинам, названным впоследствии энкефалиназой А [7]. Несмотря на то что деградация энкефалинов энкефалиназой А составляет лишь небольшой процент от общей энкефалингидролизующей активности тканей мозга, видимо, именно этот фермент избирательно вовлечен в физиологическую инактивацию энкефалинов в синаптической щели. В пользу этого свидетельствуют следующие факты: высокое средство энкефалиназы А к энкефалинам [8]; морфологическое и субклеточное распределение фермента, параллельное распределению опиатных рецепторов в головном мозге [9, 10]; высокая корреляция между биологической активностью аналогов энкефалинов и их устойчивостью к инактивации энкефалиназой А [11]; пропорциональность между ингибирующим действием барбитуратов на энкефалиназу А и их седативной активностью [12]; активация энкефалиназы А в головном мозге животных, которым хронически вводили морфин [5]. К сожалению, исследование энкефалиназы А в значительной степени затруднено в связи с методическими трудностями при определении ее активности. В этой связи в настоящей работе описана модифицированная методика определения активности энкефалиназы А в неочищенном биологическом материале, а также исследована активность этого фермента в стриатуме, гипоталамусе и среднем мозге крыс, хронически потреблявших алкоголь.

Методика

Использовали беспородных крыс-самцов массой 150—200 г. Животные опытной (7 крыс) и контрольной (8) групп находились на изо-

калорийной диете, которая содержала 18% от общего количества калорий в белках, 35 % — в жирах, 11 % — в углеводах и 36% в этаноле (животные контрольной группы получали вместо этанола изокалорийное количество сахарозы). Концентрацию этанола в диете увеличивали постепенно: 3 % от общего содержания жидкости в пище — в первые 2 дня, 4 % — в следующие 2 дня и, наконец, 5% — с 5-го дня [13].

Через 6 нед крыс декапитировали, быстро извлекали на холоду головной мозг и помещали вентральной поверхностью вверх на чашку Петри со льдом. Средний мозг (включая гипоталамус) и полосатые тела выделяли по методу Миллера и соавт. [14] и замораживали при -70°C . Мембранную фракцию из выделенных участков мозга получали по методу Горенштейна и Снайдера [7] с некоторыми модификациями: ткань среднего мозга (включая гипоталамус) или стриатума размораживали, гомогенизировали в 30 объемах холодного 10 мМ трис-НСI-буфера, рН 7,7 в гомогенизаторе Даунса (тефлон — стекло). Полученную суспензию центрифугировали при 50 000 g в течение 15 мин при 4°C . Надосадочную жидкость отбрасывали, а осадок ресуспендировали в первоначальном объеме того же буфера и центрифугировали в тех же условиях. Описанную операцию повторяли трижды. Полученный таким образом осадок ресуспендировали в 2 мл 10 мМ трис-НСI-буфера рН 7,7, замораживали аликвотами и хранили при -70°C . Перед использованием аликвоты размораживали, разводили до рабочей концентрации 10 мМ трис-НСI-буфером рН 7,7 (0,5 мг белка/мл), прединкубировали при 30°C в течение 15 мин и вносили в реакционную смесь.

Для подстановки связывания ^3H -лей-энкефалина в реакционную смесь вносили белок мембранной суспензии (0,5 мг/мл), ^3H -лей-энкефалин (10 нМ), бацитрацин (50 мкг/мл) и доводили объем до 1 мл трис-НСI-буфером (10 мМ; рН 7,7). Величину специфического связывания метки с опиатными рецепторами определяли как разницу в связывании метки с мембранной суспензией в отсутствие (опытная проба) и в присутствии (контрольная проба) в реакционной смеси 2 мкМ немеченого лей-энкефалина. После 40 мин инкубации при 25°C пробы быстро фильтровали (не более 30 с на пробу) через фильтры из стекловолокна типа GF/B (фирма «Whatman», Англия). Затем фильтры трижды промывали 2,5 мл холодного 50 мМ трис-НСI-буфера рН 7,7 и переносили во флаконы для измерения радиоактивности, куда наливали по 10 мл стандартного диоксанового сцинтиллятора. Радиоактивность проб измеряли в сцинтилляционном спектрометре типа SL-3120 (фирма «Roche Bioelectronique», Франция). Каждое измерение проводили в 2 параллельных пробах. Учитывали лишь те значения специфического связывания, для которых разброс между параллельными пробами не превышал 10%.

Активность энкефалиназы изучали путем количественного определения радиоактивности продуктов ферментативной деградации ^3H -лей-энкефалина с помощью тонкослойной хроматографии [5, 7]. Опытные пробы (конечный объем 50 мкл) содержали 600 нМ ^3H -лей-энкефалина, белок мембранной суспензии стриатума или среднего мозга и гипоталамуса крыс (0,5 мг/мл), 10^{-3} М пуромидина в 10 мМ трис-НСI-буфере рН 7,7. Проведенные нами ис-

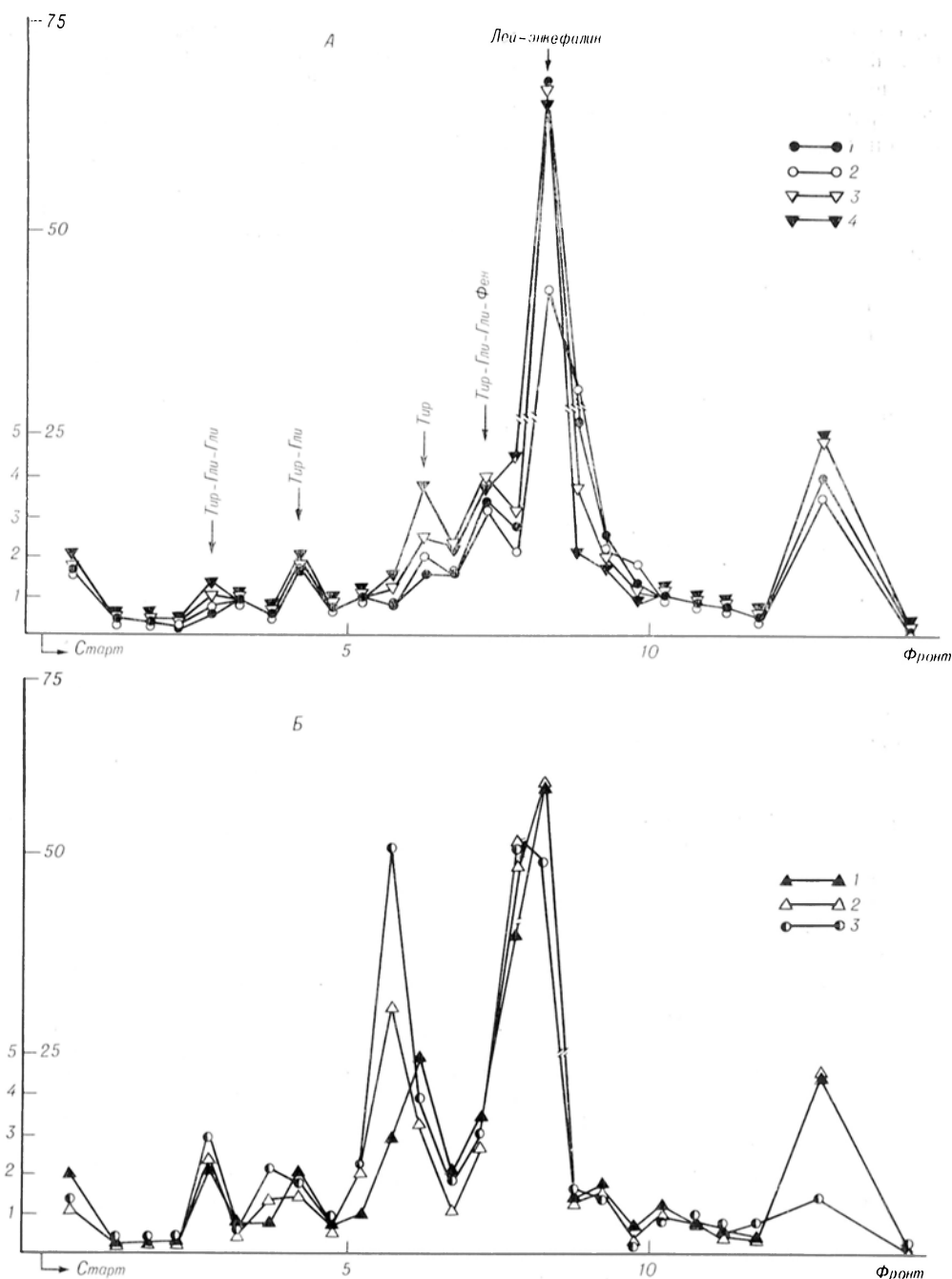


Рис. 1. Хроматограммы продуктов гидролиза ^3H -лей-энкефалина мембранной фракцией среднего мозга и гипоталамуса крыс. Время инкубации реакционной смеси 5 мин. Остальные условия проведения реакции соответствуют описанным в методике исследования. Концентрации мембранного белка (в мг/мл): А — 1 — белок отсутствует, 2, 3, 4 — соответственно 0,25, 0,5, 1; Б: 1, 2, 3 — соответственно 2, 3, 4. По оси абсцисс — расстояние от старта (в см), по оси ординат — содержание ^3H -метаболизмов (в % от исходного ^3H -лей-энкефалина).

следования показали, что при концентрации пурамицина в реакционной смеси 10^{-3} наблюдается ингибирование аминопептидазной активности на 90% без заметного влияния на активность энкефалиназы А. Контрольные пробы содержали также 10^{-4} М гли-гли-фенмет. Присутствие такого количества тетрапептида практически полностью подавляет

активность энкефалиназы А, не влияя заметно на активность пептидилдиэпептидазы (карбоксикапсина, КФ 3.4.15.1) [9]. Опытные и контрольные пробы инкубировали в течение 25 мин при 30°C . Реакцию останавливали добавлением в пробы 5 мкл 0,2 н. НСl. Тонкослойную хроматографию продуктов реакции проводили на пластинках с силикагелем-60 с

толщиной слоя 0,2 мм (фирма «Merck», артикул 5748, ФРГ) в системе этилацетатизопропанол — вода — уксусная кислота (40 : 40 : 1 : 19). Наносили на дорожку по 10 мкл реакционной смеси. Для идентификации продуктов гидролиза использовали маркеры, которые проявляли флуорескаминном [15]. Проявленные маркеры имели в описанной системе следующие значения R_f : лей-энкефалин (тир-гли-гли-фен-лей) — 0,54, тир-гли-гли-фен — 0,48, тир-гли-гли — 0,24, тир — 0,34. На хроматограммах контрольных и опытных проб вырезали пятна, соответствующие маркерам, помещали их во флаконы для измерения радиоактивности, заливали 10 мл стандартного толуонового сцинтиллятора и просчитывали на сцинтилляционном спектрометре, как описано выше.

Величину активности энкефалина A определяли как разницу в радиоактивности пятен, соответствующих тир-гли-гли в опытных и контрольных пробах, и выражали в единицах активности. За единицу активности энкефалиназы A принимали такое ее количество, которое в вышеописанных условиях образует 10^{-15} М ^3H -тир-гли-гли в 1 мин. Белок в пробах определяли по методу Лоури [16]. Использовали следующие реактивы: ^3H -лей-энкефалин (39 Ки/ммоль, фирма «Amersham» Англия), тир-гли-гли, гли-гли-фен-мет — были синтезированы и любезно предоставлены В. Ф. Позднесвым (Институт биологической и медицинской химии АМН СССР), тир-гли-тир-гли-гли-фен, лей-энкефалин (фирма «Serva», ФРГ), бацитрацин (53 500 ед/г), флуорескамин, трис и пуromинин (фирма «Sigma», США). Остальные реактивы отечественного производства.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 приведены результаты тонкослойной хроматографии продуктов гидролиза ^3H -лей-энкефалина мембранной суспензией, полученной из ткани среднего мозга и гипоталамуса крыс в зависимости от концентрации мембранного белка (0,25—4,0 мг/мл) в реакционной смеси. Хроматограмму разрезали на кусочки длиной по 0,5 см и измеряли их радиоактивность, как описано в методах. Видно, что по мере уменьшения пика радиоактивности, соответствующего лей-энкефалину, увеличиваются пики радиоактивности, соответствующие тир, тир-гли, тир-гли-гли. Пик радиоактивности, соответствующий тир-гли-гли-фен, не претерпевает существенных изменений. Поэтому в дальнейшем просчитывали не всю хроматограмму, а лишь измеряли радиоактивность пятен, соответствующих положению хроматографических маркеров: тир, тир-гли, тир-гли-гли и лей-энкефалина.

Как видно из рис. 2, скорость образования ^3H -тир-гли-гли пропорциональна количеству мембранного белка в

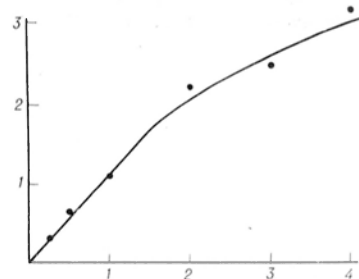


Рис. 2. Зависимость скорости образования ^3H -тир-гли-гли при ферментной деградации ^3H -лей-энкефалина от концентрации в реакционной смеси белка мембранной суспензии среднего мозга и гипоталамуса крыс. Условия проведения реакции те же, что на рис. 1. По оси абсцисс — концентрация белка (в мг/мл), по оси ординат — содержание ^3H -тир-гли-гли (в % от исходного количества энкефалина).

реакционной смеси до концентрации 2 мг/мл, при которой достигается приблизительно 10% ферментативный гидролиз ^3H -лей-энкефалина за время инкубации. В соответствии с этим для получения стабильных результатов в дальнейших экспериментах нами была выбрана концентрация мембранного белка в реакционной смеси, равная 0,5 мг/мл.

На рис. 3 представлена зависимость образования ^3H -тир-гли-гли от времени реакции. Видно, что количество образующегося ^3H -тир-гли-гли линейно возрастает до 40 мин инкубации. Это позволило нам в дальнейшем для определения активности энкефалиназы A проводить инкубацию реакционной смеси в течение 25 мин.

В описанных выше экспериментах для ферментативной деградации энкефалина за счет динептидилнептидазы (карбоксикатепсина) составляла приблизительно 20%.

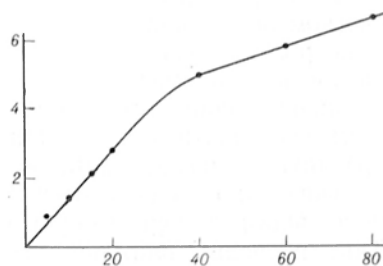


Рис. 3. Зависимость скорости образования ^3H -тир-гли-гли из ^3H -лей-энкефалина от времени реакции. Условия проведения реакции соответствуют описанным в методике исследованиям.

По оси абсцисс — время реакции (в мин), по оси ординат — содержание ^3H -тир-гли-гли (в % от исходного количества энкефалина).

Влияние хронической алкогольной интоксикации на активность энкефалиназы А и на величину специфического связывания ^3H -лей-энкефалина с опиатными рецепторами в стриатуме, гипоталамусе и среднем мозге крыс ($M \pm m$)

Отдел мозга	Опыт		Контроль	
	активность энкефалиназы А, ед. на 1 мг белка	специфическое связывание ^3H -лей-энкефалина, Фоль на 1 г белка	активность энкефалиназы А, ед. на 1 мг белка	специфическое связывание ^3H -лей-энкефалина, Фоль на 1 мг белка
Средний мозг и гипоталамус	$1304 \pm 44^{**}$ (14)	$37,7 \pm 3,5$ (7)	1024 ± 36 (16)	$34,1 \pm 2,8$ (8)
Стриатум	$3538 \pm 1323^{**}$ (14)	$50,4 \pm 3,9$ (7)	3186 ± 64 (16)	$47,4 \pm 4,9$ (8)

Примечание. * — $P < 0,001$, ** — $P < 0,05$ по отношению к контролю. Результаты, содержащиеся в таблице, подвергнуты статистической обработке с использованием t -критерия Стьюдента. В скобках — число измерений.

В таблице суммированы результаты определения активности энкефалиназы А в стриатуме, гипоталамусе и среднем мозге контрольных крыс и животных, хронически потреблявших алкоголь. При этом найдено, что у последних активность энкефалиназы А достоверно возросла примерно на 25% ($P < 0,001$) в среднем мозге и гипоталамусе и на 10% ($P < 0,05$) в полосатых телах. При этом величины специфического связывания ^3H -лей-энкефалина мембранными препаратами изученных отделов мозга в опытной группе животных достоверно не отличались от контрольных значений, то может свидетельствовать о том, что концентрация энкефалинорецепторов и их сродство к лей-энкефалину у животных обеих групп одинаковы.

Модифицированный нами метод определения активности энкефалиназы А позволяет получать устойчивые и воспроизводимые результаты (точность определения $\pm 5\%$, чувствительность — 0,2 ед. активности) при работе с неочищенным биологическим материалом, что сделало возможным исследование состояние этого фермента в норме и при хроническом потреблении алкоголя.

Особая роль в разработке гипотезы об участии энкефалиназы А в синаптической инактивации энкефалина принадлежит исследованиям о влиянии *in vivo* различных воздействий, которые предположительно реализуются через опиатную энкефалинергическую систему. Так, изучение влияния хронического введения морфина на состояние энкефалиназы А позволило сделать предположение о стимулировании ее активности в результате взаимодействия морфина с опиатными рецепторами [5].

В настоящее время появились факты, которые позволяют предполагать су-

ществование сходных опиатозависимых звеньев в механизме формирования алкогольной и морфинной зависимости, что, возможно, связано с избыточной стимуляцией опиатных рецепторов при введении животным морфина или алкоголя [17—21]. Таким образом, наблюдаемое нами заметное увеличение активности энкефалиназы А в стриатуме, среднем мозге и гипоталамусе (структурах мозга, играющих ведущую роль в патогенезе хронического алкоголизма и наркоманий) у крыс, хронически потреблявших алкоголь, является еще одним свидетельством вовлеченности энкефалиназы А в специфическую инактивацию энкефалинов в синапсах и проливает свет на возможный механизм развития толерантности к алкоголю. Эти данные хорошо согласуются с фактами об однонаправленном действии морфина и алкоголя на другие компоненты опиатных систем: опиатные рецепторы и эндогенные опиатные лиганды [17—21].

Известно, что хроническое введение алкоголя, подобно хроническому введению морфина, влияет на связывающие характеристики опиатных рецепторов μ -типа (морфинорецепторов) и не изменяет состояние опиатных рецепторов δ -типа (энкефалинорецепторов) [17—19]. Это хорошо согласуется с данными, полученными в настоящей работе. Таким образом, видимо, наблюдаемая активация энкефалиназы А не связана с функционированием опиатных рецепторов δ -типа, а имеет другой механизм.

Авторы выражают благодарность доктору хим. наук Л. М. Гиподману за помощь в выполнении настоящей работы и за ценные замечания, сделанные при чтении рукописи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анохина И. П., Панченко Л. Ф., Балашов А. М. и др. — В кн.: Всесоюзный съезд невропатологов и психиатров. 7-й. Материалы. М., 1981, т. 3, с. 76.
2. Hugues J., Smith B. W., Kosterlitz H. W. et al. — *Nature*, 1975, v. 258, p. 577.
3. Meek J. L., Yang H.-Y. T., Costa E. — *Neuropharmacology*, 1977, v. 16, p. 151.
4. Pert C. B., Pert A., Chang J. K. et al. — *Science*, 1976, v. 194, p. 331.
5. Malfroy B., Swerts J. P., Guyon A. et al. — *Nature*, 1978, v. 276, p. 523.
6. Sellivan S., Akil H., Barchas J. D. — *Comm. Psychopharmacol.*, 1978, v. 2, p. 525.
7. Gorenstein C., Snyder S. H. — *Proc. roy. Soc. Lond.*, 1980, v. 210, p. 123.
8. Fournie-Zaluski M. C., Perdrisot R., Gacel G. et al. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1979, v. 91, p. 130.
9. Malfroy B., Swerts J. P., Llorens C. et al. — *Neurosci. Lett.*, 1979, v. 11, p. 329.
10. De La Baume S., Paley G., Schwartz J. C. — *Neuroscience*, 1981, v. 6, p. 315.
11. Marks N., Suhar A., Behuck M. — In: *Neural Peptides and Neuronal Communications*. Eds E. Costa, M. Trabucchi. New York, 1980, v. 22, p. 205.
12. Allstein M., Scott M., Vogel Z. — *Life Sci.*, 1981, v. 28, p. 185.
13. Lieber Ch. S., DeCarli L. M. — *Fed. Proc.*, 1976, v. 35, p. 1232.
14. Miller R. J., Chang K.-S., Cooper B. — *J. biol. Chem.*, 1978, v. 253, p. 531.
15. Lai C. Y. — *Meth. Enzymol.*, 1977, v. 47, p. 236.
16. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al. — *J. biol. Chem.*, 1951, v. 193, p. 265.
17. Панченко Л. Ф., Анохина И. П., Балашов А. М. и др. — В кн.: Конференция биохимиков республик Средней Азии и Казахстана. 3-я. Тезисы докладов. Душанбе, 1981, т. 2, с. 212.
18. Anokhina I. P., Brusov O. S., Nechaev N. V. et al. — In: *Soviet — Italian Symposium on Neuropsychopharmacology*. Moscow, 1981, p. 6.
19. Tabakoff B., Vrwlyber S., Hoffman P. L. — *J. Neurochem.*, 1981, v. 37, p. 518.
20. Gros C., Malfroy B., Swerts J. P. et al. — *Europ. J. Pharmacol.*, 1978, v. 51, p. 317.
21. Schulz R., Wüster M., Duka T. et al. — *Psychopharmacology*, 1980, v. 68, p. 221.

Поступила 16.02.82

EFFECT OF CHRONIC ALCOHOL CONSUMPTION ON ACTIVITY OF ENCEPHALINASE A IN RAT STRIATUM, HYPOTHALAMUS AND MIDBRAIN

N. A. Belyaev, O. S. Brusov, L. F. Panchenko

Laboratory of Alcoholism Neurochemistry, V. P. Serbsky All-Union Institute of General and Forensic Psychiatry, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

A modified procedure is developed for estimation of encephalinase A activity in rough membrane material from rat brain; the accuracy of the procedure was about $\pm 5\%$ and sensitivity — $0.2 \cdot 10^{-15}$ M of $^3\text{H-Tyr-Gly-Gly}$ per min if labelled Leu-encephalin was used as a substrate. Activity of encephalinase A in midbrain and hypothalamus was increased by 10% and in striatum — by 25% after chronic consumption of alcohol within 6 weeks. Rates of specific binding of $^3\text{H-Leu-encephalin}$ with opiate receptors in the brain departments studied of the alcohol-treated rats were similar to those of control values. Encephalinase A appears to participate in development of dependence on alcohol or tolerance to it.

Н. П. Чеснокова, Т. А. Невважай

К ВОПРОСУ ОБ ИЗМЕНЕНИИ АКТИВНОСТИ АТФ-АЗНЫХ СИСТЕМ СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЙ ГОЛОВНОГО И СПИННОГО МОЗГА В ДОКЛИНИЧЕСКИЙ ПЕРИОД БОТУЛИНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Кафедра патологической физиологии Саратовского медицинского института

Вопросам патогенеза ботулинического паралитического синдрома посвящено значительное число экспериментальных исследований отечественных и зарубежных авторов. К настоящему моменту определились 2 концепции — центрального и периферического патогенного действия токсина на спинальные фазические мотонейроны и область пресинаптических терминалей холинергических нервных волокон [1—5]. Обе концепции четко аргументированы в опытах *in vivo* и *in vitro* и, по-видимому, не являются взаимноисключающими, а

значительно дополняют друг друга.

Анализируя имеющиеся литературные данные относительно механизмов нейротропного эффекта ботулинического токсина, следует отметить некоторую односторонность экспериментальных поисков, ставящих целью локализовать блокирующее действие токсина на холинергическую передачу возбуждения с помощью разнообразных электрофизиологических методов исследования. В то же время остается практически неизученным состояние активных транспортных механизмов, обеспе-

чивающих, в частности, трансмембранный перенос ионов и в значительной мере определяющих процессы возбудимости и функциональной активности различных структур мозга.

В целях частичного решения этого вопроса проведено изучение активности аденозинтрифосфатаз субклеточных фракций различных отделов спинного и головного мозга.

Методика

Опыты поставлены на контрольных и затравленных ботулиническим токсином беспородных крысах массой 180—200 г. Ботулиническую интоксикацию типа С воспроизводили внутрибрюшинным введением токсина в дозе 0,025 мг на 1 кг массы животного (1 ДЛМ—0,0005 мг сухого токсина). Опыты проведены спустя 6—8 ч после введения токсина при отсутствии каких-либо видимых проявлений интоксикации. У декапитированных животных извлекали на холоду различные отделы спинного и головного мозга: двигательную зону коры головного мозга, гипоталамус, шейный и поясничный отделы спинного мозга. Ткань гомогенизировали в 10-кратном объеме 0,32 М сахарозы и 0,01 М трис-НСl рН 7,4 (в течение 1 мин при 2 °С, при 5000 об/мин).

Фракции неочищенных синапсом и тяжелых микросом выделяли дифференциальным центрифугированием на ультрацентрифуге ЦЛР соответственно при 10 000 g и 18 000 g [6, 7]. Изучена удельная активность АТФ-аз по скорости образования неорганического фосфата (Φ_{11}). Состав инкубационной среды (1 мл) в мМ: NaCl—100; KCl—20; $MgCl_2$ —5; трис-НСl рН 7,4—50; АТФ—3. В ряде структур мозга изучена кинетика ферментативных реакций, осуществляемых при участии Na, K-АТФ-азы и Mg-АТФ-азы. Для решения этого вопроса определялась величина константы Михаэлиса (K_M) и максимальная скорость гидролиза (V_m) в соответствии с построением

прямых линейных графиков Эйзенталя и Корниш-Боудена [8], являющихся, по существу, удобной модификацией общепринятых графиков Лайнуивера—Бэрка. В опытах с исследованием удельной активности ферментов различных субклеточных фракций, а также по изучению кинетики ферментативной реакции определяли неорганический фосфат по Лоури и Лопецу [9]. Белок определяли методом Лоури [10].

Результаты и обсуждение

Как оказалось уже в доклинический период ботулинической интоксикации возникали выраженные изменения активности АТФ-аз фракции неочищенных синапсом различных отделов спинного и головного мозга. Последние характеризовались выраженным снижением удельной активности Na, K-АТФ-азы, особенно в двигательной зоне коры головного мозга, в шейном отделе спинного мозга, в гипоталамусе (табл. 1). В меньшей степени ингибировалась активность фермента в поясничном отделе спинного мозга и в продолговатом мозге. Одновременно в ряде структур мозга отмечалось некоторое возрастание удельной активности Mg-АТФ-азы фракции неочищенных синапсом.

Характерным для фракции тяжелых микросом всех изучаемых отделов спинного и головного мозга было выраженное ингибирование удельной активности Na, K-АТФ-азы. При этом активность Mg-АТФ-азы практически не изменялась в изучаемых структурах мозга (табл. 2).

Следует отметить, что выявленное нами снижение удельной активности Na, K-

Таблица 1
Активность АТФ-аз фракции неочищенных синапсом различных отделов головного и спинного мозга крыс в доклинический период ботулинической интоксикации

Объект исследования (серия опытов)	Na, K-АТФ-аза		Mg-АТФ-аза	
	контроль	опыт	контроль	опыт
Двигательная зона коры головного мозга р	2,7±0,22 —	1,3±0,21 <0,001	— —	— —
Гипоталамус р	2,5±0,24 —	1,4±0,18 <0,001	6,4±0,38 —	7,4±0,46 >0,25
Продолговатый мозг р	2,5±0,30 —	1,7±0,22 <0,05	5,5±0,32 —	6,4±0,15 <0,02
Спинной мозг, шейный отдел р	2,4±0,27 —	1,0±0,08 <0,001	— —	— —
Спинной мозг, поясничный отдел р	2,7±0,14 —	1,7±0,26 <0,01	5,5±0,25	6,6±0,45 <0,05

Примечание. Здесь и в табл. 2 приведены данные экспериментов, в каждой серии которых использовано 15—20 животных; активность ферментов выражена в мкмоль Рн/мг белка·ч.

Активность АТФ-аз фракции тяжелых микросом различных отделов головного и спинного мозга крыс в доклинический период ботулинической интоксикации

Объект исследования	Na, K-АТФ-аза		Mg-АТФ-аза	
	контроль	опыт	контроль	опыт
Двигательная зона коры головного мозга <i>p</i>	$3,8 \pm 0,37$ —	$1,6 \pm 0,17$ $<0,001$	$7,0 \pm 0,37$ —	$8,4 \pm 0,44$ $<0,05$
Гипоталамус <i>p</i>	$3,8 \pm 0,38$ —	$2,3 \pm 0,13$ $<0,001$	$6,7 \pm 0,30$ —	$8,0 \pm 0,60$ $>0,05$
Продолговатый мозг <i>p</i>	$3,8 \pm 0,49$ —	$2,0 \pm 0,36$ $<0,01$	$7,3 \pm 0,64$ —	$6,2 \pm 0,45$ $>0,25$
Спинной мозг, шейный отдел <i>p</i>	$3,3 \pm 0,36$ —	$2,1 \pm 0,28$ $<0,02$	$5,6 \pm 0,27$ —	$6,4 \pm 0,58$ $>0,05$
Спинной мозг, поясничный отдел <i>p</i>	$3,2 \pm 0,28$ —	$1,7 \pm 0,17$ $<0,001$	$6,6 \pm 0,49$ —	$6,1 \pm 0,44$ $>0,5$

АТФ-азы субклеточных фракций различных структур спинного и головного мозга не позволяет судить о характере ингибирования ферментативной активности в условиях ботулинической интоксикации. В связи с этим целью последующих экспериментов явилось изучение кинетики ферментативной реакции, обеспечиваемой Na, K- и Mg-АТФ-азами фракций тяжелых микросом и неочищенных синапсом, выделенных из продолговатого мозга и двигательной зоны коры головного мозга.

Как оказалось в этой модификации экспериментов, возникающее в условиях доклинической стадии ботулинической интоксикации ингибирование активности Na, K-АТФ-азы имеет сложный генез (табл. 3). В микросомальных фракциях двигательной зоны коры головного, а также продолговатого мозга наблюдалось сочетание конкурентного ингибирования активности фермента, о чем свидетельствует резкое возрастание K_m , а также неконкурентного ингибирования, на что указывает выраженное снижение максимальной скорости гидролиза субстрата. Что касается активности Na, K-АТФ-азы фракции неочищенных синапсом продолговатого мозга, то обнаруженное нами снижение ферментативной активности этой фракции также являлось следствием сочетания механизмов конкурентного и неконкурентного ингибирования. Между тем торможение активности Na, K-АТФ-азы во фракции неочищенных синапсом двигательной зоны коры головного мозга носило характер неконкурентного ингибирования, о чем свидетельст

во отсутствие изменений K_m при одновременном снижении максимальной скорости гидролиза субстрата.

Изучение кинетики реакций гидролиза при участии Mg-АТФ-азы субклеточных фракций различных отделов мозга в доклинический период интоксикации позволило выявить следующее. Характерным для Mg-АТФ-азы фракции неочищенных синапсом продолговатого мозга было заметное возрастание сродства фермента к субстрату, о чем свидетельствовало снижение K_m . Между тем в этот же период интоксикации обнаружено заметное возрастание K_m и снижение максимальной скорости гидролиза в реакциях, осуществляемых при участии Mg-АТФ-азы микросомальной фракции продолговатого мозга. Последнее свидетельствовало о сочетании конкурентного и неконкурентного ингибирования фермента. Неконкурентный характер ингибирования отмечен нами в отношении Mg-АТФ-азы фракции тяжелых микросом двигательной зоны коры головного мозга, в то время как Mg-АТФ-аза фракции неочищенных синапсом этой же зоны мозга угнеталась по конкурентному типу.

Резюмируя результаты проведенных экспериментов, следует заключить, что в доклинический период ботулинической интоксикации возникает выраженное угнетение энергозависимых процессов трансмембранного переноса ионов в субклеточных фракциях различных структур спинного и головного мозга, осуществляемого при участии Na, K-АТФ-азы. Анализируя генез обнару

Изменение параметров кинетики ферментативного гидролиза АТФ в доклинический период ботулинической интоксикации

Серия опытов	Фракция тяжелых микросом				Фракция неочищенных синцитосом			
	Na, K-АТФ-аза		Mg-АТФ-аза		Na, K-АТФ-аза		Mg-АТФ-аза	
	K _M	V	K _M	V	K _M	V	K _M	V

Двигательная зона коры

Контроль	0,49±0,06	4,1±0,15	0,59±0,06	12,0±0,57	1,00±0,08	4,6±0,14	0,67±0,05	13,0±0,45
Опыт	1,40±0,19	3,1±0,17	0,55±0,06	9,0±0,38	1,00±0,13	2,5±0,15	0,86±0,10	12,0±0,56
P	<0,001	<0,001	>0,5	<0,001	>0,5	<0,001	<0,05	>0,1

Продолговатый мозг

Контроль	0,54±0,09	5,4±0,32	0,43±0,05	12,6±0,49	0,35±0,05	4,1±0,27	1,5±0,16	11,3±0,33
Опыт	1,10±0,19	3,1±0,38	0,32±0,07	8,4±0,48	0,91±0,27	2,1±0,22	0,92±0,14	10,0±0,70
P	<0,01	<0,001	>0,2	<0,001	<0,05	<0,001	<0,01	>0,05

Примечание. В каждой серии экспериментов использовано 15—20 животных. K_м — рассчитано в ммоль АТФ, V — в ммоль F_н/мг белка/ч

женных изменений активности АТФ-азных систем мозга, следует высказать предположение о возможности образования в инкубационный период интоксикации под влиянием токсина различных продуктов метаболизма, обеспечивающих возникновение конкурентного торможения активности транспортных АТФ-аз в силу выраженного сродства к активным центрам фермента. В то же время не исключена возможность угнетения синтеза АТФ-аз различных субклеточных фракций или нарушения их олигомерной организации в биологических мембранах под влиянием токсина, что и приводит к ингибированию активности фермента по неконкурентному типу.

ЛИТЕРАТУРА

1. Guyton A. C., Mac Donald M. A. — Arch. Neurol. (Chic.), 1947, v. 57, p. 578—592.
2. Brooks V. B. — J. Physiol. (Lond.), 1954, v. 123, p. 501—515.
3. Harris A. J., Miledi R. — Ibid., 1971, v. 217, p. 497—515.
4. Михайлов В. В., Королев В. В. — Бюлл. эксперим. биол., 1968, № 11, с. 24—27.
5. Михайлов В. В., Михайлов В. В. — Там же, 1975, № 11, с. 21—24.
6. Глебов Р. Н., Гришанкова Е. В., Мезенцев А. И. и др. — Биохимия, 1972, № 2, с. 360—365.
7. Глебов Р. Н., Дмитриева Н. Д. — Там же, 1974, № 4, с. 822—827.
8. Корниш-Бовден Э. Основы ферментативной кинетики. М., 1979.
9. Lowry O. H., Lopez J. A. — J. biol. Chem., 1946, v. 162, p. 421—428.
10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al. — J. biol. Chem., 1946, v. 162, p. 421—428.

Поступила 05.03.82

ON ALTERATIONS IN ACTIVITY OF THE ATPASE SYSTEMS IN SUBCELLULAR FRACTIONS OF BRAIN AND SPINAL CORD AT THE PRECLINICAL PERIOD OF BOTULINIC INTOXICATION

N. P. Chesnokova, T. A. Nevvazhay

Chair of Pathophysiology, Medical School, Saratov

Under conditions of the C type botulinic intoxication of rats blockade of cholinergic synaptic transmission and development of paralytic syndrome followed the distinct alteration in activity of the ATPase systems in various subcellular fractions of brain and spinal cord. This suggests that the toxin affects the various intracellular metabolic reactions related directly or indirectly to active transmembrane transport of ions.

И. А. Фролова, А. Д. Зубенко

ХОЛЕСТЕРИН ЛИПОПРОТЕИДОВ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ И ЙОДНАКОПИТЕЛЬНАЯ ФУНКЦИЯ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У БОЛЬНЫХ АЛИМЕНТАРНЫМ ОЖИРЕНИЕМ И ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА С ИЗБЫТОЧНОЙ МАССОЙ ТЕЛА

Институт питания АМН СССР, Москва

Известно, что ишемическая болезнь сердца (ИБС) и гиперхолестеринемия часто сочетаются с клиническим и субклиническим гипотиреозом и редко встречаются при гипертиреозе [1]. Установлено, что гипотиреоз приводит к гиперхолестеринемии, хотя скорость биосинтеза холестерина (ХС) при этом состоянии обычно снижена [2, 3]. В эксперименте установлено, что увеличение содержания в сыворотке липопротеидов низкой плотности (ЛНП) в осенне-зимний период коррелирует с сезонным снижением концентрации тироксина [4]. Есть данные о повышении у больных коронарным атеросклерозом связывания T_4 и T_3 с α -, β - и пре- β -липопротеидами и хиломикронами [5]. L-трийодтиронин в физиологических концентрациях индуцирует увеличение числа рецепторов ЛНП и усиливает деградацию ЛНП в культуре фибробластов кожи человека [6]. D-тироксин в терапевтических дозах снижает концентрацию в крови ЛНП за счет уменьшения содержания ХС, фосфолипидов и апо-В, не влияя на уровень липопротеидов очень низкой и высокой плотности (ЛОНП и ЛВП) и апо-А1 [7]. Гипохолестеринемическое действие D-тироксина основано главным образом на усилении интенсивности окисления ХС в печени и повышении его выведения [8]. При гипертиреозе ускоряется «оборот» ЛНП [9].

Ускорению развития атеросклеротического процесса способствует не только высокий уровень в крови ХС и ЛНП, но и низкий уровень ЛВП или ХС ЛВП (α -ХС). Фрамингамским исследованием установлено, что индекс $ХС/\alpha$ -ХС является наиболее информативным липидным показателем риска ИБС [10]. Абсолютная концентрация α -ХС при гипотиреозе бывает незначительно сниженной или остается в пределах нормы, но изменение концентрации общего ХС (за счет ХС ЛНП) приводит к повыше-

нию величины $ХС/\alpha$ -ХС при гипотиреозе и к снижению ее при гипертиреозе [1, 3, 9].

Помимо ИБС, низкий уровень α -ХС часто имеет место у людей с избыточной массой тела. Ожирение является одним из факторов риска ИБС. Несмотря на сложившееся представление о том, что в патогенезе ожирения существенная роль принадлежит гиподисфункции щитовидной железы, в литературе до настоящего времени нет определенного мнения о характере функциональной активности этого органа у больных ожирением. Наиболее отчетливое снижение функции железы наблюдается при гипоталамогипофизарной форме тучности (по сравнению с другими ее формами), в особенности при прогрессирующей форме заболевания [11].

В настоящей работе представлены результаты параллельного определения содержания α -ХС в сыворотке и поглощения щитовидной железой ^{131}I у больных ИБС с избыточной массой тела и у больных обменно-алиментарным ожирением.

Методика

Было обследовано 50 больных ИБС II стадии, перенесших инфаркт миокарда, имеющих избыточную массу тела 9—28 кг (мужчины в возрасте 40—60 лет), и 152 больных алиментарным ожирением II—III степени (мужчины и женщины 18—56 лет). Срок после перенесенного инфаркта был равен 6 мес—3 годам. Обследование проводили в первые дни поступления в стационар. В сыворотке крови больных, взятой через 12—14 ч после последнего приема пищи, определяли содержание ХС [12] и α -ХС [13]. Исследование йоднакопительной функции щитовидной железы проводили на установке НК-150 (ВНР). Больным натощак давали пер os раствор ^{131}I активностью 1—2 мкКи на физиологическом растворе. Подсчет накопления ^{131}I железой проводили через 2, 4 и 24 ч. У больных не было клинически выраженных эндокринных нарушений (отбор). Данные подвергнуты статистической обработке с использованием критерия Стьюдента.

Содержание общего ХС, α -ХС (мм/л) и коэффициент ХС/ α -ХС у больных ИБС

Группа обследованных	n	ХС	α -ХС	ХС/ α -ХС
Все больные ИБС (I)	50	$6,19 \pm 0,20$	$1,37 \pm 0,045$	$5,06 \pm 0,2$
Больные ИБС со сниженным поглощением ^{131}I (II)				
<4,5% (через 2 ч)	3	$6,44 \pm 0,45$	$1,393 \pm 0,009$	$4,5 \pm 1,02$
P		>0,05	>0,05	>0,05
<8% (через 4 ч)	17	$6,00 \pm 0,36$	$1,41 \pm 0,053$	$4,57 \pm 0,26$
P		>0,05	>0,05	>0,05
<3% (через 24 ч)	24	$6,89 \pm 0,262$	$1,47 \pm 0,059$	$4,82 \pm 0,28$
P		<0,05	>0,05	>0,05
Больные ИБС с повышенным поглощением ^{131}I (III):				
>16% (через 2 ч)	4	$8,63 \pm 0,96$	$1,47 \pm 0,25$	$6,02 \pm 0,83$
P_1		<0,05	>0,05	>0,05
P_1		<0,05	>0,05	>0,05
>23% (через 4 ч)	1	8,32	1,05	7,9
>43% (через 24 ч)	2	7,56	1,21	6,9

Примечание. Здесь и в табл. 2—5 P — сравнение с группой I, P_1 — сравнение с группой II.

Результаты исследования

Содержание общего ХС и абсолютное содержание α -ХС в сыворотке больных ИБС было равно соответственно $6,91 \pm \pm 0,20$ мм/л и $1,37 \pm 0,045$ мм/л. У больных ИБС средняя величина коэффициента ХС/ α -ХС составляла $5,06 \pm 0,20$ (табл. 1), что превышает его величину у людей с эутиреоидным состоянием, т. е. 4—4,5 [1, 9]. При сниженном поглощении ^{131}I содержание общего ХС и коэффициент ХС/ α -ХС были ниже, а абсолютное содержание α -ХС выше соответствующих средних величин, полученных при обследовании всех больных ИБС. У некоторых больных с повышенным поглощением ^{131}I отмечалось увеличение содержания ХС и коэффициента ХС/ α -ХС (см. табл. 1). Однако статистически достоверная разница отмечена только между данными, характеризующими содержание ХС при повышенном и сниженном поглощении ^{131}I через 2 ч (см. табл. 1).

Средние значения поглощения ^{131}I были сниженными только через 24 ч после введения (табл. 2); при этом у 32 больных из 50 эта величина не достигала нижней границы нормы (табл. 3). Через 4 ч поглощение ^{131}I было сниженным у 17 человек, а через 2 ч — только у 3 (см. табл. 3). Минимальные значения наблюдались у больных с низким (менее 5,2 мм/л) содержанием α -ХС и с низким коэффициентом ХС/ α -ХС

(см. табл. 2). Напротив, у больных ИБС с высоким содержанием ХС (более 7,8 мм/л), с низким абсолютным содержанием α -ХС (менее 1,04 мм/л) и с высоким коэффициентом ХС/ α -ХС поглощение ^{131}I было несколько повышенным по сравнению с таковым у больных с нормальным содержанием ХС (см. табл. 2).

Таким образом, поглощение ^{131}I у большинства обследованных больных ИБС с избыточной массой тела снижено в основном через 24 ч, минимальное поглощение наблюдалось при низкой концентрации общего ХС, низком коэффициенте ХС/ α -ХС и высоком содержании α -ХС. Повышенное поглощение ^{131}I сочеталось с повышенным коэффициентом ХС/ α -ХС, однако оно наблюдалось в единичных случаях.

У больных ожирением среднее содержание в сыворотке общего ХС, α -ХС и величина ХС/ α -ХС были равны соответственно $7,229 \pm 0,123$ мм/л, $1,609 \pm \pm 0,025$ мм/л и $4,39 \pm 0,11$ (табл. 4). У больных со сниженным поглощением йода содержание общего ХС и α -ХС было незначительно ниже, а ХС/ α -ХС — незначительно выше средних величин (см. табл. 4). При повышенном поглощении йода наблюдалось повышение или тенденция к повышению содержания общего ХС (через 4 и 24 ч) и содержания α -ХС, а также снижение или тенденция к снижению ХС/ α -ХС (см. табл. 4).

Средние величины поглощения ^{131}I у больных ожирением укладываются в

Поглощение ^{131}I у больных ИБС

Группа обследованных	n	Поглощение ^{131}I , %		
		через 2 ч	через 4 ч	через 24 ч
Здоровые люди	—	10,5 (4,5—16)	15 (8—23)	33 (23—43)
Больные ИБС (I)	50	$9,31 \pm 0,59$	$10,61 \pm 0,56$	$20,9 \pm 1,44$
Больные ИБС (II): с содержанием ХС: $>7,8$ мм/л P	14	$11,8 \pm 1,38$ $>0,05$	$14,55 \pm 1,68$ $<0,02$	$24,1 \pm 3,55$ $>0,05$
с содержанием α -ХС: $<1,04$ мм/л P	4	$9,85 \pm 1,62$ $>0,05$	$12,1 \pm 2,0$ $>0,05$	$27,1 \pm 5,6$ $>0,05$
с коэффициентом ХС/ α -ХС: >5 P	21	$10,4 \pm 1,7$ $>0,05$	$12,9 \pm 1,22$ $>0,05$	$23,6 \pm 2,6$ $>0,05$
>6 P	12	$16,6 \pm 1,5$ $<0,02$	$14,5 \pm 1,7$ $<0,05$	$26,14 \pm 3,7$ $>0,05$
Больные ИБС (III) с содержанием ХС: $<5,2$ мм/л P P ₁	9	$7,44 \pm 1,15$ $>0,05$ $<0,05$	$9,52 \pm 1,44$ $>0,05$ $<0,05$	$19,0 \pm 3,95$ $>0,05$ $>0,05$
с содержанием α -ХС: $>1,95$ мм/л P P ₁	3	$12,0 \pm 2,42$ $>0,05$ $>0,05$	$13,4 \pm 2,27$ $>0,05$ $>0,05$	$24,5 \pm 6,0$ $>0,05$ $>0,05$
с коэффициентом ХС/ α -ХС: $<4,5$ P P ₁	17	$7,31 \pm 0,8$ $<0,05$ $>0,05$	$9,19 \pm 1,02$ $>0,005$ $<0,05$	$15,8 \pm 1,7$ $<0,05$ $<0,05$
<4 P P ₁	10	$7,8 \pm 0,23$ $<0,05$ $<0,05$	$9,78 \pm 1,47$ $>0,05$ $<0,05$	$18,7 \pm 4,26$ $>0,05$ $>0,05$

пределы нормы (табл. 5), однако обращает на себя внимание высокий процент больных со сниженным поглощением (42) через 24 ч (см. табл. 3). Это снижение поглощения наблюдается (главным образом через 24 ч) у больных с низким абсолютным содержанием α -ХС и повышенным коэффициентом ХС/ α -ХС. Тенденция к повышению поглощения через 24 ч наблюдается у больных со сниженным коэффициентом ХС/ α -ХС (по сравнению со всеми обследованными больными ожирением).

У больных ожирением с низким коэффициентом ХС/ α -ХС поглощение ^{131}I

выше, чем у больных с величиной этого коэффициента выше 5, 6 и 7 (разница статистически достоверна, см. табл. 5).

Для больных ИБС характерны более низкие по сравнению с больными ожирением величины поглощения йода, больший процент больных с низким поглощением, более низкая абсолютная концентрация α -ХС и более высокий коэффициент ХС/ α -ХС, а также более высокий процент больных с величиной его, равной 5 и выше (45 против 25 при ожирении). Величина ХС/ α -ХС менее 4 встречается у 10% больных ИБС против 41% среди больных ожи-

Т а б л и ц а 3

Частота случаев нормального, сниженного и повышенного поглощения ^{131}I (в % от общего количества больных)

Диагноз	Поглощение ^{131}I , %								
	4,5	4,5—16	16	8	8—23	23	23	23—43	43
	через 2 ч			через 4 ч			через 24 ч		
ИБС	6	86	8	30	68	2	64	32	4
Ожирение	—	89	11	6,3	87,4	6,3	42	55,5	2,5

Содержание общего ХС, α -ХС (мм/л) и коэффициент ХС/ α -ХС у больных ожирением

Группа обследованных	n	ХС	α -ХС	ХС/ α -ХС
Все больные ожирением (I)	158	$7,228 \pm 0,122$	$1,609 \pm 0,025$	$4,39 \pm 0,11$
Больные со сниженным поглощением ^{131}I (II):				
<4.5% (через 2 ч)		—	—	—
<8% (через 4 ч)	10	$6,627 \pm 0,236$	$1,521 \pm 0,379$	$4,42 \pm 0,27$
P		<0,05	>0,05	>0,05
<23% (через 24 ч)	67	$6,818 \pm 0,189$	$1,575 \pm 0,042$	$4,63 \pm 0,18$
P		>0,05	>0,05	>0,05
Больные с повышенным поглощением ^{131}I (III):				
>16% (через 2 ч)	17	$7,03 \pm 0,23$	$1,775 \pm 0,074$	$4,08 \pm 0,22$
P		>0,05	<0,05	<0,05
>23% (через 4 ч)	10	$7,00 \pm 0,53$	$1,859 \pm 0,076$	$3,81 \pm 0,31$
P		>0,05	<0,05	>0,05
P_1		>0,05	<0,05	>0,05
>43% (через 24 ч)	4	$7,779 \pm 0,356$	$1,989 \pm 0,036$	$3,86 \pm 0,21$
P		>0,05	<0,05	<0,05
P_1		<0,05	<0,01	<0,05

Таблица 5

Поглощение ^{131}I у больных ожирением

Группа обследованных	n	Поглощение ^{131}I , %		
		2 ч	4 ч	24 ч
Здоровые люди	—	10,5 (4,5—16)	15 (8—23)	33 (23—43)
Все больные ожирением	158	$10,43 \pm 0,33$	$13,2 \pm 0,37$	$24,6 \pm 0,76$
Больные ожирением (II): с содержанием ХС >7,8 мм/л	31	$13,6 \pm 0,89$	$14,06 \pm 1,02$	$25,7 \pm 2,07$
P		<0,02	>0,05	>0,05
с содержанием α -ХС: <1,04 мм/л	7	$10,3 \pm 0,98$	$11,07 \pm 0,75$	$21,8 \pm 3,0$
P		>0,05	<0,05	>0,05
с коэффициентом ХС/ α -ХС: >5	38	$9,81 \pm 0,6$	$12,17 \pm 0,79$	$22,25 \pm 1,24$
P		>0,05	>0,05	>0,05
>6	15	$9,65 \pm 0,14$	$11,8 \pm 0,16$	$18,81 \pm 0,45$
P		<0,05	<0,05	<0,02
>7	6	$10,0 \pm 0,51$	$12,15 \pm 0,69$	$19,9 \pm 2,17$
P		>0,05	>0,05	<0,05
Больные с ожирением (III) с содержанием ХС: <5,2 мм/л	14	$9,08 \pm 0,71$	$12,55 \pm 1,41$	$24,01 \pm 2,01$
P		>0,05	>0,05	>0,05
P_1		<0,02	>0,05	>0,05
с содержанием α -ХС: >1,95 мм/л	31	$11,26 \pm 0,84$	$13,98 \pm 1,02$	$24,92 \pm 1,32$
P		>0,05	>0,05	>0,05
P_1		>0,05	<0,01	>0,05
с коэффициентом ХС/ α -ХС: <4	66	$10,66 \pm 0,51$	$13,78 \pm 0,62$	$26,0 \pm 1,4$
P				>0,05
P_1				<0,05
<3	9	$10,0 \pm 1,08$	$14,1 \pm 1,27$	$28,45 \pm 1,86$
P			>0,05	>0,05
P_1				<0,02

рением. При ИБС минимальное поглощение йода наблюдается у больных с низкой величиной ХС/ α -ХС, у больных ожирением при минимальном по-

глощении эта величина незначительно повышена.

Таким образом, у большинства обследованных больных ИБС, имеющих

избыточную массу тела, снижено поглощение радиоактивного йода щитовидной железой. По данным литературы [14], у 9% больных ИБС с нормальной массой тела имеет место субклиническая форма гипотиреоза. Среди обследованных больных ожирением снижение поглощения йода встречается по сравнению с больными ИБС значительно реже.

Снижение относительного содержания α -ХС (т. е. повышение коэффициента ХС/ α -ХС) у больных ИБС наблюдается чаще, чем у больных ожирением. Абсолютное содержание α -ХС у больных ИБС ниже, чем у больных ожирением, и мало меняется в зависимости от степени поглощения ^{131}I . Снижение поглощения йода у больных ИБС с избыточной массой тела сочетается с более низким, чем при повышенном поглощении уровнем общего ХС сыворотки. Относительное содержание α -ХС у больных ИБС мало коррелирует со степенью поглощения ^{131}I . Среди больных алиментарным ожирением повышенное поглощение йода наблюдается у больных с высоким абсолютным и относительным содержанием α -ХС и повышенным содержанием общего ХС сыворотки. Изменения содержания общего ХС и α -ХС, наблюдающиеся при снижении йоднакопительной функции щитовидной железы, у больных ИБС с избыточной массой тела и у больных алиментарным ожирением неоднотипны.

ЛИТЕРАТУРА

1. Feely I., Iqbal S. J., Isles T. E. et al. — *Hormon. Metab. Res.*, 1980, v. 12, p. 560—561.
2. Хефтман Э. М. Биохимия стероидов. М., 1972, с. 21—23.
3. Burbier R., Paffoy J., Venurd-Sassolus A. et al. — *Diabete et Metabol.*, 1980, v. 6, p. 213—217.
4. Lapland P. M., Beaubutie L., Maurel D. — *J. Lipid Res.*, 1980, v. 21, p. 724—738.

5. Лившиц И. Б., Шерстюк Г. В. — *Лабор. дело.*, 1980, № 7, с. 409—412.
6. Bierman E. L. — In: *Atherosclerosis*, New York, 1980, p. 784—786.
7. Schwandt P., Weisweiler P. — *Atherosclerosis*, 1980, v. 35, p. 301.
8. Owen W. R. — In: *Treatment of the Hyperlipidemic States*. Ed. H. R. Casdorph. Springfield, 1977, p. 297—309.
9. Aydepha D., Macaron Ch., Mallik Ch. et al. — *J. clin. Endocr.*, 1979, v. 49, p. 726—729.
10. Kannel W. B., Castelly W. P. — *Lancet*, 1979, v. 2, p. 950—951.
11. Шурыгин Д. Я., Вязицкий П. О., Сидоров К. А. Ожирение. Л., 1980, с. 55, 174.
12. Ilca L. — В кн.: *Биохимические методы исследования в клинике*. Под ред. А. А. Покровского. М., 1969, с. 302.
13. Warnick G. R., Albers J. J. — *J. Lipid Res.*, 1978, v. 19, p. 65—76.
14. Сидоренко Б. А., Бегляров М. И., Туттов В. Н. и др. — *Кардиология*, 1981, № 12, с. 96.

Поступила 12.03.82

CHOLESTEROL OF HIGH DENSITY LIPOPROTEINS AND IODINE-ACCUMULATING FUNCTION OF THYROID GLAND IN PATIENTS WITH ALIMENTARY OBESITY AS WELL AS IN PATIENTS BY HEART ISCHEMIC DISEASE WITH EXCESSIVE BODY MASS

I. A. Frolova, A. D. Zubenko

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

Accumulation of ^{131}I was decreased in patients with heart ischemic disease and excessive body mass whereas this decrease occurred more seldom in patients with metabolic-alimentary obesity. Increase in the ratio of α -cholesterol/cholesterol in blood serum was more typical for the patients with heart ischemic disease as compared with corpulent patients. Deterioration of iodine-accumulating function of thyroid gland in the ischemic disease was accompanied by decrease in content of cholesterol as well as by increase of α -cholesterol. These alterations were not found in the patients with obesity. In the decrease of iodine-accumulating function of thyroid gland contents of cholesterol and α -cholesterol were dissimilarly altered in the patients with excessive body mass and heart ischemic disease as well as in the patients with metabolic-alimentary obesity.

Ю. М. Лопухин, Ю. А. Владимиров, М. Н. Молоденков, Г. И. Клебанов,
В. И. Сергиенко, Т. И. Торховская, Я. М. Чеснокова, А. В. Наумов,
В. А. Максимов, М. П. Шерстнев

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ЛИПОПРОТЕИДОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ, ВЫДЕЛЕННЫХ УЛЬТРАЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕМ И ОСАЖДЕНИЕМ В ПРИСУТСТВИИ ГЕПАРИНА И КАЛЬЦИЯ

Кафедра оперативной хирургии и топографической анатомии и кафедра библиофизики
II ММИ им. Н. И. Пирогова

При атеросклерозе наряду с увеличением содержания холестерина (ХС) в мембранах форменных элементов и липопротеидах крови возрастает интенсивность перекисного окисления липидов, что зарегистрировано по содержанию первичных и вторичных продуктов перекисного окисления в липидах крови, стенки аорты, печени экспериментальных животных [1] и больных [2, 3]. Вместе с тем остается неясным, каким образом влияет развитие атеросклеротических изменений на перекисное окисление липидов в различных фракциях липопротеидов, таких, как липопротеиды низкой (ЛНП) и высокой (ЛВП) плотности.

Для выделения фракций липопротеидов существуют 2 метода: препаративное ультрацентрифугирование и разделение с помощью гепарина и кальция. Второй метод ввиду своей простоты и доступности нашел широкое применение в клинической практике.

Одним из методов регистрации перекисного окисления липидов является хемилюминесценция (ХЛ) и, в частности, в присутствии двухвалентного железа [4]. В настоящее время интенсивно проводится изучение перекисного окисления липидов отдельных фракций липопротеидов сыворотки крови с помощью ХЛ в присутствии двухвалентного железа [5, 6] и перекиси водорода [7]. Однако сравнительного исследования различных методов выделения липопротеидов не проводилось.

Целью данной работы явилось сравнительное исследование ХЛ липопротеидов, выделенных с помощью гепарина и кальция и препаративным ультрацентрифугированием, в присутствии двухвалентного железа, а также изучение изменения ХЛ-свойств липопротеидов, выделенных из сыворотки крови доноров и больных атеросклерозом.

Методика

Обследовано 9 доноров в возрасте от 18 до 30 лет и 10 больных атеросклерозом, осложненным ишемической болезнью сердца (7 человек) или облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей (3 человека), в возрасте от 52 до 55 лет. Все доноры и больные были мужчины. Кровь для исследования брали утром через 14—16 ч после последнего приема пищи.

Липопротеиды сыворотки крови разделяли осаждением в присутствии ионов кальция и гепарина [8]. Получающийся осадок липопротеидов содержал в своем составе липопротеиды очень низкой плотности (ЛОНП) и ЛНП, так называемые апо-В, содержащие липопротеиды (апо-В ЛП; по названию преобладающего апопротеина) [9]. Оставшийся супернатант содержал ЛВП [8, 10] и все остальные компоненты сыворотки крови, т. е. в основном белки. Кроме того, ЛОНП, ЛНП и подклассы ЛВП выделяли препаративным ультрацентрифугированием [11, 12].

В сыворотке крови определяли концентрацию апо-В ЛП [13] и ХС на автоанализаторе Центрифихем-400. В липопротеидных фракциях находили содержание ХС, триглицеридов на автоанализаторе и фосфолипидов (ФЛ) [14].

ХЛ регистрировали на установке с фотоумножителем ФЭУ-127 при температуре кюветы 37 °C [15]. Концентрация соли двухвалентного железа в кювете составляла 2,5 мМ.

Результаты и обсуждение

Обнаружено, что при выделении с помощью гепарина и ионов кальция апо-В ЛП из 0,4 мл сыворотки крови доноров ХЛ апо-В ЛП была значительно выше, чем ХЛ равного объема сыворотки крови (рис. 1). Супернатант ХЛ практически не обладал.

При увеличении объема сыворотки крови в кювете обнаружено, что интенсивность ХЛ, оцениваемая по высоте медленной вспышки, снижается (рис. 2). В то же время ХЛ апо-В с увеличением их концентрации, определяемой по ФЛ, постоянно возрастает. При увеличении концентрации супернатанта, определяемой также по ФЛ, ХЛ изменяется незначительно.

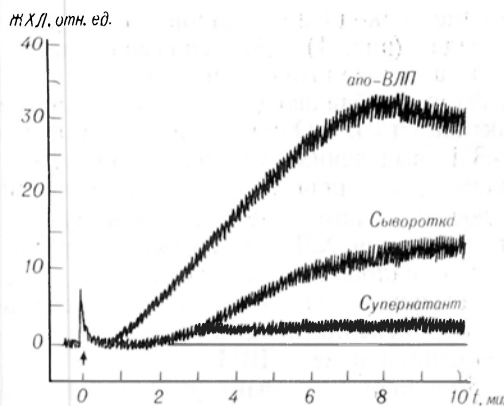


Рис. 1. ХЛ сыворотки крови и липопротеидов, разделенных с помощью гепарина и Ca^{2+} .

Стрелкой обозначен момент введения соли двухвалентного железа. Здесь и на рис. 2: 1 — апо-ВЛП; 2 — сыворотка, 3 — супернатант.

Можно предположить, что наблюдаемые изменения ХЛ обусловлены процессом разделения липопротеидов с помощью гепарина и Ca^{2+} за счет изменения их структуры. Поэтому было проведено изучение ХЛ липопротеидов, полученных препаративным ультрацентрифугированием.

Оказалось, что при одинаковой концентрации липопротеидов по ФЛ в кювете установки наибольшей ХЛ обладают ЛОНП, несколько меньшей ЛНП, затем ЛВП₂, ЛВП₃ (рис. 3). Интенсивность ХЛ липопротеидов увеличива-

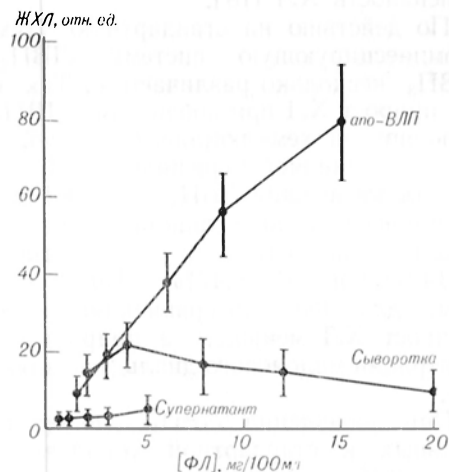


Рис. 2. Зависимость ХЛ сыворотки крови и липопротеидов, разделенных с помощью гепарина и Ca^{2+} , от содержания их в кювете. По оси абсцисс — концентрация ФЛ в кювете при добавлении различных объемов сыворотки крови и липопротеидов, по оси ординат — высота медленной вспышки ХЛ. Здесь и на рис. 3а, б: значения представлены как $M \pm m$ ($n=3$).

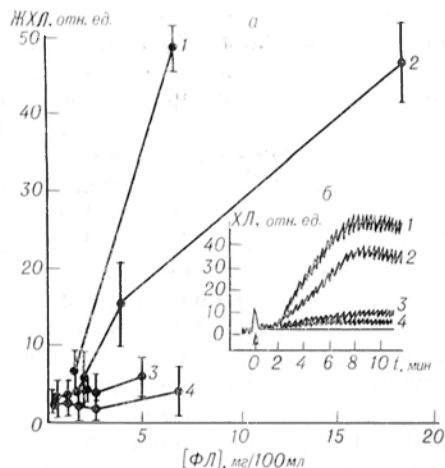


Рис. 3. а — зависимость ХЛ липопротеидов сыворотки крови, выделенных с помощью ультрацентрифугирования, от концентрации их в кювете. Значения представлены как $M \pm m$ ($n=3$); б — кинетика ХЛ различных фракций липопротеидов сыворотки крови, выделенных центрифугированием при одинаковой их концентрации в кювете, равной 5 мг на 100 мл по ФЛ.

1 — ЛОНП; 2 — ЛНП; 3 — ЛВП₂; 4 — ЛВП₃.

ется с увеличением концентрации. При сравнении рис. 1 и рис. 3, б установлено, что кинетика ХЛ апо-В ЛП, выделенных осаждением, и ХЛ ЛОНП и ЛНП, выделенных ультрацентрифугированием, одинакова. Это свидетельствует о сходстве их физико-химических свойств.

В работе Ю. Осис и соавт. [6], которые также проводили изучение ХЛ липопротеидов сыворотки крови человека, выделенных препаративным ультрацентрифугированием, не обнаружено ХЛ ЛОНП. Это обусловлено, тем, что в указанной работе липопротеиды для ХЛ-исследования выделяли из одного объема сыворотки. При этом выход липопротеидов по ФЛ был различным, а концентрация ЛОНП была слишком мала (0,36 мг на 100 мл), для того чтобы можно было обнаружить их ХЛ.

Таким образом, независимо от способа выделения ЛОНП и ЛНП эти фракции липопротеидов по своим ХЛ-свойствам идентичны, что дает возможность следить за изменением перекисного окисления в липопротеидах в клинике.

Однако возникает вопрос: с чем связано различие в ХЛ разных фракций липопротеидов, выделенных ультрацентрифугированием. Изменение ХЛ

липопротеидов, по-видимому, не обусловлено различием содержания в них триглицеридов, поскольку одинаковая концентрация триглицеридов сопровождается ХЛ разной интенсивности. Так, при концентрации триглицеридов 3,36 мг на 100 мл ($n=3$) ХЛ ЛОНП равна $6,5 \pm 1,38$ отн. ед., ЛНП — $11,0 \pm 2,32$, ЛВП₂ — $5,1 \pm 0,92$, ЛВП₃ — $4,5 \pm 1,23$. Коэффициент корреляции между концентрацией триглицеридов в суммарной фракции ЛОНП и ЛНП и высотой медленной вспышки ХЛ этих липопротеидов составляет $-0,49$ ($n=6$) и корреляция статистически недостоверна.

Способность липопротеидов к окислению под действием ионов двухвалентного железа снижается параллельно увеличению содержания в них белка. Меньше всего белка в ЛОНП, затем в порядке возрастания содержания белка следуют ЛНП, ЛВП₂, ЛВП₃ [9, 12]. Чем больше содержится белка, тем ниже ХЛ липопротеидов.

ЛВП, выделенные ультрацентрифугированием, обладают незначительной ХЛ, что соответствует ХЛ супернатанта, а поскольку в супернатанте содержится ЛВП [8, 10], то было проведено сравнительное изучение ХЛ-свойств супернатанта и ЛВП. При добавлении супернатанта к стандартной хемилюминесцирующей системе, содержащей 5 мг на 100 мл по ФЛ липопротеидов из яичного желтка, оказалось, что наряду со снижением ХЛ происходит сни-

жение накопления малонового диальдегида (рис. 4). Это указывает на то что в супернатанте находится некий фактор, обладающий антиоксидантной активностью. Однако при добавлении ЛВП, выделенных ультрацентрифугированием, к стандартной хемилюминесцирующей системе не было обнаружено ни снижения ХЛ, ни снижения накопления малонового диальдегида. Следовательно, антиоксидантная активность супернатанта не связана с содержанием в нем ЛВП.

Наличием этого фактора в крови можно объяснить то несоответствие, что в липидах, экстрагированных из крови при атеросклерозе содержание продуктов перекисного окисления увеличивается в 2—3 раза [1—3], ХЛ же сыворотки крови при этом изменяется незначительно или даже имеет тенденцию к снижению [16, 17]. Такое расхождение свидетельствует о том, что указанный фактор может быть нелипидной природы и не переходит поэтому в липидную фазу при экстракции.

Нельзя исключить, что фактор супернатанта является пептидом, низко- или среднемoleкулярным белком, поскольку обнаружено, что при фракционировании сыворотки крови собак и крыс на сефадексе G-200 фракция IV, содержащая полипептиды, ферменты, низко- и среднемoleкулярные белки, дает тушащий эффект, т. е. при добавлении к сыворотке крови снижает интенсивность ХЛ [18].

По действию на стандартную хемилюминесцирующую систему ЛВП₂ и ЛВП₃ несколько различаются. Так, если прирост ХЛ при добавлении ЛВП₂ к стандартной хемилюминесцирующей системе составляет в среднем $113 \pm 0,85\%$, то при добавлении ЛВП₃ — $117 \pm 4,86\%$, а прирост концентрации малонового диальдегида составляет соответственно $113 \pm 9,09$ и $104 \pm 1,47\%$. Таким образом, для ЛВП₂ по сравнению с ЛВП₃ прирост ХЛ меньше, а прирост концентрации малонового диальдегида больше.

При добавлении ЛВП₃ доноров и больных к стандартной хемилюминесцирующей системе отмечено, что по ХЛ-свойствам ЛВП₃ больных атеросклерозом ближе к ЛВП₂ доноров, т. е. прирост ХЛ меньше, а прирост концентрации малонового диальдегида больше, чем при добавлении ЛВП₃ доноров (см. таблицу). Это, по-видимому, обуслов-

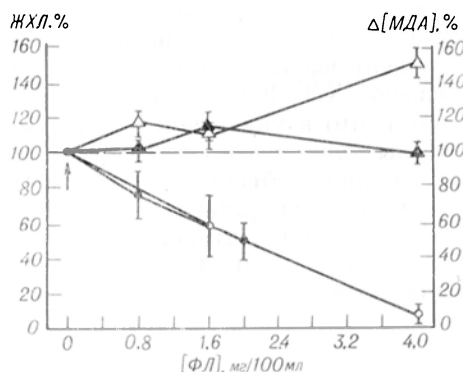


Рис. 4. Изменение ХЛ и накопление малонового диальдегида в стандартной хемилюминесцирующей системе (обозначена стрелкой) при добавлении супернатанта и ЛВП, выделенных ультрацентрифугированием.

1 и 2 — соответственно ХЛ и малоновый диальдегид супернатанта, 3 и 4 — то же ЛВП. По оси абсцисс: концентрация вводимых супернатанта или ЛВП в кювету по ФЛ, по оси ординат: справа — изменение прироста малонового диальдегида, слева — изменение ХЛ после введения соли двухвалентного железа. Величины стандартной хемилюминесцирующей системы приняты за 100%.

Изменение некоторых показателей липидного обмена и ХЛ сыворотки липопротееидов сыворотки крови доноров и больных с гиперхолестеринемией

Показатель	Доноры	Больные
ХЛ относительно стандартной хемилюминесцирующей системы при добавлении ЛВП ₃ , %	117±4,86	111±0,34*
Малоновый диальдегид относительно стандартной хемилюминесцирующей системы при добавлении ЛВП ₃ , %	104±1,47	107±0,99*
ХЛ ЛОНП+ЛНП, отн. ед.	33,7±4,64	40,7±5,42
ХС сыворотки, мг на 100 мл	167±20,1	233±19,8*
ХС ЛОНП+ЛНП, мг на 100 мл	144±16,8	147±20,3
ХС ЛВП ₃ , мг на 100 мл	12,6±4,60	29,8±16,27
ФЛ ЛВП ₃ , мг на 100 мл	61±5,06	61±4,74
Индекс ХС/ФЛ в ЛВП ₃	0,41±0,10	0,89±0,41

* $P < 0,05$ относительно показателя доноров.

лено тем, что у больных атеросклерозом имеются структурные перестройки, возможно, белковой оболочки липопротееидов, которые регистрируются с помощью ХЛ. Интересно отметить, что в организме животных с гиперхолестеринемией происходит облегчение липопротееидов с уменьшением их плотности [19]. Можно предположить, что при гиперхолестеринемии происходит как бы смещение свойств липопротееидов от ЛВП в сторону ЛОНП.

У больных атеросклерозом регистрируется статистически достоверное повышение общего ХС в сыворотке крови, что свидетельствует о наличии у них гиперхолестеринемии. Высота медленной вспышки ХЛ суммарной фракции ЛОНП и ЛНП, выделенных ультрацентрифугированием, у больных больше, чем у доноров, при этом уровень ХС в суммарной фракции у больных также выше, чем у доноров. Содержание ФЛ и ЛВП₃ доноров и больных примерно одинаковое; абсолютное и относительное содержание ХС в ЛВП₃ больных атеросклерозом больше, чем у доноров.

Итак, у апо-В ЛП, выделенных осаждением, и ЛНП и ЛОНП, полученных препаративным ультрацентрифугированием, ХЛ-свойства совпадают. Однако ЛОНП, обладающие ХЛ, вносят небольшой вклад в суммарную ХЛ апо-В ЛП вследствие низкой концентрации их в сыворотке крови. В сыворотке крови имеет место фактор, тушащий ХЛ и обладающий антиоксидантным свойством не липидной природы, остающейся в супернатанте после осаждения апо-В ЛП гепарином и кальцием. При атеросклерозе на фоне гиперхолестеринемии в ЛВП₃ наблюдаются изменения, по хемилюминесцентным свойствам характерные для фракции ЛВП₂ доноров. Авторы выражают глубокую благодарность А. С. Иванову за проведение анализов содержания холестерина и триглицеридов на автоанализаторе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ланкин В. З. — Кардиология, 1980, № 8, с. 42—47.
2. Калмыкова В. И. — Тер. арх., 1970, № 11, с. 43—48.
3. Ланкин В. З., Закирова А. И., Ахметова Б. Х. и др. — Кардиология, 1980, № 7, с. 96—98.
4. Владимиров Ю. А., Оленев В. И., Сулова Т. Б. — В кн.: Сверхслабое свечение плазмы крови в клинической диагностике. М., 1974, с. 6—34.
5. Фархутдинов Р. Р., Владимиров Ю. А. — Там же, с. 34—48.
6. Осис Ю., Формазук В. Е., Ланкин В. З. и др. — Вопр. мед. химии, 1982, № 1, с. 122—126.
7. Серкиз Я. И., Ковтун Т. В. — Физиол. ж., 1978, № 2, с. 271—274.
8. Burstein M., Samaille J. — Clin. chim. Acta, 1958, v. 3, p. 320—327.
9. Климов А. Н. — В кн.: Дислипидопроотеидемии и ишемическая болезнь сердца. М., 1980, с. 11—25.
10. Burstein M., Samaille J. — Clin. chim. Acta, 1960, v. 5, p. 609.
11. Климов А. Н., Никульчева Н. Г. — В кн.: Дислипидопроотеидемии и ишемическая болезнь сердца. М., 1980, с. 26—82.
12. Щербакова А. И., Перова Н. В., Карманский И. М. и др. — Вопр. мед. химии, 1981, № 1, с. 102—108.
13. Burstein M., Samaille J. — Presse méd., 1958, v. 43, p. 974—975.
14. Vaskowsky V. E., Latyshev N. A. — J. Chromatogr., 1975, v. 115, p. 246—249.
15. Владимиров Ю. А., Фархутдинов Р. Р., Молоденков М. Н. — Вопр. мед. химии, 1976, № 2, с. 216—223.
16. Журавлев А. И., Журавлева А. И. Сверхслабое свечение сыворотки крови и его значение в комплексной диагностике. М., 1975.
17. Сергиенко В. И., Щерстнев М. П. — Вопр. мед. химии, 1981, № 1, с. 108—112.

18. Малюгин Э. Ф., Владимиров Ю. А., Беляков Н. А. и др. — В кн.: Экспериментальные основы лечения печеночной недостаточности. М., 1975, с. 19—25.
19. Климов А. Н., Андреева Л. И., Попов А. В. — *Вопр. мед. химии*, 1982, № 1, с. 131—135.

Поступила 13.04.82

CHEMOLUMINESCENCE OF BLOOD SERUM LIPOPROTEINS OBTAINED BY MEANS OF ULTRACENTRIFUGATION AND PRECIPITATION WITH HEPARIN AND CALCIUM

Yu. M. Lopukhin, Yu. A. Vladimirov, M. N. Molodenkov, G. I. Klebanov, V. I. Sergienko, T. I. Torkhovskaya, Ya. M. Tchesnokova, A. V. Naumov, V. A. Maximov, M. P. Sherstnoev

Chair of Operative Surgery and Topographic Anatomy, Chair of Biophysics, N. I. Pirogov II Medical School, Moscow

Apo-B containing lipoproteins obtained after precipitation with heparin and calcium as well as very low (LPVLD) and low density lipoproteins (LPLD) produced using preparative scale ultracentrifugation had identical chemoluminescent properties. However, LPVLD are involved only slightly in total chemoluminescence of apo-B containing lipo-

proteins due to their low concentration in blood serum. In blood serum there is the factor having the quenching effect on the chemoluminescence and also exhibiting the antioxidant activity. Subfraction 3 of high density lipoproteins from patients with atherosclerosis differed from the analogous subfraction of donors by its chemoluminescent properties.

УДК 616.36-008.931:577.152.3]-074

М. Н. Приваленко, Т. В. Скобелева

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГЛИКОЗАМИНГЛИКАНГИДРОЛАЗ В ТКАНИ ПЕЧЕНИ

Центральный НИИ гастроэнтерологии, Москва

Одним из механизмов нарушения обмена основного вещества соединительной ткани при патологических состояниях, сопровождающихся развитием фиброза, служит изменение координированной деятельности лизосомальных гликозамингликангидролаз (ГАГ-гидролаз): гиалуронат-гликангидролазы, гиалуронидазы (ГГГ, КФ 3.2.1.35), β -глюкуронидаз (β -Гл, КФ 3.2.1.31) и N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы (β -НАГ, КФ 3.2.1.30). Уровень ГАГ-гидролаз характеризует высоту воспалительно-деструктивного процесса при диффузных поражениях печени, коррелирует с направленностью развития фиброза, а также служит целям уточнения механизмов новообразования соединительной ткани.

В предложенном нами ранее методе определения ГГГ в сыворотке крови [1] исключается эффект сопутствующих экзогликозидаз путем избирательного ингибирования β -Гл, что позволяет измерять истинную гиалуронидазную активность. В данном сообщении приводится описание этого способа, адаптированного для анализа ткани печени. При исследовании β -Гл и β -НАГ спектрофотометрическими методами предпочтительны *n*-нитрофенильные про-

изводные в качестве субстратов [2, 3]. Однако в известных способах определения активности указанных гидролаз используется избыточное количество субстрата и биологического материала [4—6]. В настоящей работе изучены и предложены оптимальные соотношения количества фермента и субстрата, что позволило значительно сократить их содержание в реакциях измерения активности ГАГ-гидролаз без потери чувствительности и воспроизводимости методов.

Методика

Использована ткань печени крыс-самцов массой 160—200 г. Животных забивали вскрытием полости сердца под гексеналовым наркозом; печень перфузировали 0,25 М раствором сахарозы на холоду, гомогенизировали при 1000 об/мин, в течение 1 мин 20 с. Исходный 10% гомогенат готовили на указанном растворе сахарозы с содержанием 0,001 М Na-соли ЭДТА (рН 7,4). При определении общей активности ГАГ-гидролаз гомогенат разводили до требуемой для каждого фермента концентрации и обрабатывали тритоном X-100 до конечного содержания 0,1%. Гомогенат готовили в день получения материала и хранили без потери ферментной активности в течение 2—3 нед при -20°C . Неседиментируемую активность измеряли в супернатанте, полученном центрифугированием исходного гомогената.

га при 105 000 g в течение 30 мин. Исследовали ткань печени интактных животных и крыс с необратимым циррозом печени, который вызывали подкожным введением 50% раствора CCl_4 в оливковом масле (0,1 мл на 100 г массы) 2 раза в неделю в течение 6 мес.

Определение ГГГ. За основу принята модификация химического метода [1, 7].

Для исследования общей активности ГГГ инкубационная смесь содержала 0,0032 M Na_2SO_4 гиалуроновой кислоты в 0,2 мл бидистиллированной воды (готовится перед опытом), 0,2 мл 0,3M ацетатного буфера pH 3,8, содержащего 0,45M NaCl , и 0,2 мл 2% гомогената, который готовили разведением исходного гомогената смесью 0,15M раствора NaCl и тритона X-100. К каждому опыту ставили контроль на фермент, к каждой серии опытов — контроль на реактивы и стандарт с содержанием 10 мкг N-ацетил-D-глюкозамина (НАГ) в объеме 0,3 мл (при использовании калибровочной кривой конечные результаты менее стабильны); неэнзиматический гидролиз субстрата был незначительным и не учитывался. Пробы инкубировали 18 ч при 37 °C, депротеинизировали нагреванием в кипящей водяной бане в течение 3 мин, центрифугировали 15 мин при 5000 об/мин. К 0,3 мл супернатанта прибавляли 0,8M тетраборат калия pH 9,6 до конечного pH 8,9, кипятили 3 мин, охлаждали, добавляли 2,0 мл реактива Эрлиха, инкубировали 20 мин при 37 °C, охлаждали, измеряли оптическую плотность при 586 или 545 нм. Активность ГГГ в общем гомогенате выражали в микромолях НАГ на 1 г ткани за 18 ч, удельную активность — в микромолях НАГ на 1 г белка за 18 ч. Концентрацию белка определяли методом Лоури.

При исследовании неседиментируемой активности ГГГ инкубационная смесь содержала 0,0016M субстрата в 0,2 мл бидистиллированной воды, 0,2 мл вышеуказанного буфера и 0,2 мл супернатанта. Далее ход анализа аналогичен определению общей активности фермента.

Определение β -Гл. Использовано сочетание двух методов с *p*-нитрофенил- β -D-глюкуронидом в качестве субстрата [5, 8].

Для исследования общей активности β -Гл инкубационная смесь содержала 1,2 мкM субстрата в 0,4 мл 0,1M ацетатного буфера pH 4,0 и 0,2 мл 0,062 % гомогената, который готовили разведением исходного 10% гомогената смесью тритона X-100 и указанного ацетатного буфера.

В данной и нижеописанной реакции к каждому опыту ставили контроль на фермент, к каждой серии опытов — контроль на реактивы; крайне незначительная экстинкция контроля на субстрат не учитывалась. Пробы инкубировали 4 ч при 37 °C, затем нагревали 2 мин в кипящей водяной бане, охлаждали, добавляли 2,5 мл 0,2M глицинового буфера pH 10,7. После 15 мин экспозиции в темноте измеряли экстинкцию против контроля на реактивы при 405 нм. Результаты рассчитывали: применением коэффициента молярной экстинкции *p*-нитрофенола, равного 18 500, и выжали в микромолях *p*-нитрофенола на 1 г ткани за 1 мин и на 1 г белка.

Определение неседиментируемой активности β -Гл аналогично исследованию общей активности за исключением состава инкубационной смеси, в которую брали 0,2 мл 0,25%

супернатанта. Последний получали центрифугированием исходного гомогената при 105 000 g, после чего надосадочную жидкость разводили до нужной концентрации ацетатным буфером. Результаты выражали в микромолях *p*-нитрофенола на 1 г ткани за 1 мин и на 1 г белка.

Определение β -НАГ. За основу приняты опубликованные методы с субстратом *p*-нитрофенил- β -D-глюкозаминидом [4, 9].

При измерении общей активности β -НАГ инкубационная смесь содержала 2,9 мкM субстрата в 0,5 мл 0,1M фосфатно-цитратного буфера pH 4,8, 0,4 мл указанного буфера и 0,1 мл 0,25% гомогената, который готовили из основного гомогената разведением смесью тритона X-100 и буфера. Пробы инкубировали 30 мин при 37 °C, добавляли 2 мл 0,25 M Na_2CO_3 и после 15 мин экспозиции в темноте измеряли оптическую плотность против контроля на реактивы при 400 нм. Активность фермента выражали в микромолях *p*-нитрофенола на 1 г ткани за 1 мин и на 1 г белка.

Для определения неседиментируемой активности инкубационная смесь содержала 0,7 мкM субстрата в 0,5 мл фосфатно-цитратного буфера, 0,4 мл указанного буфера и 0,1 мл 1% супернатанта, который получали центрифугированием исходного 10% гомогената и последующим разведением надосадочной жидкости буфером. Результаты выражали в микромолях *p*-нитрофенола на 1 г ткани за 1 мин, а также на 1 г белка.

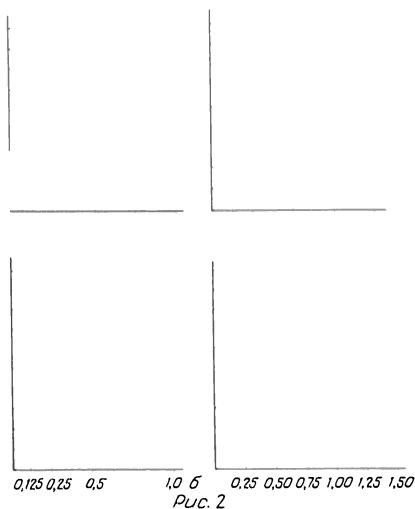


Рис. 1. Скорость гидролиза субстрата гиалуронидазой (А) и β -глюкуронидазой (Б) в зависимости от концентрации фермента.

По оси абсцисс: а — содержание белка (в мг); б — концентрация гомогената (в %). По оси ординат: А — скорость гидролиза (в мкM ГЛМ на 1 г ткани за 18 ч), Б — скорость гидролиза (в мкM *p*-нитрофенола на 1 г ткани за 1 мин).

Рис. 2. Скорость гидролиза субстрата β -НАГ в зависимости от количества фермента (А) и концентрации субстрата (Б).

По оси абсцисс: А: а — содержание белка (в мг) в инкубационной смеси, б — концентрация гомогената (в %), взятого в инкубационную смесь. Б — содержание субстрата в пробе (в мг). По оси ординат: скорость гидролиза (в мкM *p*-нитрофенола на 1 г ткани за 1 мин).

Результаты и обсуждение

С целью подбора оптимальных условий измерения активности ГАГ-гидролаз изучали влияние на скорость энзиматической реакции концентрации ферментного материала и субстрата. Как видно на рис. 1, А, скорость гидролиза субстрата ГГГ носит линейный характер при концентрации гомогената 1—4% (0,5—2,0 мг белка). Установлено также, что содержание гиалуроновой кислоты 0,8 мг в пробе является насыщающим при концентрации ферментного материала 2%.

Зависимость активности β-Гл от содержания гомогената (рис. 1, Б) была прямо пропорциональна при его концентрации 0,031—0,25% (0,015—0,125 мг белка) и количестве субстрата 0,39 мг в пробе. Исследование влияния содержания п-нитрофенилглюкуронида на скорость реакции показало, что его количество в пределах 0,195—0,78 мг в пробе было насыщающим при концентрации гомогената 0,062%.

Активность β-НАГ линейно возрастала (рис. 2, А) при содержании биологического материала 0,125—1,0% (0,031—0,125 мг белка). Концентрация субстрата 0,75—1,25 мг является насыщающей (рис. 2, Б), небольшое торможение ферментной активности наблюдалось при количестве субстрата 1,5 мг в пробе.

Таким образом, предлагаемые варианты методов исследования позволяют без потери их чувствительности при измерении активности ГГГ исключить сопутствующее действие β-Гл и в несколько раз уменьшить количество ферментного материала; последнее достигается также и в реакции определения β-Гл. Вариант способа измерения содержания β-НАГ дает возможность более чем вдвое уменьшить количество дефицитного субстрата.

Исследование с помощью вышеприведенных методов активности ГАГ-гидролаз в ткани печени интактных крыс дало результаты, близкие к приведенным в литературе [10, 11] (см. таблицу). В стадии цирроза удельная активность ГГГ, β-Гл и β-НАГ в общем гомогенате увеличивалась на 18,4, 43,9 и 97% соответственно. Одновременно наблюдалось резкое нарастание и неседиментируемой активности указанных гликозидаз, уровень которых достоверно превышал

Общая (А) и неседиментируемая (Б) активность ГАГ-гидролаз в ткани печени интактных крыс и при экспериментальном циррозе ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$)

Группа животных	ГГГ			β-Гл			β-НАГ		
	А	Б	Б/А	А	Б	Б/А	А	Б	Б/А
Контрольная	5,42±0,32 23,15±1,88 (5)	0,38±0,01 5,47±0,5 (5)	7,14±0,58 —	1,44±0,04 6,95±0,41 (14)	0,084±0,004 1,6±0,06 (8)	5,87±0,37 —	5,2±0,2 24,28±1,03 (10)	0,15±0,01 3,0±0,17 (12)	3,2±0,23 —
Крысы с циррозом печени	4,34±0,48 27,42±1,21 (7)	0,76±0,06* 19,84±0,74* (5)	18,42±1,99* —	1,51±0,22 10,0±1,32* (5)	0,24±0,01* 6,7±0,55* (7)	18,23±2,95* —	7,08±0,44* 47,83±2,56* (7)	0,31±0,02* 8,51±1,03* (7)	4,5±0,58 —

Примечание. Верхняя строка для А и Б — в микромолях на 1 г ткани, нижняя — в микромолях на 1 г белка. Б/А — процентное отношение неседиментируемой активности к общей, рассчитанных в микромолях на 1 г ткани. Звездочка — $P \leq 0,05$ в сравнении с контролем, в скобках — число животных.

контрольный. Так, удельная активность ГГ, β -ГЛ и β -НАГ в надосадочной фракции была увеличена на 263, 318,7 и 84,6% соответственно. Указанные изменения сопровождались выраженным увеличением проницаемости лизосомальных мембран (ПЛМ), о чем судили по процентному отношению неосаждаемой активности к общей, выраженных в микромолях на 1 г ткани. ПЛМ для ГГ, β -ГЛ и β -НАГ при циррозе оказалась увеличена в сравнении с контролем на 156, 210,5 и 40,6% соответственно. Таким образом, необратимая стадия токсического цирроза печени характеризуется увеличением общей и неседиментируемой активности ГАГ-гидролаз, а также увеличением проницаемости лизосомальных мембран для названных ферментов.

Предложенные варианты методов исследования ГАГ-гидролаз в ткани печени могут быть использованы в экспериментальной и клинической гепатологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Виха И. В., Приваленко М. Н., Хорлин А. Я. — *Вопр. мед. химии*, 1973, № 1, с. 90—95.
2. Szasz G. — *Clin. chim. Acta*, 1967, v. 15, p. 275—282.
3. Borooan J., Leaback D., Walker P. — *Biochem. J.*, 1961, v. 78, p. 106—110.
4. Weissmann B., Rowin G., Marshall J.

- et al. — *Biochemistry*, 1967, v. 6, p. 207—214.
5. Fishman W., Kato K., Anstiss C. et al. — *Clin. chim. Acta*, 1967, v. 15, p. 435.
6. Hutterer F. — *Biochim. biophys. Acta*, 1966, v. 115, p. 312—319.
7. Bonner W., Cantey E. — *Clin. chim. Acta*, 1966, v. 13, p. 746—752.
8. Jungalvala F., Robins E. — *J. biol. Chem.*, 1968, v. 243, p. 4258—4266.
9. Walker P., Woollen M., Pugh D. — *J. clin. Path.*, 1960, v. 13, p. 353—357.
10. Koizumi T., Suematsu T., Iwabori N. et al. — *Biochim. biophys. Acta*, 1978, v. 151, p. 628—636.
11. Koizumi T., Nakamura N., Iwabori N. et al. — *Ibid.*, 1969, v. 177, p. 486—491.

Поступила 19.03.82

ESTIMATION OF GLYCOSAMINOGLYCAN HYDROLASES IN LIVER TISSUE

M. N. Privalenko, T. V. Skobeleva

Central Research Institute of Gastroenterology, Moscow

Optimal enzyme/substrate ratios were studied to estimate the activity of lysosomal glycosaminoglycan (GAG) hydrolases in homogenate and supernatant fractions of liver tissue. The modified procedures enabled, without any loss in sensitivity, to decrease the amount of biological material in samples on estimation of hyaluronidase, β -glucuronidase and N-acetyl- β -D-hexosaminidase; concentration of substrate was also decreased in mixtures containing hexosaminidase. Under conditions of experimental cirrhosis total and, especially, non-sedimented activities of GAG-hydrolases as well as the rate of the enzymes penetration through lysosomal membranes were increased in liver tissue.

УДК 615.31:547.823].015.4:612.173.1.015.1

Н. Б. Полянский, Л. Д. Смирнов, А. А. Шведова, В. Е. Каган,
В. А. Ткачук

ИНГИБИРОВАНИЕ ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ ИЗ СЕРДЦА КРОЛИКА ОКСИПИРИДИНАМИ

МГУ им. М. В. Ломоносова, Институт химической физики АН СССР

Оксипиридины являются классом физиологически активных соединений, и в последнее время широко и успешно применяются в офтальмологической клинике, в терапии сосудистых заболеваний, для лечения геморрагий, ожогов и т. д. [1—5].

Эфиры основнозамещенных 3-окси-пиридинов проявляют антихолинэстеразную активность; синтезировано большое число производных 3-окси-пиридина, обладающих бактерицидной и противолучевой активностью [6, 7]. Производные 3-оксипиридина приме-

няются также в качестве антидепрессантов [8]. Тиосемикарбазоны 2- и 6-формил-3-оксипиридинов проявили высокую антилейкемическую активность в эксперименте и при клинических испытаниях [9]. Столь широкая область применения производных 3-оксипиридина указывает на то, что они могут влиять на важные универсальные механизмы регуляции функциональной и метаболической активности клеток.

В работах японских и американских исследователей было показано, что некоторые производные пиридина ин-

гибируют фосфодиэстеразу циклических нуклеотидов [10, 11]. С другой стороны, 3-оксипиридины являются ингибиторами перекисного окисления липидов, причем установлена связь между их антирадикальной и радиозащитной активностью [12—16]. Наряду с окислением полиеновых жирных ацилов непосредственно в составе фосфолипидов, приводящим к образованию гидронперекисей фосфолипидов, в клетке протекают реакции окисления свободных полиеновых жирных кислот, конечными продуктами которого являются лейкотриены [17] и простагландины [18]. Регуляторное действие последних реализуется, как полагают, через систему циклических нуклеотидов [19].

Таким образом, эффекты 3-оксипиридинов могут быть обусловлены, во-первых, изменением содержания циклических нуклеотидов за счет их действия как ингибиторов фосфодиэстеразы и ингибиторов свободнорадикальных стадий синтеза простагландинов, катализируемых циклооксигеназой [20], и, во-вторых, их собственно антиоксидантным действием, т. е. предотвращением окисления фосфолипидов в биомембранах [1, 3, 12, 16, 21].

Для того чтобы выяснить, какие из этих механизмов действия 3-оксипиридинов реализуются в тех или иных физиологических условиях или терапевтических эффектах, необходимо иметь возможность сравнивать их антиоксидантные свойства со способностью ингибировать фосфодиэстеразу циклических нуклеотидов. Если антирадикальные и антиоксидантные свойства 3-оксипиридинов достаточно изучены, то действие 3-оксипиридинов на фосфодиэстеразу до сих пор практически не исследовано [22].

В настоящей работе исследовано действие 14 природных и синтетических производных пиридина, содержащих разные заместители как в кольце, так и в алифатической части молекулы и имеющих существенно разные антиоксидантные свойства, на активность Ca^{2+} -независимой фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов из сердца кролика (ФДЭ-II).

Методика

Ca^{2+} -независимую фосфодиэстеразу циклических нуклеотидов выделяли из сердца кролика по опубликованному методу [23]. Опре-

деление фосфодиэстеразной активности проводили по методу, описанному в работе [24].

10 мкл раствора ФДЭ-II (4,1—4,3 мкг белка) вносили в инкубационные пробы (конечный объем 50 мкл), содержащие 5 мМ MgCl_2 , 20 мМ трис- HCl (рН 8,0), от 10^{-6} до $1,6 \times 10^{-6}$ М цАМФ и 0,5 мкКи ^3H -цАМФ, 10^{-4} — 10^{-2} М исследуемого соединения. Водонерастворимые ингибиторы растворяли в этаноле (конечная концентрация которого в среде инкубации была 1,7 М). В контрольных пробах этанол присутствовал в той же концентрации. Инкубацию проводили в течение 5 мин при 37 °С. Реакцию останавливали нанесением 10 мкл инкубационной смеси на силуфоловую пластинку «Silufol UV-254» (ЧССР) в точки, в которые предварительно вносили в качестве свидетелей по 10 мкл раствора цАМФ и АМФ в концентрациях примерно 10^{-3} М. Продукты гидролиза разделяли хроматографией в смеси растворителей изопропанол — вода — аммиак в объемных соотношениях 7 : 2 : 1. Пятна нуклеотидов выявляли под ультрафиолетовым светом, вырезали, помещали во флаконы для определения радиоактивности, заливали 0,5 мл дистиллированной воды и оставляли элюироваться 40—60 мин. Потом в каждый флакон вносили по 5 мл диоксанового сцинтиллятора ЖС-8. Измерение радиоактивности проводили в сцинтилляционном счетчике «Mark-11» по каналу ^3H .

Эксперименты по установлению обратимости или необратимости действия ингибитора проводили следующим образом. Фосфодиэстеразу преинкубировали в среде, содержащей 5 мМ MgCl_2 , 10 мМ ингибитора, 20 мМ трис- HCl (рН 8,0) при 37 °С в течение 0—30 мин (объем 50 мкл); затем аликвоты (по 2 мкл) переносили в среду инкубации (состав см. выше). Содержание белка составляло 1,5—2,2 мкг в пробе, концентрация ингибитора — $4 \cdot 10^{-4}$ М. Инкубировали 15 мин при 37 °С, после чего измеряли фосфодиэстеразную активность описанным выше способом.

В работе использовали трис, ЭДТА, ДЭАЭ-целлюлозу, цАМФ и АМФ фирмы «Reanal», ^3H -цАМФ фирмы «Amersham» (Англия). Для сравнения с производными пиридина использовали известные ингибиторы фосфодиэстеразы изобутилметилксантин и теофиллин («Sigma») и природные аналоги производных пиридина — пиридоксаль (Научно-производственное объединение «Витамины»), пиридоксол и пиридоксальфосфат (Краснодарский комбинат биохимических и восстановительных препаратов). Остальные вещества — производства «Союзреактив». Производные пиридина синтезированы в Институте химической физики АН СССР. Методики синтеза и свойства этих веществ, а также их очистки описаны в работах [25—30]. В работе использовали производные пиридина с заместителями в различных положениях: 3-оксипиридин: 2— H , 3— OH , 4— H , 5— H , 6— H (I); 2-третбутил-3-оксипиридин: 2— $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, 3— OH , 4— H , 5— H , 6— H (II); 2,6-диметил-3-оксипиридин: 2— CH_3 , 3— OH , 4— H , 5— H , 6— CH_3 (III); 2-третбутил-6-метил-3-оксипиридин: 2— $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, 3— OH , 4— H , 5— H , 6— CH_3 (IV); 2-этил-6-метил-3-оксипиридин: 2— C_2H_5 , 3— OH , 4— H , 5— H , 6— CH_3 (V); 2-фенил-3-оксипиридин: 2— C_6H_5 , 3— OH , 4— H , 5— H , 6— H (VI); 2-бензил-3-оксипиридин: 2— $\text{CH}_2\text{—C}_6\text{H}_5$, 3— OH , 4— H , 5— H , 6— H (VII); 6-метокси-2-фенил-3-окси-

пиридин: 2—C₆H₅, 3—ОН, 4—Н, 5—Н, 6—О—СН₃ (VIII); 6-метокси-2-бензил-3-оксипиридин: 2—СН₂—С₆H₅, 3—ОН, 4—Н, 5—Н, 6—О—СН₃ (IX); 3-аминопиридин: 2—Н, 3—Н₂, 4—Н, 5—Н, 6—Н(Х); 2,4,6-триметилпиридин: 2—СН₃, 3—Н, 4—СН₃, 5—Н, 6—СН₃ (XI); пиридоксол: 2—Н, 3—СН₂ОН, 4—СН₂ОН, 5—ОН, 6—СН₃; пиридоксальфосфат: 2—Н, 3—СН₂—О—Н₂РО₃, 4—СНО, 5—ОН, 6—СН₃; пиридоксаль: 2—Н, 3—СН₂ОН, 4—СНО, 5—ОН, 6—СН₃. Белок определяли по методу Лоури [31].

Результаты и обсуждение

Для оценки эффективности ингибиторов ФДЭ-II использовали величину K_{0,5}, значение которой для каждого ингибитора определялось такой его концентрацией, при которой эффект торможения составлял 50% от эффекта торможения при той концентрации ингибитора, дальнейшее увеличение которой не приводило к усилению ингибирования.

Как видно из таблицы, практически все производные 3-оксипиридина (кроме него самого) ингибируют ФДЭ-II из сердца кролика, причем эффективность производных 3-оксипиридина не коррелирует с их антирадикальной активностью (характеризуемой величиной K₇ — константой скорости реакции ингибитора с перекисными радикалами), а также гидрофобностью, характеризующей коэффициентом распределения (Р) в системе октанол — вода.

Производные 3-оксипиридина обратимо ингибируют ФДЭ. На рис. 1 вид-

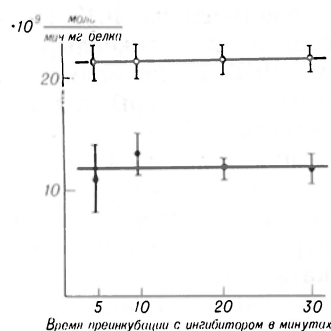


Рис. 1. Влияние времени преинкубации фермента с ингибитором на активность фермента. Соединение VIII ($4 \cdot 10^{-4}$ М) в среде инкубации.

1 — фермент преинкубировали без ингибитора; 2 — с ингибитором.
По оси ординат — активность ферментов (в моль · мг белка⁻¹ · 10⁻⁹); по оси абсцисс — время преинкубации с ингибитором (в мин).

но, что эффект торможения ферментативной активности не развивается во времени (представлены результаты для соединения VIII). Другие производные 3-оксипиридина действуют аналогичным образом.

Результаты, приведенные в таблице, показывают, что ингибирующее действие производных 3-оксипиридина проявляется сильнее при большей концентрации субстрата. Из этого следует, что производные 3-оксипиридина являются неконкурентными ингибиторами ФДЭ. Физиологический предшественник пиридоксала и пиридоксальфосфата — пиридоксол (витамин В₆) обладает незначительным ингиби-

Торможение ФДЭ циклических нуклеотидов производными пиридина, их антирадикальная активность и гидрофобность

Соединение	K ₇ · 10 ⁻⁴ моль ⁻¹ · с ⁻¹ [14, 16]	Р [39]	K _{0,5} (М); [цАМФ] = = 10 ⁻⁵ М	K _{0,5} (М); [цАМФ] = = 10 ⁻⁶ М	Остаточная активность при максимальной концентрации ингибитора (М), в % по отношению к контролю	
I	0,1	2,9	—	—	Нет эффекта	
II	4,2	245	1,3 · 10 ⁻⁴	4,0 · 10 ⁻⁴	63 ± 1	10 ⁻²
III	6,5	4,5	10 ⁻³	5 · 10 ⁻³	65 ± 10	10 ⁻²
IV	3,4	449	4,0 · 10 ⁻⁴	10 ⁻³	20 ± 3	10 ⁻²
V	8,5	12,4	1,3 · 10 ⁻⁴	1,6 · 10 ⁻⁴	32 ± 3	10 ⁻²
VI	1,5	—	1,3 · 10 ⁻⁴	3,2 · 10 ⁻⁴	55 ± 3	10 ⁻²
VII	0,6	—	8,0 · 10 ⁻⁴	—	75 ± 1	10 ⁻³
VIII	—	—	4,0 · 10 ⁻⁴	6,3 · 10 ⁻⁴	35 ± 2	10 ⁻²
IX	62,5	—	2,5 · 10 ⁻⁴	3,2 · 10 ⁻⁴	65 ± 15	5 · 10 ⁻³
X	—	—	5 · 10 ⁻⁴	4 · 10 ⁻³	55 ± 3	10 ⁻²
XI	—	—	4 · 10 ⁻⁴	6,3 · 10 ⁻³	40 ± 3	10 ⁻²
Пиридоксол	—	—	10 ⁻⁴	2,5 · 10 ⁻⁴	50 ± 3	10 ⁻²
Пиридоксаль	—	—	—	—	Нет эффекта	
Пиридоксальфосфат	—	—	—	—	Нет эффекта	
Теofilлин	—	—	1,3 · 10 ⁻³	1,3 · 10 ⁻³	20 ± 3	10 ⁻²
Изобутил-метилксантин	—	—	2,5 · 10 ⁻⁵	2,5 · 10 ⁻⁵	10 ± 1	10 ⁻³

рующим действием на ФДЭ-II, а сами пиридоксаль и пиридоксальфосфат ингибиторами ФДЭ-II не являются.

Из данных литературы известно, что Ca^{2+} -независимая фосфодиэстераза циклических нуклеотидов имеет двухфазную кинетику [32—35]. Существует предположение, что у этой формы ФДЭ есть центр связывания цАМФ, отличный от каталитического [34, 35]. При повышении концентрации субстрата в среде инкубации до некоторого уровня цАМФ начинает связываться с этим регуляторным центром, в результате чего изменяется конформация фермента и активируется гидролиз цАМФ.

В соответствии с другим предположением, аномальная кинетика Ca^{2+} -независимой ФДЭ обусловлена наличием двух форм этого фермента с высоким и низким родством к цАМФ [36, 37], разделения которых добиться не удалось.

Как видно на рис. 2, гидролиз цАМФ ФДЭ-II из сердца кролика протекает по немихаэлисовской кинетике. Он показывает также, что при более высоких концентрациях субстрата соединение V оказывает более выраженное ингибирующее действие, чем при низких, что полностью соответствует данным, приведенным в таблице.

Из кинетических кривых, представленных на рис. 2, видно, что в присутствии ингибитора кинетическая кривая имеет тот же характер, что и в его отсутствие, однако нарастание активности фермента наступает при более высоких концентрациях фермента по сравнению с контролем. Поскольку характер кинетической кривой в при-

сутствии ингибитора не меняется, из результатов эксперимента нельзя сделать вывод, объясняется ли более выраженное ингибирование при более высокой концентрации субстрата наличием 2 форм фермента, из которых форма ФДЭ-II с меньшим сродством к цАМФ более чувствительна к ингибирующему действию 3-оксипиридинов, чем «высокоаффинная» форма фермента, или тем, что 3-оксипиридины имеют большее сродство к цАМФ-связывающему участку фермента, чем к каталитическому.

Ингибирование ФДЭ 3-оксипиридинами нельзя объяснить их антиоксидантным действием, так как антиоксидантные свойства производных 3-оксипиридина не коррелируют с их ингибирующим действием на ФДЭ (см. таблицу). Сходные результаты получены в работе [38], в которой исследовалось действие производных токоферола на ФДЭ. Авторы считают, что ингибирование ФДЭ производными токоферола связано с наличием у них метильных групп, а не с антирадикальной активностью.

Оксигруппы в составе 3-оксипиридинов также не являются ответственными за эффект ингибирования ФДЭ-II, так как 3-оксипиридин не эффективен как ингибитор ФДЭ-II, а 3-аминопиридин и 2,4,6-триметилпиридин, не содержащие оксигруппы, тормозят активность ФДЭ.

Панасенко и соавт. исследовано влияние производных 3-оксипиридина на активность дыхательной цепи митохондрий и установлено, что чем выше коэффициент распределения R для производных 3-оксипиридина в системе октанол — вода, т. е. чем выше гидрофобность этих веществ, тем они эффективнее ингибируют НАД·Н-оксидазу [39]. В наших экспериментах подобная корреляция отсутствует, однако из данных таблицы видно, что полярные заместители снижают эффективность производных 3-оксипиридина как ингибиторов ФДЭ.

С другой стороны, показано, что и при наличии полярных заместителей в составе молекулы пиридина (карбок- сильных или амидных) наблюдается выраженное ингибирование ФДЭ-II [22].

При изучении механизма бактериостатического действия 3-оксипиридинов показано, что они являются специфическими ингибиторами клеточного деле-

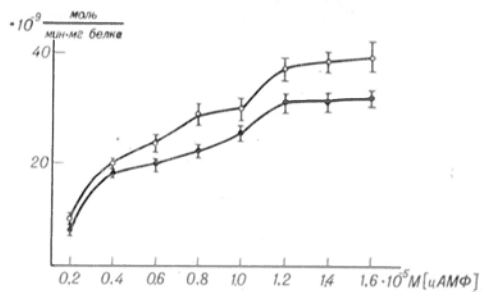


Рис. 2. Влияние субстрата в различных концентрациях на ингибирующее действие соединения V (10^{-3} М).

1 — активность в отсутствие ингибитора, 2 — в его присутствии.
По оси ординат — активность фермента (в моль · X · мин⁻¹ · мг белка⁻¹ · 10^{-3}); по оси абсцисс — концентрация цАМФ (в 10^{-5} М).

ния, избирательно блокируя системы, ответственные за синтез и эффекты инозита и пантотеновой кислоты [40]. В то же время известно, что цАМФ также тормозит деление клеток [41]. Следовательно, ингибирование ФДЭ циклических нуклеотидов 3-оксипиридинами может служить объяснением этому физиологическому эффекту.

ЛИТЕРАТУРА

- Бурлакова Е. Б., Алесенко А. В., Молочкина Е. М. и др. — Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте. М., 1975, с. 71—73.
- Шумаков В. И., Цыпин А. Б., Кургина Р. М. и др. — Кровообращение, 1977, № 2, с. 55—57.
- Etanuel N. M. — Quart. Rev. Biophys., 1976, v. 9, p. 283—308.
- Эмануэль Н. М., Обухова Л. К., Смирнов Л. Д. и др. — Докл. АН СССР, 1976, т. 226, № 4, с. 961.
- Philippe Jean (Ferlux) — Пат. ФРГ, 2205194 (1972) — Chem. Abstr., 1972, v. 7, p. 15194e.
- Stempel A., Aeschmann J. A. — J. Am. Chem. Soc., 1952, v. 74, p. 3323—3326.
- Shimamoto T., Ischihava M., Inoe M. et al. — Пат. Японии, 7001, 185 (1970) — Chem. Abstr., 1971, v. 74, p. 53553S.
- Kawazu M., Seto M., Watanabe M. Пат. Японии, 7102, 091 (1971). — Chem. Abstr., 1971, v. 74, p. 99885e.
- Blanz E., French F. A. — Cancer Res., 1968, v. 28, p. 2419.
- Skidmore I. F., Schonhofer P. S., Kritchevsky D. — Pharmacology, 1971, v. 6, p. 330—338.
- Shimoyama M., Kawai M., Hoshi Y. et al. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1972, v. 49, p. 1137—1141.
- Бурлакова Е. Б., Эмануэль Н. М. — Докл. АН СССР, 1960 т. 135, № 3, с. 599—602.
- Эмануэль Н. М., Круглякова К. Е., Захарова Н. А. и др. — Там же, 1960, т. 131, № 6, с. 1451—1453.
- Круглякова К. Е., Николаева Н. В., Захарова Н. А. и др. — Там же, 1964, т. 157, № 4, с. 979—981.
- Захарова Н. А., Кузьмин В. И., Круглякова К. Е. и др. — Изв. АН СССР, Серия хим., 1977, № 5, с. 1013—1016.
- Бурлакова Е. Б., Храпова Н. Г., Штолько В. Н. и др. — Докл. АН СССР, 1966, т. 169, № 3, с. 688—691.
- Samuelsson B. — Tends Pharmacol. Sci., 1980, v. 1, p. 227—230.
- Monkade S., Vane J. R. — Pharmacol. Rev., 1979, v. 30, p. 293—322.
- Мецлер Д. Биохимия. Химические реакции в жидкой клетке. М., 1980, т. 2, с. 553.
- Dewhirst F. E. — Prostaglandins, 1980, v. 20, p. 209—222.
- Шуляковская Т. С., Аршинов В. Ю., Пахомов В. Ю. и др. — Докл. АН СССР, 1980, т. 254, № 1, с. 242—245.
- Samir Amer M., Kreighbaum W. E. — J. pharm. Sci., 1975, v. 64, p. 1—37.
- Ткачук В. А., Лазаревич В. Г., Меньшиков М. Ю. и др. — Биохимия, 1978, т. 43, № 9, с. 1622—1629.
- Лазаревич В. Г., Ткачук В. А. — Докл. АН СССР, 1979, т. 246, № 2, с. 492—494.
- Urbanski T. — J. Chem. Soc., 1946, p. 1104.
- Urbansky T. — Ibid., 1947, p. 132.
- Heinert D., Martell A. E. — Tetrahedron, 1958, v. 3, p. 49—61.
- Смирнов Л. Д., Лезина В. П., Быстров В. Ф. и др. — Изв. АН СССР, Серия хим., 1965, № 10, с. 1836—1844.
- Смирнов Л. Д., Шолкина С. И., Круглякова К. Е. и др. — Там же, 1963, № 5, с. 890—892.
- Смирнов Л. Д. — Изв. Сибир. орг. АН СССР, Серия хим., 1981, вып. 1, № 2, с. 68—80.
- Lowry D. H., Rosenbrough N. J. et al. — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265.
- Hardman J. G., Sutherland E. W. — Ibid., 1965, v. 240, p. 3704—3705.
- Brooker G., Thomas L., Appleman M. M. — Biochemistry (Wash.), 1968, v. 7, p. 4177—4181.
- van Inwegen R. G., Pledger W. J., Strada S. J. et al. — Arch. Biochem., 1976, v. 176, p. 700—709.
- Gardner E. A., Thompson W. — J. Biochem., 1978, v. 17, p. 2995—3000.
- Endress R. — Phytochemistry, 1979, v. 18, p. 15—20.
- Yamazaki A., Sen I., Bitensky M. W. — J. biol. Chem., 1980, v. 255, p. 11619—11624.
- Schroeder J. — Biochim. biophys. Acta, 1974, v. 343, p. 173—181.
- Панасенко О. М., Гендель Л. Я., Круглякова К. Е. и др. — Изв. АН СССР, Серия биол., 1981, № 4, с. 607—610.
- Одинцова Е. Н. — Докл. АН СССР, 1967, т. 176, с. 717—718.
- Cho-Chung Y. S. — Cancer Res., 1974, v. 34, p. 3492—3496.

Поступила 17.04.82

INHIBITION OF CYCLIC NUCLEOTIDE PHOSPHODIESTERASE FROM RABBIT HEART BY HYDROXYPYRIDINES

N. B. Polyansky, L. D. Smirnov, A. A. Shvedova, V. E. Kagan, V. A. Tkachuk

M. V. Lomonosov State University, Institute of Chemical Physics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

3-Hydroxypyridines, which are inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase, affected reversibly and non-competitively the enzyme molecule as compared with cAMP. A number of substances was found exhibiting high inhibitory and antioxidant activities, high inhibitory and low antioxidant activities, as well as low inhibitory and high antioxidant activities. Elucidation of the 3-hydroxypyridines action via antioxidant or phosphodiesterase pathways became possible.

А. Т. Иващенко, К. Р. Утеулин, И. А. Бушнев, Т. Ли

КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНИОННОЙ АДЕНОЗИНТРИФОСФАТАЗЫ ЭРИТРОЦИТОВ

Институт зоологии АН Казахской ССР, Алма-Ата

После обнаружения аниончувствительной АТФ-азы в эритроцитах млекопитающих [1, 2] были изучены свойства фермента в растворимом и мембраносвязанном состояниях [3—9]. Результаты этих исследований показывают, что анионная АТФ-аза эритроцитов во многом сходна с АТФ-азой митохондрий. Отмечалась одинаковая специфичность ферментов к анионам, подобным образом изменялись при переводе из мембраносвязанной в растворимую форму такие их свойства, как термостабильность, чувствительность к анионам, дициклогексилкарбодимиду (ДЦКД) и т. д. Для выяснения физиологической функции анионной АТФ-азы эритроцитов необходимо изучение механизма влияния анионов на фермент. В проведенной недавно работе показано [10], что анионы действуют на митохондриальную АТФ-азу в соответствии с ранее предложенным механизмом [11]. Поскольку анионная АТФ-аза эритроцитов представляет наиболее типичный фермент плазматических мембран (ПМ), мы исследовали ее кинетические свойства и с целью установления степени соответствия механизмов влияния анионов на АТФ-азы ПМ и митохондрий.

Методика

Мембраны эритроцитов крысы получали по описанной методике [1]. Суспензию мембран озвучивали в течение 1 мин в 50 мМ трис- H_2SO_4 буфере pH 7,4 на ультразвуковом дезинтеграторе VD-11 в режиме 1. Полученный препарат мембранных везикул использовали в опытах, Mg^{2+} -АТФ-азную активность измеряли при 37°C в 50 мМ трис- H_2SO_4 буфере pH 7,4 с 3 мМ MgCl_2 , 3 мМ АТФ и выражали, в микромолях Φ_{II} отщепленного в час 1 мг белка. Активность Na^+ , K^+ -АТФ-азы определяли в этой же среде с добавлением 120 мМ NaCl и 30 мМ KCl , а Ca^{2+} -АТФ-азную активность измеряли при концентрации кальция 0,5 мМ. Фосфор и белок определяли по описанным методикам [12, 13].

Результаты и обсуждение

Проведение кинетических исследований анионной АТФ-азы на мембранах эритроцитов было затруднено

ввиду наличия в них Na^+ , K^+ - и Ca^{2+} -АТФ-аз [4, 9]. Озвучивание мембран приводило к повышению активности анионной АТФ-азы и вызывало инактивацию Na^+ , K^+ - и Ca^{2+} -АТФ-аз, что контролировали по чувствительности мембранных везикул к соответствующим ионам-активаторам.

У АТФ-азы озвученных мембран заметно повышалась чувствительность к анионам, что выражалось в уменьшении констант активации для сульфита, бикарбоната и константы ингибирования для тиоцианата. Широкий ряд неорганических анионов по влиянию на активность АТФ-азы эритроцитов делится на 3 группы: стимулирующие, ингибирующие и индифферентные [3, 9]. Наиболее типичными представителями каждой из этих групп являются соответственно ионы сульфита, тиоцианата и хлора, которые мы использовали в дальнейших опытах.

Из данных, приведенных на рис. 1, следует, что анионы тиоцианата конкурентно по отношению к сульфиту ингибировали активность АТФ-азы. Такой же характер их взаимодействия на-

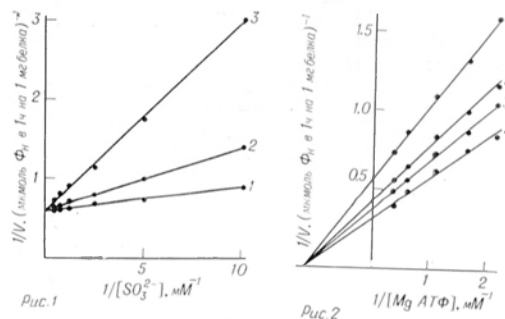


Рис. 1. Зависимость активности анионной АТФ-азы эритроцитов от концентрации сульфита без тиоцианата (1) и в его присутствии в концентрациях 5 мМ (2) и 10 мМ (3) в координатах Лайнуивера — Берка.

Рис. 2. Зависимость активности анионной АТФ-азы эритроцитов от концентрации АТФ в присутствии 10 мМ тиоцианата (1), 30 мМ хлор-аниона (2), 30 мМ бикарбоната (3) и 30 мМ сульфита (4) в координатах Лайнуивера — Берка.

блюдался с митохондриальной АТФ-азой [10].

По отношению к истинному субстрату Mg АТФ активирующие и ингибирующие анионы неконкурентно угнетали активность фермента (рис. 2), т. е. константа Михаэлиса, равная 0,83 мМ, не менялась в присутствии испытанных анионов. АТФ-азу митохондрий эти анионы ингибировали тоже неконкурентно по отношению к Mg АТФ при изменении концентрации магния или АТФ [10]. Такой характер влияния анионов на гидролиз АТФ соответствует предложенному механизму [11].

Известно, что АДФ конкурентно к АТФ ингибирует АТФ-азную активность митохондрий. Основываясь на этих и приведенных выше данных следует ожидать неконкурентного действия анионов по отношению к АДФ. Действительно, результаты опытов показывают (рис. 3, а), что АДФ неконкурентно по отношению к тиоцианату, хлору и сульфиту угнетал гидролиз АТФ. АТФ-азу субмитохондриальных частиц клеток печени АДФ ингибировал тоже неконкурентно по отношению к анионам. Следовательно, имеется хорошее соответствие в этих свойствах АТФ-аз эритроцитов и митохондрий.

Ионы кальция обычно ингибируют активность анионных АТФ-аз эритроцитов и митохондрий [9, 11], наблюдаемую в присутствии магния. Результаты наших экспериментов свидетельствуют о том, что сульфит и тиоцианат не изменяют константу ингибирования для Ca^{2+} (рис. 3, б). Это говорит о неконкурентном действии на АТФ-азу анионов и кальция. Такой же характер взаимодействия кальция и анионов на-

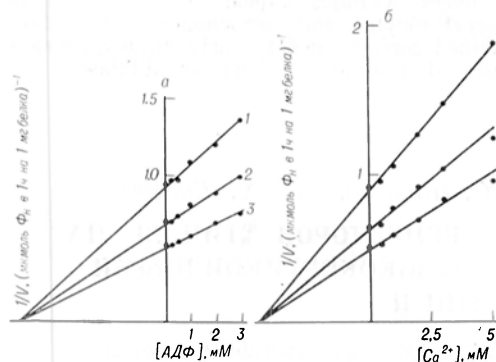


Рис. 3. Влияние АДФ (а) и кальция (б) в различных концентрациях на АТФ-азную активность мембран эритроцитов в присутствии 10 мМ тиоцианата (1), 10 мМ хлор-аниона (2) и 10 мМ сульфита (3).

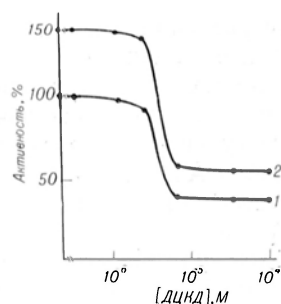


Рис. 4. Влияние ДЦКД на АТФ-азную активность мембран эритроцитов в присутствии 10 мМ хлор-аниона (1) и 10 мМ сульфита (2).

блюдался с АТФ-азой митохондрий.

АТФ-азы эритроцитов и митохондрий сходны и по чувствительности к ДЦКД, соединению довольно специфически угнетающему активность митохондриальной АТФ-азы. ДЦКД ингибировал примерно в равной степени Mg^{2+} , Mg^{2+} , HCO_3^- и Mg^{2+} и Mg^{2+} , SO_3^{2-} -АТФ-азы (рис. 4) [8, 11].

Изучение термодинамических характеристик АТФ-азной реакции, катализируемой мембранами эритроцитов, показало (рис. 5), что анионы существенно изменяют энергию активации (E_a). Так, в присутствии 10 мМ Cl^- ход температурной зависимости реакции гидролиза АТФ претерпевал излом при 31 °С и энергия активации выше и ниже этой температуры составляла 6,6 и 18,6 ккал/моль. Сульфит соответственно повышал E_a до 8,6 и 21,2 ккал/моль, а тиоцианат снижал ее значение до 4,4 и 17,0 ккал/моль. Следовательно, анионы существенно влияют на энергию активации АТФ-азной реакции, причем стимулирую-

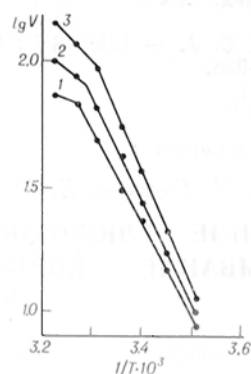


Рис. 5. Температурная зависимость АТФ-азной активности мембран эритроцитов в присутствии 10 мМ тиоцианата (1), 10 мМ хлор-аниона (2) и 10 мМ сульфита (3).

щие анионы увеличивают, а ингибирующие уменьшают значение E_a . Исходя из общепринятых представлений, соединения, изменяющие энергию активации многоступенчатой реакции (которой является АТФ-азная), влияют на лимитирующую стадию всего процесса [14]. Аналогичный характер действия анионов на энергию активации наблюдался с АТФ-азой субмитохондриальных частиц клеток печени. Таким образом, и по этому свойству анионные АТФ-азы эритроцитов и митохондрий близки друг к другу.

Как отмечалось выше, физиологическая функция анионной АТФ-азы эритроцитов неясна. Возможно, что этот фермент участвует в транспорте анионов через клеточную мембрану. Близкое сходство свойств ферментов митохондрий и эритроцитов дает основание говорить об участии АТФ-азы в процессе мембранного фосфорилирования. Не исключено, что обе предполагаемые функции выполняются ферментом одновременно. Для выяснения этой важной проблемы необходимы дальнейшие исследования.

Результаты проведенных в настоящей работе кинетических исследований анионной АТФ-азы эритроцитов, во-первых, подтверждают предложенный ранее механизм действия анионов на активность АТФ-аз, и, во-вторых, демонстрируют сходство механизмов влияния анионов на гидролиз АТФ ферментами эритроцитов и митохондрий, т. е. свидетельствуют об его универсальности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иващенко А. Т., Рыскулова С. Т. — *Вопр. мед. химии*, 1975, т. 21, с. 492—494.
2. Duncan C. J. — *Life Sci.*, 1975, v. 16, p. 955—966.

3. Izutsu K. T., Madden P. R., Watson E. et al. — *Pflüg. Arch.*, 1977, Bd 369, S. 119—124.
4. Amelsvoort J. M. M., Hoof P. M. K. B., Pont J. J. H. H. M. et al. — *Biochim. biophys. Acta*, 1978, v. 507, p. 83—93.
5. Au K. S. — *Int. J. Biochem.*, 1979, v. 10, p. 687—689.
6. Au K. S. — *Ibid.*, 1980, v. 12, p. 583—589.
7. Иващенко А. Т. — *Биохимия*, 1978, т. 43, с. 1086—1089.
8. Иващенко А. Т. — *Вопр. мед. химии*, 1980, т. 26, с. 668—671.
9. Бушневая И. А., Иващенко А. Т. — *Изв. АН КазССР. Серия биол.*, 1981, № 4, с. 23—26.
10. Утеулин К. Р., Иващенко А. Т. — *Биохимия*, 1982, т. 47, с. 20.
11. Иващенко А. Т. Анионные аденозинтрифосфатазы. *Алма-Ата*, 1982.
12. Deniges G. — *C. R. Soc. Biol.*, 1921, v. 84, p. 875—879.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al. — *J. biol. Chem.*, 1951, v. 193, p. 265—275.
14. Яковлев В. А. Кинетика ферментативного катализа. *М.*, 1965.

Поступила 26.04.82

KINETIC PARAMETERS OF ANION ADENOSINE TRIPHOSPHATASE OF ERYTHROCYTES

A. T. Ivaschenko, K. P. Uteulin, I. A. Bushneva, T. Li

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

Effect of anions on kinetic properties of ATPase from rat erythrocyte membranes was studied. The ATPase activity was competitively inhibited by thiocyanate in mixtures containing sulfite. Thiocyanate, chlorine-anion, bicarbonate and sulfite affected noncompetitively the enzymatic activity as compared with Mg^{2+} -ATP, ADP and calcium. Dicyclohexylcarbodiimide inhibited similarly Mg^{2+} - and Mg^{2+} , SO_3^{2-} -ATPase activities of membranes. Effect of anions on kinetic parameters of anion-dependent ATPases appears to be analogous in erythrocytes and mitochondria; the data obtained corresponded to early proposed hypothesis of the anion effect on ATPases.

УДК 615.357.453.015.44

П. П. Голиков, Е. Г. Кириллова, Н. Ю. Николаева, Р. Х. Енелесв

ВЛИЯНИЕ ГЛЮКОКОРТИКОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ТИПА III НА СВЯЗЫВАНИЕ КОРТИКОСТЕРОНА ГЛЮКОКОРТИКОИДНЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ ТИПА II

НИИ скорой помощи им. Н. В. Склифосовского, Минздрава РСФСР, Москва

В механизме действия глюкокортикоидов важное место отводится цитоплазматическим глюкокортикоидным рецепторам. Они принимают участие в транс-

локации стероидов в ядро клетки и в реализации глюкокортикоидного эффекта на уровне ДНК [1, 2]. Обнаружено несколько типов глюкокортикоид-

ных рецепторов [3]. Однако только рецепторы, специфически связывающие наряду с природными и синтетические глюкокортикоиды (дексаметазон, ацетонид триамцинолона), являются истинными глюкокортикоидными рецепторами [4]. Другие глюкокортикоидные рецепторы, в том числе и глюкокортикоидные рецепторы тип III, хотя и связываются с природными глюкокортикоидами, не способны транслоцировать гормон в ядро клетки [4]. Биологическая роль последних изучена недостаточно. Немногочисленные работы свидетельствуют о возможной роли глюкокортикоидных рецепторов тип III в поддержании внутриклеточного уровня глюкокортикоидов [5] и истинных глюкокортикоидных рецепторов II [6].

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния глюкокортикоидных рецепторов тип III на связывание кортикостерона истинными глюкокортикоидными рецепторами тип II цитозоля печени и тимуса адреналэктомированных крыс.

Методика

Исследование проведено на 12 адреналэктомированных за 4 сут до опыта крысах-самцах линии Вистар (100—120 г). В работе использованы $1,2,6,7^3\text{H}$ -кортикостерон (80 Ки/ммоль), $1,2,4^3\text{H}$ -ацетонид триамцинолона (22 Ки/ммоль) фирмы «Амершам» (Англия), немеченый кортикостерон фирмы «Калбиохем» (США) и немеченый ацетонид триамцинолона фирмы «Сигма» (США). Получение цитозоля и выявление связывания кортикостерона и ацетонида триамцинолона рецепторами печени и тимуса проводили по опубликованному методу [4] с некоторыми дополнениями. На всех этапах исследования соблюдали строгий температурный режим (0—4 °C). Перед экстирпацией тимуса и печени последние промывали через нижнюю полую вену 50 мл фосфатного буфера (6,5 мМ, pH 7,4), содержащего 150 мМ хлорида натрия. Гомогенизацию ткани проводили в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком со скоростью 1000 об/мин (2 раза по 3 хода с интервалами в 30 с). Соотношение ткани и буфера для печени составило 1:2, для тимуса — 1:4. Для гомогенизации и последующих этапов реакции конкурентного связывания использовали буфер, содержащий трис-HCl—10 мМ; ЭДТА—1,5 мМ; дитиотриетол—0,5 мМ pH 7,4 [7]. Гомогенат центрифугировали в центрифуге ВАК-601 (ГДР) на угловом роторе (8×10 мл) при 110 000 g в течение часа. После центрифугирования удаляли верхний слой липидов, осторожно отсасывали супернатант (цитозоль), который использовали в последующей работе для связывания глюкокортикоидов.

Белок в цитозоле определяли по методу Лоури [8]. В пробирки вносили по 100 мкл

цитозоля, содержащего 200—300 мкг белка, меченый ацетонид триамцинолона (или кортикостерон) в 100 мкл буфера в возрастающих концентрациях от $0,25$ — $4,0 \cdot 10^{-8}$ М без добавления немеченого стероида и, для выявления неспецифического связывания, с добавлением 200-кратного избытка немеченого соответствующего гормона в 100 мкл буфера. В пробирки, не содержащие немеченый гормон, вносили 100 мкл буфера для восполнения объема.

О скорости ассоциации кортикостерона с глюкокортикоидными рецепторами тип II или тип II и тип III судили по связыванию меченого кортикостерона цитоплазмными рецепторами печени или тимуса в зависимости от продолжительности инкубации гормона с цитозолем. Продолжительность инкубации составила 1, 20, 60 и 90 мин. При изучении скорости ассоциации кортикостерона с глюкокортикоидными рецепторами тип III инaktivировались глюкокортикоидные рецепторы тип II путем предварительной термической обработки (37 °C) цитозоля в течение 15 мин [4]. Полноту инактивации глюкокортикоидных рецепторов тип II контролировали с помощью меченого ацетонида триамцинолона. Число связывающих мест и константы диссоциации стероид-рецепторного комплекса определяли методом Скетчарда [9].

Результаты и обсуждение

Специфическое связывание кортикостерона глюкокортикоидными рецепторами тип III (в отсутствие глюкокортикоидных рецепторов тип II) цитозоля тимуса (рис. 1, Б) независимо от концентрации гормона в основном завершалось в течение первых минут инкубации и незначительно повышалось в последующие сроки инкубации. Уровень связывания кортикостерона этими рецепторами находился в определенной зависимости от концентрации мече-

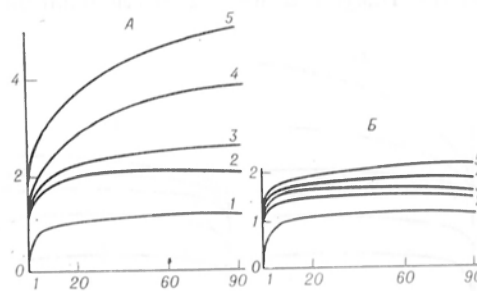


Рис. 1. Влияние продолжительности инкубации на связывание кортикостерона глюкокортикоидными рецепторами тип III (Б) и глюкокортикоидными рецепторами тип II и тип III (А) цитозоля тимуса при различных концентрациях ^3H -кортикостерона. 1—0,25; 2—0,5; 3—1,0; 4—2,0; 5— $4,0 \cdot 10^{-8}$ М. По оси абсцисс — время инкубации (в мин); по оси ординат — специфическое связывание кортикостерона $\cdot 10^{-13}$ моль на 1 мг белка.

ного кортикостерона. Специфическое связывание кортикостерона совместно глюкокортикоидными рецепторами тип II и тип III цитозоля тимуса (рис. 1, А) существенно отличалось от связывания кортикостерона только одними глюкокортикоидными рецепторами тип III. Исключение составила минимальная концентрация кортикостерона ($0,25 \times 10^{-8}$ М), при которой связывание гормона мало зависит от времени инкубации и фактически заканчивалось в первые минуты инкубации с такой же интенсивностью, как и в исследовании с одним видом глюкокортикоидных рецепторов тип III (см. рис. 1, Б). Однако с увеличением концентрации кортикостерона от $1,0$ до $4,0 \cdot 10^{-8}$ М характер кривой специфического связывания гормона изменялся в соответствии с продолжительностью инкубации: чем продолжительнее была инкубация, тем больше увеличивалось специфическое связывание кортикостерона. При этом число связывающих мест для кортикостерона на глюкокортикоидных рецепторах тип II и тип III цитозоля тимуса было примерно в 2 раза выше, чем только на глюкокортикоидном рецепторе тип III (см. рис. 1, А и Б).

По данным ряда авторов [10, 11], характер связывания дексаметазона или ацетонида триамцинолона, специфически взаимодействующих с глюкокортикоидными рецепторами тип II, также тесно связан с продолжительностью инкубации. Число связывающих мест для ацетонида триамцинолона на глюкокортикоидном рецепторе тип II цитозоля тимуса в наших исследованиях

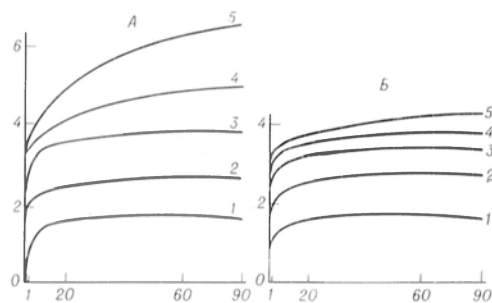


Рис. 2. Влияние продолжительности инкубации на уровень связывания кортикостерона глюкокортикоидными рецепторами тип III (Б) и глюкокортикоидными рецепторами тип II и тип III (А).

1— $0,25$; 2— $0,5$; 3— $1,0$; 4— $2,0$; 5— $4,0 \cdot 10^{-8}$ М. По оси абсцисс — время инкубации (в мин); по оси ординат — специфическое связывание кортикостерона $\cdot 10^{-13}$ моль на 1 мг белка.

составило $3-6 \cdot 10^{-13}$ моль на 1 мг белка, а после термической обработки цитозоля глюкокортикоидные рецепторы тип II не выявлялись. Уровень глюкокортикоидных рецепторов тип III, определяемый с помощью ^3H -кортикостерона в цитозоле тимуса после термической обработки, составил $2-3 \times 10^{-13}$ моль на 1 мг белка.

Изучение динамики связывания кортикостерона глюкокортикоидными рецепторами тип III цитозоля печени показало, что образование стероид-рецепторного комплекса так же, как и в случае с цитозолем тимуса, в основном завершается в первые минуты инкубации (рис. 2, Б). Существенным отличием в связывании кортикостерона глюкокортикоидными рецепторами тип III цитозоля печени от такового в цитозоле тимуса является то, что общий уровень связывания меченого кортикостерона глюкокортикоидными рецепторами тип III цитозоля печени был выше, чем в цитозоле тимуса. Динамика связывания кортикостерона совместно глюкокортикоидными рецепторами тип II и тип III цитозоля печени (рис. 2, А) аналогична таковой для цитозоля тимуса. Однако в цитозоле печени повышение уровня связывания кортикостерона глюкокортикоидными рецепторами тип II и тип III в зависимости от продолжительности инкубации выявлялось менее демонстративно, чем в цитозоле тимуса. Это обусловлено, по-видимому, относительно более высоким содержанием глюкокортикоидных рецепторов тип III в цитозоле печени, по сравнению с таковым в цитозоле тимуса. Число связывающих мест для ацетонида триамцинолона на глюкокортикоидном рецепторе тип II цитозоля печени соответствовало $2,0-4,0 \cdot 10^{-3}$ моль на 1 мг белка, а после термической обработки цитозоля глюкокортикоидные рецепторы тип II не обнаруживались. Содержание глюкокортикоидных рецепторов тип III, определяемое с помощью ^3H -кортикостерона после термической обработки цитозоля печени, колебалось в пределах $3,0-5,0 \cdot 10^{-13}$ моль на 1 мг белка.

Таким образом, наши исследования показали, что скорость ассоциации кортикостерона с глюкокортикоидными рецепторами тип III значительно выше, чем с глюкокортикоидными рецепторами тип II. Кроме того, насыщенные глюкокортикоидных рецепторов

тип II происходит при более высоких концентрациях кортикостерона, чем насыщение глюкокортикоидных рецепторов тип III.

При изучении глюкокортикоидных рецепторов тип II большинство исследователей [10, 12] используют синтетические глюкокортикоиды (дексаметазон и ацетонид триамцинолона), не взаимодействующие с другими типами цитоплазматических рецепторов и транскортином. В связи с этим определенный интерес могут представить полученные нами данные о том, что природные глюкокортикоиды взаимодействуют с глюкокортикоидными рецепторами тип II с такой же скоростью, что и синтетические глюкокортикоиды. Следовательно, результаты многих исследователей, применявших синтетические стероиды для изучения глюкокортикоидных рецепторов тип II, могут быть в этой части использованы для физиологической трактовки. Однако синтетические стероиды не приемлемы для выяснения физиологических механизмов взаимосвязи различных типов рецепторов в реализации глюкокортикоидного эффекта, поскольку они не связываются с другими типами глюкокортикоидных рецепторов, кроме глюкокортикоидных рецепторов тип II. В связи с этим в наших исследованиях использован природный глюкокортикоид кортикостерон, который связывается как глюкокортикоидными рецепторами тип III, так и глюкокортикоидными рецепторами тип II. При этом более высокая скорость ассоциации кортикостерона с глюкокортикоидными рецепторами тип III, как оказалось, препятствует связыванию гормона с глюкокортикоидными рецепторами тип II до тех пор, пока не заканчивается насыщение кортикостероном глюкокортикоидных рецепторов тип III (см. рис. 1, 2). Подтверждением этого положения является то, что при более низком содержании глюкокортикоидных рецепторов тип III кортикостерон быстрее начинает связываться с глюкокортикоидными рецепторами тип II (см. рис. 1, А). Можно полагать, что внутриклеточный уровень глюкокортикоидных рецепторов тип III является физиологическим регулятором транслокации кортикостерона глюкокортикоидными рецепторами тип II в ядро клетки и биологической активности гормона. Изложенное выше со-

ласуется с результатами других авторов [4], отмечавших, что глюкокортикоидные рецепторы тип III снижают транслокацию кортикостерона глюкокортикоидными рецепторами тип II в ядро клетки. Механизм этого угнетения в известной мере получил объяснение благодаря результатам, полученным в данном исследовании.

Ранее было показано, что в различных тканях уровень глюкокортикоидных рецепторов тип III неодинаков [13]. Больше их содержание обнаружено в цитозоле легких, меньшее — в цитозоле печени, тимуса. По-видимому, в тканях с низким содержанием глюкокортикоидных рецепторов тип III быстро реализуется биологический эффект глюкокортикоидов, опосредованный глюкокортикоидными рецепторами тип II.

Полученные данные имеют прямое отношение к концепции, согласно которой глюкокортикоидные рецепторы тип III выполняют антиглюкокортикоидную функцию, препятствуя проявлению биологического эффекта глюкокортикоидов на уровне глюкокортикоидных рецепторов тип II.

Исходя из различий в скорости ассоциации природных глюкокортикоидов с глюкокортикоидными рецепторами, можно полагать, что глюкокортикоидные рецепторы тип III выполняют еще одну чрезвычайно важную для организма функцию. Так, при различных непродолжительных стрессорных ситуациях, сопровождающихся повышением уровня глюкокортикоидов в крови, глюкокортикоидные рецепторы тип III, по-видимому, в первую очередь связывают глюкокортикоиды и таким образом препятствуют реализации биологического эффекта глюкокортикоидов на уровне генетического аппарата клетки. Однако эти вопросы требуют прямого экспериментального подтверждения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kalimi U. et al. — Biochemistry (Wash.), 1973, v. 12, p. 3365—3371.

2. Bloom E. et al. — J. Steroid Biochem., 1980, v. 12, p. 175—184.
3. Feldman D. et al. — Endocrinology, 1973, v. 92, p. 1389—1396.
4. Beato M. et al. — J. biol. Chem., 1972, v. 247, p. 7890—7896.
5. Feldman D. et al. — Endocrinology, 1973, v. 92, p. 1429—1436.
6. Голиков П. П. — Пробл. эндокринолог., 1979, № 1, с. 11—13.
7. Murakami A. et al. — J. Steroid Biochem., 1979, v. 10, p. 475—481.
8. Lowry O. H. et al. — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265—274.
9. Scatchard G. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1949, v. 51, p. 660—665.
10. Bell P. A., Munck A. — Biochem. J., 1973, v. 136, p. 97—107.
11. Feldman D. et al. — Endocrinology, 1978, v. 103, p. 2091—2095.
12. Giannopoulos G. — Steroids, 1976, v. 28, p. 51—66.
13. Голиков П. П. и др. — Пробл. эндокринолог., 1979, № 6, с. 65—68.

Поступила 03.05.82

EFFECT OF THE TYPE III GLUCOCORTICOID RECEPTORS ON BINDING OF CORTICOSTERONE BY THE TYPE II GLUCOCORTICOID RECEPTORS

P. P. Golikov, E. G. Kirillova, N. Yu. Nikolaeva, R. Kh. Eneleev

N. V. Sklifosovsky Institute of Urgent Medicine, Ministry of Public Health of the RSFSR, Moscow

Binding of ^3H -corticosterone by the glucocorticoid receptors of the II and III types in liver and thymus cytosol was studied in adrenalectomized rat males. After thermoinactivation of the type II glucocorticoid receptors the rate of corticosterone binding with the only receptors of the III type was estimated at various periods of incubation. The rate of ^3H -corticosterone association with the glucocorticoid receptors of the III type in liver and thymus cytosol was distinctly higher as compared with that of the II type receptors. The type III glucocorticoid receptors were shown to inhibit binding of corticosterone with the receptors of II type until their saturation with the hormone occurred. Physiological role of the type III glucocorticoid receptors in biological efficiency of glucocorticoids is discussed.

УДК 612.352.2-06:612.352.3

Б. Г. Ляпков

ИССЛЕДОВАНИЕ ПУЛА И ИНДУЦИБЕЛЬНОСТИ ЛИПИДПЕРЕНОСЯЩИХ БЕЛКОВ В ПЕЧЕНИ КРЫС

Институт питания АМН СССР, Москва

Механизмы регуляции метаболизма внутриклеточных транспортных форм липидов представляют в настоящее время предмет особого интереса и дискуссий. Это объясняется в первую очередь новизной вопроса, недостаточностью имеющихся в литературе данных, а также несомненной значимостью процессов переноса липидов между компартментами клетки в репарации липидов биомембран, подвергающихся воздействию свободнорадикального окисления и фосфолипаз. Из супернатанта гомогената печени, сердца, мозга и легких выделены внутриклеточные липопротеины, способные переносить фосфолипиды между субклеточными мембранами [1—5]. Постулировано, что данный способ транспорта фосфолипидов в цитозоле является основным и благодаря специфичности указанных белков по отношению к фосфолипидам обеспечивает липидную дифференцировку биомембран [6, 7].

Ранее [8, 9] нами было показано, что скорость обновления липидпереносящих

белков в печени изменяется при воздействии ряда факторов: при введении фенобарбитала и при преимущественно углеводном питании. В определенных условиях опыта установлена положительная корреляция между скоростью транспорта фосфолипидов между субклеточными мембранами и обновлением липидпереносящих белков (ЛПБ). Это позволило предположить, что интенсивность переноса фосфолипидов в цитозоле может определяться скоростью обновления ЛПБ.

В настоящей работе исследовали пул ЛПБ в печени крыс в норме, при введении фенобарбитала и при гиперинсулинизме, вызванном скормливанием высокоуглеводного рациона с сахарозой. Для установления индуцибельности ЛПБ печени использовали ингибитор транскрипции — актиномицин D.

Методика

Опыты проведены на 20 крысах-самцах Вистар с массой тела 200—220 г. Контрольная группа животных получала общевивар-

ный рацион Института питания (натуральные корма). Крысы 1-й опытной группы в течение 7 дней содержали на высокоуглеводном рационе (71% от общей калорийности составляли углеводы, в том числе 41% сахара), после чего части животных вводили подкожно раствор актиномицина D (1 мг/кг). Крысы 2-й опытной группы получали также общеживарный рацион, при этом им ежедневно в течение 5 дней вводили фенотарбитал (80 мг/кг). Пул ЛПБ в печени определяли методом изотопного разбавления. Преимущество данного метода состоит в том, что такой анализ не требует выделения исследуемых веществ в значительных количествах и при стандартных условиях очистки неизбежные потери в контроле и опыте примерно одинаковы. Относительность метода для определения величин пулов ЛПБ лимитируется следующими обстоятельствами: 1) степенью очистки ЛПБ; 2) в выделенной фракции содержатся ЛПБ различных типов, в анализируемых образцах — ЛПБ, включающие в себя лишь фосфатидилхолин; 3) анализируемые фракции ЛПБ находятся в водном растворе, а не являются чистыми (кристаллическими) белками.

Получение ЛПБ, содержащих ^{14}C -фосфатидилхолин. ЛПБ выделяли из 50 г печени крыс методом, описанным ранее [8]. Очистка ЛПБ из супернатанта 105 000 г гомогената печени включала в себя осаждение белков при pH 5,1, высаливание сульфатом аммония при 90% насыщении раствора, гель-фильтрацию на колонке с сефадексом G-50. Степень очистки ЛПБ определяли по фосфолипидообменивающей активности образцов *in vitro* — скорости переноса радиоактивных фосфолипидов из микросомальной фракции к митохондриям [8]. Полученная колонки фракция ЛПБ обладала в 202 раза большей фосфолипидообменивающей активностью по сравнению с исходным супернатантом. Объем фракции равнялся 50 мл, содержание белка составляло 16 мг. Концентрирование проводили сефадексом G-15 с последующим отделением белка центрифугированием. L, α -фосфатидил (N-метил- ^{14}C)-холин дигальмитойл с удельной радиоактивностью 58 мкКи/ммоль был получен Amercham, Radiochemical Centre. Содержание фосфатидилхолина в препарате составляло 0,128 мг. Раствор радиоактивного препарата в этанол-толуоле выпаривали в вакууме при комнатной температуре, к осадку приливали 5 мл 0,15 М раствора KCl и диспергировали встряхиванием в течение 30 мин при 30 °C на эвапораторе фирмы «Buchler». К полученной эмульсии, содержащей везикулы ^{14}C -фосфатидилхолина, приливали раствор ЛПБ в трис-ацетатном буфере) pH 7,4), сконцентрированный до объема 19 мл. Инкубацию смеси проводили при непрерывном вращении колбы при 30 °C в водяной бане в течение 2 ч. По окончании инкубации колбу с содержимым охлаждали. Из 1 мл раствора белок осаждали 12% ТХУ на фильтрах «Millipore», радиоактивность измеряли в сцинтилляционной среде на основе толуола и этанола (1 : 1), в аликвоте определяли белок по Лоури. Рассчитывали удельную радиоактивность полученного меченого ЛПБ и содержание в нем фосфатидилхолина. Приготовленный препарат хранили при 1 °C.

Характеристика полученного ЛПБ, содержащего ^{14}C -фосфатидилхолин. Объем образца 14 мл, содержание белка 16 мг. Удельная радиоактивность 86 800 имп/мин на 1 мг

белка. В препарате на 1 мг белка приходилось 1,5 мкг фосфатидилхолина.

Гомогенат печени крыс контрольной и опытных групп готовили на среде выделения (0,25 М сахара, 20 мМ K_2HPO_4 и 20 мМ ЭДТА, pH 7,4). Субклеточные фракции осаждали центрифугированием при 105 000 г в течение 50 мин. В образцы супернатанта контрольных и опытных групп объемом 15 мл каждый вносили по 1,5 мл раствора ЛПБ, меченного по ^{14}C -фосфатидилхолину (1 мг белка, 86 800 имп/мин). В полученных образцах измеряли содержание белка и его радиоактивность. Затем по указанному выше методу выделяли ЛПБ, определяли содержание белка, степень очистки и радиоактивность. Величину пула ЛПБ в исходном препарате (супернатанте 105 000 г) находили следующим образом.

Выделенная фракция ЛПБ в контроле содержала 1,74 мг белка (30 556 имп/мин). Введенный препарат ЛПБ, меченный по ^{14}C -фосфатидилхолину, в 1 мг содержал 86 800 имп/мин. Учитывая эти данные, пул ЛПБ в исходном супернатанте рассчитывали по следующей формуле: Удельная радиоактивность выделенного

удельная радиоактивность введенного

$$\text{ЛПБ} = \frac{\text{ЛПБ}}{\text{количество введенного ЛПБ} + X},$$

где X — пул ЛПБ в супернатанте. Для крыс контрольной группы это уравнение имело вид: $30\,556 = \frac{86\,800}{1 + X}$, откуда $X = 1,84$ мг.

В расчете на 1 мг белка супернатанта пул составил соответственно 5,2 мкг. Аналогичным способом были рассчитаны величины пулов ЛПБ для супернатанта гомогената печени крыс опытных групп.

Результаты и обсуждение

В таблице представлены данные по количеству и удельной радиоактивности белков супернатанта и образцов ЛПБ, полученных с колонки (очищенные в 176 раз) у крыс контрольной и опытных групп. Вычисленные величины относительного пула ЛПБ для каждой группы животных показали его значительную вариабельность: в контроле 5,2 мкг, при введении фенотарбитала 12,6 мкг, на высокоуглеводном рационе 16,5 мкг на 1 мг белка супернатанта. После введения актиномицина D у крыс, содержавшихся на высокоуглеводном рационе, пул ЛПБ в печени был равен 4,7 мкг на 1 мг белка супернатанта, т. е. был в $3\frac{1}{2}$ раза меньше, чем у животных аналогичной группы, не получавших препарата, и приближался к контролю. Таким образом, кормление крыс высокоуглеводным рационом с сахарозой приводит к увеличению пула ЛПБ в печени, что сочетается с большей скоростью их обновления [9].

Содержание белка и его удельная радиоактивность в исходном препарате (супернатант 105 000 g) после внесения ЛПБ, содержащего ^{14}C -фосфатидилхолин, и во фракциях ЛПБ, элюированных с колонки сефадекса G-50

Группа животных	Белок		Радиоактив- ность 1 мл раствора белка	Удельная радиоактив- ность, имп/мин/мг
	количество	концентра- ция, мг/мл		
Надмикросомальный супернатант после введения радиоактивного ЛПБ				
Контроль	351,5	21,3	4730	222
Высокоуглеводный рацион	338,2	20,5	5965	290
Введение актиномицина D на фоне высоко- углеводного рациона	325,2	19,1	4560	240
Введение фенобарбитала	308,6	18,6	5670	303
Ф р а к ц и я Л П Б:				
Контроль	1,74	0,18	5500	30 556
Высокоуглеводный рацион	1,70	0,17	2240	13 176
Введение актиномицина D на фоне высоко- углеводного рациона	1,75	0,17	5820	34 235
Введение фенобарбитала	1,40	0,14	2480	17 714

Примечание. Средние величины из 3 определений. В супернатант внесен 1 мг ЛПБ, радиоактивность препарата составляла 86 800 имп/мин.

Последнее свидетельствует о возникновении стационарного состояния на новом, более высоком уровне между процессами синтеза и деградации этих белков в печени. Увеличение пула ЛПБ в печени под влиянием фенobarбитала может быть следствием уменьшения скорости их деградации. На возможность участия этого механизма указывает снижение константы деградации, определенной нами ранее в аналогичных условиях опыта [8].

Полученные данные свидетельствуют о том, что пул ЛПБ в печени вариабелен и факторы внешней среды способны оказывать влияние на его величину. Поскольку введение актиномицина D на фоне питания высокоуглеводным рационом привело к снижению пула ЛПБ в печени, можно полагать, что этот эффект обусловлен ингибированием транскрипции ДНК. Следовательно, увеличение пула и скорости обновления ЛПБ в печени в условиях преимущественно углеводного питания является индуктивным эффектом. Что выполняет функцию индуктора синтеза ЛПБ — неясно. Возможно, что этим индуктором является инсулин, концентрация которого в сыворотке крови при скармливании высокоуглеводного рациона повышается [10]. Индуцибельность ЛПБ в печени указывает на то, что эти белки являются

жизненно важными функциональными белками, количество которых адаптивно регулируется в зависимости от условий внешней среды, в частности, питания. Это мнение подтверждается данными о различном содержании фосфатидилхолинотоменивающего белка в печени и гепатоме крыс [11].

ЛИТЕРАТУРА

1. Dawson R. M. C. — Subcell. Biochem., 1973, v. 2, p. 69—74.
2. Wirtz K. W. A. — Biochim. biophys. Acta, 1974, v. 344, p. 95—114.
3. Wirtz K. W. A., van Deenen L. L. M. — Trends biochem. Sci., 1977, v. 2, p. 49—51.
4. Stewart-De Haan P. J., McMurray W. C. — Chem. phys. Lipids, 1976, v. 17, p. 290—300.
5. Zilversmit D. B., Hughes M. E. — In: Methods in Membranes Biology. New York, 1976, v. 7, p. 211—260.
6. Bloj B., Zilversmit D. B. — Biochemistry (Wash.), 1976, v. 15, p. 1277—1283.
7. Дятловицкая Э. В., Тимофеева Н. Г., Горькова Н. П. и др. — Биохимия, 1977, т. 42, с. 940—945.
8. Ганпаров М. М., Ляпков Б. Г. — Там же, 1980, т. 45, с. 1744—1747.
9. Ляпков Б. Г. — Вopr. питания, 1981, № 1, с. 16—19.
10. Ляпков Б. Г., Маркелова В. Ф. — Бюлл. exper. биол., 1981, № 5, с. 566—568.
11. Teerlink T., Poorthuis B. J., van der Krift T. P. et al. — Biochim. biophys. Acta, 1981, v. 665, p. 74—80.

Поступила 03.05.82

Poole of lipid-transferring proteins was
studied by means of isotope dilution in super-
natants of liver homogenates of rats maintained

on highly carbohydrate diet or treated with
phenobarbital. In the both animal groups pool
of lipid-transferring proteins was higher as
compared with controls. Administration of
actinomycin D into the animals, kept on the
carbohydrate diet, normalized the protein
content, thus indicating the induction of the
proteins.

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 616.33-008.843.4:577.175.732]-074

Г. А. Афанасьева, Г. А. Орликов

О ВОЗМОЖНОСТЯХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГАСТРИНА В ЖЕЛУДОЧНОМ СОКЕ ЧЕЛОВЕКА

Рижский медицинский институт

Гастрин — один из важнейших ауто-
регуляторов желудочной функциональ-
ной активности. Основная масса g-кле-
ток, синтезирующих и продуцирующих
гастрин, локализована в антральном
отделе желудка [1—3].

Разработка радиоиммунологического
метода определения гастрина [4, 5]
позволила уточнить место его образо-
вания, закономерности изменения его
содержания в крови больных пернициоз-
ной анемией, больных с синдромом Зол-
лингера — Эллисона, с постваготомич-
еским синдромом [6—8].

Однако надежды, возлагавшиеся на
определение гастрина в сыворотке кро-
ви больных язвенной болезнью для вы-
яснения нейрогуморальных взаимо-
отношений как одного из важнейших
факторов патогенеза этого заболевания,
не оправдались. Результаты этих
исследований крайне противоречивы.
Так, некоторые авторы [9—12] отмеча-
ли повышение содержания гастрина в
сыворотке крови больных язвенной
болезнью, в то время как другие либо
обнаруживали снижение его concentra-
ции, либо вообще не находили сущест-
венной разницы по сравнению со здо-
ровыми лицами [13—19].

Более достоверны и однородны факты,
касающиеся гиперреакций сывороточ-
ного гастрина на пищевой и другие

раздражители при язвенной болезни
по сравнению с нормой [14, 20—24].

Подобных результатов можно было
ожидать, исходя из современных пред-
ставлений о том, что одним из основных
ареалов влияния гастрина служит сли-
зистая оболочка фундального отдела
желудка, и он оказывается в контакте
с обкладочными клетками, каким-то
образом достигая их по региональным
венозным антрально-фундальным ана-
стомозам. Так или иначе, лишь отно-
сительно небольшая его часть распре-
деляется в периферическом венозном
русле. По данным немногочисленных
исследований, проведенных у людей
и животных [25, 26], содержание га-
стрина в желудочном соке, особенно в
антральном секрете, значительно пре-
вышает его содержание в сыворотке кро-
ви.

Мы исследовали содержание гастри-
на в желудочном соке человека. Кро-
ме разработки самой методики, кото-
рая в отечественной литературе не от-
ражена, мы попытались, исходя из
разных параметров, определяющих со-
держание гастрина в желудочном со-
ке, дифференцировать его изменения
при язвенной болезни желудка и двена-
дцатиперстной кишки как самой ча-
стой и тяжелой патологии верхнего
отдела желудочно-кишечного тракта.

Исследованы больные язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки (9), желудка (5) и гастродуоденитом, сопровождавшимся непрерывной желудочной функциональной активностью и язвенным симптомокомплексом (4).

Диагноз заболевания был подтвержден рентгенологически, а у 13 больных и эндоскопически. Контрольную группу составили 10 человек без гастроэнтерологических заболеваний. У всех обследованных проводили внутрижелудочную рН-метрию с аспирацией желудочного содержимого через дополнительный канал зонда. После отсасывания тощачного секрета в течение 1 ч отсасывали желудочный сок, в котором определяли объем и концентрацию титруемой HCl, затем рассчитывали дебит HCl в миллиэквивалентах. Затем больным вводили подкожно 1 мл 0,1% сернокислого атропина и исследование продолжали еще в течение 1 ч. Пациентам из контрольной группы вводили подкожно 0,1% солянокислый гистамин из расчета 0,1 мл на 10 кг массы (простой гистаминовый тест) и исследование продолжали еще в течение 1 ч. Кроме того, по показаниям рН-метра (4-замера с 15-минутными интервалами) отмечали динамику базального и последовательного фундального и антрального рН. Гистамин использовали в качестве общепринятого стимулятора желудочной секреции.

Последовательный секрет для исследования в нем гастрин в настоящей работе не использовали, поскольку применялись разные фармакологические влияния.

Для предотвращения разрушения гастрин желудочный сок собирали в ледяной бане с одновременной его фильтрацией, затем 5 мл сока нейтрализовали 0,1 н. NaOH до pH 7,0; нейтрализованную порцию сока кипятили в водяной бане 10 мин, затем доводили до объема 25 мл дистиллированной водой и замораживали [27].

Концентрацию гастрин в образцах желудочного сока определяли с помощью стандартного набора, предназначенного для радиоиммунологических определений, выпускаемого фирмой «Cea-Sorin». В реакции инкубации с антисывороткой и меченым гормоном (G-17) брали 0,1 мл разведенного образца желудочного сока. Конечную концентрацию гастрин выражали в пикограммах на 1 мл. Параллельно исследовали содержание гастрин (также радиоиммунологическим методом) в сыворотке крови больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки (11) и здоровых лиц (8) натощак. Концентрацию гастрин также выражали в пикограммах на 1 мл.

Содержание соляной кислоты и гастрин в базальном желудочном соке

Группа обследованных	Объем часовой (базальной) секреции, мл/ч	ВАО, мэкв	Концентрация гастрин в желудочном соке, пг/мл	Дебит гастрин в базальной фракции желудочного сока	Скорость выделения гастрин, пг/мин
Здоровые (10)	21±7	2,0±0,7	185±28	3 885±1098	64,7±18,3
Больные язвенной болезнью и гастродуоденитом (18) р	56±11 <0,05	5,4±1,3 <0,05	242±42 >0,05	13 552±1 860 <0,001	225,8±31,0 <0,001

Результаты исследований представлены в таблице.

Концентрация гастрин в желудочном соке и сыворотке крови. По данным большинства исследователей [11, 19, 28], в сыворотке крови концентрация гастрин колеблется от 40 до 100 пг/мл. По нашим данным, содержание гастрин в сыворотке крови здоровых людей натощак составляло в среднем 95 ± 19 пг/мл. В желудочном соке в контрольной группе концентрация гастрин в среднем равнялась 185 ± 28 пг/мл с крайними колебаниями от 31 до 350 пг/мл, т. е. значительно превышала его концентрацию в сыворотке. У больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки отмечалась тенденция к повышению содержания гастрин как в сыворотке крови (144 ± 18 пг/мл), так и в желудочном базальном секрете (242 ± 42 пг/мл), но статистически разница была недостоверной. По мнению авторов, концентрация гастрин в желудочном соке уже теоретически должна была проявлять такую закономерность, так как желудочный сок состоит по крайней мере из 2 компонентов [29]: антрального, который и является основным источником гастрин в желудочном содержимом, и фундального, причем от обычного взаимоотношения этих парциальных компонентов и зависит в конечном счете концентрация гастрин. Между тем при язвенной болезни превалирует как раз фундальный (кислый) парциальный компонент, что, несомненно, накладывает свой отпечаток на представляемые данные.

Дебит гастрин в базальной фракции желудочного сока. Судя по данным таблицы, дебит гастрин в желудочном соке больных язвенной болезнью и гастродуоденитом в $3\frac{1}{2}$ раза превышает его дебит в контрольной группе, что

грубо коррелирует с взаимоотношениями ВАО. Иначе говоря, несмотря на большее разбавление антрального базального секрета фундальным (повышение ВАО), общий выход гастрина в желудочный сок оказывается значительно повышенным, несмотря на постоянно низкий антральный pH, который у больных язвенной болезнью и гастродуоденитом равнялся $1,7 \pm \pm 0,31$. Настоящие факторы красноречиво свидетельствуют о нарушении физиологического механизма регуляции гастринна pH антрального отдела при язвенной болезни.

Скорость выделения гастрина. Этот показатель может представлять практический интерес, так как он достаточно четко отражает базальную гипергастринию желудочного сока при язвенной болезни.

Оценивая полученные данные в целом, необходимо отметить, что определение гастрина в желудочном соке практически осуществимо и может оказаться полезным для ряда дальнейших исследований при выяснении как отдельных звеньев патогенеза заболеваний желудка, так и особенностей фармакологических воздействий препаратов, применяемых для лечения этих заболеваний.

Авторы выражают признательность доктору мед. наук Л. С. Бассалык за ценные рекомендации при проведении настоящей работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Edkins J. S.* — J. Physiol. (Lond.), 1906, v. 34, p. 133—140.
2. *Yalow R. S., Wu N.* — Gastroenterology, 1973, v. 65, p. 19—27.
3. *Walsh J. H., Grossman H. J.* — New Engl. J. Med., 1975, v. 202, p. 1324—1334.
4. *Mc Guigan J. E.* — Gastroenterology, 1968, v. 55, p. 315—330.
5. *Yalow R. S., Berson S. A.* — Ibid., 1970, v. 58, p. 1—14.
6. *Olbe L.* — Ibid., 1963, v. 44, p. 463—468.
7. *Poak J. M., Stagg B., Pearse A. G. F.* — Gut, 1972, v. 3, p. 501—512.
8. *Cowley O. J., Dymork J. B., Boyes B. E.* et al. — Ibid., 1973, v. 14, p. 25—29.
9. *Byrness D. J., Young J. D., Chishalm D. J.* et al. — Brit. med. J., 1970, v. 2, p. 626—629.

10. *Feurle G., Ketterer H., Becker H. D.* et al. — Scand. J. Gastroent., 1972, v. 7, p. 177—183.
11. *Sauberly H., Largiader F., Welter W.* — Schweiz. med. Wschr., 1974, Bd 104, S. 745—751.
12. *Gedde-Dahl D.* — Scand. J. Gastroent., 1975, v. 10, p. 187—192.
13. *Korman M. J., Soveny C., Hansky G.* — Gut, 1970, v. 12, p. 899—902.
14. *Reeder D. D., Jackson B. M., Ban J. L.* et al. — Surg. Forum, 1970, v. 21, p. 290—291.
15. *Trudean W. L., Mc Guigan J. A.* — Gastroenterology, 1970, v. 59, p. 6—12.
16. *Walsh J. H., Yalow R. S., Berson S. A.* — Ibid., 1971, v. 60, p. 16—21.
17. *Lorenzo J. W., Martinez J. M., Luque M. T.* et al. — Rev. esp. Euferm. Apar. Dig., 1976, v. 35, p. 443—456.
18. *Булгаков С. А.* — Тер. арх., 1977, № 5, с. 86—89.
19. *Кочина Е. Н., Цветкова Л. И., Гребенев А. Л.* — Клин. мед., 1979 № 2, с. 49—54.
20. *Ganglue P. S., Elder J. B.* — Gut, 1971, v. 12, p. 861—864.
21. *Hansky G., Korman M. G., Cowley D. E.* et al. — Ibid., p. 959—962.
22. *Isenberg Y. J., Walsh J. H., Best W. R.* et al. — Gastroenterology, 1972, v. 62, p. 764—768.
23. *Wormsley K. G.* — Gut, 1974, v. 16, p. 58—81.
24. *Бассалык Л. С.* Гастрин и биогенные амины нейрогуморальной регуляции желудочной секреции — в норме и патологии. Автореф. дис. докт. М., 1975.
25. *Jordan P. H., Vip B. S.* — Surgery, 1972, v. 72, p. 352—356.
26. *Unas-Wallensten K., Rehfeld J.* — Acta physiol. scand., 1976, v. 98, p. 217—226.
27. *Unas-Wallensten K.* — Ibid., N 438. Suppl., p. 1—39.
28. *Бассалык Л. С., Постолов П. М.* — Тер. арх., 1975, № 2, с. 33—38.
29. *Jordan P. H., Vip B. S.* — Am. J. Surg., 1974, v. 128, p. 336—339.

Поступила 28.01.82

ON POTENTIALITIES FOR ESTIMATION OF GASTRIN IN HUMAN GASTRIC JUICE

G. A. Afanas'eva, G. A. Orlikova

Medical School, Riga

Concentration of gastrin was estimated in the stomach contents using a radioimmunoassay following careful collection and conservation of gastric juice. Debit of gastrin and the rate of its secretion are the most informative patterns as compared with estimation of the hormone content in the juice. The estimation of gastrin might be important both in studies of pathogenesis of stomach diseases and of mechanisms of drug action in treatment of the diseases.

УДК 612.75+616.018.22

В. В. Серов, А. Б. Шехтер. Соединительная ткань (функциональная морфология и общая патология). М., Медицина, 1981, 312 с. Тираж 7200

В развитии биохимии соединительной ткани в последнее время все более отчетливо проявляется тенденция к синтезу функционально-биохимических и структурно-морфологических представлений. Биохимические методы (анализ метаболических функций, иммуноцитохимический метод) широко используются для характеристики и идентификации клеточных элементов соединительной ткани. Большие успехи электронной микроскопии, в частности электронной гистохимии и гистоавтордиографии, на электронно-микроскопическом уровне дали возможность связать воедино данные о макромолекулах межклеточного вещества соединительной ткани и сведения о надмолекулярных структурах и всей пространственной организации (архитектонике) ткани. В качестве примеров можно привести раскодировку электронно-микроскопического изображения коллагеновых фибрилл на основе выяснения последовательности аминокислотных остатков в полипептидной цепи коллагена или изучение протеогликановых агрегатов хрящевой ткани с применением биохимических и морфологических методов.

Авторы рецензируемой книги дали ей удачный подзаголовок, употребив термин «функциональная морфология». Функции соединительнотканых клеток (биосинтез и катаболизм межклеточного вещества, регуляция его структурной стабильности) являются по сути своей биохимическими, и идея неразрывного единства метаболических процессов и структурной организации пронизывает всю монографию.

В первой главе подробно рассмотрена биохимическая активность каждого вида клеток. Это касается не только главных клеток соединительной ткани (фибробластов и лаброцитов), но и клеток гематогенного происхождения, в частности лимфоцитов, играющих важную роль в патологических процессах, происходящих в соединительной ткани. Следует отметить, что в этой главе представлены весьма интересные данные о фибронектине — белке, локализованном преимущественно на мембранах фибробластов и принимающем участие во взаимодействии клеток с межклеточным матриксом; по существу это первый краткий обзор по фибронектину в отечественной литературе.

Еще более насыщена биохимическими данными вторая глава, в которой рассматривается межклеточное вещество соединительной ткани. Эти данные изложены на самом современном уровне: освещена молекулярная гетерогенность коллагена, дана систематизированная картина биосинтеза, секреции и фибрилlogenеза коллагена, а также его катаболизма, изложены новейшие гипотезы молекулярной структуры эластина, обсуждено значение протеогликанов и гликопротеинов в общей архитектонике межклеточного матрикса.

Самое интересное заключается в том, что все эти биохимические данные представлены на морфологическом фоне.

Центральное место в монографии занимает третья глава. В ней авторы излагают оригинальную концепцию целостности физиологической системы соединительной ткани, основанную на современных принципах системного подхода. Эта новая концепция базируется на детальном учете всех известных биологически активных веществ (медиаторов), секретируемых всеми соединительными клетками в норме и патологии и обеспечивающих взаимодействие клеток между собой и их регулирующее влияние на межклеточный матрикс. Существенное звено концепции — положение о том, что все без исключений клетки соединительной ткани являются локальными регуляторами своего ближайшего окружения. Вместе с тем авторы подчеркивают информативно-регуляторную (морфогенетическую) роль коллагена в клеточных и тканевых взаимодействиях. Эвристическая ценность такого подхода к исследованию общих принципов жизнедеятельности соединительной ткани не вызывает сомнений.

Глава четвертая посвящена общей патологии соединительной ткани. В первой ее части рассматриваются так называемые мезенхимальные дистрофии (мукоидное набухание, фибриноидные изменения, кальциноз, гиалиноз, амилоидоз), при этом используются все биохимические данные по этим патологическим процессам, накопленные к настоящему времени. Если кальциноз и особенно амилоидоз достаточно хорошо изучены в биохимическом плане (известны, например, химический состав и физико-химические свойства амилоидной субстанции), то о других процессах этого сказать нельзя, и представления о них носят главным образом морфологический характер. Во второй части главы изложен анализ роли соединительной ткани в воспалении. Отмечена тесная связь между воспалением и иммунитетом, приводятся подробные сведения о биохимических факторах, участвующих в воспалительной реакции и связанных с ней иммунных механизмах.

В последней, пятой, главе описана репаративная функция соединительной ткани. Глубоко и систематизированно даны современные сведения о последовательных стадиях раневого процесса, и на этой основе выдвигается гипотеза ауторегуляции роста соединительной ткани. Важнейшим звеном этой гипотезы являются представления об обратной связи между распадом и синтезом коллагена, которые получили свое развитие в результате многолетних исследований авторов по применению препаратов коллагена в медицине. Эта гипотеза распространяется на различные фибро-но-склеротические реакции.

В кратком заключении дана общая оценка современного этапа учения о соединительной ткани, который авторы называют этапом системного анализа. Для этого этапа характерно обостренное внимание к проблемам регуляции. С позиций системного анализа по-новому

оцениваются функции соединительной ткани в организме, причем подчеркивается особая роль взаимодействия между всеми клеточными и неклеточными компонентами в осуществлении функции гомеостаза.

В. В. Серов и А. Б. Шехтер написали интересную и нужную книгу. Она поможет морфологам и патологам связать воедино структурный и молекулярный уровни исследования соединительной ткани. Книга будет полезна

и для биохимиков, работающих в области изучения соединительной ткани. Фактический материал и оригинальные теоретические концепции, содержащиеся в ней, помогут сблизить биохимические и морфологические подходы к характеристике функций соединительной ткани и обеспечить получение важных для клинической медицины результатов.

Проф. Л. И. Слущкий (Рига)

СОДЕРЖАНИЕ

- Тупикова З. А. Среднемолекулярные уре-
мические токсины (Обзор литературы) 2
Шишкин С. С. Новые возможности в ана-
литическом фракционировании белков
(обзор) 10
Шлемкевич М. П. Влияние аскорбиновой
кислоты на включение $[6-^3\text{H}]-5$ -фтору-
рацила в РНК опухолевой ткани рака
желудка, неизмененную слизистую же-
лудка и слизистую тонкой кишки in
vitro 17
Попова Г. М. УДФ-коферменты в ткани
глиом мозга человека 20
Лунина Н. В., Коваль С. Б. Влияние ли-
зосомальных ферментов нейтрофильных
лейкоцитов на синтез простагландинов 23
Петрина С. Н., Юшина Л. В. Фосфолипид-
ный состав различных тканей крыс
при обезвоживании организма 26
Даниленко М. П., Ким Э. А., Омаро-
ва Р. Д., Есырев О. В. Действие аце-
тилхолина на Na^+ , K^+ -АТФ-азную ак-
тивность разных препаратов сарко-
леммы миокарда 29
Клейменов А. Н., Розенфельд М. А.,
Бурлакова Е. Б., Зенков Ю. В., Шве-
дова А. А., Смирнов Л. Д. Влияние
антиоксиданта ОП-6 на некоторые мо-
дельные реакции системы свертывания
крови 33
Трюфанов В. Ф., Денисенко А. Д., Олей-
ник И. А., Лозовский В. Т. Липопротей-
ны, аполипопротеины и липиды плаз-
мы крови у лиц старческого возраста
и долгожителей Грузии и Киргизии 37
Петрунин Д. Д., Молоденков М. Н.,
Благосклонов А. С., Кузнецов В. Н.,
Олефиренко Г. А., Репина С. И. Ком-
плексное иммунохимическое обследо-
вание больных с некоторыми заболе-
ваниями печени 42
Субботина Н. П., Белоус А. М. Влияние
медленных скоростей замораживания
на функциональное состояние митохонд-
рий разных типов тканевых препара-
тов коры почки 45
Савин И. Г., Бахманова Г. И., Кару-
зина И. И., Скоцелья Е. Д., Антоно-
ва Г. Н., Жирнов Г. Ф., Карякин А. В.,
Арипов А. П., Арчаков А. И. Влияние

CONTENTS

- Tupikova, Z. A.* Mean-molecular uremic
toxins 2
Shishkin, S. S. New possibilities in ana-
lytical fractionation of proteins 10
Shlemkevich, M. P. Effect of ascorbic
acid on incorporation of $6-^3\text{H}$ -5-fluorouracil
in RNA of tumoral tissue of stomach,
of unaltered stomach mucosa and of small
intestinal mucosa in vitro 17
Popova, G. M. UDP-coenzymes in the glioma
tissue of the human brain 20
Lunina, N. V., Koval, S. B. Effect of
nutrophil lysosomal enzymes synthesis
of prostaglandins 23
Petrina, S. N., Yushina, L. V. Phospho-
lipid composition of various tissues
of rats in dynamics of dehydration 26
*Danilenko, M. P., Kim, E. A., Omarova,
R. D., Esyrev, O. V.* Effect of ace-
tylcholine on the Na^+ , K^+ -ATPase acti-
vity in different preparations of myocar-
dial sarcolemma 29
*Kleymenov, A. N., Rosenfeld, M. A.,
Burlakova, E. B., Zenkov, Yu. V.,
Shvedova, A. A., Smirnov, L. D.* Effect of
antioxidant OP-6 on some
reactions of blood coagulation system 33
*Tryufanov, V. F., Denisenko, A. D.,
Oleynik, I. A., Losovsky, V. T.* Lipo-
proteins, apolipoproteins and blood plas-
ma lipids in senile age and longevity in
men and women from Georgia and Kir-
ghizia 37
*Petrinin, D. D., Molodenkov, M. N.,
Blagosklonov, A. S., Kuznetsov, V. N.,
Olefirenko, G. A., Repina, S. I.* Com-
plex immunochemical examination of
patients with some liver disorders 42
Subbota, N. P., Belous, A. M. Effect
of slow freezing of the functional state
of mitochondria from various prepara-
tions of kidney cortex 45
*Savin, I. G., Bachmanova, G. I., Ka-
ruzina, I. I., Skotselyas, E. D., Anto-
nova, G. N., Zhirnov, G. F., Kary-
kin, A. V., Aripov, A. N., Archakov,*

- гелиотрина на систему микросомального окисления печени крыс 49
- Хватов В. Б., Платонова Т. К. Экспериментальное исследование тромболитического действия плазмакиназы . . . 53
- Вилков Г. А., Вовченко И. Б., Мендзерицкий А. М., Трапезонцева Р. А. Активация кислой протеиназы мозга крыс сывороткой крови больных рассеянным склерозом и шизофренией в опытах *in vitro* 58
- Агзамов Х., Алматов К. Т., Рахимов М. М., Туракулов Я. Х. Функционирование митохондрий печени при аллоксановом диабете 61
- Карманский И. М. Влияние детергентов на нейтральную холестеринэстеразу аорты свиней 66
- Макаров С. А., Колотилова А. И. Некоторые особенности метаболизма гексофосфатов в экстрактах кровяных пластинок человека 69
- Князев Ю. А., Туркина Т. И., Юрьева Э. А. Действие ксидифона и витамина Е на показатели липидного обмена при дислипидемии, индуцированной холестериновой нагрузкой 72
- Сергеев А. В., Самохвалов Г. И., Еникеев В. Р., Яковлева И. М., Вакулова Л. А., Поляченко Л. Н., Давыдова Л. П. Влияние природных метаболитов витамина А и их 4-оксопроизводных на образование специфических цитолитических Т-лимфоцитов . . . 76
- Юлдашева Л. Н., Султанов Р. Г. Состояние окислительных процессов в печени крыс при хроническом гелиотринном гепатите 81
- Требухина Р. В. Активность транскетолазы и ТДФ-эффект в тканях животных с экспериментальными опухолями . . . 85
- Воронов Г. Г., Лукиенко П. И. Влияние α -токоферола на гидроксилирующую систему и перекисное окисление липидов мембран эндоплазматического ретикулаума ишемизированной печени крыс 90
- Струмило С. А. Различная эффективность ионов Mn^{2+} , Ca^{2+} и Mg^{2+} при взаимодействии пируватдегидрогеназного комплекса надпочечников с тиаминпирогосфатом 94
- Третьяков А. В., Ратовицкий Э. А., Петров А. С., Головатова В. А. Действие антиэстрогенов и антиандрогенов из класса ацилгидразинов на свойства нуклеозидтрифосфатаз и на содержание адениловых нуклеотидов в ядрах нормальных и опухолевых клеток . . . 98
- Беляев Н. А., Брусов О. С., Панченко Л. Ф. Влияние хронического потребления алкоголя на активность энцефалиназы А в стриатуме, гипоталамусе и среднем мозге крыс 102
- Чеснокова Н. П., Невважай Т. А. К вопросу об изменении активности АТФ-азных систем субклеточных фракций головного и спинного мозга в доклинический период ботулинической интоксикации 107
- Фролова И. А., Зубенко А. Д. Холестерин липопротеидов высокой плотности и йоднакопительная функция щитовидной железы у больных алиментарным ожирением 107
- kov, A. I. The influence of heliotrin on the rat liver microsomal oxygenase system 49
- Khvatov, V. B., Platonova, T. K. Experimental studies of the thrombolytic effect of plasmakinase 53
- Vilkov, G. A., Vovchenko, I. B., Mendzheritsky, A. M., Trapezontseva, R. A. In vitro activation of acid proteinase from rat brain in presence of blood serum from patients with multiple sclerosis and schizophrenia 58
- Agzamov, Kh., Almatov, K. T., Rakhimov, M. M., Turakulov, Ya. Kh. Function of liver mitochondria in alloxane diabetes 61
- Karmansky, I. M. Effects of detergents on neutral cholesterol esterase from porcine aorta 66
- Makarov, S. A., Kolotilova, A. I. Some patterns of hexosephosphates metabolism in extracts of human blood platelets 69
- Knyazev, Yu. A., Turkina, T. I., Yur'eva, E. A. Effect of xidiphone and vitamin E on lipid metabolism patterns in dislipidemia induced by cholesterol 72
- Sergeev, A. V., Samokhvalov, G. I., Enikeev, V. R., Yakovleva, I. M., Vakulova, L. A., Polyachenko, L. N., Davydova, L. P. Effect of native vitamin A metabolites and their 4-oxo-derivatives on formation of specific cytolytic T lymphocytes 76
- Yuldasheva, L. N., Sultanov, R. G. Oxidative reactions in rat liver tissue under conditions of chronic heliotrine hepatitis 81
- Trebukhina, R. V. Activity of transketolase and the TDP-effect in tissues of animals with experimental tumors 85
- Voronov, G. G., Lukienko, P. I. Effect of α -tocopherol on the hydroxylating system and lipid peroxidation in membranes of endoplasmic reticulum from ischemized rat liver tissue 90
- Strumilo, S. A. Different efficiency of Mn^{2+} , Ca^{2+} and Mg^{2+} in reaction of pyruvate dehydrogenase complex from adrenal glands with thiamine pyrophosphate 94
- Tretyakov, A. V., Ratovitsky, E. A., Petrov, A. S., Golovatova, W. A. The effect of antiestrogen and antiandrogen derivatives of acylhydrazines on properties of nucleoside triphosphatases and adenylate content in nuclei of normal and tumoral cells 98
- Belyaev, N. A., Brusov, O. S., Panchenko, L. F. Effect of chronic alcohol consumption on activity of encephalinasase A in rat striatum, hypothalamus and midbrain 102
- Chesnokova, N. P., Nevvazhay, T. A. On alterations in activity of the ATPase systems in subcellular fractions of brain and spinal cord at the preclinical period of botulinic intoxication 107
- Frolova, I. A., Zubenko, A. D. Cholesterol of high density lipoproteins and iodine-accumulating function of thyroid gland in patients with alimentary obesity 107

- ожирением и ишемической болезнью сердца с избыточной массой тела 111
- Лопухин Ю. М., Владимиров Ю. А., Молоденков М. Н., Клебанов Г. И., Сергиенко В. И., Торховская Т. И., Чеснокова Я. М., Наумов А. В., Максимов В. А., Шерстнев М. П.* Хемилюминесценция липопротеидов сыворотки крови, выделенных ультрацентрифугированием и осаждением в присутствии гепарина и кальция 116
- Приваленко М. Н., Скобелева Т. В.* Определение активности гликозамингликангидролиз в ткани печени 120
- Полянский Н. Б., Смирнов Л. Д., Шведова А. А., Казан В. Е., Ткачук В. А.* Ингибирование фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов из сердца кролика оксипиридинами 123
- Иващенко А. Т., Утеулин К. Р., Буинева И. А., Ли Т.* Кинетические характеристики анионной аденозинтрифосфатазы эритроцитов 128
- Голиков П. П., Кириллова Е. Г., Николаева Н. Ю., Енелев Р. Х.* Влияние глюкокортикоидных рецепторов типа III на связывание кортикостерона глюкокортикоидными рецепторами тип II 130
- Ляпков Б. Г.* Исследование пула индуцибельности липидпереносящих белков в печени крыс 134
- as well as in patients by heart ischemic disease with excessive body mass 111
- Lopukhin, Yu. M., Vladimirov, Yu. A., Molodenkov, M. N., Klebanov, G. I., Sergienko, V. I., Torkhovskaya, T. I., Tchesnokova, Ya. M., Naumov, A. V., Maximov, V. A., Sherstnev, M. P.* Chemoluminescence of blood serum lipoproteins obtained by means of ultracentrifugation and precipitation with heparin and calcium 116
- Privalenko, M. N., Skobeleva, T. V.* Estimation of glycosaminoglycan hydrolases in liver tissue 120
- Polyansky, N. B., Smirnov, L. D., Shvedova, A. A., Kagan, V. E., Tkachuk, V. A.* Inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterase from rabbit heart by hydroxypyridines 123
- Ivaschenko, A. T., Uteulin, K. P., Bushneva, I. A., Li, T.* Kinetic parameters of anion adenosine triphosphatase of erythrocytes 128
- Golikov, P. P., Kirillova, E. G., Nikolaeva, N. Yu., Enelev, R. Kh.* Effect of type III glucocorticoid receptors on binding of corticosterone by the type II glucocorticoid receptors 130
- Lyapkov, B. G.* Poole and induction of lipid-transferring proteins in rat liver tissue 134

Методы биохимических исследований

Methods of Biochemical Investigations

- Афанасьева Г. А., Орликов Г. А.* О возможностях определения гастрин в желудочном соке человека 137
- Afanas'eva, G. A., Orlikova, G. A.* On potentialities for estimation of gastrin in human gastric juice 137

Рецензии

Book Reviews

Техн. редактор *О. В. Куперман*

Корректор *Л. П. Петрова*

Сдано в набор 24.11.82. Подписано в печать 23.12.82. Формат 70×108¹/₁₆. Бумага тип. № 1
Гарнитура литературная. Печать высокая. Печ. л. 9,0 + печ. л. вкл. 0,13 усл. печ. л. 12,78
усл. кр.-отт. 13,30 Уч.-изд. л. 15,48 Тираж 1551 экз. Цена 1 р. 30 к. Заказ 2978

Ордена Трудового Красного Знамени
Издательство «Медицина», Москва 101838, Петроввереский пер., 6/8.
Ордена Трудового Красного Знамени
Чеховский полиграфический комбинат ВО «Союзполиграфпром»
Государственного комитета СССР
по делам издательств, полиграфии и книжной торговли
г. Чехов Московской области