

ТОМ XXXII

ВЫПУСК I

ЯНВАРЬ — ФЕВРАЛЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.



МОСКВА . МЕДИЦИНА . 1986

ВОПРОСЫ
МЕДИЦИНСКОЙ
ХИМИИ



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. И. МАЗУРОВ (зам. главного редактора), Т. Т. БЕРЕЗОВ, Е. И. ГЕРАСИМОВА,
В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ, А. Н. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВКИН, Л. А. ЛОК-
ШИНА, В. И. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ, Е. Л. РОЗЕН-
ФЕЛЬД, Ю. А. РОМАКОВ (ответственный секретарь), В. А. САКС, С. Е. СЕВЕРИН,
В. Б. СПИРИЧЕВ

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БАЕВ А. А. (Москва)	ТРОИЦКИЙ Г. В. (Симферополь)
БЕЛИЦЕР В. А. (Киев)	ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)
БЫЧКОВ С. М. (Москва)	ТЯХЕПЫЛЬД Л. Я. (Тарту)
КОНСТАНТИНОВ А. А. (Хабаровск)	УТЕВСКИЙ А. М. (Харьков)
КУДРЯШОВ Б. А. (Москва)	ШАПОТ В. С. (Москва)
ЛЯХОВИЧ В. В. (Новосибирск)	ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)
НАСХИНА Т. С. (Москва)	ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)

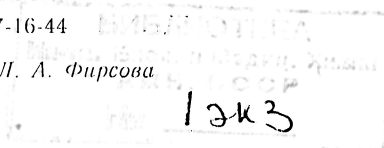
Адрес редакции журнала:

Москва, Солянка, 14

АМН СССР

Тел. 297-16-44

Зав. редакцией Л. А. Фирсова





XXVII съезду КПСС — достойную встречу

С. С. Кривобокова

МЕДИЦИНСКАЯ ХИМИЯ И НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЙ ПРОГРЕСС

Научно-технический прогресс — основной фактор социально-экономического развития нашей страны. Коммунистическая партия Советского Союза поставила перед советской наукой огромные и ответственные задачи — необходимо сосредоточить усилия на основных направлениях, мобилизовать научно-технический потенциал страны, обеспечить выход на самые передовые рубежи в важнейших областях науки и техники. Эти задачи имеют самое прямое отношение к медицине.

Генеральный секретарь ЦК КПСС М. С. Горбачев в докладе «Коренный вопрос экономической политики партии» на совещании в ЦК КПСС по вопросам ускорения научно-технического прогресса 11 июня 1985 г. сказал: «На задачи науки необходимо взглянуть по-новому, сквозь призму требований времени — требований решительного поворота ее к пугдам общественного производства, а производства — к науке». При этом он подчеркнул, что приоритетное значение должно быть придано фундаментальной науке.

Медицинская наука, в том числе медицинская химия, также должна войти в эту новую систему. Это обусловлено тем, что одной из характернейших черт научно-технического прогресса являются значительные успехи в познании мира живого, а также в росте практического приложения новых открытий. Современные биология и медицина претерпевают революционные изменения и особую роль в этом процессе играет биохимия. При этом, как отметили А. А. Баев и А. Н. Шамин в докладе на симпозиуме «Революция в биологии» 16-го Международного конгресса по истории науки (Бухарест, 1981), формирование биохимии было выражением новейшей революции в естествознании на уровне биологии. Для биологии XX века про-

никновение на молекулярный уровень проявлений жизнедеятельности означало то же самое, что для физики проникновение в область микроявлений. Биохимия превратилась в важнейший фактор революционных преобразований в биологии, что немедленно нашло отражение в появлении новых направлений научной и практической медицины.

Акад. Ю. А. Овчинников, характеризуя важнейшие достижения современной биологии, пишет: «Главная черта происходящих ныне в биологии событий — открывшаяся возможность, пусть еще на простейших системах, управлять клеточными процессами. В лабораториях стали искусственно создаваться клетки с пугными характеристиками для микробиологического синтеза, начали проводиться эксперименты по слиянию клеток высших организмов с целью получения принципиально новых клеточных гибридов, найдены условия для выращивания клеток растений, животных и даже человека вне организма, на искусственных средах. Разработаны методы перестройки генетического аппарата, создания искусственных генов и их встраивания в геном клетки и на этой основе удалось получить сотни новых мельчайших организмов, неизвестных в природе, но несущих нужные человеку признаки. Так произошло формирование генетической и клеточной инженерии как принципиально нового научного направления. Революционизирующее воздействие ее на решение практических задач сельского хозяйства и медицины было отмечено на совещании в ЦК КПСС по вопросам ускорения научно-технического прогресса 11 июня 1985».

Естественно, что наиболее важной для современной медицины является возможность управления клеточными процессами. Все эти достижения, име-

ющие важный выход в медицинскую практику, были результатом прогресса фундаментальных исследований в области физико-химической биологии — комплексного научного направления сложной структуры со специфическим методическим аппаратом, опирающегося на обширный, новый по своему характеру эмпирический материал, способствующий построению новых теоретических концепций и обладающий четким механизмом практического использования полученных результатов.

Однако именно те области физико-химической биологии, которые непосредственно смыкаются и переплетаются с рядом фундаментальных направлений медицинской науки, показывают, что достижения современной науки не ограничиваются только областью клетки. Качественно новыми стали изучение различных регуляторных механизмов, открытие ряда гормонов, нейропептидов, простагландинов, что привело к постановке важнейших проблем функционирования сложных организмов. Физико-химическая биология играет в настоящее время наиболее важную роль в разработке проблем иммунитета.

Вместе с тем сохранила свое значение для медицины и классическая биохимия, в центре внимания которой были разнообразные системы обменных процессов и активности ферментов, катализирующих отдельные обменные реакции. Однако и в классической биохимии происходят существенные изменения, связанные прежде всего с созданием многочисленных принципиально новых методов исследования, например иммуноэлектрофореза, разнообразных форм хроматографии, что приводит к более углубленной детализации наших знаний в области нормальной биохимии и патобиохимии человеческого организма.

Пожалуй, в настоящее время именно это в наибольшем масштабе влияет на клинко-биохимические методы, что очень важно, так как фундаментальные исследования при всей их значимости не должны заслонять специфику клинической медицины, имеющей дело с людьми. Сегодня это особенно важно, так как нередко имеет место сочетание нескольких заболеваний, причем только биохимические подходы позволяют их точно дифференцировать и

диагностировать. Необходимо отметить одно обстоятельство, о котором редко упоминают в статьях, посвященных медицинской химии, фармакологии и т. п. Речь идет об экономическом факторе, связанном с резким удешевлением и увеличением доступности еще недавно уникальных приборов и препаратов. Кроме того, прогресс физико-химической биологии и возникновение биотехнологии сопровождаются значительным повышением отдачи затрат на фундаментальные исследования по сравнению даже с такими областями, как электроника, химия полимеров и др.

Таким образом, прогресс физико-химической биологии и медицинской химии оказывает существенное влияние и на такие отрасли, как производство лекарственных препаратов высокоэффективного направленного действия, производство которых основано на наиболее современных технологиях, позволяющих быстро переходить от изготовления опытных образцов к серийному выпуску продукции. Одновременно все это оказывает влияние на разработку и производство новых медицинских приборов и аппаратов, автоматических и полуавтоматических устройств, предназначенных для анализа и контроля физиологических параметров человека, проведение клинко-биохимических экспресс-анализов, различных приборов, выполняющих функции жизненно важных органов человека. Это в свою очередь требует разработки и производства необычайно широкого спектра реактивов и различных химических средств, обеспечивающих функционирование парка приборов новых поколений. И то и другое невозможно без углубления и расширения исследований в области биохимии, биоорганической химии, молекулярной биологии и т. д.

Таковы предпосылки той важной, часто решающей роли, которую играет современная медицинская химия, значительно видоизменившаяся под влиянием фундаментальных открытий физико-химической биологии, в прогрессе современной медицинской науки. О применении этих достижений можно говорить очень много. Остановимся лишь на отдельных примерах, представляющих наиболее перспективными и отражающих наиболее ярко воздействие фундаментальных исследе-

дований на тенденции развития практической медицины.

Так, по инициативе акад. Ю. А. Овчинникова было начато комплексное исследование ионных каналов и мембран белков, из которых они построены. Последовательно были реализованы две всесоюзные научные программы «Нервный импульс» и «Ионный канал». Характерно, что эти комплексные исследования проводились институтами биорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, хирургии им. А. В. Вишневского АМН СССР, биохимии АН Узбекской ССР, физиологии им. А. А. Богомольца АН УССР, цитологии АН СССР.

Работа важнейших систем организма человека обусловлена в конечном счете поразительно точно сбалансированным функционированием ионных каналов клеток. Примером такого функционирования являются нервные импульсы. Ионные каналы участвуют в таких процессах, как инициация сокращения сердечной и гладкой мышц, секреция гормонов и ферментов, рост и деление клеток, регуляция клеточного обмена веществ. Многие лекарственные вещества и гуморальные регуляторы действуют на организм, прямо или опосредованно влияя на ионные каналы. По существу столь знакомые всем врачам электрокардиограммы, электроэнцефалограммы и электромиограммы являются ни чем иным, как записями суммарных электрических сигналов необычайного множества специализированных ионных каналов клетки. Таким образом, изучение их функционирования имеет необыкновенно важное значение для понимания молекулярных основ проведения нервного возбуждения и, следовательно, является основой для создания принципиально новых лекарственных препаратов.

Изучение ионных каналов представляло определенные трудности и стало возможным только после открытия нейротоксинов, действующих избирательно на электровозбудимые ионные каналы нервных волокон или блокирующих действие главного медиатора — ацетилхолина и т. п. Возникла возможность создания новых методов изучения ионных каналов. В результате многолетней работы были получены важные данные о строении и свойствах

хемовозбудимых ионных каналов мембраны нервной клетки.

Взаимодополняющие исследования, биохимические и электрофизиологические, позволили получить новые данные об электровозбудимых натриевых каналах, участвующих в генерализации и проведении импульсов возбуждения в нервных клетках, нервных волокнах, клетках сердечной и скелетных мышц.

Какое значение имеют фундаментальные исследования этих объектов для медицинской практики? Оказалось, что у натриевых каналов существует общий регуляторный центр, управляющий всеми его функциями. Вместе с тем воздействие на определенные участки натриевого канала может избирательно повышать или понижать его чувствительность к электрическому сигналу. При изучении механизма действия нейротоксинов на натриевые каналы ученые обратили внимание на взаимодействие токсинов с некоторыми лекарственными препаратами, а именно антиаритмическими, анестетическими, противосудорожными веществами. Биохимикам удалось установить с помощью меченных радиоактивными изотопами аналогов нейротоксинов, что наибольшее количество натриевых каналов содержится в клетках мозга. Было показано, что натриевые каналы представляют собой белково-углеводный комплекс, который пронизывает липидную мембрану. В настоящее время ведется интенсивное изучение деталей молекулярной структуры таких каналов.

В результате этих исследований удалось не только приблизиться к пониманию молекулярных основ проведения нервного возбуждения, но и наметить конкретные подходы к разработке приемов направленного воздействия на ионные каналы, а следовательно, к управлению функцией нервных клеток. Таким образом оказались открыты и новые пути для направленного синтеза нового класса биологически активных веществ — модуляторов действия лекарственных препаратов, а также принципиально новых лекарственных средств для лечения заболеваний нервной системы.

Этот цикл научных исследований показывает интегрирующую роль современной физико-химической биологии в медико-биологических исследова-

ниях. Такого рода программы объединяют различные направления исследований в области медицинской науки, сформулированные с учетом долгосрочной комплексной программы научно-технического прогресса и его социально-экономических последствий до 2000 года. Если проанализировать развитие основных долгосрочных направлений, начатых еще в одиннадцатой пятилетке, то можно увидеть две четкие тенденции: повышение комплексирования исследований и, следовательно, сближение, а иногда и переплетение отдельных направлений; повышение роли физико-химической биологии в фундаментальных исследованиях в области медицины и разработка новых методов диагностики и лечения различных заболеваний.

Эти тенденции находят свое воплощение в области изучения основ жизнедеятельности здорового организма человека, в том числе механизмов его стабилизации, осуществляющих обеспечение нормальных жизненных функций в условиях воздействия разнонаправленных факторов внешней среды. Это касается всей иерархии его жизненно важных органов и систем, а также и всего организма в целом. Первостепенно важным является изучение нервной, сердечно-сосудистой систем, дыхания, пищеварения, органов выделения и др. Особое внимание уделяется изучению генетики человека, а также основных закономерностей его высших мозговых функций. Важнейшим направлением является, в частности, изучение роли нейропептидов в деятельности нервной системы и возможности использования их в качестве лечебных и регуляторных средств.

Изучение физиологически активных пептидов является также примером комплекса исследований, интегрирующих несколько медико-биологических направлений. Еще два десятилетия назад советские ученые обратили внимание на возможную роль пептидов как переносчиков терминальной информации в различных тканевых и клеточных процессах, т. е. на их функции как вторичных семаптитов. Пептиды, как известно, выполняют в природе только одну функцию — тонко направленных эффективных регуляторов. И эти регуляторы представляют определенный интерес как для теоретической, так и для практической медицины. Известны

пептидные гормоны, токсины и анти-токсины, ингибиторы и активаторы ферментов, антибиотики, иммуностимуляторы, пептиды-переносчики ионов через мембраны. В последние годы интерес к пептидам был стимулирован еще и открытием нейропептидов, изучением их взаимоотношений, механизмов образования и функций.

В гипоталамусе образуются пептидные гормоны нового типа, которые, поступая в гипофиз, дают сигнал для мощного каскада биохимических процессов, прежде всего для образования гормонов гипофиза и стероидных гормонов. Гипоталамические пептидные факторы являются наиболее эффективными биологически активными веществами. Наибольший интерес представляет существование пептидов, оказывающих влияние и воздействующих на процессы высшей нервной деятельности. Открыты пептиды, обуславливающие ощущение боли, различные эмоции, развитие отдельных стадий сна, выработку условных рефлексов, а также воздействующие на оперативную и долговременную память. Не удивительно поэтому, что их исследованиям уделяют внимание многие специалисты: нейрохимики, нейрофизиологи, специалисты в области высшей нервной деятельности, психологи, биохимики, биоорганики, а также ученые-медики. Уже сейчас в СССР разработаны многочисленные методы химического синтеза пептидов. Имеются все предпосылки для значительного расширения изучения механизма действия и лечебного применения пептидных препаратов.

В силу вышеуказанного все большее значение приобретают биохимические исследования таких фундаментальных проблем, как биохимия и патохимия обмена веществ и механизмов его регуляции, структура и функции физиологически активных белков, пептидов и других азотистых соединений, биохимия различных по своей химической природе биорегуляторов — от пептидов до простагландинов, функционирование ферментов в здоровом организме и при патологических состояниях, тончайшие механизмы биосинтеза белков и биохимия морфогенеза, структура и функции липидов и их комплексов в здоровом и больном организме, структура и функции мембран.

Биохимические исследования вышли уже в космос. Как известно, в програм-

му экспедиций на орбитальную станцию «Салют-7» были внесены эксперименты по электрофоретическому разделению биологически активных соединений, прежде всего белков и пептидов, для получения сверхчистых препаратов в условиях невесомости.

Значительное распространение получают исследования по медицинской энзимологии, в том числе вопросы энзимодиагностики и энзимотерапии. Эти исследования оказывают влияние на изменения в клинической химии. Они оказываются ключевыми и при изучении молекулярных механизмов действия ряда лекарственных препаратов, и при исследовании особенностей обмена веществ в экстремальных условиях, при стрессах и при воздействии неблагоприятных факторов окружающей среды. Через биохимические исследования осуществляется наиболее важный процесс комплексирования медицины и экологии, образования нового медико-экологического направления в медицине.

Все эти биохимические исследования оказывают все большее влияние на развитие важнейших направлений медицины. В области изучения сердечно-сосудистых заболеваний — важнейшего из этих направлений — все больший удельный вес приобретают исследования в области молекулярной кардиологии. Однако наряду с этим развиваются и общеприкладные подходы к изучению и предупреждению тромбообразования, атеросклероза, нейрогуморальной регуляции сосудистого тонуса и артериального давления, разработки методов предупреждения и диагностики сердечно-сосудистых заболеваний на основе биохимических показателей.

Без углубления биохимических и молекулярно-биологических основ невозможно представить себе и развитие такой важнейшей области медицины, как онкология. Все большее значение приобретают работы по иммунологическим маркерам опухолей, ранним методам биохимической диагностики опухолеобразования, изучению молекулярно-биологических основ противоопухолевого иммунитета, созданию методов иммунитета, созданию методов иммунотерапии рака. Проблема онкогенов также является биохимической проблемой и решается с помощью биохимических методов. Следует отметить, что практически все надежды победить рак без

хирургического вмешательства замыкаются в конце концов на использовании для решения этой проблемы методов физико-химической биологии.

Среди фундаментальных наук, на основе которых развивается медицина, одно из основных мест занимает генетика человека. Развитие методов определения последовательности нуклеотидов в ДНК позволило начать прямое изучение генома человека. Соотнесение этих исследований с последними данными геносистематики, с одной стороны, и данными о строении хроматина и функциональной морфологии каждой хромосомы — с другой, создает новую ситуацию в изучении нормальной и патогенетики человека.

Расширение знаний о наследственности человека значительно облегчило подходы к диагностике и лечению наследственных болезней. И здесь биохимические представления и методы играют существенную роль. Вместе с тем и здесь ожидается существенный прогресс, связанный с прогрессом в области молекулярной генетики, особенно методов манипулирования с генетическим материалом, а также с формированием у генетиков «химического мышления»: методы генетической инженерии сделали зримым квантовый корпускулярный характер отдельных генов.

Близко смыкаются с проблемами онкологии и генетики проблемы вирусологии. Сам характер этой науки, ее положение в системе медицинских и биологических наук за последние годы значительно изменились благодаря развитию физико-химической биологии. Вирусология оказалась ключевым направлением в разработке ряда теоретических положений и методов манипулирования с генетическим материалом. Хотя ряд важнейших исследований последних десятилетий, начиная с исследования онкорнавирусов и ревертазы или создания методов внесения генов и их фрагментов в геном или клетку, неотделимы от создания основ современной физико-химической биологии как сложного комплексного направления, вирусология не утратила своего облика и своих важных практических задач в области медицины. Однако сейчас трудно предположить, что такие важные практические задачи, как, например, борьба с эпидемиями гриппа, может быть решена без про-

гресса в изучении первичной и вторичной структур генома и структуры белков вируса гриппа, без прогресса в изучении интерлейкинов, без создания эффективного производства интерферонов и т. д.

Большую роль биохимические направления играют и в эндокринологии. В результате последних открытий биохимиков и возникновения нейроэндокринологии принципы, лежащие в основе представлений о гуморальной регуляции процессов жизнедеятельности, претерпели революционизирующие изменения. Перед эндокринологией большие перспективы были открыты чисто химико-синтетическими по своей методологии исследованиями, связанными с указанным выше открытием, изучением структуры и синтезом различных соединений (прежде всего пептидной природы) и их биологически активных аналогов. Экспериментальная и клиническая эндокринология и биохимия гормонов получают новое развитие благодаря более детальному изучению механизмов образования и физиологического действия различных биорегуляторов. Эндокринология благодаря формированию нейроэндокринологии оказалась сближенной с нейропатологией. Выше приведен пример изучения ионных и натриевых каналов, однако вклад биохимиков в исследования нейропептидов открывает трудно оценимые пока перспективы познания механизмов их действия и практического приложения.

Биохимия продолжает играть важную роль в решении таких традиционных медицинских проблем, как питание. Вопросы гигиены питания оказались связанными не только со структурой питания и дифференциацией биохимических характеристик пищевых продуктов, но и с изучением биохимии и физиологии питания, в том числе молекулярного уровня усвоения питательных веществ организмом. По проблемам лечебного питания на основе изучения метаболического статуса организма разрабатываются патогенетически обоснованные лечебные рационы, рекомендуемые при заболеваниях систем пищеварения, почек, обмена веществ, сердечно-сосудистой системы, различных форм аллергий. Сейчас без участия биохимии невозможны рекомендации по созданию специализиро-

ванных продуктов диетического и детского питания.

Биохимия и биотехнология сейчас воздействуют на многие аспекты проблемы питания благодаря развитию новых производств пищевых продуктов, пищевых добавок, вкусовых веществ. Налажено производство разнообразных ферментативных и биоактивных препаратов, в том числе эубиотиков, которые оказывают стабилизирующее и лечебное действие при нарушениях процессов пищеварения.

Биохимия решительно вторглась в область фармакологии и фармации. Разработка новых лекарственных средств полностью основана на исследовании биохимических механизмов действия различных препаратов, изучении взаимосвязи химической структуры, физико-химических свойств с их фармакологической активностью. Важнейшей проблемой стало изучение молекулярных основ взаимодействия эндогенных и экзогенных регуляторов физиологических функций с рецепторами биологических мембран. Клиническая фармакология сосредоточивает внимание на биохимических исследованиях механизмов фармакокинетики и фармакодинамики лекарственных средств, влияющих на центральную нервную и сердечно-сосудистую системы, а также антибиотиков и препаратов других классов соединений. Не прекращаются работы по изысканию и изучению новых антибиотиков, направленные на внедрение новых антибактериальных антибиотиков, а также их полусинтетических производных.

Наибольшее внимание уделяется в настоящее время двум областям исследований, необычайно перспективным с точки зрения практического приложения, особенно в медицине. Эти области, первоначально достаточно удаленные друг от друга, сблизились в процессе исследований. Речь идет о генетической инженерии и иммунобиологии.

Развитие этих направлений явилось специальной заботой Коммунистической партии Советского Союза и Советского правительства. В 1974 г. было принято постановление ЦК КПСС и Совета Министров СССР «О мерах по ускорению развития молекулярной биологии и молекулярной генетики и использованию их достижений в народном хозяйстве». После его успешного

выполнения в 1981 г. было принято новое чрезвычайно важное постановление ЦК КПСС и Совета Министров СССР «О дальнейшем развитии физико-химической биологии и биотехнологии и использованию их достижений в медицине, сельском хозяйстве и промышленности». В настоящее время Межведомственный научно-технический совет по проблемам физико-химической биологии и биотехнологии при Государственном Комитете СССР по науке и технике и президиуме АН СССР координируют большую комплексную программу по биотехнологии, выполнение которой ведется нарастающими темпами. Вопросы, связанные с использованием достижений физико-химической биологии, координирует также Межведомственный совет АН СССР и АМН СССР по фундаментальным проблемам медицины.

История генетической инженерии и биотехнологии насчитывает всего немногим более 10 лет. Первые работы, в которых открывались перспективы манипулирования с генетическим материалом, были опубликованы в 1972 г. Однако за эти годы был достигнут грандиозный прогресс в создании организмов с искусственными и модифицированными генами. Для медицинской практики стали доступны естественные регуляторы человеческого организма. Впервые возникла возможность промышленного получения непосредственно инсулина человека, в то время как ранее для лечения диабета использовали препараты инсулина, полученные из животных организмов, т. е. не полностью идентичного по своей структуре инсулину человека, а следовательно, вызывающие образование в организме антител, блокирующих их действие. Инсулин человека производится с помощью микроорганизмов, в состав которых методами генетической инженерии введен искусственно полученный ген, обеспечивающий его биосинтез. В 1984 г. советскими специалистами с помощью методов генетической инженерии создан противовирусный агент — интерферон человека, проходящий сейчас завершающую стадию медицинских испытаний.

Важно отметить, что возникновение генетической инженерии и использование ее в биотехнологии знаменовало принципиально новый этап современной научно-технической революции.

Впервые в истории науки фундаментальные исследования и прикладные разработки оказались не просто организационно сближенными, но практически объединенными. Одни и те же исследователи осуществляли синтез гена, введение его в тот или иной продуцент, и те же самые ученые проводили подготовку этого организма для получения промышленных штаммов. В истории науки еще не было такого случая, чтобы одни и те же умы и рабочие руки исследователей на одних и тех же лабораторных столах, одними и теми же методами проводили тончайшие фундаментальные исследования, которые тут же трансформировались в прикладные разработки большой эффективности. В результате путь от фундаментальных исследований до промышленного внедрения сократился до минимума. Необходимо учесть и то обстоятельство, что новые методы, разработанные в институтах, очень скоро становятся достоянием работников заводских лабораторий, обеспечивающих производство.

Такое же положение сложилось и в области клеточной инженерии. Микроорганизмы и низшие грибы давно использовались в биотехнологических процессах, необходимых для получения, например, антибиотиков. Уже давно умеют получать культуры тканей и клеток растений и животных организмов. Такие культуры используются в промышленных условиях для получения многих лечебных препаратов.

Но в настоящее время в клеточной инженерии был осуществлен революционный прорыв в область иммунологии. Речь идет о создании так называемой гибридной технологии, открывшей новую эру в иммунологии и создавшей предпосылки для получения средств диагностики любых заболеваний и, возможно, направленных, индивидуализированных средств лечения наиболее серьезных болезней. Сущность этого процесса заключается в том, что главные продуценты белков-антител — лимфоциты, стимулированные необходимым агентом (например, вирусом), соединяются с клеткой лимфоцита, пораженного раком (миеломной клеткой). В результате такого слияния и получается гибридома. Эта клетка от исходного лимфоцита получает способность продуцировать антитела лишь против стимулирующего

агента — вируса, а от раковой клетки — способность к безудержному росту и размножению. Таким образом возникла возможность получения больших количеств индивидуальных или моноклональных антител.

Эти открытия, так же как достижения в области инженерной энзимологии (прежде всего получения иммобилизованных ферментов и клеток), создали принципиально новую ситуацию как в области медико-биологических исследований, так и в ряде важных направлений практической медицины и медицинской промышленности.

Таким образом, влияние физико-химической биологии и биотехнологии на решение многих проблем практической медицины, к которым до последнего времени были неясны даже подходы, будет непрерывно возрастать. На биотехнологической основе создаются сейчас многочисленные лекарственные препараты, биологически активные вещества, разнообразные пищевые добавки. Достаточно отметить, что получение полупродуктов для синтеза современного поколения пенициллинов в СССР осуществляется полностью с помощью иммобилизованных ферментов. Генетическая инженерия помогает разрабатывать принципы получения всего спектра пептидных и полипептидных (белковых) регуляторов, которые можно использовать в качестве лекарственных препаратов. Кроме инсулина и интерферона, открываются возможности синтеза соматостатина, соматотропина, нейропептидов и многих других биологически активных пептидов. Гибридная техника открывает перспективы получения новых вакцин, моноклональных антител, реагентов для диагностики различных заболеваний. Появление иммуноэлектрофореза в его разнообразных модификациях было революционным достижением не только биохимии, но и аналитической химии в целом. Впервые появились возможности аналитического определения веществ, находящихся

не в фазовом состоянии, а в виде отдельных молекул.

Инженерная энзимология также внесла свой вклад в теоретическую и практическую медицину. Иммобилизация ферментов привела к появлению новых технологических приемов получения различных соединений, сами иммобилизованные ферменты позволяют гораздо полнее использовать их ценнейшие биокаталитические качества. Кроме того, сам принцип иммобилизации привел к появлению важных идей о создании систем «доставки» лекарственных препаратов целенаправленного действия к пораженным органам, тканям и даже клеткам. Это можно осуществить, заключив фермент в иммобилизующую его микрокапсулу. Кроме того, большой интерес представляет разработка метода переноса лекарственных средств к пораженным тканям с помощью липосом, которые можно рассматривать как специальную «упаковку» для ряда биологически активных препаратов направленного действия.

Таким образом, фундаментальные исследования в области физико-химической биологии и ее медико-биохимической составляющей являются прообразом значимых, если не важнейших воплощений практической медицины завтрашнего дня. В ряде случаев стремительный прогресс современных научных исследований при правильной организации их внедрения отчетливо виден уже сегодня. Необходимо лишь подчеркнуть, что все достижения медицинской химии содействуют главной цели, которую подчеркнул Генеральный секретарь ЦК КПСС М. С. Горбачев во время своего пребывания в Тюменской и Томской областях — решению социальных задач, повышению благосостояния и жизненного уровня советских людей, заботе об их здоровье. Охрана здоровья советских людей — благородное призвание биохимиков — ученых и врачей, важная социально-экономическая проблема.

Г. А. Галегов, Н. Д. Львов, И. Г. Петрова, В. Л. Флорентьев

РИБАВИРИН КАК АНТИВИРУСНЫЙ ХИМИОПРЕПАРАТ: ХИМИЯ, МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ, ВОЗМОЖНОСТИ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ (ОБЗОР)

Институт вирусологии им. Д. И. Иванковского АМН СССР, Институт молекулярной биологии АН СССР, Москва

Нуклеозиды с антиметаболической активностью составляют один из важных классов биологически активных веществ. Они нашли широкое применение в онкологии, вирусологии, микробиологии, энзимологии и в последние годы используются для генно-инженерных работ. В вирусологии — это класс наиболее эффективных химиопрепаратов, используемых, во-первых, для изучения механизма репродукции вирусов, и, во-вторых, в качестве средств для лечения ряда вирусных заболеваний, в частности вызываемых вирусами герпеса и гриппа. К ним относятся 9-β-D-аденинарабинозид, цитозинарабинозид, 5-йод- и 5-бром- и 5-бромвинил-2'-дезоксипуридин, ациклические производные гуанозина, 6-азауридин, дноксипропиладеннин.

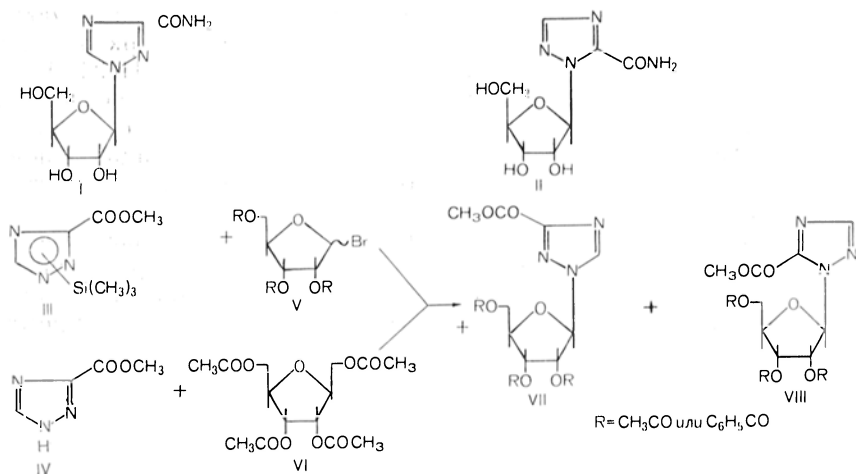
В 60-х годах из *Streptomyces candidus* был изолирован антибиотик пирозофуриин-3-β-D-рибофуранозил-1-4-оксипирозол-5-карбоксамид, т. е. С-нуклеозид, обладающий свойством подавлять репродукцию ряда ДНК- и РНК-содержащих вирусов. Это стимулировало исследования по синтезу нуклео-

среди них группу триазольных нуклеозидов.

На протяжении последних 10 лет большое внимание уделяется рибавирину (виразолу) [-1-β-D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид], оказавшемуся структурным аналогом гуанозина. Интерес к рибавирину определялся его необычно широким спектром антивирусного действия в отношении большого числа ДНК- и РНК-содержащих вирусов. Наибольшее количество вирусологических исследований посвящено антигриппозному действию рибавирина [17, 71].

Синтез рибавирина, его фосфатов и аналогов

Рибавирин и его фосфаты. Рибавирин был впервые получен Витковским и соавт. [84] либо конденсацией триметилсилильного производного метилового эфира 1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты (III) [15] с защищенным рибофуранозилбромидом (V), либо сплавлением эфира (IV) с 1,2,3,5-тетра-0-ацетил-β-D-рибофуранозой (VI).

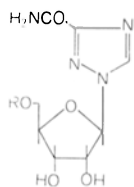


зидов, содержащих в качестве гетероциклических компонентов азотсодержащие пятичленные гетероциклы и

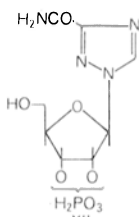
В обоих случаях образуется смесь изомеров VII и VIII. В первом случае суммарный выход конденсации выше

90 %, а соотношение изомеров близко к 1:1, во втором — при общем выходе 85 % преобладает изомер VII (10:1). После хроматографического разделения изомеров и обработки раствором аммиака в метаноле были получены рибавирин (I) и изомерный ему 1-β-D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-5-карбоксамид (II).

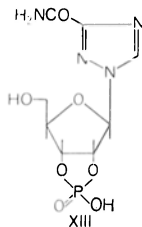
В дальнейшем были синтезированы фосфорные эфиры рибавирина [16, 71] рибавирин-5'-моно-(IX), ди-(X) и трифосфат (XI), рибавирин-2 (3)-фосфат (XII), рибавирин-2',3-циклофосфат (XIII) и рибавирин-3',5'-циклофосфат (XIV).



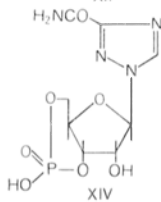
IX: R=H₂PO₃-
X: R=H₂P₂O₆-
XI: R=H₂P₃O₉-



XII



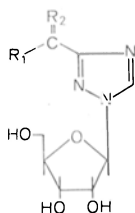
XIII



XIV

Отметим, что все фосфаты обладают противовирусной активностью, близкой к активности самого рибавирина.

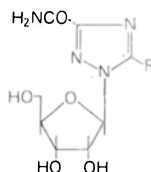
Аналоги рибавирина с измененным гетероциклом. Высокая активность рибавирина против широкого круга РНК- и ДНК-содержащих вирусов стимулировала исследования в области синтеза гликозидов, содержащих в качестве агликона различные пятичленные гетероциклы. Простейшие модификации затрагивают либо карбоксамидную группу, либо пятое положение триазольного цикла.



XV: R₁=NHNH₂; R₂=O
XVI: R₁=NHOH; R₂=O
XVII: R₁=NH₂; R₂=S
XVIII: R₁=NH₂; R₂=NH

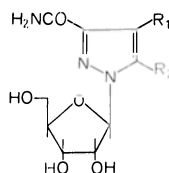
водит к потере противовирусной активности. С другой стороны и тиоамид (XVII), и амидин (XVIII) сохраняют заметную активность.

Синтезировали ряд 5-замещенных аналогов рибавирина (XIX—XXIII) [59]. Все эти соединения оказались неактивными.

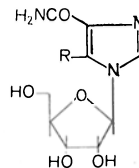


XIX: R=Cl
XX: R=NH₂
XXI: R=NO₂
XXII: R=CH₃
XXIII: R=SH

Другой тип аналогов рибавирина представляют D-рибофуранозильные производные пиразола (XXIV—XXVII), имидазола (XXVIII—XXXIII), 1,2,3-триазола (XXXIV, XXXV) и тетразола (XXXVI).

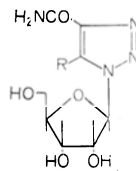


XXIV: R₁=R₂=H [49]
XXV: R₁=CONH₂; R₂=H [49]
XXVI: R₁=NH₂; R₂=CONH₂ [49]
XXVII: R₁=NO₂; R₂=CONH₂ [49]

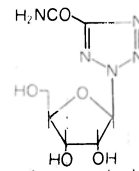


XXVIII: R=Br [74]
XXIX: R=Cl [74]
XXX: R=F [74]
XXXI: R=H [74]
XXXII: R=CH₂CN [23]
XXXIII: R=NO₂ [39]

За редким исключением приведенные выше соединения, содержащие N-гликозидную связь, были получены прямым гликозилированием соответствующих гетероциклов. Существенно более сложные синтетические процедуры были использованы при получении перечисленных ниже C-гликозидных аналогов рибавирина.



XXXIV: R=H [19, 50, 52, 78]
XXXV: R=OH [68, 87]

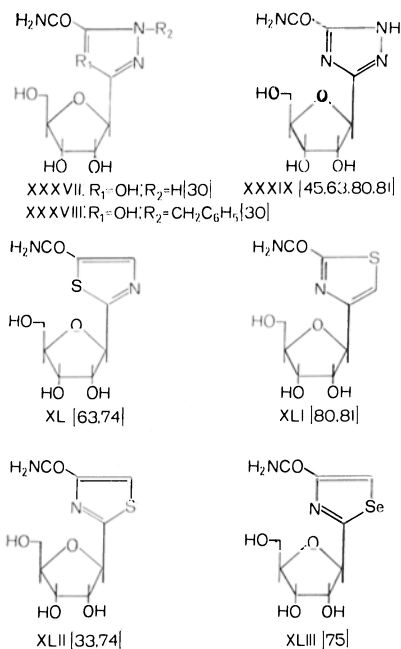


XXXVI: [62]

Аналоги рибавирина с видоизмененным углеводным остатком. Аналоги рибавирина с видоизмененным углеводным остатком можно разделить на

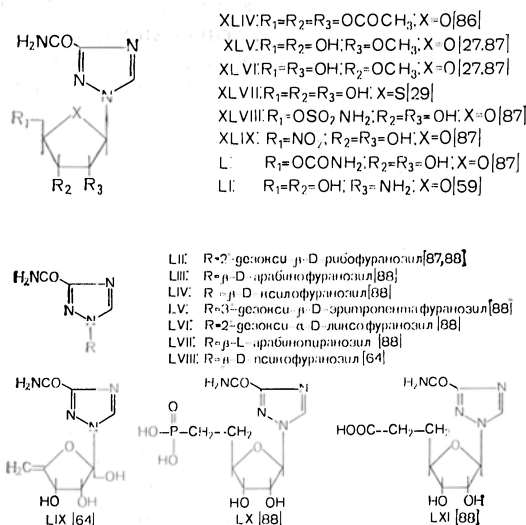
Замещение амидной NH₂-группы на NH₂NH- или HONH-группу [84] при-

два типа. К первому типу относятся соединения, содержащие модифицированную β -D-рибофуранозу (XLIV—LI).

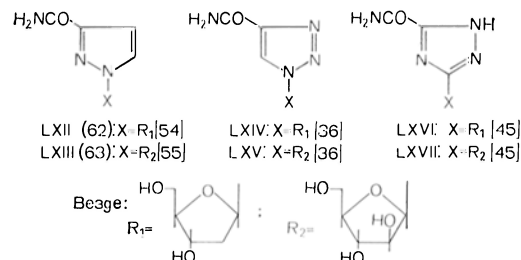


Из всех этих соединений заметной противовирусной активностью обладают лишь 2', 3', 5'-три-0-ацетилрибавирин (XLIV). Отметим, что в случае 2'-3'-0-метилрибавирин (XLVI) и (XLVII) были синтезированы не только нуклеозиды, но и их 5'-фосфаты [26].

Ко второму типу относятся аналоги, в которых D-рибоза заменена другими сахарами (LI—LXI).



Аналоги рабавирин с видоизмененным гетероциклом и углеводным остатком. Заклучим наш краткий обзор аналогами рибавиринна, у которых видоизменены обе части молекулы и гетероциклическая и углеводная (LXII—LXVII).



Синтез рибавиринна, его аналогов и фосфорилированных производных открыл новые возможности в создании и разработке нуклеозидов с антивирусным действием.

Антивирусное действие *in vivo*, метаболические превращения, молекулярный механизм действия

Активность рибавиринна *in vitro*. Рибавирин подавлял репродукцию РНК-вирусов гриппа А и В, парагриппа, кори, реовирусов, рабдовирусов, арена-вирусов, буньявирусов и ряда онкогенных РНК-вирусов и незначительно — тогавирусов. Практически не влияет на репродукцию энтеро- и риновирусов. Таким образом, из приводимого перечня следует, что рибавирин обнаруживает активность в первую очередь в отношении вирусов, имеющих негативный РНК-геном и «экспроированный» 5'-конец вирусных информационных РНК.

Ингибирующее действие рибавиринна распространяется на значительное количество вирусов гриппа А и В. Его минимально-ингибирующая концентрация в отношении вируса гриппа А составляет от 0,01 до 1,0 мкг/мл. Эта модель является наиболее чувствительной к действию рибавиринна. Существенное значение имеют результаты по изучению комбинированного действия рибавиринна и ремантадина (амантадина) на гриппозной модели *in vitro* [36]. В этом случае два химиопрепарата, используемые в субингибиторных концентрациях, обеспечивают высо-

кий ингибиторный эффект синергидного типа. Аналогичная картина наблюдается и при изучении образования белков вируса гриппа, когда в условиях одновременного присутствия двух химиопрепаратов в минимально эффективных концентрациях имеет место наиболее значительное подавление синтеза белков вируса гриппа [6]. В этом случае характер синтеза белков максимально приближается к условиям синтеза белков в неинфицированных пробах. Такой антигриппозный эффект является следствием действия двух антигриппозных химиопрепаратов, имеющих различную химическую структуру и различный механизм действия на течение гриппозной инфекции.

Среди ДНК-вирусов, покс- (вирусы вакцины и миксомы) и герпесвирусы оказались умеренно чувствительными к рибавирину. В целом ряде случаев чувствительность определяется видом культуры клеток. Комбинированное применение рибавиринна и арабинофуранозилгипоксантина приводило к подавлению репродукции вируса герпеса обычного по синергидному типу [18]. Цитомегаловирусы оказались малочувствительными к действию этого препарата по сравнению с вирусами герпеса обычного. Аденовирусы практически не чувствительны к рибавирину [1, 10, 16, 17, 69, 70, 71].

Попытка ряда авторов получить из чувствительных вирусов резистентные к рибавирину на моделях вирусов парогриппа 3, гриппа А и герпеса обычного не увенчалась успехом. Однако в литературе имеется сообщение о получении резистентности к рибавирину варианта вируса гриппа А, полученного в результате многократных его пассажей в присутствии рибавиринна; с другой стороны, рибавирин эффективно подавляет репродукцию вируса гриппа А, резистентного к ремантадину или амантадину [9, 14, 70].

В 1984 г. американские авторы опубликовали первые результаты об аналоге рибавиринна — селеназоле, отличающимся от рибавиринна наличием атома селена, который замещает один из атомов азота триазольного гетероцикла. Его спектр активности *in vitro* несколько отличается от такового рибавиринна и распространяется на вирус японского энцефалита и желтой лихорадки (см. формулу XLIII).

В тканях организма животных ^{14}C -рибавирин подвергается расщеплению по месту гликозидной связи с образованием 1,2,4-триазол-3-карбоксамидна, а также продукта энзиматического дезамидирования, т. е. соответствующей карбоновой кислоты. С другой стороны, рибавирин подвергается фосфорилированию, превращаясь в моно-, ди- и три-фосфаты. Рибавирин и гуанозин, как показали результаты рентгено-структурного анализа, имеют структурную аналогию, однако превращение рибавиринна в монофосфат осуществляется ферментом, не фосфорилирующим гуанозин [21, 58]. Наибольшая концентрация его фосфорилированных производных обнаружена в печени и легких. При этом в легочной ткани рибавирин в форме трифосфата присутствует в максимальной концентрации. В сыворотке крови не найдены фосфорилированные производные рибавиринна, что указывает на их предварительное дефосфорилирование в тканях. Рибавирин минимально включается в структуру нуклеиновых кислот эукариотических клеток. Например, на 10^9 нуклеотидов ДНК приходится один остаток монофосфата рибавиринна. Несколько больше монофосфата обнаруживается в РНК.

Монофосфат рибавиринна в бактериальных и животных клетках по конкурентному типу ингибирует активность дегидрогеназы инозинмонофосфата, что опосредованно приводит к ингибированию синтеза гуанозинмонофосфата и уменьшению пула гуаниловых нуклеотидов. Вероятно, этим можно объяснить снятие гуанином, но не аденозином, ингибирующего действия рибавиринна на репродукцию вируса кори. Аналогичные результаты были получены на гриппозной модели в клетках MDCK [77].

Активность этого энзима эффективно подавляется 1,4,5-триазол-карбоксамидным аналогом рибавиринна-5'-фосфата. Однако этот аналог не дает антивирусного эффекта, а следовательно, ингибирующее действие монофосфата рибавиринна на активность инозинмонофосфата дегидрогеназы может не определять антивирусного действия рибавиринна. Например, карбоксамидный аналог незначительно ингибирует активность этого фермента, однако оказывает выраженное антивирусное действие. Таким образом, ингибирован-

ние инозинмонофосфатдегидрогеназы и, следовательно, истощение пула гуаниловых нуклеозидов могут привести к цитотоксическому действию рибавирина. Однако даже в таких концентрациях (и это несомненно важно) рибавирин не подавляет репродукции некоторых пикорнавирусов и вируса псевдобешенства. С другой стороны, рибавирин подавляет репродукцию некоторых вирусов в концентрациях, не оказывающих цитотоксического действия.

Трифосфат рибавирина, обнаруживаемый в ряде органов (в том числе и в легких), подавляет активность вирусной РНК-полимеразы (транскриптазы) вируса гриппа. В этой реакции ингибитор конкурирует с АТФ и гуанозинтрифосфатом (ГТФ). Наиболее демонстративен эффект ингибирования в присутствии динуклеозидов аденилгуанозина и гуанилцитозина, стимулирующих активность РНК-полимеразы и являющихся праймерами, т. е. факторами инициации транскрипции. Действие трифосфата рибавирина в данном случае является избирательным; оно не ингибирует активность ДНК-зависимых РНК-полимераз эукариотических и бактериальных клеток. В условиях использования как источника праймера глобиновой РНК можно полагать, что рибавирин — 5'-трифосфат может предотвращать использование ГТФ в качестве первого нуклеотида, непосредственно связанного с концевым 3'-нуклеотидом экзпированного праймера и формирующего таким образом первую комплементарную ГЦ-пару с 3'-конца вирусной РНК. Эти результаты свидетельствуют о молекулярном механизме антигриппозного действия рибавирина [28]. Ингибировать активность РНК полимеразы вируса гриппа в присутствии аденилгуанозина удалось также и с помощью его структурного аналога аденилрибавирина, который должен присутствовать в реакционной смеси непосредственно с момента начала реакции [4, 5, 13]. Следствием ингибирования активности транскриптазы вируса гриппа явилось подавление синтеза вирусных комплементарных РНК и белков [6, 67].

Выше указывалось, что пикорнавирусы нечувствительны к рибавирину, а вирусы с негативным РНК-геномом и некоторые ДНК-содержащие вирусы

чувствительны к нему. Очевидно, рибавирин (его трифосфат) может в качестве аналога ГТФ действовать на стадии процессирования вирусной РНК и нарушать формирование специфической структуры «КЭП» на 5'-конце мРНК. Структура «КЭП» представлена тремя нуклеотидами: концевым остатком N₇-метил-гуанозин-5'-трифосфата, связанным с последующим нуклеозидом 5'→5' фосфодиэфирной связью; второй нуклеозид связан с третьим 3'→5' фосфодиэфирной связью. Включение ГТФ катализируется гуанилтрансферазой. Обычно незамещенный гидроксил при С₂ рибозильного остатка у второго и третьего нуклеозидов также метилирован [68]. На примере мРНК вируса осповакцины, содержащей на 5'-конце структуру «КЭП», исследовали действие фосфорилированных производных рибавирина на активность гуанилтрансферазы, катализирующей 5'-гуанилирование вирусной мРНК. Рибавирин-5'-трифосфат (но не его монофосфат) на 55 % подавлял активность этого энзима, снижая соответственно включение ³H-ГМФ в 5'-конец неэкспонированной вирусной мРНК. Ингибиторный эффект достаточно выражен, так как соотношение K_i и K_m равно 1,45. Это — специфическое действие ингибитора, так как трифосфат рибавирина не влиял на активность вирусной ДНК-зависимой РНК полимеразы вируса осповакцины, т. е. не конкурировал в такой реакции с ГТФ. Последние результаты свидетельствуют об отсутствии конкуренции с ГТФ в процессе полирибонуклеотидного синтеза и о практическом отсутствии включения рибавирина в вирусную РНК. Полученные данные могут указывать и на то, что рибавирин включался в структуру «КЭП» вместо концевой гуанилата [38].

На другой вирусной модели — вируса Венесуэльского энцефаломелита лошадей, имеющего позитивный РНК-геном, исследовали влияние рибавирина (1,25 мМ) на репродукцию этого вируса. Удалось установить любопытный факт, также проливающий свет на роль рибавирина в формировании «КЭП» у вирусной мРНК. Рибавирин не ингибировал синтеза мРНК этого вируса. Однако изолированная мРНК опытных проб содержала значительно

меньше кефированных молекул. И эффективность ее трансляции в ретикулоцитарной системе была на 70 % меньше, чем в контрольных пробах [20]. Этим, вероятно, и объясняется молекулярный механизм действия рибавирина на репродукцию ряда вирусов.

Однако в случае гриппозной инфекции этот процесс, как известно, не может иметь места, и ингибирующий эффект рибавирина, вероятнее всего, связан со специфическим ингибированием активности вирусной транскриптазы. В какой степени это может распространяться на другие вирусные семейства с негативным РНК-геномом (например, арена и бунья, которые также чувствительны к рибавирину), покажут последующие исследования.

Активность рибавирина in vivo. Результаты многочисленных экспериментальных исследований показали, что рибавирин *in vivo* оказывает широкий спектр антивирусного действия, хотя и несколько более узкий, чем в случае испытаний рибавирина *in vitro*.

Кратко о токсикологии рибавирина. При оральном приеме для мышей LD₅₀ равна 5000 мг/кг, интраперитонеально LD₅₀ = 900 мг/кг для мышей и 2000 мг/кг для крыс. На основании этих основополагающих показателей токсичности можно отнести рибавирин к хорошо переносимым малотоксичным веществам. Максимально переносимая оральная доза для крыс равна 1000 мг/кг и 10 г/кг для макаков резусов. Крысы хорошо переносят ежедневный оральный прием рибавирина — 30 мг/кг в день в течение 2 лет, макаки резусы — 90 мг/кг в день в течение 10 мес. Рибавирин не оказывает мутагенного действия *in vivo* и *in vitro*. Однако препарат дает эмбриотоксический эффект у кроликов и крыс, не влияет на бабуинов. Рибавирин может оказывать иммуносупрессивное действие на лабораторных животных [17, 70].

Наибольшее число экспериментальных работ с рибавирином *in vivo* посвящено гриппозной инфекции мышей. Необычно высокий процент выживаемости (до 100 %), превосходящий таковой у ремантадина и амантадина, выраженная эффективность при лечебной схеме применения, активность как при А, так и при В гриппозной инфекции, возможность комбинаций с другими химиопрепаратами привлекли к

рибавирину большое внимание. Все эти данные были высоковоспроизводимыми при оральном и интраперитонеальном способах введения. Разовая доза колебалась от 25 до 400 мг/кг при оральном введении и от 25 до 100 мг/кг при интраперитонеальном. Препарат был эффективен при его интрацеребральном введении в условиях инфицирования нейротропным вирусом гриппа А и не оказывал действия при периферических способах введения [69, 70].

Важные результаты были получены в условиях аэрозольного введения рибавирина, когда удалось снизить суточную дозу химиопрепарата в 4,5—5 раз по сравнению с оральным введением и получить выраженное лечебное действие даже в условиях начала аэрозольного введения рибавирина через 72 ч после инфицирования мышей вирусом гриппа. Аэрозоль рибавирина не вызывал токсических изменений в легких мышей в условиях его длительного, даже 4-суточного введения. Значительная эффективность рибавирина обнаружена и при различных способах введения: внутривенном, внутримышечном и подкожном [12, 58, 81].

Комбинированное применение рибавирина и ремантадина (амантадина) при экспериментальной гриппозной инфекции белых мышей позволяет получить аддитивное защитное действие, обеспечить максимальную выживаемость при лечебной схеме применения двух химиопрепаратов, предотвратить развитие воспалительных реакций в легких. Применение такого сочетания может иметь практическую значимость для лечения гриппа, имея в виду аэрозольное введение амантадина (ремантадина), либо одновременное аэрозольное введение двух химиопрепаратов [6, 11, 47, 48].

Активность рибавирина *in vivo* в отношении аренавирусов в опытах на обезьянах была выявлена при его внутримышечном и подкожном способах введения. Препарат подавлял развитие вирусемии и увеличивал выживаемость животных [10, 17].

Аналогичные результаты были получены в опытах на мышах и обезьянах с представителями семейства Буньявирусов. На моделях инфекций обезьян и мышей, вызванных этими вирусами, подкожные инъекции рибавирина обеспечивали выживаемость более

50 % животных [1, 17]. Рибавирин не снижал выживаемости мышей, зараженных целым рядом тогавирусов (α - и флавивирусов). Вероятнее всего, препарат в малой степени проникает в ЦНС, хотя *in vitro* в отношении, например α -вирусов, действие имеет место [70].

Рибавирин обладает определенной активностью в отношении экспериментальных герпетических инфекций. Растворы препарата (0,1—10 %) оказались эффективными при лечении герпетических кератитов кроликов и хомяков. Терапевтическое действие рибавирина усиливалось в сочетании с полным амфотерицином В [70].

Рибавирин высокоэффективен при экспериментальном кожном герпетическом поражении мышей (местное применение). Вместе с тем рибавирин не влиял на течение герпетического энцефалита мышей при периферическом введении, а также на цитомегаловирусную нелегальную инфекцию мышей [8, 17].

Рибавирин при местном применении оказывал выраженное действие при осповакцинальной инфекции глаз кроликов и не влиял на течение осповакцинального энцефалита мышей [17].

Эффективность рибавирина при ряде онкорнавирусных инфекций мышей в виде интраперитонеальных инфекций выражалась в виде значительной задержки развития спленоmegалии, гепатомегалии и снижении титра вируса в плазме. При сочетании с цитотоксическими веществами эффективность рибавирина возрастает: значительно увеличивается продолжительность жизни лейкоэмических мышей [72].

Клиническая эффективность

Клиническое изучение рибавирина при пероральном введении во время эпидемий гриппа А и В и экспериментальном инфицировании волонтеров дало противоречивые результаты [65]. Изучали терапевтическую эффективность рибавирина при натуральной вспышке гриппа А/Англия/42/73 (H3N2). Препарат (300 мг/день) применяли перорально в течение 5 дней. В результате лечения рибавирином тяжелая форма заболевания имела место в 2 случаях из 21, в группе плацебо — в 16 случаях из 24. В группе людей, получавших рибавирин, не наблю-

далось вирус-носительства и простота титра сывороточных антител по сравнению с контролем. Положительные результаты изучения препарата в клинике при гриппе были получены также и другими авторами [31, 82].

В одной публикации американских авторов было показано, что рибавирин, назначаемый в течение 5 дней по 1000 мг в день, не позднее чем через 6 ч после инфицирования волонтеров вирусом гриппа А/Виктория/3/75 (H3N2) снижал тяжесть заболевания и выделение вируса по сравнению с таковыми группы, получившей плацебо [56].

Наряду с сообщениями об эффективности рибавирина в клинике при гриппе были получены и противоположные результаты. Профилактическое применение препарата (600 мг/кг) за 2 дня до инфицирования волонтеров вирусами гриппа А (H3N2) и В и затем в течение последующих 8 дней не привело к снижению тяжести симптомов заболевания [21, 79].

Отсутствие терапевтического эффекта рибавирина было показано в ходе «двойного слепого» изучения в клинике во время эпидемии гриппа А/Бразилия/11/78 (H1N1). Препарат (1000 мг/день) назначали в течение 5 дней [73].

Следует отметить, что при введении высокой дозы рибавирина (1000 мг/кг) у 25 % больных наблюдалось временное повышение уровня сывороточного билирубина (1,4—2,2 мг на 100 мл), который возвращался к норме через 4 нед [21, 73, 79].

Накопленная информация о низкой эффективности рибавирина в условиях перорального введения при гриппозной инфекции в клинике способствовала поиску иных способов введения препарата. Модификация аэрозольного генератора для получения мелкодисперсных частиц аэрозоля (средний диаметр 1,2—1,3 мкм) позволила распылять противовирусные препараты в течение длительного периода времени (до 24 ч). С помощью генератора Найт и соавт. [47] продемонстрировали высокую эффективность рибавирина при экспериментальной гриппозной инфекции белых мышей. Они начали введение препарата через 72—96 ч и даже через 120 ч после инфицирования животных. Положительные результаты *in vivo* позволили приступить

к испытанию аэрозольного способа введения препарата при гриппе в клинике.

Во время эпидемии, вызванной вирусом гриппа А/Англия/333/80 (H1N1), проведено изучение эффективности рибавирина в условиях аэрозольного введения людям. 14 больных получали препарат (50 мг/ч) 23 ч в сутки в течение 3 сут, 17 лиц служили контролем. Все больные были подобраны таким образом, что симптомы их заболевания проявились не позднее чем за 24 ч до начала лечения. Терапия аэрозолем рибавирина снижала степень выраженности и продолжительности лихорадки. Улучшение общего состояния у больных наступило менее чем через 24 ч после начала введения препарата. Титр вируса в смывах слизистой носа больных, получавших препарат, через 17—18 ч после начала лечения был значительно ниже, чем в контроле, а через 63—68 ч вирус уже не определялся, в то время как в контрольной группе он находился еще на высоком уровне [47].

Значительная терапевтическая эффективность аэрозольного способа введения рибавирина в клинике была показана при гриппе В/Сингапур/222/79 [57]. Аэрозоль рибавирина оказался эффективным и в отношении респираторно-синтициального вируса (РС-вируса) — наиболее частой причины серьезных заболеваний верхних отделов дыхательных путей новорожденных и детей дошкольного возраста [34, 37, 40, 41].

Хотя все исследования основаны на небольшом числе случаев, они открывают реальную перспективу для аэрозольной терапии рибавирином гриппа и других острых респираторных заболеваний. Несомненно, обоснованным является выявление терапевтического эффекта у рибавирина при гриппозной инфекции в ходе его инъекционного применения, а также в сочетании с ремантадином (амантадином). Определенная эффективность рибавирина была выявлена в условиях клиники при лечении герпесвирусных инфекций, кори и некоторых других заболеваний [35].

По данным Галассо [7], рибавирин проходит испытания в клинике при заболеваниях, вызванных аренавирусами. Первое исследование, проведенное в 1978 г. в Сьерра-Леоне совместно с

Центром по борьбе с инфекционными болезнями (США), показало, что пероральное введение рибавирина (1000 мг в день) больным лихорадкой Ласса оказалось неэффективным. Позднее в лабораторных опытах на приматах продемонстрировано, что внутривенное или внутримышечное введение более высоких доз препарата при комбинации с иммунной плазмой позволяет спасти жизнь животных даже через 7—8 дней после заражения вирусом Ласса. В настоящее время в Сьерра-Леоне проводится повторное исследование эффективности рибавирина в клинике при лихорадке Ласса. Пока слишком рано предсказывать результаты этих испытаний, но в случае успеха медицина приобретает эффективное химиотерапевтическое средство для борьбы с инфекцией, смертность при которой составляет 36—67 %.

Рибавирин явился первым признанным нуклеозидным противовирусным препаратом широкого спектра действия. Он представляет значительный интерес как средство для лечения вирусных заболеваний. Это определяется особенностями его молекулярного механизма действия. Рибавирин-5'-трифосфат — первый избирательный ингибитор РНК-полимеразы вируса гриппа. В связи с этим рибавирин (его фосфорилированные производные) является ценным средством для изучения механизма синтеза вирусных мРНК на завершающих этапах их процессирования.

Рибавирин обладал выраженным терапевтическим действием при его клиническом изучении в отношении лихорадки Ласса. В контрольной группе больных, получавших плацебо, смертность составляла 50 %, в группе, получавших рибавирин орально или внутривенно, смертность снижалась до 17 %. (Mc Cormick J. B. et al. "In Clinical application of ribavirine". Acad. Press, 1984, p. 187—192).

Рибавирин подавлял репликацию вируса, сходного с вирусом СПИД, в культуре клеток Т-лимфоцитов человека и индукцию обратной транскриптазы (концентрация 50 мкг/мл). (Lancet, 1984, p. 1367—1369).

ЛИТЕРАТУРА

1. Березина Л. К., Леонтьева Н. А., Галегов Г. А., Львов Д. К. — *Вопр. вирусол.*, 1983, № 5, с. 627—628.

2. Вотяков В. И., Галегов Г. А. — Вестн. АМН СССР, 1983, № 12, с. 62—66.
3. Галегов Г. А., Жданов В. М. — Там же, 1976, № 3, с. 77—82.
4. Галегов Г. А. — В кн.: Перспективы биоорганической химии в создании новых лекарственных препаратов. Рига, 1982, с. 113.
5. Галегов Г. А., Правдина Н. Ф. — Вопр. вирусол., 1982, № 5, с. 616—617.
6. Галегов Г. А., Найдт В., Пушкарская Н. Л., Львов Н. Д. — Там же, 1981, № 6, с. 69—72.
7. Галассо Д. Д. — Бюл. ВОЗ, 1984, № 4, с. 394—403.
8. Демидова С. А., Фарбер Н. А., Мартынова В. Н., Савицкий Г. И. — Вопр. вирусол., 1983, № 2, с. 228—232.
9. Индулен М. К., Фельдблюм Р. Л. — Acta virol., 1982, v. 26, N 1, p. 109—109.
10. Петкевич А. С., Сабынин М. В., Вотяков В. И., Лукашевич И. С. — Вопр. вирусол., 1981, № 2, с. 244—245.
11. Петрова И. Г., Балашов В. И., Пушкарская Н. Л., Терских И. И. — Там же, 1982, № 4, с. 440—444.
12. Петрова И. Г. — Там же, 1983, № 4, с. 109—110.
13. Правдина Н. Ф., Весловская Т. В., Шобухов В. М., Галегов Г. А. — Докл. АН СССР, 1984, т. 274, с. 274—277.
14. Львов Н. Д., Пушкарская Н. Л., Галегов Г. А. — Вопр. мед. химии, 1981, № 6, с. 820—823.
15. Чипен Г. И., Гринштейн В. Д. — Химия гетероцикл. соед., 1965, т. 1, с. 420—428.
16. Allen L. B., Boswell K. H., Khwaja T. A. et al. — J. med. Chem., 1978, vol. 21, p. 742—751.
17. Allen L. B. — In: Ribavirin. A Broad Spectrum Antiviral Agent. New York, 1980, p. 43—62.
18. Allen L. B., Vanderclive L. K., Fingal C. M. et al. — Antiviral Res., 1982, vol. 2, p. 203—206.
19. Alonso G., Garcia-Lopez M. T., Garcia-Munoz G. et al. — Heterocycl. Chem., 1970, vol. 1, p. 1269—1277.
20. Canonico P. G., Little J. S., Jahrling P. B. et al. — In: 19th Ann. Congress on Antimicrob. Agents. Chemoter, 1980.
21. Catlin D. H., Smith R. A., Sammel A. I. — In: Ribavirin. A Broad Spectrum Antiviral Agent. New York, 1980, p. 83—96.
22. Cohen A., Togo I., Khakoo R. et al. — J. infect. Dis., 1976, vol. 133, Suppl. p. A-114—A-120.
23. Cook F. D., Allen L. B., Streeter D. G. et al. — J. med. Chem., 1978, vol. 21, p. 1212—1218.
24. Darby G., Field H. J. — Pharmacol. Ther., 1983, vol. 23, p. 217—228.
25. Descamps I., De Clercq E. — In: International Congress of Chemotherapy. 10th. Proceedings. Washington, 1978, vol. 1, p. 338.
26. Drabikowska., Dudycz L., Shugar D. — J. med. Chem., 1979, vol. 22, p. 653—657.
27. Dudycz L., Shugar D., De Clercq E., Descamps J. — Ibid., 1977, vol. 20, p. 1354—1362.
28. Eriksson B., Helgstrand E., Johannson N. et al. — Antimicrob. Agents Chemother., 1977, vol. 11, p. 946—949.
29. Esper D. O., Scholz I., Arago P. A. — Sem. Med. Mexico, 1977, vol. 92, p. 245—250.
30. Farkas J., Flegelova Z., Sorm F. — Tetrahedron Letters, 1972, vol. 22, p. 2279—2281.
31. Fernandez-Lertuche H., Diaz-Perches R. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1977, vol. 284, p. 282—288.
32. Fuertes M., Garcia-Lopez T., Garcia-Munoz G., Sleed M. — J. org. Chem., 1976, vol. 40, p. 4074—4079.
33. Fuertes M., Wilkowski J. T., Streeter D. G., Robins R. K. — J. med. Chem., 1974, vol. 17, p. 642—649.
34. Fedson D. S. — J. A. M. A., 1983, vol. 249, p. 2689—2690.
35. Fernandez H. — In: Ribavirin. A Broad Spectrum Antiviral Agent. New York, 1980, p. 215—230.
36. Galegov G. A., Pushkar'skaya N. I., Obrosova N. P., Zhdanov V. M. — Experientia (Basel), 1977, vol. 33, p. 905—906.
37. Gelfand E. W., Mc Curdy D., Pandu Rao C., Middleton P. J. — Lancet, 1983, vol. 2, p. 732.
38. Goswami B. B., Borek E., Sharma O. K. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1979, vol. 89, p. 830—836.
39. Gugliemi H. — Justus Liebigs Ann. Chem., 1973, vol. 8, p. 1286—1292.
40. Hall C. B., Mc Bride J. T., Walsh E. E. et al. — New Engl. J. Med., 1983, vol. 308, p. 1443—1447.
41. Hall C. B., Walsh E. E., Hruska J. F. et al. — J. A. M. A., 1983, vol. 249, p. 2660—2670.
42. Hernandez-Manon J., Arago C. A. — Sem. Med. Mexico, 1977, vol. 92, p. 171—176.
43. Hillyard I. W. — In: Ribavirin. A Broad Spectrum Antiviral Agent. New York, 1980, p. 59—72.
44. Huffman I. H., Sidwell R. W., Khare G. P. et al. — Antimicrob. Agents. Chemother., 1973, vol. 3, p. 235—241.
45. Huynh-Dinh T., Igolen J., Bisagni E. et al. — J. chem. Soc. Perkin Trans 1, 1977, p. 761—766.
46. Joung H. W., Dominik J. W., Walker J. S., Larson E. W. — J. clin. Microbiol., 1977, vol. 5, p. 131—136.
47. Knight V., Mc Clung H. W., Wilson S. L. et al. — Lancet, 1981, vol. 2, p. 945—949.
48. Knight V., Wilson S. L., Wydl P. R. et al. — In: Ribavirin. A Broad Spectrum Antiviral Agent. New York, 1980, p. 129—136.
49. Korbukh I. A., Preobrazhenskaya M. N., Yudin O. N. — J. Carbohydr., Nucleosid., Nucleotid., 1974, vol. 1, p. 363—371.
50. Lemkuhl F. A., Wilkowski J. T., Robins R. K. — J. Heterocycl. Chem., 1972, vol. 9, p. 1195—1201.
51. Lorenc R., Camargo M. J. A., Castro J. O. — Rev. Bras. Med., 1977, vol. 33, p. 401—403.
52. Makabe O., Fukatsu S., Umezawa S. — Bull. chem. Soc. Japan, 1972, vol. 45, p. 4577—2583.
53. Makabe O., Nakamura M., Umezawa S. — Ibid., 1975, vol. 48, p. 3210—3214.
54. Makabe O., Yajima J., Umezawa S. — Ibid., 1976, vol. 49, p. 3552—3557.
55. Makabe O., Suzuki H., Umezawa S. — Ibid., 1977, vol. 50, p. 2689—2693.
56. Mangussen C. R., Douglas R. G., Belts R. H. et al. — Antimicrob. Agents Chemother., 1977, vol. 12, p. 498—502.
57. Mc Clung H. W., Knight V., Gilbert B. E. et al. — J. A. M. A., 1983, vol. 249, p. 2671—2674.

58. Miller I. P., Streeter D. G., Robins R. K. — Ann. N.Y. Acad. Sci., 1977, vol. 284, p. 211.
59. Naik S. R., Witkowski J. T., Robins R. K. — J. med. Chem., 1974, vol. 17, p. 57—65.
60. Narand A. S., Vince R. — Ibid., 1977, vol. 20, p. 1684—1694.
61. Pickering M. V., Witkowski J. T., Robins R. K. et al. — Ibid., 1976, vol. 19, p. 841—842.
62. Poonian M. S., Nowoswiat E. F., Blount J. F. et al. — Ibid., p. 286—290.
63. Poonian M. S., Nowoswiat E. F. — J. org. Chem., 1977, vol. 41, p. 1109—1114.
64. Prisbe E. J., Smejkal J., Verheyden J. P. H., Mojfall G. — Ibid., p. 1836—1846.
65. Salido-Rengell F., Nasser-Quinones H., Briseno-Garsia B. — Ann. N.Y. Acad. Sci., 1977, vol. 284, p. 272—276.
66. Thannon W. M., Shabel F. M. — Pharmacol. Ther., 1980, vol. 11, p. 263—296.
67. Schollissek C. — Arch. Virol., 1977, vol. 50, p. 349—332.
68. Shatkin A. J. — Cell, 1976, vol. 9, p. 645—650.
69. Sidwell R. W., Huffman J. H., Khare G. P. et al. — Science, 1972, vol. 177, p. 705—706.
70. Sidwell R. W. — Pharmacol. Ther., 1979, vol. 6, p. 123—149.
71. Sidwell R. W. — In: Ribavirin. A Broad Spectrum Antiviral Agent. New York, 1980, p. 23—26.
72. Sidwell R. W., Allen L. B., Huffman J. H., Witkowski J. T. — Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.), 1975, vol. 148, p. 854—857.
73. Smith C. B., Charette R. P., Fox J. P. et al. — J. infect. Dis., 1980, vol. 141, p. 548—554.
74. Srivastava P., Streeter D. G., Matthews T. R. et al. — J. med. Chem., 1976, vol. 19, p. 1020—1026.
75. Srivastava P. C., Robins R. K. — Ibid., 1983, vol. 26, p. 445—448.
76. Stephen E. L., Walker J. S., Dominik J. W. et al. — Ann. N.Y. Acad. Sci., 1977, vol. 284, p. 264—271.
77. Streeter D. B., Witkowski J. T., Khare G. P. et al. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1973, vol. 70, p. 1174—1178.
78. Thurber T. C., Townsend L. B. — J. Amer. chem. Soc., 1973, vol. 95, p. 3081—3087.
79. Togo I., Mc Crachen E. A. — J. infect. Dis., 1976, vol. 133, Suppl., p. 109—113.
80. Vanek T., Farkas J., Gut J. — Collect. Czech. chem. Commun., 1979, vol. 44, p. 1334—1338.
81. Vanek T., Farkas J., Gut J. — Ibid., p. 1339—1344.
82. Velasques J. B. — Mexican periodical, 1975, vol. 2, p. 90—95.
83. Walker I. S., Stephen E. L., Spertzel R. O. — J. infect. Dis., 1976, vol. 133, p. 140—147.
84. Witkowski J. T., Robins R. K., Sidwell R. W., Simon L. N. — J. med. Chem., 1972, vol. 15, p. 1150—1154.
85. Witkowski J. T., Robins R. K., Khare G. P., Sidwell R. W. — Ibid., 1973, vol. 16, p. 935—942.
86. Witkowski J. T., Robins R. K., Lemkuh F. A. — U.S. Patent 3, 948, 885, 1976.
87. Witkowski J. T., Robins R. K. — In: Chemistry and Biology of Nucleosides and Nucleotides. /Eds R. E. Harmon, R. K. Robins, L. B. Townsend. New York, 1978, p. 267—282.
88. Witkowski J. T., Fuertes M., Cook P. D., Robins R. K. — J. Carbohydrat., Nucleosid., Nucleotid., 1975, vol. 2, p. 1—17.

Поступила 26.09.81

УДК 577.112.853(048.8)

С. М. Бычков, С. А. Кузьмина

БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ (ОБЗОР)

НИИ биологических структур Минздрава СССР, Москва

Гиалуроновая кислота (ГУК), открытая 50 лет назад в стекловидном теле глаза млекопитающих [1, 71—73], присутствует вместе с другими протеогликанами в клетках и межклеточных пространствах всех тканей позвоночных [8].

ГУК является высокополимерным неразветвленным гликозаминогликаном, построенным из N-ацетил-β-D-глюкозамина и β-D-глюкуроновой кислоты, соединенных между собой 1→3 и 1→4 гликозидными связями соответственно. В высокоочищенных препаратах ГУК, выделенных из синовиальных клеток, обнаружено наличие фукозы [20]. Не исключается, что этот минорный моносахарид постоянно присутствует во всех препаратах ГУК, но, возможно,

что он встречается в отдельных ее представителях, обладающих особыми функциями. Изолированные из различных объектов препараты ГУК всегда содержат некоторые количества не относящегося при всех методах очистки белка, содержащего треонин, серин, аспарагиновую и глутаминовую кислоты, которые присутствуют в белковых компонентах протеогликанов [8, 9, 24, 68, 90, 96]. Таким образом, ГУК представляет собой протеогликан с низким и сильно варьирующим количеством ковалентно связанного белкового (полнпептидного) компонента.

В физическом отношении ГУК характеризуется как биополимер, молекулярные параметры которого могут

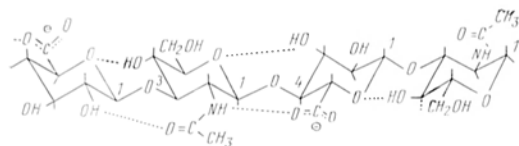


Рис. 1. Структура тетрасахаридного сегмента ГУК [94].

различаться в зависимости от вида организма, органа, ткани и т. п. Препараты ГУК, выделенные из одного исходного материала, неоднородны по молекулярной массе, которая обычно находится в пределах $2-3,1 \cdot 10^5-2-3,1 \cdot 10^6$ и может достигать порядка 10^7 дальтон, длина ее цепи составляет $0,5-5,0$ мкм [28, 44, 46, 47, 96]. Длина и гибкость макромолекулы ГУК в значительной мере изменчивы. Доминирующее влияние на конформацию макромолекулы ГУК, как и других протеогликанов, оказывает природа катиона. Особенно активны в этом отношении Ca^{2+} и Mg^{2+} [5-7]. В твердом состоянии ГУК обнаруживает значительную вариабельность конформации и упаковывается так, что соседние цепи становятся антипараллельными. На упаковку влияют также природа катиона, степень гидратации и наличие в препаратах других протеогликанов [29]. Показано, что Na-соль ГУК, не содержащая воды, имеет элементарную ячейку тетрагональной формы ($a=b=0,989$ нм, $c=3,381$ нм). Цепь ГУК представляет собой спираль, закрученную в левостороннем направлении, из 4-кратных дисахаридных единиц. В такой структуре имеются интрамолекулярные водородные связи $\text{OH} \dots \text{O}$ через $1 \rightarrow 3$ гликозидные связи и $\text{NH} \dots \text{O}$ через $1 \rightarrow 4$ гликозидные связи, а также координационные связи $\text{O} \dots \text{Na} \dots \text{O}$. При относительно высокой увлажненности Na^+ -гиалуроната возникает орторомбическая форма элементарных ячеек ($a=1,153$ нм, $b=0,989$ нм и $c=3,380$ нм). Орторомбическая форма содержит по крайней мере 4 молекулы воды на тетрасахаридную единицу полимера. Обе формы сходны по водородным связям и ионным «мостикам» [28, 29, 43]. С помощью ядерного магнитного резонанса установлено, что ГУК обладает стерическим расположением донорных и акцепторных групп, которое необходимо для возникновения стабильных водородных связей между ацетамидными, карбоксилатными группами, как пока-

зано на рис. 1 [23, 93, 94]. Расположение водородных связей в ГУК зависит от природы катиона, что выявлено методом ИК-спектроскопии. Более того, в агрегатах протеогликанов (см. ниже) расположение водородных связей также зависит от природы катиона [5, 6]. Методами ядерного магнитного резонанса и окисления ГУК периодатом показано, что конформационные особенности макромолекулы ГУК, обусловленные водородными связями, карбоксилатными, ацетамидными и гидроксильными группами, сохраняются и в водных растворах ГУК [93, 95].

Факторы, определяющие вторичную структуру макромолекулы ГУК в твердом состоянии, могут влиять на нее и в водных растворах, что следует из результатов вискозиметрических и других исследований. В то же время в водных растворах макромолекулы ГУК могут существовать и в виде неупорядоченных клубков, захватывающих пространство, в 10^3-10^4 раз большее, чем собственный объем цепей макромолекул. Наличие водородных связей способствует разворачиванию клубков при физиологических значениях ионной силы и pH [78]. Об особенностях и исключительной лабильности конформации макромолекул ГУК свидетельствует то, что при pH 12,5 водного раствора Na^+ -гиалуроната происходит резкое, но обратимое при pH 7,0 снижение вязкости без изменения молекулярной массы, что является специфичным для ГУК [67]. Методами ядерного магнитного резонанса и кругового дихроизма определены наличие чередующихся между собой относительно более жестких и более гибких структур в цепи ГУК и существование равновесия между этими структурами. Исключительно высокая вязкость и другие уникальные свойства растворов ГУК, помимо обусловленных выше отмеченными особенностями ее макромолекул являются также следствием специфических и неспецифических межмолекулярных взаимодействий макромолекул ГУК [30]. Контактные взаимодействия между макромолекулами ГУК приводят к образованию межмолекулярных ассоциаций, имеющих ячеистую структуру и захватывающих еще большее пространство, чем ее неупорядоченные клубки. Динамические свойства таких сложных структур увеличиваются с повышением ионной си-

лы и понижаются с уменьшением pH раствора. Изолированный в близких к физиологическим условиям ионной силы и pH Na^+ -гиалуронат, состоящий из 35 000 дисахаридных единиц, в растворах в результате взаимодействия цепей быстро образует пространственные структуры, что обнаруживается вискозиметрическими и другими методами. Добавление к таким растворам в равной концентрации фрагментов макромолекулы ГУК, состоящих из 60 дисахаридных единиц, разрушает структурные ассоциации и в реологическом отношении. Смешанные растворы ведут себя как растворы изолированных неассоциированных цепей ГУК. Очень короткие (из 4 дисахаридных единиц) и очень длинные (из 400 дисахаридных единиц) фрагменты не обладают указанным действием [115]. Конформационные особенности ГУК определяют вязкоэластические свойства ряда биологических жидкостей, межклеточного матрикса и прочих структур, образующихся с участием ГУК и других протеогликанов. Уменьшение полимерности нескольких макромолекул ГУК при патологических состояниях может повлечь диспропорциональные нарушения нормальных структур, образованных высокополимерной ГУК, что опасно для систем, выполняющих оптические и механические функции (стекловидное тело глаза, пуповина, синовиальная жидкость и др.), в которых ГУК является преобладающим протеогликаном. Образуя в растворах ячеистые структуры, цепи макромолекул ГУК придают растворам способность противостоять деформирующему действию давления извне. Создание «буферного объема» из ГУК между фибриллами и волокнами в определенных образованиях может быть основано на этих ее свойствах [95].

ГУК, связывая значительные количества воды и образуя ячеистые структуры в растворе, контролирует распределение других одноименно заряженных макромолекул посредством стерического исключения из заполненного макромолекулами ГУК объема. Линейные макромолекулы, несущие электрический заряд, образующие в растворе трехмерные структуры, оказывают большее исключяющее стерическое действие, чем компактные макромолекулы [62]. Такой эффект приводит к концентрированию вытесненных из ос-

новного пространства макромолекул в предельно ограниченном при данных условиях объеме, что может способствовать различным взаимодействиям их между собой и приводить к образованию новых структур. ГУК может электростатически взаимодействовать с низко- и высокомолекулярными положительно заряженными веществами. Наиболее выражено это проявляется в слабощелочной среде, где соединение ГУК с указанными веществами выделяется в виде нерастворимых комплексов [2, 61]. В физиологических пределах ионной силы и pH электростатическое взаимодействие ГУК с белками и другими веществами, не приводящее к выделению нерастворимых комплексов, может иметь своим последствием определенную пространственную ориентацию макромолекул, что выразится в возникновении гетерогенных по макромолекулярному составу структур.

Исследования взаимодействия ГУК с другими протеогликанами проводились главным образом в связи с изучением матрикса различных видов соединительной ткани [45, 46, 51, 100]. Почти все наиболее важные результаты по данному вопросу были получены в исследованиях матрикса хряща, сведения о протеогликанах которого представлены в таблице. Матрикс хряща (около 90 % объема этой ткани) состоит (в расчете на сухую массу) из 40—70 % коллагена типа II и 10—30 % сульфатсодержащих протеогликанов (С-протеогликаны). Последние представляют собой комплексы с молекулярной массой $0,5 \cdot 10^6$ — $4,0 \cdot 10^6$ дальтон, состоящие из белкового стержня, к удлиненной части (до 350 нм) которого ковалентно присоединено около 100 цепей хондроитинсульфатов и 30—60 цепей кератансульфатов [4, 6, 8]. Около 90 % хондроитинсульфатов расположено на белковом стержне в отдалении от так называемого ГУК-связывающего участка данного белка, а 60 % кератансульфата сосредоточено в области, примыкающей к этому участку. Интересно, что этот белковый стержень синтезируется до образования указанного комплекса [75]. Кроме того, к белковому стержню присоединено N-гликозидной связью значительное количество олигосахаридов (см. таблицу; рис. 2). Существует семейство протеогликанов хряща, представ-

Состав протеогликанов хряща

Компонент	Моносахаридные компоненты гликозаминогликанов	Число цепей, групп на макромолекулу протеогликана	Молекулярная масса компонента, дальтон	Содержание в макромолекуле, средний % от молекулярной массы
Белок (стержень)	—	1?	$2 \cdot 10^5$ — $3 \cdot 10^5$	7—12
Хондритинсульфаты (4 и 6)	D-N-ацетилгалактозамин и D-глюкуроновая кислота	100	$2 \cdot 10^4$ — $3 \cdot 10^4$	80—85
Кератансульфат	D-N-ацетилглюкозамин и D-галактоза	50	$4 \cdot 10^3$ — $8 \cdot 10^3$	5—10
Олигосахариды	—	50	$12 \cdot 10^3$ — $2 \cdot 10^3$	1—3
О-сульфатные группы	—	4500	—	—
Карбоксильные группы	—	4200	—	—
Всего заряженных групп	—	8700	—	—

ляющих собой протенихондроитинкератансульфаты (ПХКС), различающиеся по молекулярной массе, величина которой зависит от длины белкового стержня, числа присоединенных гликозаминогликанов, соотношения изомеров хондритинсульфатов и олигосахаридов [26, 27, 51, 52, 63]. Хондритин и кератансульфаты определяют главные свойства протеогликанов матрикса хряща, а белковый стержень формирует распределение и плотность упаковки вдоль него гликозаминогликанов, на конформацию которых могут влиять олигосахариды, ковалентно связанные с этим стержнем. Одна молекула гликозаминогликана, соединяясь с белковым стержнем, взаимодействует с 4—6 аминокислотными остатками. Наиболее крупные макромолекулы протеогликанов содержат относительно боль-

ше гликозаминогликанов и меньше белка. Часть белкового компонента протеогликанов хряща, так называемый ГУК-связывающий участок эллипсоидной формы ($15 \times 3 \times 3$ нм, мол. масса $5,5 \cdot 10^4$ Д), содержащий олигосахариды, ковалентно соединен с длинной частью этого компонента перпендикулярно к его длинной оси [34, 45, 46, 63]. Протеогликаны, содержащие хондритинсульфаты, продуцируемые различными типами клеток, могут различаться по размерам гликозаминогликановых цепей и белкового стержня [120]. Высокая молекулярная масса, развернутая структура, гибкость гликозаминогликановых компонентов и белкового стержня, исключительная гидрофильность протеогликанов обеспечивают им возможность создавать в растворах трехмерные структуры, обладающие рядом свойств, которые присущи структурам ГУК [10, 11, 33, 105].

В матриксе хряща значительная часть протеогликанов находится в виде агрегатов, возникающих посредством соединения эллипсоидной части белкового компонента протеогликана с ГУК при участии связующего (стабилизирующего) белка (рис. 3). К одной макромолекуле ГУК с мол. массой $2 \cdot 10^5$ — $2 \cdot 10^6$ Д и длиной 0,5—5,0 мкм может присоединиться от 20 до 250 молекул С-протеогликанов (мономеров) на расстоянии между ними 25—50 нм, в результате чего образуются агрегаты протеогликанов (АПГ). Одна цепь ГУК с мол. массой $1,6 \cdot 10^6$ Д может присоединить 200 протеогликанов, в результате чего получается агрегат с мол. массой $3,5 \cdot 10^8$ Д и длиной 4 мкм [33, 46]. Мономеры-протеогли-

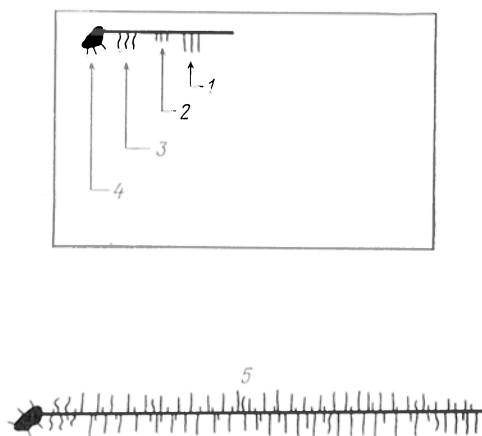


Рис. 2. Схема структуры протенихондроитинкератансульфата (ПХКС) протеогликана хряща позвоночных животных [44].
1 — хондритинсульфат; 2 — О-связь олигосахаридов; 3 — кератансульфат; 4 — N-связь олигосахаридов; 5 — протеогликан.

каны в агрегатах расположены радиально вдоль цепи ГУК, и длина этих протеогликанов, определяемая длиной их белкового стержня, остается неизменной (580 нм) после соединения с ГУК. АПГ имеют форму эллипсоида, длина главной оси определяется степенью растяжимости цепи ГУК [55].

Обнаружены два вида связующего белка, различающиеся по молекулярной массе. В более легком из них отсутствуют углеводные компоненты [21, 44, 51, 59, 103]. Связующий белок может секретироваться клетками в больших количествах, чем необходимо для стабилизации АПГ. Очевидно, что одним из важнейших факторов, управляющих образованием стабильных АПГ в хряще, является наличие концентрации ГУК [45, 46].

АПГ не диссоциируют в физиологических пределах рН и ионной силы. Полная и обратимая диссоциация АПГ на мономеры-протеогликаны, ГУК и связующий белок происходит при высоких концентрациях (2—4 М) гуанидина гидрохлорида, $MgCl_2$, $CaCl_2$ и $CsCl$, а в 4 М мочевины они не диссоциируют. Молекулярные массы мономеров-протеогликанов, отделенных от связующего белка и ГУК, находятся в пределах величин молекулярных масс неагрегирующихся протеогликанов хряща. Изменением рН и ионной силы раствора можно вызвать диссоциацию АПГ на протеогликаны, связующий белок и ГУК или на ГУК и протеогликаны, соединенные с этим белком. Продукты диссоциации вновь соединяются в АПГ при значениях рН и ионной силе, способствующих ассоциации. Включение связующего белка в комплекс ГУК-протеогликанов необходимо для стабилизации АПГ [42, 52, 60]. Взаимодействие эллипсоидной части белкового компонента протеогликанов с ГУК является строго специфичным. ДНК, хондритинсульфаты, дерматансульфат, гепарин [3], несulfатированный промежуточный продукт биосинтеза гепарина и хондритин, отличающийся от ГУК соответственно гликозидными связями и положением гидроксильной группы при C_4 аминоксахара, и декстрансульфат не образуют агрегаты с протеогликанами [48, 49]. Для соединения эллипсоидной части белкового компонента протеогликана с ГУК необходимо наличие в этой части остатков аргинина и лизина и 4 кар-

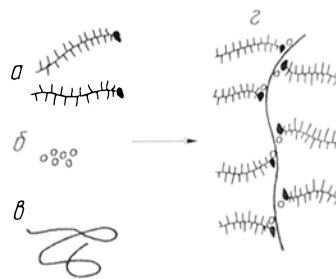


Рис. 3. Схема структуры агрегатов протеогликанов хряща позвоночных животных [44].
а — протеогликан; б — связующий белок; в — глыбу; г — агрегат протеогликанов.

боксильных групп на каждый декасахаридный фрагмент ГУК. В растворах при рН 3,0—4,0 происходит обратимая диссоциация АПГ. Однако, кроме электростатического взаимодействия, для устойчивого соединения протеогликанов с ГУК необходимо наличие в эллипсоидной части неблокированного остатка триптофана и немодифицированной третичной структуры. По-видимому, весь объем гликозаминогликанов, соединенных с белковым стержнем, а не только эллипсоидная часть белкового компонента, определяют упаковку протеогликанов вдоль макромолекулы ГУК [48—50, 52]. ПХКС в 0,15 М растворе $NaCl$ при рН 7,0 в присутствии ГУК может образовать с ней агрегаты в отсутствие связующего белка. Такие нестабилизированные указанным белком АПГ диссоциируют в кислой среде при высоких концентрациях гуанидин гидрохлорида, $MgCl_2$ и в 6 М мочевины при 60°, но не диссоциируют в концентрированных растворах $NaCl$ и $CsCl$ [42, 52].

Стабильные АПГ обнаружены в культурах хондросаркомы (Swarm), ЗТЗ клеток мышей, глияльных клетках [44, 51, 87]. У крупного рогатого скота одних и тех же возраста и пола в протеогликанах суставного хряща содержится меньше хондритинсульфатов и больше кератансульфата, чем в таком носовой перегородки и трахеи, но все они в одинаковой степени способны образовывать агрегаты с ГУК. В суставном хряще по мере удаления от поверхности и вглубь ткани, протеогликанов содержат больше кератансульфата и меньше хондритинсульфатов, в то время как количество АПГ не зависит от глубины и составляет около 90 % всех протеогликанов ткани [37, 38]. В эластичном хряще и

некоторых других видах соединительной ткани содержание ГУК превышает таковое, необходимое для включения всех имеющихся в них С-протеогликанов в АПГ [119]. Выделенные из культуры глиальных клеток мозга человека протеогликаны (ПХКС) образуют в растворе в присутствии ГУК агрегаты, что подавляется прибавлением к смеси дека- и тетрадисахаридных фрагментов ГУК [87].

ГУК является единственным из всех протеогликанов, способным ориентировать и концентрировать вокруг себя макромолекулы ряда других протеогликанов, создавая сложные гетерогенные стерические структуры, что в предельной форме выражается в образовании АПГ различной степени устойчивости, в зависимости от участия связующего белка. Образование стабильных АПГ является механизмом иммобилизации макромолекул протеогликанов внутри коллагеновых и эластиновых каркасов соединительной ткани. АПГ несут высокий концентрированный отрицательный заряд, обладают исключительной гидрофильностью и значительно большей эластичностью, чем неагрегированные протеогликаны, что особенно важно для систем, несущих переменные механические нагрузки [66, 82]. Изолированные АПГ обладают более сильно выраженной, чем ГУК, способностью создавать в растворах трехмерные структуры, обладающие свойством стерического исключения других элементов из пространства, заполненного такими структурами [13].

Во многих тканях, клетках и клеточных органеллах при наличии в них ГУК, протеогликанов, состоящих из изомеров хондроитинсульфата и кератансульфата, и других протеогликанов стабильные АПГ не образуются. Неагрегированные С-протеогликаны наряду с АПГ содержатся во всех видах хряща. Поскольку С-протеогликаны в тканях и клетках всегда присутствуют совместно с ГУК в тех или иных количественных соотношениях, то между ГУК и другими протеогликанами могут возникнуть и в отсутствие связующего белка сложные подвижные структуры, что наблюдается в модельных опытах [11]. Такие структуры в тканях в зависимости от физиологических ситуаций могут быстро и легко возникать и распадаться. Постоянно присут-

ствующие в хряще и не вступающие в агрегаты с ГУК протеогликаны, вероятно, необходимы для подобного структурирования, когда это требуется по физиологическим условиям.

Представляют интерес исследования в целях выявления взаимодействия ГУК с другими протеогликанами, гликопротеидами и липопротеидами. Из хондроцитов суставного хряща человека, клеток хондросаркомы крыс (Swarm) и аорты крупного рогатого скота выделены комплексы ГУК с дерматансульфатом [80]. В аорте крупного рогатого скота обнаружены два комплекса, различающиеся по молекулярной массе, содержанию изомеров хондроитинсульфатов и ГУК [69]. Из фиброзных бляшек (fibrous plaque lesions) аорты человека выделены ассоциаты ГУК с липопротеидами сыворотки крови. По-видимому, ГУК принадлежит определенная роль захватывания и связывания липопротеидов в матриксе соединительной ткани аорты [99]. Эти данные представляют интерес в связи с участием гепарина в освобождении липопротеидлипазы из ее комплекса с гепарансульфатом, находящегося на поверхности эндотелиальных клеток [3]. Большое значение имеют исследования взаимодействия ГУК с фибронектином клеток, так как этот фосфогликопротеид участвует в осуществлении контакта клетки с клеткой. Фибронектин клеток обладает сродством к ГУК только в форме мультимера, в которой он отличается в конформационном отношении от димера — его обычной формы. В мультимерной форме фибронектина создаются структуры, реагирующие с ГУК и ее фрагментами, состоящими из 50 дисахаридных единиц. Очевидно, для соединения ГУК с фибронектином клеток не требуется стабилизации ее макромолекулярной структуры [4].

Биосинтез ГУК в организме млекопитающих мало изучен. Предполагается, что он осуществляется последовательным присоединением N-ацетилглюкозаминна и глюкуроновой кислоты, в результате чего создается длинная неразветвленная цепь макромолекулы ГУК. О сложности механизма биосинтеза ГУК свидетельствует то обстоятельство, что в коже мышей эстрогены сильно и одновременно увеличивают синтез ГУК и число специфических рецепторов эстрогена в данном органе.

Поскольку антиэстрогены подавляют синтез ГУК, предполагается, что увеличение ее синтеза в указанной ситуации вызывается индуцированием ферментной системы, осуществляющей синтез ГУК [111]. Для изучения механизма биосинтеза ГУК широко используется гемолитический стрептококк группы А, не синтезирующий никакие другие протеогликаны, кроме ГУК. Из свободных от клеток этого микроорганизма энзиматических систем, синтезирующих ГУК, получены две фракции вновь синтезированной ГУК одинаковой молекулярной массы, одна из которых находится в процессе удлинения цепи молекулы ГУК. Инкубирование энзиматической системы с УДФ-[¹⁴C]-глюкуроновой кислотой приводит к включению [¹⁴C]-глюкуроновой кислоты в эту фракцию. Предполагается, что синтез ГУК в организме гемолитического стрептококка осуществляется удлинением ее цепи путем постепенного присоединения глюкуроновой кислоты и N-ацетилглюкозамина синтезирующей системой, связанной с мембранами, и последующей реализации с них готовой макромолекулы ГУК [101].

ГУК может регулировать биосинтез других протеогликанов. Добавленная к культурам зрелых хондроцитов ГУК вызывает быстрое перемещение синтезируемых ими С-протеогликанов из клеточного слоя в культуральную среду, где они образуют агрегаты с добавленной ГУК. Более высокие концентрации ГУК подавляют включение [³⁵S]-сульфата в протеогликаны, что сопровождается увеличением количества ГУК, связанной с поверхностью клеток [91, 97, 98, 116]. Предполагается, что понижение синтеза С-протеогликанов в таких опытах вызывается подавлением синтеза белкового стержня или активности β-кислосинтразы, необходимых для синтеза С-протеогликанов [51]. Однако указанное действие ГУК не является универсальным. В культурах фибробластов большие количества экзогенной ГУК не вызывают депрессии синтеза С-протеогликанов [117, 118]. По-видимому, пути биосинтеза ГУК отличаются от таковых синтеза С-протеогликанов. Монезин, подавляя включение [³⁵S]-сульфата и [³H]-галактозамина в С-протеогликаны в клетках культуры саркомы крыс, не влияет на включение [³H]-глюкозамина в ГУК, так

же синтезируемую этими клетками [76].

ГУК вместе с другими протеогликанами участвует в миграции клеток, дифференциации тканей и морфогенезе. При эмбриогенезе отмечается зависимость между накоплением ГУК и увеличением миграции клеток, а также между наступающей затем деградацией ГУК в период прекращения миграции клеток и началом их дифференциации [44, 51, 98, 104]. Показано, что экстрацеллюлярная концентрация ГУК является одним из регулирующих факторов дифференциации зародышевой хрящевой ткани в зрелый хрящ [58, 64]. Изучение миогенеза в культурах выявило, что миотубы содержат значительно больше ГУК, чем С-протеогликанов, и что ГУК, находящаяся на поверхности клеток, более высокополимерна, чем ГУК культуральной среды. Формированию миотубов предшествует создание высокого отношения содержания ГУК к содержанию С-протеогликанов на поверхности клеток и в культуральной среде. По-видимому, на размещение миобластов и фибробластов, имевшее место до начала формирования миотубов, влияет сдвиг отношения ГУК/С-протеогликанов. Миотубы в культурах синтезируют ГУК в количествах, в 8 раз превышающих синтез других протеогликанов. В организме они также окружены большим количеством ГУК. Вообще, все растущие и дифференцирующиеся ткани характеризуются высокой величиной отношения ГУК/С-протеогликанов [18, 19]. Важные результаты получены при совместном культивировании эмбриональных печеночных клеток (эпителиальных) и фибробластов курицы. В отдельных культурах первые клетки продуцируют мало С-протеогликанов или совсем их не образуют. В совместных же культурах указанных клеток при преобладающем количестве первых из них имеют место значительное увеличение синтеза ГУК и уменьшение образования С-протеогликанов. При этом отношение ГУК/С-протеогликанов прогрессивно растет. Фибробласты, культивируемые в среде роста клеток печени, увеличивают синтез ГУК и С-протеогликанов так, что отношение ГУК/С-протеогликанов не изменяется. Клетки же печени в среде роста фибробластов не обнаруживают изменений в уровне

С-протеогликанов. Из этого следует, что только фибробласты ответственны за увеличение уровня ГУК, а снижение уровня С-протеогликанов является результатом тесной близости двух типов клеток в совместных культурах. Эти данные подтверждают концепцию, согласно которой некоторые виды эпителиальных тканей способны влиять на количественные соотношения между отдельными протеогликанами в матриксе примыкающей к ним соединительной ткани [70]. Таким образом, ГУК выполняет важную роль одного из посредников во взаимодействии клеток между собой и между тканями.

Многие (если не все) клетки способны связывать ГУК. На поверхности SV-3T3 клеток, трансформированных лимфоцитов, макрофагов и некоторых других клеток мышей и других животных, имеются рецепторы, соединяющиеся с ГУК [41, 53, 74]. Количество связанной с клетками эндогенной ГУК зависит от вида клеток, их физиологического состояния и степени трансформации. В культурах хондроцитов курицы, трансформированных вирусом Рауса, наблюдается значительное уменьшение количества ассоциированной с клетками ГУК и увеличение связанных с ними хондронинсульфатов [41, 54, 74, 79, 102]. Обработка клеток трипсином исключает их способность связывать ГУК [19]. С увеличением молекулярной массы ГУК возрастает ее сродство с поверхностью клеток, поскольку каждая макромолекула ГУК соединяется с большим числом рецепторов (доменов). Когда одна макромолекула ГУК соединяется рецепторами разных клеток, образуются агрегаты клеток. Связывание ГУК клетками увеличивается с понижением температуры до 18°C, что соответствует температуре фазового перехода мембран. Разумеется, что связывание нетекучей мембраной больше, чем текучей [109, 110]. Прибавленная к культурам фибробластов мыши [^{14}C]-ГУК быстро связывается с поверхностью клеток и для отделения ее требуется обработка клеток трипсином. Кроме того, это прибавление сопровождается выделением С-протеогликанов в среду, изменением поверхности клеток и их миграцией. В культурах SV-3T3 клеток связывание [^{14}C]-ГУК происходит более эффективно, но оно подавляется высокими концентрациями фрагмен-

тов ГУК, состоящими из 6 и более моносахаридных остатков. SV-3T3 клетка может связать $3 \cdot 10^3$ молекул ГУК с молекулярной массой $2 \cdot 10^6$ Д [19]. Предполагается, что места на мембранах, связывающие ГУК, неспецифичны для N-ацетилглюкозамина, но специфичны для глюкуроновой кислоты, поскольку дерматансульфат, содержащий 80 % идуроновой кислоты и 20 % глюкуроновой кислоты, менее активен в отношении связывания с клетками, чем хондронинсульфаты. Соединение ГУК с клетками не зависит от Ca^{2+} и Mg^{2+} . Не исключается, что связь ГУК с поверхностью клеток может быть ковалентной [54, 74].

Еще в более ранних работах показано, что прибавление к культурам различных клеток небольших количеств ГУК вызывает их агрегацию, а большие количества подавляют ее [35, 83, 108, 112]. В клетках с высоким уровнем собственной ГУК агрегация их более легко подавляется экзогенной ГУК. С-протеогликаны менее активны в указанном отношении. Подавление агрегации клеток высокими концентрациями ГУК не связано с повышением вязкости среды за счет этой кислоты, так как растворы декстрансульфата такой же вязкости не подавляют агрегацию клеток в тех же культурах [19]. Выяснено, что существуют независимый от Ca^{2+} и Mg^{2+} и зависимый от этих катионов механизмы агрегации клеток SV-3T3, SV-PY-3T3 и других линий. Не зависящая от Ca^{2+} и Mg^{2+} агрегация осуществляется соединением одной макромолекулы ГУК с несколькими клетками, и обработка клеток специфической гиалуронидазой полностью подавляет их агрегацию в отсутствие Ca^{2+} и Mg^{2+} и только частично подавляет ее в присутствии этих катионов. Вероятно, зависящая от Ca^{2+} и Mg^{2+} агрегация не нуждается в ГУК, что подтверждается полным подавлением агрегации избытком ГУК в отсутствие данных катионов и ослаблением подавляющего действия агрегации избытком ГУК в присутствии их [108].

Изучение агрегации зерен ионообменной смолы (Dowex Ag 50-N-x—1, меш 50—100), соединенных с ГУК и различными гликозаминогликанами, содержащими менее 0,10 % белка, выявило, что в смеси ГУК-зерен с хондронинсульфат-4 и -6 зернами проте-

ходит их агрегация, которая не зависит от Ca^{2+} и подавляется избытком свободных ГУК и хондроитинсульфатов. Предполагается, что взаимодействие происходит между гликозаминогликановыми компонентами. В смеси ГУК-зерен с дерматансульфат- и гепарин-зернами, а также в гомологичных зернах агрегация не имеет место [106]. Интересно, что даже в значительно упрощенных модельных системах агрегация, вызываемая ГУК и хондроитинсульфатами, может не зависеть от Ca^{2+} и подавляться избытком свободных тех же биополимеров.

Для рассмотрения вопроса о механизме участия ГУК и других протеогликанов в агрегации и адгезии клеток необходимо уточнить различия между этими процессами. Агрегация, в большинстве случаев предшествующая адгезии, представляет собой неспецифическое концентрирование клеток в ограниченном объеме в результате стерического исключения их из пространства, заполненного трехмерными структурами ГУК, других протеогликанов и АПГ, которые препятствуют их дальнейшей дисперсии и сближают поверхности клеток, не соединяясь с ними, на расстояния, необходимые для действия специфических и неспецифических механизмов следующей стадии соединения клеток между собой — адгезии. Разумеется, что в ряде случаев трудно четко определить границы между агрегацией и адгезией, так как механизмы этих явлений могут перекрываться. ГУК и некоторые С-протеогликаны в определенных условиях непосредственно или при участии других биополимеров (например, фибронектина) могут быть специфическими и неспецифическими факторами адгезии, сохраняя при этом функции стерического исключения [11—13]. Возможно, что, кроме ГУК и других протеогликанов, способностью создавать самостоятельно или совместно с С-протеогликанами трехмерные структуры, стерически исключаяющие из заполненного ими пространства клетки, обладают также гликопротенды с высокой гидрофильностью [36].

Высокая вязкость растворов ГУК, АПГ и остальных протеогликанов сама по себе не может быть фактором агрегации. При высоких концентрациях этих биополимеров (особенно при

их совместном присутствии) образующие ими трехмерные структуры ограничивают подвижность клеток. ГУК, ассоциированная с поверхностью клеток непосредственно или при участии фибронектина и других каких-либо протендов, может по указанным причинам препятствовать агрегации клеток в зависимости от количественных соотношений между соединенной с клетками и находящейся в среде ГУК. Этим объясняется, почему в культурах, когда клетки синтезируют большие количества ГУК и значительная часть ее ассоциирована с их поверхностью, добавленная экзогенная ГУК к культурам действует как фактор, препятствующий агрегации. Соотношение ассоциированной с поверхностью клеток и включенной в трехмерные структуры матрикса ГУК имеет регулирующие значения в миграции, агрегации и дезагрегации клеток в процессах эмбриогенеза, как это видно из предыдущего материала статьи.

Наиболее демонстративно выявляется различие между неспецифической обратимой агрегацией и адгезией при изучении агрегации эритроцитов. Эритроциты кролика, суспензированные в 0,15 М NaCl (рН 7,4) в присутствии ГУК ($>0,6$ мг/мл), С-протеогликанов ($>5,0$ мг/мл) и АПГ ($>0,2$ мг/мл), быстро и обратимо разделяются на фазы раствора и агрегированных эритроцитов, что вызывается стерическим исключением их из пространства, заполненного в растворе трехмерными структурами указанных биополимеров [10—13]. Клетки сетчатки эмбриона курицы агрегируются С-протеогликанами при их физиологических концентрациях также посредством стерического исключения из жидкой среды. При этом клетки плотно соединяются между собой без образования «мостиков» протеогликанов. При наличии в среде специфических факторов адгезии имеет место синергизм в действии этих факторов и механизма стерического исключения. Клетки сетчатки эмбриона курицы, обработанные конканавалином А, агрегируются в присутствии С-протеогликанов значительно быстрее [77].

В адгезию клеток вовлекается множество специфических и неспецифических белковых веществ, глико- и липопротендов, протеогликанов, а также других высоко- и низкомолекулярных

веществ, принимающих прямое и косвенное участие в этом явлении [25, 40, 121]. В физико-химическом отношении в той или иной мере могут участвовать ковалентные, электростатические и водородные связи, силы Ван-дер-Ваальса, дипольная ориентация, гидрофобные и комплементарные контакты и многие другие факторы [16, 17, 31, 32, 39, 84, 86, 113]. В задачу данной работы не входит подробное описание роли всех перечисленных выше факторов в специфической и неспецифической адгезии клеток. Ниже приведены сведения о некоторых механизмах клеточной адгезии только в той мере, в какой это необходимо для понимания роли ГУК в неспецифической обратимой агрегации клеток, что мало освещено в литературе, несмотря на актуальность этого вопроса.

Существует ряд предположений об участии определенных энзиматических систем в адгезии клеток животного организма. Предполагается, что локализованные на поверхности многих клеток гликозилтрансферазы вступают в комплекс с находящимися на поверхности другой гомологичной клетки субстратом, т. е. незавершенным концом углеводного компонента гликопротеида, гликозаминогликана, гликопептида, а один из этих субстратов первой клетки образует комплекс с гликозилтрансферазой второй клетки, что связывает клетки по типу комплекса фермент — субстрат. В зависимости от концентрации в системе соответствующего УДФ-моносахарида может происходить частичное или полное гликозилирование молекул субстрата, приводящее к ослаблению адгезии или диссоциации клеток [86, 88]. Кроме того, можно предположить, что адгезия асцитных и других клеток увеличивается после прибавления к культурам L-глутаминна, необходимого для синтеза гексозаминов, которые при участии УДФ и гликозилтрансфераз включаются в полисахаридные цепи гликозаминогликанов и гликопротеидов, участвующих в адгезии клеток. Специфическое активирование и угнетение глутаминсинтетазы в клетках могут управлять их адгезией, поскольку от количества глутаминна зависит синтез указанных выше биополимеров [81]. Значительная роль энзиматическим системам отводится и в гипотезе, по которой адгезия и миграция

клеток, особенно в эмбриогенезе, могут регулироваться в определенной степени сокращением и расслаблением находящегося на поверхности ряда клеток актомиозинподобного белка при участии АТФ. Определяющие активность этого белка система АТФ—АДФ, Ca^{2+} и Mg^{2+} могут изменять распределение зарядов на поверхности клеток, форму самих клеток и этим влиять на поведение их в указанных отношениях [56, 57]. В культурах различных клеток человека, а также мышей и некоторых других животных на поверхности клеток имеется энзиматическая система, фосфорилирующая белки (фибронектин и другие) посредством АТФ и ГТФ, но без участия циклических АМФ, ГМФ и ЦМФ. Допускается, что она имеет значение для адгезии клеток [85]. Высказано мнение, что адгезия клеток может происходить по типу реакции антиген — антитело, когда на поверхности клеток находятся вещества, подобные веществам групп крови, и при наличии в среде антител к ним. Вероятно, такие взаимодействия имеют место в узнавании клеток и специфической адгезии их при эмбриогенезе [89]. Из множества гипотез о механизме специфической и неспецифической адгезии клеток позвоночных животных невозможно выбрать одну, наиболее полно объясняющую механизм этого сложного биологического явления. Почти все объяснения механизма адгезии клеток обоснованы фактическими данными, полученными на культурах клеток и тканей, отличающихся отсутствием регуляторных систем, функционирующих в организме, относительно однородностью окружающей клетки среды, наличием особых адаптаций к условиям этой среды и многими другими моментами [4]. Все это вносит трудности и ограничения в использование результатов таких исследований для объяснения взаимоотношения различных механизмов специфической и неспецифической адгезии клеток в организме, но в механизмах, выявленных в культурах, едва ли можно сомневаться.

В условиях организма в зависимости от вида клеток, их состояния, внутренней среды и многих других моментов одни и те же факторы специфической и неспецифической адгезии клеток, вероятно, могут быть попере-

менно определяющими и второстепенными. Однако одна из множества функций ГУК и других протеогликанов — функция неспецифической обратимой агрегации различных клеток посредством стерического вытеснения — остается постоянной. При любых механизмах адгезии клеток и особенно если она осуществляется с участием гликозилтрансфераз, глутаминсинтетазы и других ферментных систем, когда устойчивость адгезии может волнообразно изменяться, роль ГУК и других протеогликанов как стабилизирующего барьера является физиологически необходимой. При этом синтез ГУК и ее распад также зависят от активности соответствующих энзиматических систем. Кроме того, в зависимости от соотношения между количеством ГУК, ассоциированной с клеточной поверхностью, и количеством ее в межклеточном пространстве трехмерные структуры ГУК могут посредством стерического исключения направлять другие макромолекулы к клеткам или от них и таким путем влиять на концентрацию в окружении клеток молекул, требующихся для их существования, дифференциации, контакта и взаимодействия друг с другом [77]. Параллельно с этим ГУК осуществляет и транспорт воды, ионов и низкомолекулярных веществ.

Стерическое исключение, производимое ГУК, С-протеогликанами и АПГ, имеет значение в зарождении и росте фибрилл коллагена, помимо других механизмов участия этих биополимеров в фибрилlogenезе коллагена [2, 14, 119]. Распространенный повсеместно в организме млекопитающих гепарин уменьшает и полностью разрушает агрегацию клеток, вызванную стерическим исключением ГУК и другими протеогликанами. Возможно, что гепарин препятствует образованию трехмерных структур ГУК и придает более высокий отрицательный заряд клеткам [3, 12].

Сформулированные здесь представления о неспецифической обратимой агрегации клеток, осуществляемой ГУК и другими протеогликанами, предшествующей адгезии, согласуются с данными других исследователей. Клетки печени и сетчатки эмбриона курицы сначала обратимо агрегируются без вовлечения специфических рецепторов адгезии и без затраты мета-

болической энергии. Затем наступает селективная адгезия клеток, требующая метаболической энергии, и клетки соединяются стабильной связью. Допускается, что обратимая агрегация может переходить в стабильное соединение клеток [107]. Пространственное исключение клеток и концентрирование их в ограниченном объеме, осуществляемое трехмерными структурами ГУК, непосредственно не связаны с метаболической энергией и в этом заключается глубокий биологический смысл таких структур. В условиях развивающегося животного организма в образовавшиеся агрегаты клеток сразу же врастают соединительнотканые элементы с высоким содержанием ГУК, указанные выше структуры которой препятствуют дезагрегации образовавшихся ассоциатов клеток [16]. Пожалуй, можно утверждать, что, если специфическая и неспецифическая адгезия клеток осуществляется множеством веществ и факторов, то неспецифическая и обратимая агрегация, предшествующая адгезии, осуществляется главным образом ГУК и рядом других протеогликанов.

Кроме изложенных выше функций, ГУК прямо или косвенно принимает участие в самых разнообразных биологических явлениях. В культурах различных видов сарком и карцином ГУК защищает опухолевые клетки от лизиса, опосредованного лимфоцитами [65]. ГУК подавляет, а в некоторых случаях стимулирует активность моно- и полинуклеарных фагоцитов. Она же подавляет миграцию и митоз лимфоцитов, миграцию клеток лимфатической системы, чувствительность клеток к некоторым вирусам, проникновение спорозондов и взаимодействие между клетками мишеней и лимфоцитами. Из этого следует, что ГУК непосредственно включается в процессы воспаления и иммунитета, но механизм ее участия в них не изучен. Благодаря вязкоэластическим свойствам растворов ГУК амортизируются удары в стекловидном теле глаза, что предотвращает отслоение сетчатки и пигментного эпителия [22]. В пуповине ГУК препятствует сдавливанию кровеносных сосудов и этим обеспечивает нормальное развитие плода. Поверхность хряща выстлана слоем комплекса ГУК-протеогликаны, защищающим эту поверхность во время функциони-

рования сустава. Однако этим не ограничивается значений ГУК в функции суставов. С возрастом указанный слой становится тоньше [114]. ГУК, соединяясь с лекарственными веществами, способна в виде таких соединений транспортировать их к клеткам, а также выделять их в нерастворимой форме в матриксе соединительной ткани посредством стерического исключения [15].

По химической природе и структуре, относительно менее высокому электрическому заряду, низкому содержанию ковалентно связанного белкового (полипептидного) компонента ГУК является сравнительно более простым протеогликаном. Возможно, что именно этими особенностями ГУК обусловлены ее резко выраженные способности создавать в растворах пространственные структуры и уникальная роль как фактора, организующего сложные надмолекулярные образования с участием С-протеогликанов и гликопротеидов, а также многие другие биологические функции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бычков С. М. — Успехи совр. биол., 1948, т. 25, № 1, с. 1.
2. Бычков С. М. — Докл. АН СССР, 1950, т. 75, № 1, с. 83.
3. Бычков С. М. — Вопр. мед. химии, 1981, № 6, с. 726.
4. Бычков С. М. — Там же, 1983, № 6, с. 2.
5. Бычков С. М., Богатов В. Н., Кузьмина С. А. — Бюл. exper. биол., 1981, № 9, с. 302.
6. Бычков С. М., Богатов В. Н., Кузьмина С. А. — Там же, 1982, № 11, с. 52.
7. Бычков С. М., Богатов В. Н., Харламова В. Н. — Там же, 1980, № 6, с. 680.
8. Бычков С. М., Захарова М. М. — Вопр. мед. химии, 1979, № 3, с. 227.
9. Бычков С. М., Колесникова М. Ф. — Биохимия, 1969, № 1, с. 204.
10. Бычков С. М., Кузьмина С. А. — Бюл. exper. биол., 1973, № 6, с. 41.
11. Бычков С. М., Кузьмина С. А. — Там же, 1977, № 3, с. 284.
12. Бычков С. М., Кузьмина С. А. — Там же, № 11, с. 562.
13. Бычков С. М., Кузьмина С. А. — Там же, 1983, № 6, с. 58.
14. Бычков С. М., Фомина В. А. — Вопр. мед. химии, 1958, № 1, с. 59.
15. Бычков С. М., Харламова В. Н. — Там же, 1972, № 3, с. 269.
16. Поликар А. Поверхность клетки и ее микросреда. Пер. с франц. М., 1975.
17. Гринкаус Дж. От клеток к органам. Пер. с англ. М., 1972.
18. Angello J. C., Hauschka S. D. — Develop. Biol., 1979, vol. 73, p. 322.
19. Angello J. C., Hauschka S. D. — Exp. Cell Res., 1980, vol. 125, p. 389.
20. Axelsson I., Heinegard D. — Upsala J. med. Sci., 1977, vol. 82, p. 120.
21. Baker J. R., Caterson B. C. — J. biol. Chem., 1979, vol. 254, p. 2387.
22. Balazs E. A. — Upsala J. med. Sci., 1977, vol. 82, p. 94.
23. Bochk S. M., Dorke A. H., Welth D., Rees D. A. — Europ. J. Biochem., 1980, vol. 109, p. 447.
24. Chakrabarti B., Hultsch E. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1976, vol. 71, p. 1189.
25. Cederberg B. M., Gray G. R. — Analyt. Biochem., 1979, vol. 99, p. 221.
26. Christner J. E., Brown M. L., Dziewiatkowski D. D. — Biochem. J., 1977, vol. 167, p. 711.
27. Christner J. E., Brown M. L., Dziewiatkowski D. D. — Analyt. Biochem., 1978, vol. 90, p. 23.
28. Cleland R. L. — Upsala J. med. Sci., 1977, vol. 82, p. 86.
29. Cleland R. L. — Arch. Biochem., 1977, vol. 180, p. 57.
30. Cowman M. K., Balazs E. A., Bergmann C. W., Meyer K. — Biochemistry (Wash.), 1981, vol. 20, p. 1379.
31. Curtis A. S. — Amer. Naturalist, 1960, vol. 94, p. 37.
32. Curtis A. S. — Biol. Rev., 1962, vol. 37, p. 82.
33. DeLuca S., Heinegard D., Hascall V. C. et al. — J. biol. Chem., 1977, vol. 252, p. 6600.
34. DeLuca S., Lohmander L. S., Nilsson B. et al. — Ibid., 1980, vol. 255, p. 6077.
35. Deman J. J., Bruyneel E. A., Mareel M. M. — J. Cell Biol., 1974, vol. 60, p. 641.
36. Edwards A. W. — Nature, 1978, vol. 271, p. 248.
37. Franzen A., Inerati H., Hejderup S. O., Heinegard D. — Biochem. J., 1981, vol. 195, p. 335.
38. Gardell S., Baker J., Caterson B. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1980, vol. 95, p. 1823.
39. Gingell D. — J. theor. Biol., 1971, vol. 50, p. 121.
40. Goldstein I. J., Murphy L. A., Ebisu S. — Pure appl. Chem., 1977, vol. 49, p. 1095.
41. Glimelius B., Norling B., Westermarck B., Wasteson A. — Biochem. J., 1979, vol. 172, p. 443.
42. Gregory J. D. — Ibid., 1973, vol. 133, p. 383.
43. Guss J. M., Hukins D. W., Smith P. J. et al. — J. molec. Biol., 1975, vol. 95, p. 359.
44. Hardingham T. — Biochem. Soc. Trans., 1981, vol. 9, p. 489.
45. Hardingham T. — In: Proc. Eur. Symp. Connect. Tiss. Res. 7-th, 1980, p. 142.
46. Hardingham T., Dunham D. G., Muir H. — Biochem. Soc. Trans., 1980, vol. 9, p. 489.
47. Hardingham T., Ewins R. J., Dunham D., Muir H. — Seminars Arth. Rheum., 1981, vol. 11, N 1, Suppl. 1, p. 28.
48. Hardingham T., Muir H. — Biochim. biophys. Acta, 1972, vol. 279, p. 401.
49. Hardingham T., Muir H. — Biochem. Soc. Trans., 1973, vol. 1, p. 282.
50. Hardingham T., Muir H. — Biochem. J., 1973, vol. 135, p. 905.
51. Hascall V. C. — J. Supramol. Struct., 1977, vol. 7, p. 101.

52. Hascall V. C., Sajdera S. W. — J. biol. Chem., 1977, vol. 244, p. 2384.
53. Hopwood J. J., Dorfman A. — Ibid., 1978, vol. 252, p. 4777.
54. Hopwood J. J., Dorfman A. — *Pediat. Res.*, 1978, vol. 12, p. 52.
55. Isles M., Foweraker A. R., Jennings B. R. et al. — *Biochem. J.*, 1978, vol. 173, p. 237.
56. Jones B. M. — *Nature*, 1966, vol. 212, p. 362.
57. Jones Dr. P. — Ibid., p. 365.
58. Kimura J. H., Caputi C. B., Hascall V. C. — J. biol. Chem., 1980, vol. 255, p. 4368.
59. Kimura J. H., Hardingham T. E., Hascall V. C. — Ibid., p. 7134.
60. Kimata R., Hascall V. C., Kimura J. H. — Ibid., 1982, vol. 257, p. 3827.
61. Launt T. C. — In: *Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix* / Ed. E. A. Balazs. New York, 1970, p. 703.
62. Laurent T. C. — *Upsala J. med. Sci.*, 1977, vol. 87, p. 90.
63. Lohmander L. S., DeLuca S., Nilsson B. et al. — J. biol. Chem., 1980, vol. 255, p. 6084.
64. Mason R. M., Kimura J. H., Hascall V. C. — Ibid., 1982, vol. 257, p. 2236.
65. McBride W. H., Bard J. B. — *J. exp. Med.*, 1979, vol. 149, p. 505.
66. Mathews M. B. — *Nature*, 1967, vol. 213, p. 1255.
67. Mathews M. B., Decker T. — *Biochim. biophys. Acta*, 1977, vol. 498, p. 259.
68. Mathieson J. M., Pearce R. H. — *Biochem. J.*, 1977, vol. 161, p. 419.
69. McMurtrey J., Radhakrishnamurthy B., Dal-Jeres R. — J. biol. Chem., 1979, vol. 254, p. 1621.
70. Merrillees M. J., Scott L. — *Develop. Biol.*, 1980, vol. 76, p. 396.
71. Meyer K. — *Cold. Spring. Harbor. Symp. Quant. Biol.*, 1938, vol. 6, p. 91.
72. Meyer K., Palmer J. — J. biol. Chem., 1934, vol. 107, p. 629.
73. Meyer K., Palmer J. — Ibid., 1936, vol. 114, p. 689.
74. Mikuni-Takagaki Y., Toole B. P. — Ibid., 1979, vol. 254, p. 8409.
75. Mitchell D. C., Hardigam T. E. — *Biochem. J.*, 1981, vol. 196, p. 521.
76. Mitchell D. C., Hardingham T. E. — Ibid., 1982, vol. 202, p. 249.
77. Morris J. E. — *Exp. Cell Res.*, 1979, vol. 120, p. 141.
78. Morris E. R., Rees D. A., Welsh E. J. — *J. molec. Biol.*, 1979, vol. 138, p. 383.
79. Norling B., Glimelius R., Westermarck B., Wasterson A. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1978, vol. 84, p. 914.
80. Oegema T. R., Thompson K. C. — J. biol. Chem., 1981, vol. 256, p. 1015.
81. Oppenheimer S. B. — *Amer. Zool.*, 1978, vol. 18, p. 13.
82. Pennypacker J. P., Goclinck P. F. — *Develop. Biol.*, 1976, vol. 50, p. 35.
83. Pessac B., Defendi V. — *Science*, 1972, vol. 175, p. 898.
84. Pethica B. A. — *Exp. Cell Res.*, 1961, vol. 8, Suppl., p. 123.
85. Pfeifle J., Hadmann W., Anderer A. — *Biochim. biophys. Acta*, 1981, vol. 670, p. 274.
86. Roth S. — *Quart. Rev. Biol.*, 1973, vol. 48, p. 541.
87. Rollins B. J., Culp L. A. — *Biochemistry (Wash.)*, 1979, vol. 18, p. 5621.
88. Roseman S. — *Chem. Phys. Lipid.*, 1970, vol. 5, p. 270.
89. Rosen S. D., Kaur J., Clark D. L. et al. — J. biol. Chem., 1979, vol. 254, p. 9408.
90. Sahu S., Lynn W. S. — *Biochem. J.*, 1978, vol. 173, p. 565.
91. Schwartz N. B., Ho P. L., Dorfman A. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1976, vol. 71, p. 851.
92. Scott J. E., Heatley F. — *Biochem. J.*, 1979, vol. 181, p. 445.
93. Scott J. E., Heatley F., Moorcroft D., Olavsen H. — Ibid., 1981, vol. 199, p. 829.
94. Scott J. E., Orford R., Hughes E. — Ibid., vol. 195, p. 573.
95. Scott J. E., Tigwell M. J. — Ibid., 1978, vol. 173, p. 103.
96. Shimada E., Matsumura C. — J. Biochem. (Tokyo), 1975, vol. 78, p. 513.
97. Solursh M., Vacrewyck S. A., Reiter R. S. — *Develop. Biol.*, 1974, vol. 41, p. 233.
98. Solursh M., Hardingham T., Hascall V. C., Kimura J. — Ibid., 1980, vol. 75, p. 121.
99. Srivinasan S. R., Yost K., Radhakrishnamurthy B. et al. — *Atherosclerosis*, 1980, vol. 36, p. 25.
100. Stookwell R. A. *Biology of Cartilage Cells*. Cambridge, 1979.
101. Sugahara K., Schwartz N. B., Dorfman A. — J. biol. Chem., 1979, vol. 254, p. 6252.
102. Tajiri K., Uehida N., Tanzer M. U. — Ibid., 1980, vol. 255, p. 6036.
103. Tang I. H., Rosenberg L., Reiner R. J., Poole A. R. — Ibid., 1979, vol. 254, p. 10523.
104. Toole B. P. — In: *Neuronal Recognition* / Ed. H. Barondes. New-York, 1976, p. 275.
105. Torchia D. A., Hasson M. A., Hascall V. C. — J. biol. Chem., 1981, vol. 256, p. 7129.
106. Turley E. A., Roth S. — *Nature*, 1980, vol. 283, p. 268.
107. Umbreit J., Roseman S. — J. biol. Chem., 1975, vol. 250, p. 9360.
108. Underhill C. B., Dorfman A. — *Exp. Cell Res.*, 1978, vol. 117, p. 155.
109. Underhill C. B., Toole B. P. — J. Cell. Biol., 1979, vol. 82, p. 475.
110. Underhill C. B., Toole B. P. — J. biol. Chem., 1980, vol. 255, p. 4544.
111. Uzuka M., Nakajima K., Ohota S., Mori J. — *Biochim. biophys. Acta*, 1981, vol. 673, p. 387.
112. Wasteson A., Westermarck B., Lindahl U., Ponten J. — *Int. J. Cancer*, 1973, vol. 12, p. 169.
113. Weiss L. — *Rev. Citol.*, 1960, vol. 9, p. 187.
114. Weiss M. S. — *Upsala J. med. Sci.*, 1977, vol. 82, p. 91.
115. Welsh E. J., Rees D. A., Morris E. R., Madden J. K. — *J. molec. Biol.*, 1980, vol. 138, p. 375.
116. Wiebkin O. W., Hardingham T. E., Muir H. — In: *Extracellular Matrix Influences on Gene Expression* / Ed. H. C. Slavkin, R. C. Greulich. New York, 1975, p. 209.
117. Wiebkin O. W., Muir H. — *Phil. Trans. roy. Soc. Lond.*, 1975, vol. 271, p. 283.

118. Wiebkin O. W., Muir H. — J. Cell Sci., 1977, vol. 27, p. 199.
119. Wusteman F. S., Gillard G. C. — Experientia (Basel), 1977, vol. 33, p. 721.
120. Yanagishita M., Rodbard D., Hasscalt V. C. — J. biol. Chem., 1979, vol. 254, p. 911.
121. Yamada K. M., Yamada S. S., Pastan I. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1975, vol. 72, p. 3158.

Поступила 11.02.85

THE BIOLOGICAL ROLE OF HYALURONIC ACID

S. M. Bychkov, S. A. Kuzmina

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

The most important studies on hyaluronic acid carried out within the recent 5-7 years are reviewed. Chemical structure, physical parameters and properties of hyaluronic acid are considered. Various functions of hyaluronic acid are discussed on the basis of current information.

УДК 616.5-002.525.2-092:616.155.3-008.13-008.931:577.152.314]-074

Л. И. Матильская, В. Ю. Климов, Т. А. Рязанцева, Г. Н. Плесковская

ДНКазы II КЛЕТОК ФАГОЦИТИРУЮЩЕГО РЯДА В ИЗУЧЕНИИ ПАТОГЕНЕЗА СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКИ

Институт ревматологии АМН СССР, Москва

С внедрением новых методов исследования было показано наличие в плазме крови людей ДНК [23, 24], особенно в условиях воспалительных и деструктивных процессов [1].

Значение внеклеточной ДНК в жизнедеятельности организма, по-видимому, неоднозначно [18]; необходимо иметь в виду ее возможную антигенную активность [2].

При системной красной волчанке (СКВ) и аналогичном заболевании мышей F_1 (NZB/W) феномен нуклеинемии приобретает важное патогенетическое значение. Клинико-лабораторными исследованиями показано, что в этих случаях ДНК идентифицируют в составе растворимых иммунных комплексов, отложение которых в стенках сосудов и почечных канальцев генерализует и углубляет патологические процессы [12, 14, 15]. Экспериментальными работами [10, 11, 26] на мышах линий NZB/W и Swiss Webster показано, что разрушение внеклеточной ДНК происходит в основном в печени и селезенке клетками макрофагального ряда. Наряду с этим показано, что при СКВ в удалении ядерного материала погибших клеток принимают участие, возможно, нейтрофилы [22]. Основным внутриклеточным ферментом, катализирующим гидролитическое расщепление как нативных, так и денатурированных форм ДНК до олигонуклеотидов, является ДНКазы II, локализованная в лизосомах [9].

Целью данной работы было сравнительное изучение активности ДНКазы II лизосом купферовских клеток и нейтрофилов в процессе развития синдрома волчанки у экспериментальных животных и у людей.

Методика

Опыты проведены на 26 мышах-самках линии F_1 (NZB/W) в возрасте 2,6 и 9 мес массой тела 25, 35 и 30 г соответственно, а также на 5 белых беспородных мышках-самках в возрасте 1—2 мес массой 20 г. Животных декапитировали, после чего извлекали печень, которую промывали холодным раствором Хенкса и использовали для выделения макрофагов методом, основанным на избирательном разрушении клеточных мембран гепатоцитов пропазой [25].

Препараты нейтрофилов выделяли из крови [13] женщин в возрасте 20—40 лет, больных СКВ (14 человек), и практически здоровых (11 человек).

Активность ДНКазы II определяли по количеству кислоторастворимых продуктов гидролиза ДНК, регистрируемому спектрофотометрически при $\lambda=260$ нм, и выражали в микромолях уридин-5-фосфата на 10^6 клеток. В качестве субстрата использовали выделенную из тимуса телят [19] высокополимерную нативную ДНК (молекулярная масса $13,5 \cdot 10^6$, $\epsilon=6029$, $R_{270}=0,54$).

Результаты и обсуждение

В таблице представлены результаты определения активности ДНКазы II макрофагов печени мышей F_1 (NZB/W) разного возраста. Полученные данные свидетельствуют о статистически достоверном снижении активности этого фермента у 9-месячных мышей (NZB/W) по сравнению с 2-месячными животными того же генотипа.

Поскольку клиника аутоиммунной

патологии у F_1 (NZB/W) развивается к 4—6 мес. 2-месячных животных обычно рассматривают в качестве контроля (клинической нормы) для животных 4-месячного возраста и старше [3]. Полученные нами данные свидетельствуют о тенденции к увеличению активности ДНКазы II макрофагов мышей F_1 (NZB/W) 2-месячного возраста по сравнению с таковой беспородных белых мышей 1—2-месячного возраста.

Результаты сравнительного изучения активности ДНКазы II нейтрофилов периферической крови здоровых и больных СКВ людей показали, что в группе больных (женщины с диагнозом СКВ стадии II—III, острого течения, с воспалительным поражением почек) титры антител к нативной ДНК колебались в интервале 35—100 ед. У клинически здоровых женщин титры антител к нативной ДНК в среднем составляли 17 ед. Было отмечено достоверное ($P < 0,02$) снижение активности ДНКазы II нейтрофилов крови больных СКВ (до $5,32 \pm 0,57$ мкмоль УМФ на 10 клеток, против $12,63 \pm 2,08$ мкмоль УМФ на 10 клеток у здоровых лиц). Количество выделенных клеток на 1 мл крови у больных было $(0,80 \pm 0,06) \cdot 10^6$; у здоровых $(0,67 \pm 0,07) \cdot 10^6$.

Таким образом, согласно результатам проведенных исследований, в макрофагах печени мышей F_1 (NZB/W) в период развития люпус-синдрома, а также в нейтрофилах периферической крови больных СКВ с поражением почек было отмечено статистически достоверное снижение активности нуклеол ДНКазы.

Механизмы, ответственные за снижение активности ДНКазы II в макрофагах и нейтрофилах, в настоящее время неизвестны. Возможно, дефицит данного фермента связан с генетически обусловленной неполноценностью организма больных СКВ [17], но вполне вероятно, что в данном случае имеет место ингибирующее влияние различных веществ, появляющихся в результате усиленной деструкции клеток [8].

Известно, что активность ДНКазы плазмы крови больных СКВ и мышей F_1 (NZB/W) при развитии у них специфической патологии не претерпевает существенных изменений [7, 27]. Однако катаболизм внеклеточной

Активность ДНКазы II в макрофагах, выделенных из печени мышей

Возраст и линия мышей	Количество выделенных: клеток на 1 г печени	Активность ДНКазы II, мкмоль УМФ на 10^6 клеток
2 мес, F_1 (NZB/W)	$(6,1 \pm 0,5) \cdot 10^6$ ($n = 5$)	$2,12 \pm 0,19$ ($n = 5$)
6 мес, F_1 (NZB/W)	$(4,3 \pm 0,4) \cdot 10^6$ ($n = 8$)	$1,79 \pm 0,13$ ($n = 8$)
9 мес, F_1 (NZB/W)	$(6,0 \pm 1,4) \cdot 10^6$ ($n = 5$)	$1,40 \pm 0,17$ ($n = 5$)
P		0,01
2 мес, беспородные	$(5,2 \pm 1,0) \cdot 10^6$ ($n = 5$)	$1,85 \pm 0,17$ ($n = 5$)

Примечание. P рассчитано по отношению к 2-месячным мышам линии NZB/W.

ДНК при люпус-синдроме все же называется нарушенным.

У больных СКВ в крови появляются ингибиторы ДНКазы I [20] с тяжестью патологии. Комплексообразование антител с ДНК предохраняет ее от действия ДНКаз [21].

Эти факторы и описанные в настоящей работе данные об ингибировании ДНКазы II важны для объяснения того факта, что при СКВ внеклеточная ДНК обнаруживается чаще и в больших количествах, чем при других заболеваниях [5]. В условиях специфического антителогенеза против ДНК ее циркуляция в русле крови приобретает значение фактора антигенемии, поддерживающей антителогенез и ведущей к образованию патогенно-активных иммунных комплексов. В этих условиях борьба с пуклением есть борьба с иммунокомплексной патологией [4, 6, 16].

ЛИТЕРАТУРА

1. Волкова З. И., Кайнова А. С., Бронзов И. А. — Тер. арх., 1977, № 11, с. 51.
2. Гольдфарб Д. М., Замчук Л. А. Иммунология нуклеиновых кислот. М., 1968.
3. Грицман И. И., Плесковская Г. Н., Дрейер Е. О., Кусельтан И. В. — В кн.: Физиология и патология соединительной ткани. Новосибирск, 1980, т. 2, с. 111—112.
4. Демин А. А. — В кн.: Лечение хронических нефритов. Тула, 1977, с. 8.
5. Исаева Л. А., Левина С. Г., Климов В. Ю. — Вопр. ревмат., 1973, № 4, с. 56.
6. Климов В. Ю. — Сов. мед., 1974, № 11, с. 78.
7. Климов В. Ю., Левина С. Г., Прозоровская И. И., Белокрыцкий Д. В. — В кн.: Сердечно-сосудистые и коллагеновые заболевания. М., 1972, с. 144.
8. Разумовский А. Е., Ермакова Т. М., Комиссарова И. А., Боровой С. Н. — В кн.: Актуальные вопросы ревматологии и реабили-

- литации больных ревматическими заболеваниями. Вильнос, 1979, с. 65.
9. *Shanor B. C.* Нуклеазы. М., 1968, с. 89.
 10. *Chia O., Dorsh C., Barret E., Levi L.* — Immunology, 1977, vol. 32, p. 351.
 11. *Chused T. M., Steinberg A. D., Talat N.* — Clin. exp. Immunol., 1972, vol. 12, p. 465.
 12. *Davis J. S., Codjery S. M., Weinfeild J. B.* — Arthr. a. Rheum., 1978, vol. 28, p. 17.
 13. *English D., Andersen B.* — J. immunol. Meth., 1974, vol. 5, p. 249.
 14. *Friou G. H.* — J. lab. clin. Med., 1978, vol. 91, p. 545.
 15. *Harlej E. H., Lutton D., Meyers O. L.* — S. Afr. med. J., 1977, vol. 51, p. 935.
 16. *Hughes G. R., Cohen S. A., Lightfoot R. W.* — Arthr. a. Rheum., 1971, vol. 14, p. 209.
 17. *Marx J. L.* — Science, 1976, vol. 192, p. 1089.
 18. *Kalbarczik S.* — Postepy Biochem., 1973, vol. 19, p. 247.
 19. *Kay E. R., Simmons N., Daunse A.* — J. Amer. chem. Soc., 1952, vol. 74, p. 1724.
 20. *Lachman P. Y.* The Immunological Properties of Cell Nucley, Cambridge, 1961.
 21. *Liebling M. R., Barnett E. V.* — Clin. Immunol. Immunopath., 1977, vol. 8, p. 80.
 22. *Petranyi G. Y.* — In: Immunological Aspects of Allergy and Allergic Diseases. London, 1975, vol. 3, p. 17.
 23. *Steinman C. R.* — J. clin. Invest., 1975, vol. 56, p. 512.
 24. *Ton E. M., Schur P. H., Carr R. H., Kunzel H. G.* — Ibid., 1966, vol. 45, p. 1732.
 25. *Van Wyk G. P., Linder-Horowitz M., Munro H. N.* — J. Biol. Chem., 1971, vol. 246, p. 1025.
 26. *Woodruff E., Mart M.* — J. exp. Med., 1978, vol. 147, p. 684.
 27. *Zollner E. J., Heicke B., Zahn R. K.* — Z. klin. chem. klin. Biochem., 1977, Bd 12, s. 459.

Поступила 06.10.84

ROLE OF DNAase II FROM PHAGOCYTIC CELLS IN PATHOGENESIS OF SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

L. I. Malul'skaya, N. Yu. Klimov, T. A. Ryazantseva, G. N. Pleskovskaya

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

Activity of acid DNAase (DNAase II) was shown to decrease in neutrophils from peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus as well as in macrophages of liver tissue from mice of the F₁(N/ZB/w) strain during development of the lupus syndrome. Inhibition of the DNAase II activity in phagocytic cells might be among the reasons of accumulation of extracellular highly polymeric DNA in blood of the patients with systemic lupus erythematosus and to play a definite role in pathogenesis of the disease.

УДК 617-001.32-036.17-092.9-085.355:577.152.112]-036.8:616.36-092:612.013.7

И. В. Зарубина, Б. И. Криворучко

ВЛИЯНИЕ ЦИТОХРОМА С НА БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ПЕЧЕНИ ПРИ ТЯЖЕЛОЙ КОМПРЕССИОННОЙ ТРАВМЕ

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

В патогенезе синдрома длительного раздавливания мягких тканей наряду с острой почечной недостаточностью важная роль принадлежит нарушениям функций печени. По мнению А. Я. Пытеля [1], тяжесть гепаторенальных расстройств при синдроме длительного раздавливания определяет характер его течения и исходов. Нарушения функций печени при раздавливании обширных мышечных массивов обусловлены рядом причин, к числу которых в первую очередь следует отнести расстройства центральной гемодинамики и регионарного кровотока, анемизацию печени и повреждение клеточных структур печени ишемическим токсином — продуктом аутолиза травмированных тканей [2, 3].

Ишемический токсин, как и острая ишемия печени, повышает проницае-

мость митохондриальных мембран и снижает скорость дыхания и фосфорилирования, что в свою очередь приводит к уменьшению энергетического потенциала печени и снижению концентрации АТФ [3]. Это снижение лежит в основе нарушений синтеза гликогена, белков, ряда других биополимеров и специфических функций печени. В связи с этим поиск фармакологических средств, способствующих нормализации биоэнергетических процессов в печени при синдроме длительного раздавливания, является актуальным.

В настоящее время при различных заболеваниях печени с лечебной целью используют водные экстракты и гидролизаты печени, витамины, гормоны, альбумин, сорбит и др. Однако перечисленные средства либо не оказы-

Влияние цитохрома *c* на биоэнергетические процессы в печени при тяжелой компрессионной травме ($n = 10$)

Условия опыта	Адениннуклеотиды, мкмоль на 1 г ткани			Энергетический заряд системы АТФ—АДФ—АМФ	Неорганический фосфат, мкмоль на 1 г ткани
	АТФ	АДФ	АМФ		
Контроль	$2,86 \pm 0,02$	$0,84 \pm 0,02$	$0,41 \pm 0,02$	$0,799 \pm 0,003$	$5,16 \pm 0,17$
Травма	$1,35 \pm 0,18^*$	$0,97 \pm 0,08$	$0,90 \pm 0,14^*$	$0,562 \pm 0,039^*$	$12,90 \pm 1,51^*$
Травма + цитохром <i>c</i>	$2,65 \pm 0,17^*$	$0,57 \pm 0,03^*$	$0,46 \pm 0,05^*$	$0,796 \pm 0,016^*$	$6,61 \pm 0,48^*$

Примечание. Звездочкой отмечены различия, статистически достоверно отличающиеся от аналогичных показателей у предыдущей группы животных ($P < 0,05$).

вают прямого влияния на биоэнергетику печени, либо этот эффект выражен слабо.

Ранее нами было показано, что парентеральное введение цитохрома *c* может служить эффективным средством регулирования биоэнергетических процессов в печени при ее токсическом поражении [4, 5].

Целью настоящей работы явилось изучение влияния цитохрома *c* на биоэнергетические процессы в печени крыс при тяжелой механической травме, вызванной раздавливанием мягких тканей. О характере биоэнергетических процессов судили по содержанию в печени АТФ, АДФ, АМФ, неорганического фосфата и величине «энергетического заряда» системы адениннуклеотидов.

Методика

Белым крысам-самцам массой 150—200 г наносили тяжелую компрессионную травму по методу В. К. Кулагина [6]. Цитохром *c* (цитохром *c* для инъекций, Ленинградский завод медицинских препаратов) вводили внутрибрюшинно сразу же после травмы в дозе 5 мг/кг. Контрольным крысам вводили равный объем физиологического раствора. При определении концентраций адениннуклеотидов и неорганического фосфата животных замораживали в жидком азоте спустя 6 ч после введения цитохрома *c*. Свободные адениннуклеотиды экстрагировали из навесок печени 6 % раствором хлорной кислоты. Адениннуклеотиды разделяли хроматографически на пластинках силифола UV-254 (фирма «Chemapol», ЧССР) в системе растворителей диоксан — изопропан — аммиак — вода. Концентрации АТФ, АДФ и АМФ определяли с помощью флуориметрического сканирования тонкослойных хроматограмм на спектрофлуориметре MPF-4 (фирма «Hitachi», Япония) по описанному методу [7]. Содержание неорганического фосфата определяли по методу Фiske и Суббароу [8]. В гомогенатах печени определяли концентрацию цитохрома *c* [9].

Полученные данные обрабатывали по общепринятым биометрическим методам с использованием критерия *t* Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Тяжелая компрессионная травма сопровождалась (см. таблицу) нару-

шениями биоэнергетических процессов в печени, которые характеризовались уменьшением концентрации АТФ, суммы адениннуклеотидов и величины «энергетического заряда» системы адениннуклеотидов, рассчитанной по Atkinson [10], увеличением концентраций АДФ, АМФ и неорганического фосфата.

Уменьшение энергетического потенциала печени могло быть обусловлено как интенсивным использованием АТФ, так и нарушениями процессов энергопродукции. И. В. Левандовский и соавт. [3] показали, что ишемия печени *in vivo*, как и ишемический токсин *in vitro*, способны изменять структуру и функциональную активность митохондрий. Не исключено, что в подобных условиях нарушение проницаемости митохондриальных мембран сопровождается потерей митохондриями цитохрома *c* — наиболее лабильного компонента дыхательной цепи. Косвенным подтверждением такого предположения служит способность экзогенного цитохрома *c* восстанавливать скорость переноса электронов по дыхательной цепи митохондрий печени, взаимодействующих *in vitro* с ишемическим токсином или выделенной из ишемизированной печени [3]. Прямым подтверждением высказанного предположения служат результаты определения содержания цитохрома *c* в печени крыс. Так, если у контрольных животных содержание цитохрома *c* в печени составляло $3,42 \pm 0,59$ мкмоль/г, то у крыс с травмой оно снижалось до $0,87 \pm 0,20$ мкмоль/г ($P < 0,01$). Парентеральное введение животным цитохрома *c* сопровождалось увеличением содержания фермента в печени до $3,59 \pm 0,34$ мкмоль/г ($P < 0,01$). Одновременно в печени повышалась концентрация АТФ, уменьшались концентрации АДФ, АМФ и неорганического фосфа-

та, увеличивался «энергетический заряд» адениннуклеотидного пула.

Полученные результаты дают основание полагать, что нормализация биоэнергетических процессов в печени при парентеральном введении травмированным крысам цитохрома *c* обусловлена проникновением его в печень и взаимодействием с ультраструктурами гепатоцитов.

Ранее считалось, что экзогенный цитохром *c* не способен проникать в клетки. Действительно, цитохром *c* имеет относительно большую молекулярную массу, и в обычных условиях клеточные мембраны для него непроницаемы, поэтому уже спустя 2 ч после инъекции крысам цитохрома *c*, имеющего радионуклеидную метку, большая часть введенной активности экскретируется с мочой [11]. Однако показано, что при нарушении проницаемости клеточных мембран цитохром *c* способен проникать в клетки и повышать концентрацию цитохрома в печени [12]. Наши предыдущие исследования [4, 13] подтвердили этот факт и показали, что парентеральное введение цитохрома *c* при повреждении печени у крыс тетрахлорметаном сопровождается повышением не только интенсивности дыхания и фосфорилирования в гомогенатах и митохондриях печени, но и степени сопряжения этих процессов. При этом увеличивается интенсивность полос поглощения в дифференциальных спектрах митохондрий печени, характерных для цитохрома *c*, а на кривой диоперени высокочастотной электропроводности митохондрий восстанавливаются резонансные зоны, соответствующие этому ферменту [14].

Таким образом, цитохром *c* способен проникать через поврежденные мембраны гепатоцитов и может быть использован как регулятор биоэнергетических процессов в печени при синдроме длительного раздавливания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зарубина И. В., Криворучко Б. И. — Укр. биохим. журн., 1982, № 4, с. 437.
2. Криворучко Б. И., Манойлов Ю. С., Слепнева Л. В. — В кн.: Изучение экстремальных состояний. Казань, 1976, с. 30.
3. Кулагин В. К. — Бюл. экспер. биол., 1961, № 6, с. 42.
4. Кулагин В. К., Ковлев О. А., Криворучко Б. И. — В кн.: Современные проблемы реаниматологии. М., 1980, с. 113.
5. Левандовский И. В., Ляхович В. В., Панов А. В. и др. — Бюл. экспер. биол., 1977, № 9, с. 301.
6. Манойлов Ю. С., Лапаева Л. А., Слепнева Л. В. и др. — В кн.: Физико-химические основы функционирования надмолекулярных структур. М., 1974, с. 30.
7. Пытель А. Я. — Хирургия, 1957, № 10, с. 3.
8. Слепнева Л. В., Криворучко Б. И. — Бюл. экспер. биол., 1974, № 6, с. 44.
9. Слепнева Л. В., Манойлов Ю. С., Криворучко Б. И. — В кн.: Физико-химические основы функционирования надмолекулярных структур. М., 1974, с. 98.
10. Atkinson D. E. — Biochemistry (Wash.), 1968, vol. 7, p. 4030.
11. Beinert H., Reisseemann K. R. — Fed. Proc., 1949, vol. 8, p. 183.
12. Beraud Ph., Vannotti A. — Schweiz. med. Wschr., 1955, Bd 128, S. 281.
13. Fiske C. H., Subbarow J. — J. biol. Chem., 1925, vol. 66, p. 375.
14. Proder A., Gonella A. — Experientia (Basel), 1947, vol. 3, p. 462.

Поступила 21.09.84

EFFECT OF CYTOCHROME C ON BIO-ENERGY PROCESSES IN LIVER TISSUE DURING SEVERE COMPRESSIONAL TRAUMA

I. V. Zarubina, B. I. Krivoruchko

S. M. Kirov Military Medical Academy, Leningrad

After severe mechanical trauma of rat soft tissue content of ATP, total adenine nucleotides, amounts of "energy charge" of the adenine nucleotide system and cytochrome *c* were decreased in liver tissue, while content of AMP and P_i was increased. Parenteral administration of cytochrome *c* at a dose of 10 mg/kg into animals after the trauma normalized the energy processes in liver tissue and increased the content of endogenous cytochrome *c*.

А. Э. Кранаускас, Л. В. Кравченко, В. А. Тутельян

СПЕКТРОФЛЮОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АКТИВНОСТИ ЭПОКСИДГИДРОЛАЗЫ

Лаборатория энзимологии Института питания АМН СССР, Москва

Химические соединения, имеющие в своей структуре эпоксидную группу, отличаются высокой биологической активностью, связанной со способностью быстро вступать во взаимодействие с различными структурами клетки, в частности с макромолекулами, что обуславливает выраженное токсическое, канцерогенное, мутагенное и тератогенное действие на организм [8]. Соединения этого класса широко распространены в природе и могут поступать в организм человека в виде лекарств, пищевых добавок и природных загрязнителей. Эпоксидные соединения также могут образоваться эндогенно, в процессе метаболического окисления различных химических веществ монооксигеназной системой печени [3].

Основную роль в обезвреживании эпоксидсодержащих соединений играет фермент эпоксидгидролаза (НФ 3.3.2.3), отвечающая за гидратацию эпоксидной группы, с образованием более полярных метаболитов — диолов [5, 7, 11], как правило, менее токсичных или нетоксичных соединений [6, 10].

Функции и свойства эпоксидгидролазы долгое время оставались неизученными из-за большой сложности синтеза специфических субстратов. В настоящее время синтезирован ряд ароматических и алифатических соединений, которые могут служить субстратами в этой ферментной реакции.

С использованием моноциклического субстрата стиреноксида наиболее распространенными являются радиоизотопный и газохроматографический методы анализа [2, 9]. К основным недостаткам этих методов следует отнести сложность и длительность исследования, что ограничивает их применение в серийных экспериментах, а также необходимость использования сложной и дорогостоящей аппаратуры.

Отличительной чертой предлагаемого метода является простота и быстрота исполнения при достаточно высокой чувствительности, позволяющей определить активность эпоксидгидролазы

в тканях и субклеточных фракциях. Метод основан на измерении флуоресценции фенолэтиленгликоля, образующегося в результате энзиматического гидролиза стиреноксида.

Методика

В нашем исследовании источником фермента служили гомогенаты органов половозрелых крыс линии Вистар, забитых декапитацией, приготовленные с использованием в качестве суспендирующей среды 0,25 М сахарозы (рН 7,4), содержащей 0,001 М ЭДТА в гомогенизаторе Поттера—Эльвейма (тефлон — стекло, 90 с, 1200 об/мин) [1].

Субстрат — 0,025 М раствор стиреноксида (фирма «Sigma», США) в ацетонитриле в объеме 0,015 мл вносили в реакционную среду, состоящую из 0,2 мл гомогената ткани органов крыс (в контрольных пробах фермент был инактивирован 10-минутным кипячением при 100 °С) и 0,2 мл 0,15 М трис-НСl буфера рН 8,7. Инкубацию проводили в течение 30 мин при 37 °С. Реакцию останавливали охлаждением в ледяной бане и добавлением 3 мл хлороформа. После интенсивного встряхивания в течение 1 мин хлороформный слой отбирали и обезвоживали 2 г безводного Na₂SO₄. Концентрацию образовавшегося фенолэтиленгликоля измеряли на спектрофлуориметре MPF-43A (фирма «Perkin—Elmer», США) при $\lambda_{\text{возб}} = 263$ нм, $\lambda_{\text{изл}} = 282$ нм. Активность эпоксидгидролазы выражали в наномолях фенолэтиленгликоля за 1 мин на 1 г ткани и рассчитывали по следующей формуле:

$$A = \frac{F \cdot C \cdot V_1}{F_{\text{ст}} \cdot t \cdot V_2},$$

где F — интенсивность флуоресценции анализируемого образца (в %); C — концентрация стандартного раствора фенолэтиленгликоля (в нмолях в мл); V_1 — объем хлороформа, использованного для экстракции (в мл); $F_{\text{ст}}$ — интенсивность флуоресценции стандартного раствора фенолэтиленгликоля (в %); t — время инкубации (в мин); V_2 — количество ткани, использованной для исследования (в г).

Результаты и обсуждение

Для подбора оптимальных условий проведения ферментной реакции исследовали зависимость активности эпоксидгидролазы от рН среды, концентрации субстрата и инкубации. Зависимость от рН в гомогенате печени крыс представлена на рис. 1. Исследуемый фермент обладал максималь-

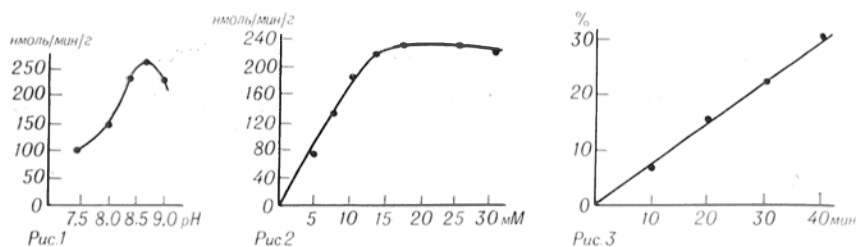


Рис. 1. Зависимость активности эпексидгидролазы от рН в гомогенате печени крыс. По оси абсцисс — рН реакционной среды; по оси ординат — активность эпексидгидролазы (в нмоль/мин/г ткани).

Рис. 2. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата. По оси абсцисс — концентрация стиреноксида (в мМ); по оси ординат — активность эпексидгидролазы (в нмоль/мин/г ткани).

Рис. 3. Гидролиз стиреноксида в гомогенате печени крыс в зависимости от времени инкубации.

По оси абсцисс — время (в мин); по оси ординат — уровень флуоресценции (в %).

ной активностью при рН 8,7. Гидролиз стиреноксида под действием эпексидгидролазы протекал с максимальной скоростью при концентрации субстрата 0,01—0,025 М. Дальнейшее увеличение концентрации субстрата приводило к снижению активности фермента (рис. 2). При изучении зависимости скорости гидролиза от времени инкубации было обнаружено, что она является постоянной в течение 40 мин (рис. 3).

Определение активности эпексидгидролазы разработанным нами методом в различных органах крыс показало, что наивысшей активностью этого фермента обладает печень и почки — соответственно $279,2 \pm 2,1$ и $38,5 \pm 2,1$ нмоль на 1 г ткани в 1 мин. В селезенке, легких и слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки

активность фермента значительно ниже — соответственно $11,5 \pm 1,0$, $6,2 \pm 0$ и $3,1 \pm 0$ нмоль на 1 г ткани в 1 мин.

В связи с тем что в литературе встречаются противоречивые данные по внутриклеточной локализации эпексидгидролазы, определенной с помощью различных субстратов, что, по-видимому, обусловлено разными изоформами фермента, нами было проведено исследование его активности в субклеточных фракциях, выделенных по методу Де Дюва [4]. Исследование показало, что максимальная активность эпексидгидролазы связана с микросомальной фракцией (рис. 4). Для сравнения приведены диаграммы внутриклеточного распределения маркерных ферментов лизосом — α -маннозидазы и митохондрий — сукцинатдегидрогеназы.

Таким образом, соблюдая изложенные выше условия, можно получить наиболее достоверные результаты при оценке активности эпексидгидролазы как в тканях, так и в субклеточных фракциях органов. Необходимо отметить, что активность фермента в печени крыс, установленная предложенным методом, совпадает с данными, полученными радиоизотопным и газохроматографическим [2, 9] методами. Предложенная нами методика отличается простотой выполнения и доступностью, что позволяет ее рекомендовать для широкого применения в биохимических и токсикологических исследованиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Покровский А. А., Тутьелья В. А. — Биохимия, 1968, т. 33, с. 809—815.

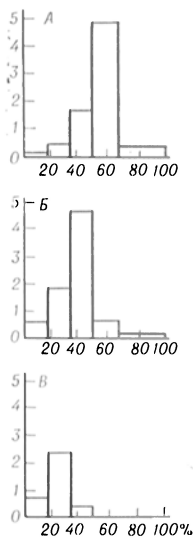


Рис. 4. Внутриклеточное распределение ферментов печени крыс.

По оси абсцисс — содержание белка во фракции в процентах от общего содержания белка в гомогенате; по оси ординат — значения относительной удельной активности, т. е. активности на 1 мг белка фракции по отношению к активности на 1 мг белка гомогената. Порядок фракций: ядра, митохондрии, лизосомы, микросомы, надосадочная жидкость. А — эпексидгидролаза, В — α -маннозидаза, В — сукцинатдегидрогеназа.

2. *Belvedere G., Pachecka J., Cantoni L.* et al. — *J. Chromatogr.*, 1976, vol. 118, p. 387—393.
3. *Daly J. W., Jerina D. M., Wilkop B.* — *Experientia* (Basel), 1972, vol. 28, p. 1129—1164.
4. *De Duve C., Pressman B. C., Gianetto R.* et al. — *Biochem. J.*, 1955, vol. 60, p. 604—617.
5. *Du Bois G. C., Appela E., Levin W.* et al. — *J. biol. Chem.*, 1978, vol. 253, p. 2932—2939.
6. *Glover P. L., Sims P., Huberman E.* et al. — *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, 1971, vol. 68, p. 1098—1101.
7. *Lu A. Y. H.* — *Annu. Rev. Pharmacol.*, 1980, vol. 20, p. 513—531.
8. *Miller J. A.* — In: *Chemical Carcinogenesis* / Ed. P. O. P. Ts'o, V. A. Di Palo, New York, 1980, Pt A, p. 61.
9. *Oesh F., Jerina D. M., Daly J.* — *Biochim. biophys. Acta*, 1971, vol. 227, p. 685—691.
10. *Sims P., Glover P. L.* — *Advanc. Cancer Res.*, 1974, vol. 20, p. 165—274.
11. *Wislocki P. G., Miwa G. T., Lu A. Y. H.* — In: *Enzymatic Basis of Detoxication* / Ed. W. B. Jakoby, New York, 1980, vol. 1, p. 135—182.

Поступила 31.01.85

SPECTROFLUOROMETRIC PROCEDURE FOR ESTIMATION OF EPOXIDE HYDROLASE ACTIVITY

A. E. Kranauskas, L. V. Kravchenko, V. A. Tutel'yan

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

A spectrofluorometric procedure is developed for estimation of epoxide hydrolase activity using styrol oxide as a substrate. The data were plotted, reflecting the dependence of the enzymatic reaction on time, pH value and the substrate concentration. Activity of epoxide hydrolase was studied in various tissues and subcellular fractions of rat liver tissue.

УДК 618.3-07:616.153.96-053.1-074

Т. В. Демченко, А. И. Шевцова, В. А. Березин, К. В. Воронин, Л. В. Усенко, Ю. Г. Поддубняк

ОПРЕДЕЛЕНИЕ α -ФЕТОПРОТЕИДА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БЕРЕМЕННЫХ МЕТОДОМ РАКЕТНО-ЛИНЕЙНОГО ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Кафедра акушерства и гинекологии Днепропетровского медицинского института, кафедра биофизики и биохимии Днепропетровского университета

В пренатальной диагностике широкое применение получают иммунохимические методы определения специфических белков в сыворотке крови беременных и амниотической жидкости [6, 12]. Эти методы специфичны, обладают высокой чувствительностью, дают возможность быстро количественно определять большое число проб, что позволяет организовать массовое обследование беременных [11, 14, 16].

Одним из основных показателей, определение которых иммунохимическими методами используется в пренатальной диагностике пороков развития, является концентрация α -фетопротенна (АФП). АФП — специфический белок плазмы крови плода ранних сроков развития, который синтезируется в желточном мешке, печени и (в меньшей мере) в желудочно-кишечном тракте [2].

Концентрация АФП в сыворотке крови беременных женщин определяется с 7—10-й недели беременности [5], возрастает пропорционально сроку беременности и достигает максимума к 32—33-й неделе беременности

(до 300 нг/мл), снижаясь в последние недели перед родами [14].

Содержание АФП в крови матери значительно повышается (400—500 нг/мл) при аномалиях развития нервной трубки плода.

Измерение концентрации АФП в материнской сыворотке между 15-й и 24-й неделями беременности используется как средство скрининга при выявлении дефектов развития нервной трубки и других аномалий развития плода человека [5, 7] и осуществляется методами радиоиммунного и иммуноферментного анализов. Однако не все лаборатории пренатальной диагностики имеют необходимое оборудование для постановки этих методов.

Задачами настоящей работы явились следующие: 1) выбор доступного и достаточно чувствительного иммунохимического теста, позволяющего организовать массовое определение (скрининг) содержания АФП в сыворотке крови беременных женщин для выявления дефектов развития; 2) установление статистически достоверных

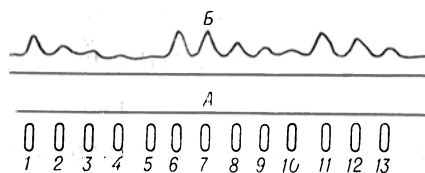


Рис. 1. Ракетно-линейный иммуоэлектрофорез стандартных растворов АФП.

А — промежуточный гель, содержащий тритоновый экстракт печени эмбриона (0,24 мкг/см²); Б — гель, содержащий моноспецифическую кроличью антисыворотку (8 мкл/см²); 1—5 — 10 мкл растворимой фракции печени эмбриона в разведении 1:2, 1:6, 1:12, 1:24 и 1:48 соответственно; 6—10 — 10 мкл тритонового экстракта печени эмбриона в разведении 1:2, 1:6, 1:12, 1:24 и 1:48 соответственно; 11—13 — соответственно 3, 7 и 10 мкл стандартного раствора АФП (фирма СЕА, Франция).

нормальных концентраций АФП в различные сроки беременности. В качестве такого доступного иммуохимического теста определения АФП в данной работе был использован ракетно-линейный иммуоэлектрофорез (ИЭФ) [3].

Методика

ИЭФ проводили на стеклянных пластинках размером 7×12 см, залитых 1% агарозным гелем («Litex», Дания), содержащим 0,2% тритон X-100. Добавление тритона X-100 способствовало усилению пиков преципитации. Кроме того, поскольку стандартные образцы АФП в наших исследованиях содержали тритон X-100, введение детергента в гель препятствовало появлению неспецифических преципитатов при нанесении сложной белковой смеси. Толщина агарозного геля составляла 0,15 см.

Анодная часть геля (3×12 см) содержала моноспецифическую кроличью антисыворотку (8 мкл/см²) против АФП человека. Антисыворотка с концентрацией антител 130—180 мкг/мл, определенной методом ракетного ИЭФ [10], была любезно предоставлена лабораторией иммуохимии опухолей Всесоюзного онкологического научного центра АМН СССР (зав. — проф. Г. И. Абелев).

Со стороны катода (3×12 см) в серию лунок емкостью 10 мкл, расположенных друг под другом строго по вертикали, вносили по 70 мкл исследуемых образцов сывороток крови. При таком расположении лунок сохраняется однородность электрического поля и практически не нарушается сцепление геля с пластинкой, следовательно, потери антигена вследствие подтекания его в промежутки между гелем и пластинкой минимальны.

Промежуточный гель (1×12 см) содержал тритоновый экстракт печени 16-недельного плода человека в объеме 20 мкл (0,24 мкг АФП) на 1 см² геля. Этот же экстракт использовали в качестве стандарта при построении калибровочной кривой.

Для получения тритонового экстракта 1 г печени 16-недельного плода человека гомогенизировали в 5 мл 0,025 М трис-буфера pH 7,4 с 2% тритона X-100, центрифугировали 1 ч при 20 000 g. Аналогично готовили растворимую фракцию белка, используя тот же буфер без тритона X-100.

Содержание АФП в полученных фракциях оценивали методом ракетно-линейного ИЭФ. Для сравнения использовали стандарт человеческого АФП (фирма СЕА, Франция).

Электрофорез проводили при напряжении 2 В/см в течение 16—18 ч в трис-барбиталовом буфере pH 8,6; I=0,02. После окончания электрофореза пластинки с гелем промывали, отжимали и окрашивали Кумасси PR-250 [10].

При расчете содержания АФП в исследуемых сыворотках измеряли площади соответствующих пиков иммуопреципитации, которые сравнивали с таковыми стандартных растворов. Результаты обрабатывали по Ойвину [1].

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлена иммуоэлектрофоретическая диаграмма стандартного раствора АФП, тритонового экстракта и растворимой фракции печени эмбриона.

По известной концентрации белка в стандартном растворе (3,2 мкг/мл) была рассчитана концентрация АФП в тритоновом экстракте (12,2 мкг/мл) и растворимой фракции (8,4 мкг/мл) печени эмбриона. В дальнейшем ввиду большей стабильности для построения калибровочной кривой на каждой пластинке с исследуемыми образцами сывороток крови в качестве стандарта АФП использовали тритоновый экстракт печени эмбриона.

Предложенный в этой работе вариант ракетно-линейного ИЭФ позволил значительно повысить чувствительность метода. Наименьшая концентрация АФП, определяемая методом обычного ракетного ИЭФ, составляет 0,5—1 мкг/мл [4], что делает его неприемлемым для оценки содержания АФП в сыворотке крови беременных женщин, где максимальная концентрация этого белка составляет 0,17—0,2 мкг/мл [13]. Использование промежуточного геля с тритоновым экстрактом эмбриональной печени, содержащим АФП, позволяет определить до 1,6 нг этого белка при нанесении 20 мкл образца, т. е. чувствительность метода составляет 0,08 мкг/мл.

Кроме того, чувствительность метода можно повысить увеличением объема наносимого образца. Размеры пластинок позволяли нанести до 70 мкл исследуемых сывороток беременных женщин, что повышало чувствительность метода до 0,022 мкг/мл. Подобная чувствительность уже достаточна для определения АФП в сыворотках крови; следовательно, ракетно-линейный ИЭФ может быть использован при

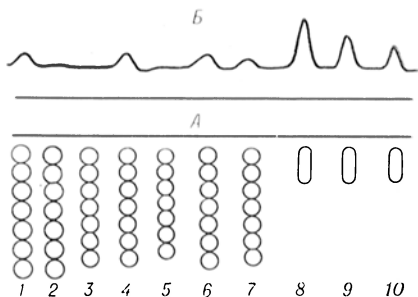


Рис. 2. Ракетно-линейный иммуноэлектрофорез образцов сывороток крови беременных.

А — промежуточный гель, содержащий тритоновый экстракт печени эмбриона (0,24 мкг/см²); Б — гель, содержащий моноспецифическую кроличью антисыворотку (8 мкл/см²); 1—7 — образцы сывороток крови беременных (70 мкл); 8, 9, 10 — 10 мкл тритонного экстракта печени эмбриона в разведении 1:6, 1:9 и 1:14 соответственно.

скрининге сывороток беременных наряду с радиоиммунным и иммуноферментным анализом.

Следует учесть, что ракетно-линейный ИЭФ благодаря введению в линию гомологичного антигена гарантирует определение именно АФП и свободен от таких недостатков, как появление побочной реакции в некоторых пробах на какой-то неизвестный антиген. Поэтому этот метод является даже более специфичным, чем радиоиммунный и иммуноферментный анализы, которые основаны не на иммунопреципитации, а на принципе связывания.

Так, например, ракетно-линейный ИЭФ использовался в диагностике нарушений ЦНС при определении растворимых дериватов нейроспецифического белка D₂ [15]. Этот же подход позволил выявить белок D₂ в амниотической жидкости при дефектах нервной трубки, где его концентрация была чрезвычайно низкая и не регистрировалась обычным ракетным ИЭФ [16].

На рис. 2 приведен пример иммуноэлектрофореграммы образцов сывороток крови. Стандартные растворы АФП вносили в первые 3 лунки для построения калибровочной кривой и последующей количественной оценки содержания АФП в исследуемых образцах сывороток крови.

Описанным методом было исследовано 150 образцов сывороток крови женщин с нормально протекающей беременностью. Результаты исследования графически представлены на рис. 3.

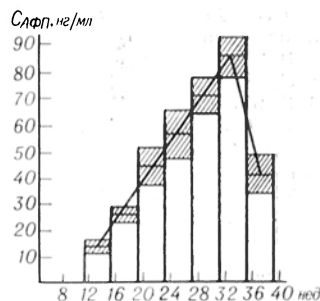


Рис. 3. Зависимость концентрации АФП в сыворотке крови беременных от срока беременности.

Концентрация АФП, составляющая в 12—15 нед $13,3 \pm 2,34$ нг/мл, растет по мере увеличения срока беременности и достигает максимума в 32—35 нед ($84,5 \pm 7,42$ нг/мл), затем снижается и составляет к 39 нед $39,6 \pm 7,02$ нг/мл.

Полученные результаты в целом несколько ниже среднестатистических данных, приведенных в обзоре [14], согласно которому содержание АФП на 12—16 неделях беременности составляет 30—40, на 32-й неделе — 300, а на 40-й неделе — 100 нг/мл. Однако достаточно большое число наблюдений позволяет считать полученные нами результаты более достоверными для региона, в котором проводилось обследование.

Действительно, ряд авторов наблюдали различия среднестатистических данных по содержанию АФП в сыворотках крови беременных в отдельных географических регионах [14, 15].

Метод ракетно-линейного ИЭФ позволяет анализировать до 10—12 образцов сыворотки крови на 1 пластинке. Используя 4—5 пластинок, можно увеличить число исследуемых одновременно образцов до 50—60 в сутки.

Таким образом, метод может быть использован при организации скрининга дефектов развития плода в пренатальный период.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ойвин Н. А. — Пат. физиол., 1960, № 4, с. 76.
2. Радиков Н. — Акуш. и гин. (София), 1979, № 6, с. 468—471.
3. Kroll J. — В кн.: Руководство по количественному иммуноэлектрофорезу. М., 1977, с. 78—88.
4. Axelsen N. H. — Blackwell Sci. Rbl., 1975, 175 p.
5. Forerst J. C., Verreault T. — Clin. Chem., 1982, vol. 28, p. 339—343.

6. Guibanud S., Bonnet M., Bornet H. et al. — Rev. franc. Gynec. Obstet., 1975, vol. 70, p. 155—162.
7. Hemke C., Weise W. — Zbl. Gynäk., 1981, Bd 103, S. 617—623.
8. Jørgensen O. S., Bock E., Bech R., Rafaelsen O. J. — Acta psychol. (Amst.), 1977, vol. 41, p. 50—56.
9. Jørgensen O. S., Nørgard-Pedersen B. — Prenatal. Diagn., 1981, vol. 1, p. 3—6.
10. Kemp H. A., Simpson S. A., Woodheard J. S. — Clin. Chem., 1981, vol. 27, p. 1388—1391.
11. Macri J. N., Weiss R. R. — Obstet. Gynec., 1982, vol. 59, p. 633—639.
12. Nevin N. C., Thompson W., Nesbitts J. — J. Obstet. Gynec. Brit. Cwlth, 1975, vol. 81, p. 757—760.
13. Nørgard-Pedersen B., Graede P. — Scand. J. Immunol., 1975, vol. 4, p. 19.
14. Seppälä M. — Clin. Obstet. Gynec., 1977, vol. 20, p. 737—757.
15. Standing S. J., Brindle M. J., MacDonald A. P., Lacey R. W. — Brit. med. J., 1981, vol. 283, p. 705—707.
16. Ward A. M. J. — Ric. Clin. Zol., 1972, vol. 12, p. 189—193.

Поступила 14.07.84

ESTIMATION OF α -FETOPROTEIN IN BLOOD SERUM OF PREGNANT WOMEN USING ROCKET-LINEAR IMMUNOELECTROPHORESIS

T. V. Demchenko, A. I. Shvetsova, V. A. Berezin, K. V. Voronin, L. V. Usenko, Yu. G. Poddubnyak

Chair of Obstetrics and Gynecology, Medical School, Chair of Biophysics and Biochemistry, State University, Dnepropetrovsk

Rocket-linear immunoelectrophoresis enabled to estimate the α -fetoprotein content in blood serum of pregnant women. Sensitivity of the procedure constituted as low as 13-22 ng of the protein per 1 ml of blood serum. Concentration of the protein in blood serum depended on the period of pregnancy; middle values of normal content of α -fetoprotein in blood serum were estimated within various periods of pregnancy in women of the district studied. The procedure might be used simultaneously with immunoenzymatic and radioimmune methods in prenatal diagnosis of impairments in development of the fetus neural tube.

УДК 612.397.2:577.112.856].014.46:615.256.51

М. Г. Творогова, В. Н. Титов

МЕТАБОЛИЗМ ЛИПОПРОТЕИДОВ У КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭТИНИЛЭСТРАДИОЛА

ВКНЦ АМН СССР, Москва

Различия в распространенности ишемической болезни сердца (ИБС) среди мужчин и женщин в пременопаузе, обнаруженные половые различия в показателях липидного обмена, нарушения которого рассматривают как фактор риска ИБС, были предпосылкой для использования эстрогенов в качестве гипохолестеринемического для предупреждающего риск развития инфаркта миокарда препаратов [31]. Однако гипертриглицеридемия, вызываемая применением натуральных и синтетических эстрогенов, была одной из причин отказа от использования этих гормонов при лечении инфаркта миокарда. Кроме того, за последнее время в клинической практике участились случаи развития гиперлипидотемии и инфаркта миокарда у молодых женщин, длительно принимающих синтетические эстрогены — оральные контрацептивы [4, 21, 35]. Повышение уровня триглицеридов при применении натуральных и синтетических эстрогенов показано и в эксперименте на крысах [27, 39] и птицах [22]. В клинических и экспериментальных исследо-

ваниях, кроме натуральных эстрогенов, часто используют этинилэстрадиол, представляющий собой синтетическое производное наиболее физиологически активного натурального эстрогена — эстрадиола.

Применение эстрогенов связывают со значительными изменениями в биосинтезе и катаболизме липидов, но экспериментальные данные противоречивы, что зачастую связано с гормонозависимым и дозозависимым характером влияния эстрогенов на липидный обмен. Одновременные исследования основных реакций обмена липопротеидов (ЛП) при применении синтетического эстрогена этинилэстрадиола, широко применяемого в клинической практике, позволят уточнить характер нарушений липидного обмена, индуцируемых эстрогенами.

Методика

Исследование основных реакций биосинтеза и катаболизма ЛП при введении этинилэстрадиола проведено на крысах-самках линии Вистар массой 180—200 г. В экспериментах использовано 100 животных. В период, предше-

Концентрация и удельная радиоактивность липидов при введении этинилэстрадиола

Объект исследования	Группа животных	Свободный холестерин	Эфиры холестерина	Триглицериды
Концентрация липидов ($M \pm \sigma$, мг/дл)				
Сыворотка крови	Контрольная	29,4 \pm 3,09	31,9 \pm 1,88	58,2 \pm 2,0
	Опытная	20,2 \pm 2,39	22,9 \pm 3,37	118,0 \pm 1,83
	<i>P</i>	<0,05	<0,05	<0,001
Удельная радиоактивность липидов (^{14}C , $M \pm \sigma$, имп/мин на 1 мг липида)				
Ткань печени	Контрольная	518 \pm 40	114 \pm 14	980 \pm 170
	Опытная	1188 \pm 140	53 \pm 4	1995 \pm 65
	<i>P</i>	<0,01	<0,01	<0,01
Сыворотка крови	Контрольная	712 \pm 257	298 \pm 105	2487 \pm 711
	Опытная	690 \pm 110	405 \pm 125	4593 \pm 560
	<i>P</i>	>0,05	<0,05	<0,05

Примечание. Число животных в каждой группе.

ствующий эксперименту (2 нед), и во время эксперимента крысы получали сухой брикетированный корм и находились в помещении с регулируемым световым режимом. Каждая исследуемая группа состояла из 20 животных: подопытных (получавших препарат) и контрольных. Этинилэстрадиол вводили внутримышечно в дозе 50 мкг на 1 кг массы тела в 0,2 мл оливкового масла в течение 5 дней. Животным контрольной группы ежедневно вводили 0,2 мл оливкового масла.

Липопротенды очень низкой плотности (ЛПОНП) ткани печени выделяли путем препаративного ультрацентрифугирования. ЛПОНП, липопротенды низкой плотности (ЛПНП) и липопротенды высокой плотности (ЛПВП) сыворотки крови выделяли методом последовательного ультрацентрифугирования в солевых растворах соответствующих плотностей [19]. Экстракцию липидов сыворотки крови и отдельных классов ЛП проводили, как описано ранее [3]. Фракцию суммарных апопротеннов выделяли методом ультрафильтрации из делипидированных проб, концентрацию суммарных апопротеннов каждого класса ЛП определяли по модифицированному [1] методу Lowry и соавт. [24]. Содержание липидов определяли сульфовапильным методом [34]. Удельную радиоактивность липидов и белков исследовали описанным ранее методом [5]. Для определения активности постгепариновой липопротеинлипазы (ЛПЛ, КФ 3.1.1.3) крысам за 15 мин до умерщвления внутривенно вводили гепарин («Гедеон Рихтер», Венгрия) в дозе 100 ед/кг. Активность постгепариновой ЛПЛ и печеночной триглицеридлипазы исследовали радиологическим методом [2]. Активность лецитинхолестеринацетилтрансферазы (ЛХАТ, КФ 2.3.1.43) исследовали радиологическим методом [17]. Данные обрабатывали методом вариационной статистики при использовании критерия *t* Стьюдента.

Результаты исследования

Применение этинилэстрадиола приводило к развитию гипохолестеринемии

у крыс-самцов линии Вистар. Снижение концентрации холестерина происходило за счет как свободного, так и эфирсвязанного стерола (табл. 1). Введение крысам этинилэстрадиола приводило к двукратному увеличению удельной радиоактивности триглицеридов и свободного холестерина и снижению удельной радиоактивности эфиров холестерина в ткани печени, но удельная радиоактивность свободного холестерина и его эфиров не изменялась в сыворотке крови экспериментальных животных, тогда как удельная радиоактивность триглицеридов была значительно увеличена у крыс опытной группы.

Для выяснения характера действия этинилэстрадиола на биосинтез ЛП в печени крыс мы исследовали удельную радиоактивность суммарных липидов и суммарных апопротеннов ЛПОНП, выделенных из ткани печени. Разнонаправленные изменения удельной радиоактивности белковых и липидных компонентов ЛПОНП печени (табл. 2) не позволяют однозначно охарактеризовать воздействие этинилэстрадиола на формирование ЛПОНП. Для выяснения этого вопроса мы исследовали удельную радиоактивность липидов и белков, секретируемых в составе ЛП в кровь. Оказалось, что после введения этинилэстрадиола удельная радиоактивность липидов ЛПОНП увеличивалась в большей степени, чем удельная радиоактивность апопротеннов этого класса ЛП, что дает основание

Удельная радиоактивность липидов и апопротеинов липопротеидов печени и сыворотки крови крыс при введении этинилэстрадиола

Группа животных	Ткань печени	Сыворотка крови		
	ЛПОНП	ЛПОНП	ЛПНП	ЛПВП
Удельная радиоактивность липидов (^{14}C , $M \pm \sigma$, имп/мин на 1 мг липида)				
Контрольная	1962 \pm 219	2185 \pm 219	1199 \pm 286	995 \pm 236
Опытная	3376 \pm 298	4004 \pm 431	1841 \pm 273	1272 \pm 179
<i>P</i>	<0,01	<0,05	<0,05	<0,05
Удельная радиоактивность апопротеинов (^3H , $M \pm \sigma$, имп/мин на 1 мг белка)				
Контрольная	4096 \pm 311	2153 \pm 99	3612 \pm 100	2934 \pm 143
Опытная	3264 \pm 208	3365 \pm 133	2083 \pm 111	5160 \pm 310
<i>P</i>	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

Примечание. Число животных в каждой группе 9.

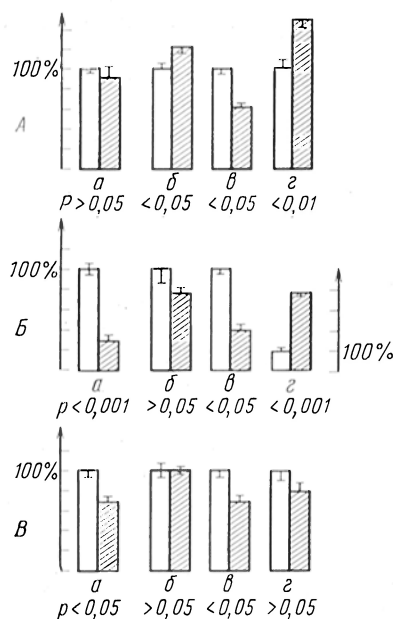
для предположения об изменении состава частиц. Отсутствие изменений удельной радиоактивности липидов ЛПНП при значительном снижении удельной радиоактивности апопротеинов этого класса ЛП также позволяет предположить изменение состава ЛПНП за счет обогащения липидами. Сравнение удельной радиоактивности

липидов и белков ЛПВП, напротив, служит основанием для предположения о снижении концентрации липидов в этом классе ЛП.

Для более подробной характеристики нарушений обмена липидов при введении этинилэстрадиола нами были проведены исследования липидного состава ЛП сыворотки крови (см. рисунок). Оказалось, что гипоchoлестеринемическое и гипертриглицеридемическое действие этинилэстрадиола сопровождалось изменением состава всех классов ЛП.

В ЛПОНП содержание холестерина не изменялось, однако доля этерифицированного холестерина возрастала, что вызывало достоверное повышение отношения эфиры холестерина/холестерин свободный в этом классе ЛП. Уровень триглицеридов возрастал в ЛПОНП животных, получавших этинилэстрадиол, что при неизменном уровне холестерина приводило к уменьшению отношения холестерин/триглицериды ($P < 0,05$) у подопытных животных. Содержание фосфолипидов не изменялось в ЛПОНП животных, получавших этинилэстрадиол.

В ЛПНП при введении гормона резко снижалось содержание холестерина, что при неизменном уровне триглицеридов вызывало снижение в этом классе ЛП соотношения холестерин/триглицериды, отражающего накопление ЛПНП, т. е. частиц, обогащенных триглицеридами [10]. Снижение уровня фосфолипидов было пропорционально изменению содержания холестерин-



Изменение липидного состава ЛП сыворотки крови при введении этинилэстрадиола (средние значения контроля приняты за 100%). Светлые столбцы — контроль ($M \pm m$), заштрихованные — опыт ($M \pm m$); а — холестерин, б — триглицериды, в — отношение холестерин/триглицериды, г — отношение эфиры холестерина/холестерин свободный; А — ЛПОНП, Б — ЛПНП (оси ординат слева — для показателей а, б, в, справа — для показателя г), В — ЛПВП.

на; при этом не изменялось отношение холестерина/фосфолипиды ($P > 0,05$). Следует отметить, что при снижении уровня общего холестерина в ЛПНП доля этерифицированного стерина значительно увеличивалась.

В ЛПВП при введении этинилэстрадиола уменьшалось содержание холестерина. При этом содержание свободного и этерифицированного холестерина понижалось в равной степени, о чем свидетельствовала неизменность отношения эфиры холестерина/холестерин свободный. Уровень фосфолипидов и отношение холестерина/фосфолипиды не менялись в ЛПВП подопытных животных. Снижение содержания холестерина при неизменном уровне триглицеридов изменяло отношение холестерина/триглицериды с 3,28 в контроле до 2,28 в группе животных, получавших этинилэстрадиол ($P < 0,05$), свидетельствуя, что и в этом классе ЛП под влиянием гормона происходило накопление триглицеридов.

Результаты проведенных экспериментов показали, что введение этинилэстрадиола в дозе 50 мкг на 1 кг массы тела приводило к снижению активности основных ферментов метаболизма триглицеридбогатых ЛП — постгепариновой ЛПЛ (контроль $73,6 \pm 1,5$ нмоль/мл/мин, опыт $56,8 \pm 4,6$ нмоль/мл/мин; $P < 0,01$) и триглицеридлипазы печени (контроль $45,7 \pm 2,0$ нмоль/мл/мин, опыт $31,9 \pm 1,9$ нмоль/мл/мин; $P < 0,01$). В эксперименте наблюдалось также снижение активности ЛХАТ в опытной группе животных ($9,7 \pm 1,68$ нмоль/мл/ч) по сравнению с таковой в контрольной ($14,5 \pm 0,36$ нмоль/мл/ч; $P < 0,02$).

Обсуждение результатов

В настоящее время исследованиями в клинике [8, 38] и эксперименте [15, 27] показано, что действие эстрогенов на концентрацию липидов и ЛП сыворотки крови зависит от вида применяемого гормона и является дозозависимым как для натуральных, так и для синтетических гормонов. С этих позиций легко объяснить противоречивость литературных данных о влиянии гормонов на уровень липидов в крови.

Хотя гипохолестеринемический эффект введения эстрогенов был отмечен многократно, влияние гормонов на биосинтез холестерина в печени изучено

недостаточно. Существуют лишь единичные данные о пониженной [32] или неизменной [7] активности гидрокси-метилглутарил-КоА-редуктазы (КФ 1.1.1.34) — ключевого фермента биосинтеза холестерина в печени разных видов экспериментальных животных. Полученные нами данные об увеличении удельной радиоактивности свободного холестерина в печени позволяют предположить возрастание биосинтеза этой фракции стерола при введении этинилэстрадиола в дозе 50 мкг на 1 кг массы. Однако неизменная удельная радиоактивность свободного холестерина в сыворотке крови указывает, что при применении этинил-эстрадиола секрция синтезированного холестерина в кровяное русло не возрастает. Опираясь на экспериментальные данные о том, что *de novo* синтезированный холестерин печени является предпочтительным субстратом для биосинтеза желчных кислот [28], можно предположить прямое включение синтезированного холестерина в желчные кислоты под действием гормона. Полученные данные о достоверном снижении уровня свободного холестерина, несмотря на двукратное увеличение удельной радиоактивности стерола в печени и неизменный уровень удельной радиоактивности в сыворотке крови, позволяют предположить, что снижение уровня холестерина связано не только с увеличением удаления холестерина, синтезированного *de novo* с желчью, но и с ускорением катаболизма его в плазме. Нами в эксперименте получены данные о снижении этерификации холестерина в печени, что может быть косвенным доказательством снижения активности ацил-КоА: холестерол-О — ацетилтрансферазы (АХАТ, КФ 2.3.1.26) — фермента, этерифицирующего холестерин в клетках печени и других тканей. Такие данные получены при исследовании влияния эстрогенов на этерификацию холестерина в печени [32] и аорте [33] голубей со спонтанным атеросклерозом. Снижение уровня эфиров холестерина обусловлено, однако, не только уменьшением этерификации холестерина в печени. Сопоставление неизменной удельной радиоактивности эфиров холестерина в сыворотке крови, свидетельствующей о неизменном поступлении их в кровь, и снижения концентрации эфиров холестерина в сыво-

ротке крови позволяет предположить усиление катаболизма этой фракции стерола под действием гормона.

Концентрация триглицеридов в крови животных, получавших этинилэстрадиол, увеличена вдвое по сравнению с таковой в контрольной группе. Увеличению концентрации триглицеридов соответствует возрастание удельной радиоактивности этого липида в печени и сыворотке крови животных опытной группы. Следовательно, гипертриглицеридемия, развивающаяся при введении этинилэстрадиола, в значительной степени обусловлена увеличением биосинтеза триглицеридов в печени и секреции их в кровяное русло. Естественно предположить, что при этом увеличивается и секреция ЛПОНП — основного носителя эндогенных триглицеридов. Это предположение подтверждается данными об одностороннем увеличении удельной радиоактивности белковых и липидных компонентов ЛПОНП сыворотки крови крыс, получавших этинилэстрадиол. Удельная радиоактивность апо-ЛПОНП печени понижена у животных опытной группы, однако значительное увеличение удельной радиоактивности апо-ЛПОНП сыворотки, сопоставимое с абсолютным значением удельной радиоактивности апо-ЛПОНП печени, наводит на мысль, что это явление связано с необычно быстрым выбросом вновь синтезированных ЛП в кровяное русло. Это предположение подтверждается экспериментальными исследованиями [11], в которых показано, что под действием эстрадиола 17- β увеличивается биосинтез апо-ЛПОНП в печени цыплят, и данными об увеличении концентрации суммарных белков ЛПОНП сыворотки при введении эстрадиола бензоата [23].

Наблюдавшееся нами в эксперименте повышение удельной радиоактивности апо-ЛПВП в сыворотке крови может свидетельствовать об активности биосинтеза и формирования этого класса ЛП. Действительно, в клинических условиях обнаружено увеличение концентрации апо- A_1 у мужчин и женщин при лечении эстрогенами [9, 25].

Однако обнаруженные изменения липидного состава ЛПВП не подтверждают предположение об увеличении формирования ЛПВП в условиях нашего эксперимента. Возрастание

удельной радиоактивности белков ЛПВП, по-видимому, связано с увеличением синтеза в печени апо-С, апо-протеина, переходящего из фракции ЛПОНП во фракцию ЛПВП во время липолиза [16]. Снижение концентрации холестерина отражает, возможно, усиление захвата апо-Е-содержащих ЛПВП печенью, отмеченное при применении больших доз эстрогенов [12].

Увеличение биосинтеза и секреции триглицеридов отразилось также на увеличении доли триглицеридов в частице ЛПОНП, что свидетельствует о формировании частиц большего размера при применении этинилэстрадиола. Формирование печенью самок крыс частиц ЛПОНП большего, чем у самцов, размера и содержащих меньше молекул холестерина и фосфолипидов на 1 моль триглицеридов показано в экспериментах с перфузированной печенью крыс [42]. Существует предположение [40], что изменение размеров ЛПОНП вызвано половыми различиями, тогда как применение гормона увеличивает количество секретируемых частиц. Полученные нами данные о снижении отношения холестерина/триглицериды в ЛПОНП и повышении удельной радиоактивности суммарных липидов и белков ЛПОНП сыворотки предполагают увеличение секреции ЛПОНП большего, чем в норме, размера при введении этинилэстрадиола. Увеличение секреции обогащенных триглицеридами ЛПОНП, вероятно, приводит к возрастанию уровня триглицеридов в первичных ремнантах — ЛПНП и во вторичных ремнантах — ЛПВП.

Обогащение ЛПОНП эфирами холестерина в условиях снижения биосинтеза их в печени может быть связано с возрастанием концентрации холестерина в печени [13]. Кроме того, в эксперименте показаны увеличение массы печени животных, получавших этинилэстрадиол [41], и гипертрофия клеток печени и эндоплазматического ретикулума у крыс под действием эстрогенов [30]. Таким образом, при снижении радиоактивности эфиров холестерина печени, отражающем относительное уменьшение этерификации холестерина под влиянием гормона, абсолютный уровень эфиров холестерина не изменяется, о чем свидетельствуют неизменная удельная радиоактив-

ность липида в сыворотке крови и возрастание доли эфиров холестерина в ЛПОНП. По-видимому, эти же механизмы ответственны за увеличение доли эфиров холестерина в ЛПНП, независимо от происхождения частиц: как ремнантов, обогащенных эфирами холестерина ЛПОНП или синтезированных *de novo* в печени.

Изменение постгепариновой липолитической активности отмечено в литературе при применении эстрогенов в клинике и эксперименте. Однако отмеченный выше разнонаправленный и дозозависимый эффект натуральных и синтетических эстрогенов на уровень липидов плазмы позволяет предположить наличие неадекватных изменений активности изучаемых нами ферментов в разных экспериментальных условиях. Показано [36], что применение этинилэстрадиола и эстрадиола 17- β в одинаковых дозах различно влияет на активность липазы печени. Выявлен также дозозависимый эффект этинилэстрадиола на активность ЛПЛ жировой ткани у экспериментальных животных [37].

Полученные нами экспериментальные данные показывают, что введение этинилэстрадиола вызывает достоверное снижение постгепариновой липопротеидлипазной активности печеночного и внепеченочного происхождения. Аналогичные данные получены при введении крысам эстрадиола [18, 37]. Следует отметить, что снижение активности фермента при действии эстрогенов происходит неодинаково у разных видов: у человека в отличие от крыс снижение общей постгепариновой липопротеидлипазной активности происходит за счет снижения активности печеночной триглицеридлипазы при неизменной или слабо сниженной активности ЛПЛ внепеченочного происхождения [6]. Учитывая эти данные, изменения соотношения апо-С_{II} и апо-С_{III} вряд ли могут быть объяснением снижения активности постгепариновой ЛПЛ при проведении терапии эстрогенами, так как эти апопротеины являются активатором и ингибитором только для ЛПЛ внепеченочной (например, жировой) ткани. Кроме того, при введении эстрадиола отмечено увеличение концентрации как апо-С_{II}, так и апо-С_{III} при снижении соотношения апо-С_{II}/апо-С_{III} [25]. Показана неизменность уровня апо-С_{II} в период

лечения эстрогенами [43].

Концентрация апо-Е, который участвует в образовании фермент-субстратного комплекса в реакции ЛПЛ и ЛПОНП [13], увеличивается при введении эстрадиола животным [23]. В то же время отмечено снижение концентрации апо-Е при введении больших доз эстрогенов [14].

Сообщают об изменении резистентности тканей к гепарину как о возможной причине изменения активности ЛПЛ под влиянием оральных контрацептивов [20]. Однако снижение выброса фермента при инъекции гепарина вряд ли может серьезно отражаться на функции тканевосвязанного фермента в физиологических условиях. Таким образом, окончательный механизм снижения активности постгепариновой ЛПЛ под влиянием эстрогенов остается неясным. Можно предположить, что многочисленные изменения, отмеченные при применении гормонов, в уровне липидов и апопротеинов сыворотки крови снижают способность фермента и/или субстрата к образованию комплекса. На основании полученных нами экспериментальных данных о снижении активности постгепариновой ЛПЛ и печеночной триглицеридлипазы можно заключить, что накопление триглицеридов в ЛПОНП и ЛПНП вызвано не только увеличением формирования ЛП, но и снижением катаболизма ЛПОНП при применении этинилэстрадиола.

Данные литературы об изменении активности ЛХАТ под влиянием эстрогенов крайне немногочисленны. Не было обнаружено различий в активности фермента у мужчин и женщин разного возраста [45]. У крыс, однако, активность ЛХАТ у самок достоверно выше, чем у самцов [29]. Наблюдаемые половые различия в активности фермента авторы связывают с различиями не в уровне фермента в крови, а в концентрации или составе субстрата. Исследования активности ЛХАТ в крови крыс при применении этинилэстрадиола в дозах 5 и 15 мкг на 1 кг массы тела указывают на зависимость повышения активности фермента от изменения субстрата, но не увеличения количества фермента [40]. К сожалению, в этой работе нет данных об изменении процента этерификации холестерина в условиях эксперимента. Однако приведенные данные об увеличении со-

держания холестерина ЛПОНП, связываемом авторами с повышенной секрецией холестерина, и о неизменном уровне общего холестерина позволяют предположить, что и в этом случае увеличение активности фермента отражает увеличение субстрата — свободного холестерина.

Проведенный нами анализ полученных экспериментальных данных показал, что при действии этинилэстрадиола возрастание биосинтеза свободного холестерина в печени, по всей вероятности, не сопровождается повышением секреции его в кровяное русло, возможно, вследствие прямого превращения холестерина, синтезированного *de novo*, в жирные кислоты, без вхождения его в плазменный пул. Снижение секреции синтезированного *de novo* свободного холестерина в кровь при применении этинилэстрадиола отражается на соотношении свободного и эфиросвязанного холестерина в ЛПОНП, тогда как этерификация холестерина в плазме, регулируемая ЛХАТ, понижена.

Таким образом, результаты экспериментальных исследований показывают, что применение этинилэстрадиола в дозе 50 мкг на 1 кг массы тела вызывает гипохолестеринемию и гипертриглицеридемию одновременно с нарушением липидного состава всех классов ЛП. Обнаруженные изменения обусловлены как увеличением биосинтеза и секреции ЛПОНП, так и нарушением трансформации ЛП в крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мосолов В. В., Скарлат Н. В. — Приклад. биохим., 1965, № 2, с. 233.
2. Творогова М. Г., Кантарджян И. Г., Неговская А. В., Титов В. Н. — Лаб. дело, 1982, № 4, с. 214.
3. Творогова М. Г., Титов В. Н., Санфирова В. М. — Фармакол. и токсикол., 1982, № 4, с. 48.
4. Титов В. Н., Жемерикина Е. В., Щербакowa Н. А. и др. — Тер. арх., 1978, № 12, с. 22.
5. Титов В. Н., Пицун Д. Г. — Биохимия, 1978, № 1, с. 83.
6. Appelbaum D., Goldberg A., Pycalisto O. et al. — J. clin. Invest., 1977, vol. 59, p. 601.
7. Bonorris G., Coyne M., Chung A. et al. — J. Lab. clin. Med., 1977, vol. 90, p. 963.
8. Buckman M., Johnson J., Ellis H. et al. — Metabolism, 1980, vol. 29, p. 803.
9. Cabana V., Albers J., Wahl P. et al. — Circulation, 1975, vol. 52, Suppl. 2, p. 1039.
10. Carlson L. — In: Lipoprotein Metabolism / Ed. H. Greten. Berlin, 1976, p. 69.
11. Chan L., Jackson R., O'Malley B. et al. — J. clin. Invest., 1976, vol. 58, p. 368.
12. Chao Y., Windler E., Chen G. et al. — J. biol. Chem., 1979, vol. 254, p. 11360.
13. Davis R., Kern F., Showalter R. et al. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1978, vol. 75, p. 4130.
14. Davis R., Roheim P. — Atherosclerosis, 1978, vol. 30, p. 293.
15. Ferrery L., Naito H. — Endocrinology, 1978, vol. 102, p. 1621.
16. Glangeand M., Eisenberg S., Olivercrona T. — Biochim. biophys. Acta, 1977, vol. 486, p. 23.
17. Glomset J. — Meth. Enzymol., 1969, vol. 15, p. 543.
18. Hamosh M., Hamosh P. — J. clin. Invest., 1975, vol. 55, p. 1132.
19. Havel H., Eder H., Bragadon J. — Ibid., 1955, vol. 34, p. 1345.
20. Hazzard W., Notter D., Spiger M. et al. — J. clin. Endocr., 1972, vol. 35, p. 425.
21. Jick H., Dinan B., Rothman K. — J. A. M. A., 1978, vol. 239, p. 1403.
22. Kidzma D., Claire F., Delallo L. et al. — J. Lipid Res., 1975, vol. 16, p. 123.
23. Kim H., Kalhoff R. — Metabolism, 1978, vol. 27, p. 571.
24. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. — J. biol. Chem., 1951, vol. 193, p. 265.
25. Reman F., Vermond A. — Clin. chim. Acta, 1978, vol. 87, p. 387.
26. Shelburne F., Quarfordt S. — J. clin. Invest., 1977, vol. 60, p. 944.
27. Shillinger E., Gerhards E. — Biochem. Pharmacol., 1973, vol. 22, p. 1835.
28. Schwartz C., Berman M., Vlancevic Z. et al. — J. clin. Invest., 1978, vol. 61, p. 408.
29. Soler-Argilaga C., Russel R., Goh E. et al. — Biochim. biophys. Acta, 1977, vol. 488, p. 69.
30. Song C., Rifkind A., Gilette P. et al. — Amer. J. Obstet. Gynec., 1969, vol. 105, p. 813.
31. Stamler J., Pick R., Katz L. et al. — J. A. M. A., 1963, vol. 183, p. 632.
32. Subbiah M. — Endokrinologie, 1977, Bd 70, S. 257.
33. Subbiah M. — Steroids, 1977, vol. 30, p. 259.
34. Tapscott H. — J. Chromatogr., 1975, vol. 107, p. 420.
35. Tyroler H., Heiss G., Heyden S. et al. — Amer. J. Epidemiol., 1977, vol. 106, p. 238.
36. Valette A., Carasco G., Verine A. et al. — J. Endocr., 1978, vol. 79, p. 405.
37. Valette A., Mercier L., Verine A. et al. — Molec. cell Endocr., 1983, vol. 29, p. 243.
38. Wahl P., Walden C., Knopp R. et al. — New Engl. J. Med., 1983, vol. 308, p. 862.
39. Weinstein I., Seedman S., Veldhuis A. — Proc. Soc. exp. Biol., 1975, vol. 149, p. 181.
40. Weinstein I., Turner F., Soler-Argilaga C. et al. — Biochim. biophys. Acta, 1978, vol. 530, p. 394.
41. Weinsweiler P., Neurenther G., Schwandt P. — Atherosclerosis, 1979, vol. 33, p. 295.
42. Wilcox H., Woodside W., Breen K. et al. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1974, vol. 58, p. 919.
43. Wilcox H. — Biochim. biophys. Acta, 1981, vol. 666, p. 348.
44. Wilson D., Flowers C., Cartile S. et al. — Atherosclerosis, 1976, vol. 24, p. 491.
45. Yao J., Dyck P. — Clin. Chem., 1977, vol. 23, p. 447.

Поступила 05.01.85.

Effect of ethinyl-estradiol on metabolism of lipoproteins was studied in rat blood. Administration of ethinyl-estradiol at a dose of 50 µg/kg of body mass led to hypocholesterolemia and to hypertriglyceridemia in blood of experimental animals as well as the hormone-impaired lipid composition of all the lipoprotein classes. These alterations in lipid composition of lipoproteins occurred as a result of an increase in biosynthesis and secretion of very low density lipoproteins as well as due to impairments of lipoprotein transformation in blood serum caused by a decrease in activity of main enzymes responsible for the transformation of lipoproteins in circulation—lipoprotein lipase, liver triglyceride lipase and lecithin-cholesterol acyltransferase.

lemia and to hypertriglyceridemia in blood of experimental animals as well as the hormone-impaired lipid composition of all the lipoprotein classes. These alterations in lipid composition of lipoproteins occurred as a result of an increase in biosynthesis and secretion of very low density lipoproteins as well as due to impairments of lipoprotein transformation in blood serum caused by a decrease in activity of main enzymes responsible for the transformation of lipoproteins in circulation—lipoprotein lipase, liver triglyceride lipase and lecithin-cholesterol acyltransferase.

УДК 612.351.1.015.36:[547.953+547.426.23]014.46:547.262

В. Н. Титов, Д. Г. Пицин

ВЛИЯНИЕ ЭТАНОЛА НА БИОСИНТЕЗ ОСНОВНЫХ КОМПОНЕНТОВ ТРИАЦИЛГЛИЦЕРИДОВ И ФОСФОЛИПИДОВ В ПЕЧЕНИ КРЫС

Всесоюзный кардиологический научный центр АМН СССР, Москва

Введение этанола человеку и экспериментальным животным вызывает значительное накопление триацилглицеридов в гепатоцитах. Однако патогенез возникающей «жировой инфильтрации» печени остается недостаточно изученным. Возможно, что жирные кислоты триацилглицеридов, накапливающихся в печени, происходят из жировой ткани, из жиров пищи или синтезированы *in situ* [1].

Введение этанола подопытным животным, получавшим рацион с низким содержанием жиров, индуцирует синтез жирных кислот в печени [25] и изолированных клетках эпителия кишечника [31]. Ткань печени, полученная при биопсии у пациентов с хроническим алкоголизмом, включала меченый ацетат в триацилглицериды достоверно выше, чем у лиц, не потреблявших этанол [19].

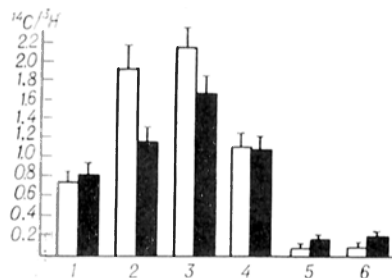
Показано, что скорость синтеза триацилглицеридов в гепатоцитах лимитирована содержанием в них α -глицерофосфата [8] и длинноцепочных жирных кислот [16]. Глицерофосфат, необходимый для синтеза глицеролипидов, может быть образован из глюкозы, оксалацетата, генерированного из пирувата, или в реакции цитратного цикла. Факторы, стимулирующие глицеронеогенез, одновременно усиливают синтез триацилглицеридов в печени [33].

В то же время в большинстве проведенных ранее исследований влияние этанола на биосинтез липидов в пече-

ни оценивалось только по включению меченых предшественников в суммарные жирные кислоты глицеролипидов (триацилглицеридов и фосфолипидов) и почти не были рассмотрены особенности влияния этанола на синтез отдельных компонентов сложных липидов. Поэтому мы считаем целесообразным исследовать влияние этанола на биосинтез отдельных компонентов глицеролипидов, что, по нашему мнению, расширит возможности понимания механизмов накопления липидов в гепатоцитах, а возможно, и жировой инфильтрации печени.

Методика

Работа выполнена на 100 крысах-самцах Вистар массой 180–200 г, разбитых на 2 группы: животным 1-й группы (опыт), голодавшим в течение 3 ч, однократно вводили через зонд в желудок этанол из расчета 6 г на 1 кг массы тела в виде 50 % раствора, крысы 2-й группы (контроль) получали вместо этанола изокалорическое количество глюкозы. Животных декапитировали через 14 ч после введения этанола. За 2 ч до декапитации крысам внутрибрюшинно вводили $[2-^{14}\text{C}]$ -ацетат, и $[4,5-^3\text{H}]$ -лейцин по 10 и 30 мкКи на 100 г массы тела соответственно. Печень перфузировали изотоническим раствором NaCl, нарезали на кусочки, высушивали фильтровальной бумагой и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе. Экстракт общих липидов получали по методу Фолча [11]. Для разделения нейтральных липидов использовали одномерную двухступенчатую хроматографию в тонком слое силикагеля [12]. Для разделения метиловых эфиров жирных кислот глицеролипидов в зависимости от степени их ненасыщенности был применен метод тонкослойной хроматографии в силикагеле, содержащем 10 % AgNO_3 [9]. После проявления эфиры жирных



Использование ^{14}C -ацетата и ^3H -лейцина в биосинтезе фосфолипидов и нейтральных липидов печени крыс при действии этанола.

1 — фосфолипиды; 2 — триацилглицериды; 3 — свободный холестерин; 4 — диацилглицериды; 5 — моноацилглицериды; 6 — свободные жирные кислоты. Светлые столбики — контроль, темные — введение этанола.

кислот элюировали диэтиловым эфиром. Радиоактивность липидных фракций измеряли в сцинтилляционной смеси 0,5 % РРО и 0,02 % РОРОР в толуоле; в случае глицериновой части глицеролипидов — в сцинтилляционной жидкости для водных растворов «Trilisol» [12], используя спектрометр «Mark-III» с модулем ДПМ. Содержание отдельных липидных фракций и метиловых эфиров жирных кислот определяли описанными методами [27, 36]. Результаты исследования обработаны методом вариационной статистики с использованием *t*-критерия Стьюдента. Большинство использованных реактивов получено от фирмы «Merk» (ФРГ) и «Sigma» (США), меченые предшественники — от фирмы «Amersham» (Англия).

Результаты

Как показано ранее [12, 17], однократное введение этанола крысам увеличивает в печени содержание триацилглицеридов; такие же изменения отмечены и в сыворотке крови. После однократного введения этанола в печени повышается синтез моно-, ди- и

триацилглицеридов из ^{14}C -ацетата и ^3H -лейцина.

Для выяснения различий в использовании для синтеза отдельных классов липидов печени пулов ацетил-КоА, образованного из ^{14}C -ацетата и сформированного при эндогенном расщеплении $[4,5-^3\text{H}]$ -лейцина, рассчитаны процентное распределение ^3H - и ^{14}C -меток и соотношение $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ для каждой липидной фракции печени в контроле и опыте. Полученные данные представлены в графическом изображении на рисунке. В триацилглицеридах, диацилглицеридах, свободном холестерине и его эфирах из печени контрольных животных это соотношение варьировало от 1,5 до 2,2, на основании чего можно полагать, что ацетил-КоА, образованный из ^{14}C -ацетата, используется для синтеза этих липидных фракций в большей степени, чем происходящий из ^3H -лейцина. Напротив, в общих фосфолипидах, моноацилглицеридах и свободных жирных кислотах преобладает ^3H -метка, происходящая из меченого лейцина.

Из приведенных в табл. 1 данных следует, что метка из ^3H -лейцина утилизируется преимущественно в синтезе глицериновой части фосфолипидов и триглицеридов. Напротив, ^{14}C -метка ацетата используется главным образом для синтеза жирных кислот. Под влиянием этанола более значительно активируется биосинтез глицериновой части глицеролипидов, чем образование жирных кислот.

В целях выяснения участия синтезированных *de novo* жирных кислот, входящих в состав глицеролипидов, в ин-

Таблица 1
Влияние однократного введения этанола на включение ^{14}C -ацетата и ^3H -лейцина в жирные кислоты и глицериновые остатки триацилглицеридов и фосфолипидов печени крыс ($M \pm m$)

Липидная фракция	Меченый предшественник	Условия опыта	Радиоактивность, имп на 1 г влажной ткани в 1 мин	
			жирные кислоты	глицериновый остаток
Триацилглицериды	^{14}C -ацетат	Контроль	6 663 ± 782 (63,7)	3 797 ± 439 (36,3)
		Этанол	13 114 ± 1 523 (49,8)*	13 212 ± 1 490 (51,2)*
	^3H -лейцин	Контроль	724 ± 97 (42,9)	964 ± 118 (57,1)
		Этанол	2 616 ± 310 (49,4)*	2 679 ± 326 (50,6)*
Фосфолипиды	^{14}C -ацетат	Контроль	11 531 ± 1 186 (70,8)	4 756 ± 473 (29,2)
		Этанол	13 734 ± 1 579 (67,3)	6 523 ± 812 (32,7)**
	^3H -лейцин	Контроль	3 059 ± 487 (26,3)	8 572 ± 1 020 (73,7)
		Этанол	1 944 ± 241 (17,5)*	9 166 ± 1 182 (82,5)

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 одна звездочка — $P < 0,001$, две — $P < 0,005$ по отношению к контролю. В скобках — радиоактивность жирных кислот или глицеринового остатка в процентах от их общей радиоактивности.

Влияние этанола на включение [^{14}C]-ацетата и [^3H]-лейцина в отдельные жирные кислоты триацилглицеридов печени крыс ($M \pm m$)

Исследуемый показатель	Условия опыта	Меченый предшественник	Жирные кислоты					с числом двойных связей более 4
			насыщенные	моноеновые	двиеновые	триеновые	тетраеновые	
Радиоактивность, нмп на 1 мг липида в 1 мин	Контроль	[^{14}C]-ацетат	2080 \pm 217 (62,0)	310 \pm 32 (7,5)	199 \pm 24 (4,7)	908 \pm 92 (5,2)	1078 \pm 116 (10,0)	1241 \pm 167 (10,6)
		[^3H]-лейцин	672 \pm 85 (78,2)	79 \pm 9 (7,2)	49 \pm 7 (4,0)	134 \pm 11 (4,1)	89 \pm 11 (4,9)	87 \pm 10 (2,5)
	Этанол	[^{14}C]-ацетат	4523 \pm 470* (64,6)	833 \pm 87 (11,1)	177 \pm 24 (2,2)	1997 \pm 171* (6,8)	1930 \pm 205* (6,6)	2235 \pm 298* (8,7)
		[^3H]-лейцин	1631 \pm 226* (90,5)	87 \pm 5 (5,2)	45 \pm 11 (1,9)	49 \pm 18 (0,7)	33 \pm 8 (0,4)	121 \pm 19 (1,3)
Содержание жирных кислот, мг на 1 г влажной ткани	Контроль		29,0 \pm 1,9	23,7 \pm 3,0	22,8 \pm 1,1	6,6 \pm 1,0	10,0 \pm 1,7	7,9 \pm 1,5
	Этанол		27,6 \pm 2,7	29,3 \pm 3,4	25,7 \pm 3,2	6,3 \pm 1,0	6,0 \pm 0,9	5,1 \pm 0,8

Примечание. Здесь и в табл. 3 в скобках — распределение радиоактивности между отдельными классами жирных кислот (в %).

дуцируемом этанолом накоплении липидов в печени исследовано их содержание у крыс контрольной и опытных групп. Под влиянием этанола процентное содержание пальмитиновой кислоты в триацилглицеридах существенно не менялось, в то время как концентрация арахидоновой и полиеновых жирных кислот, имеющих более 4 двойных связей, была снижена (табл. 2). Процентное содержание олеиновой и линолевой кислот триацилглицеридов под влиянием этанола повысилось. Полученные данные свидетельствуют о том, что под влиянием этанола в триацилглицеридах значительно снижается содержание полиеновых и увеличивается уровень моноеновых и двиеновых жирных кислот. Такая же зависимость прослежена и для фосфолипидов при хроническом введении этанола [6]. Снижение содержания полиеновых жирных кислот в накапливающихся в печени триацилглицеридах позволило предположить, что жирнокислотный состав триацилглицеридов и процесс их секреции печеню являются взаимосвязанными. Действительно, можно редуцировать явления жировой дистрофии печени крыс при хроническом введении этанола путем повышения в пище содержания арахидоновой кислоты [13].

В печени контрольных животных синтез насыщенных жирных кислот (в частности, пальмитиновой) протекает весьма активно. Этанол при однократном введении стимулирует синтез насыщенных жирных кислот триацилглицеридов более чем в 2 раза

(см. табл. 2). В той же степени повышается под влиянием этанола и удельная радиоактивность моноеновых жирных кислот. Радиоактивность полиеновых жирных кислот (кроме линолевой) по ^{14}C оказалась также значительно выше у крыс, получавших этанол. В то же время анализ включения [^3H]-лейцина в жирные кислоты триацилглицеридов показал, что этанол интенсивно повышал удельную радиоактивность насыщенных жирных кислот, однако включение ^3H -метки в линолевую и арахидоновую кислоты было сниженным.

Представляет интерес сопоставить влияние этанола на включение меток в пальмитиновую кислоту триацилглицеридов (см. табл. 2) и фосфолипидов (табл. 3). Введение этанола приводило к значительному (на 26 %) повышению включения ^{14}C -метки в пальмитиновую кислоту фосфолипидов, тогда как удельная радиоактивность полиеновых жирных кислот либо не менялась (С 18:2), либо умеренно снижалась (С 18:3, 20:4, 22:5,6). Необходимо отметить, что под влиянием этанола значительно (в 3 раза) возрастало включение ацетата в олеиновую кислоту фосфолипидов.

Рассматривая механизмы накопления триацилглицеридов в печени и развития гипертриглицеридемии под влиянием этанола, следует отметить, что за эти изменения могут быть ответственны непосредственно этанол и образованный из него ацетальдегид. Продуктами окисления этанола и ацетальдегида являются ацетат и НАД \cdot H;

Влияние этанола на включение [^{14}C]-ацетата и [^3H]-лейцина в отдельные жирные кислоты фосфолипидов печени крыс (в имп на 1 мг липида в 1 мин)

Условия опыта	Меченый предшественник	Жирные кислоты					
		насыщенные	моноеновые	диеновые	триеновые	тетраеновые	с числом двойных связей более 4
Контроль	[^{14}C]-ацетат	3500 \pm 404 (84,0)	155 \pm 25 (2,0)	106 \pm 21 (1,7)	750 \pm 67 (3,2)	431 \pm 37 (5,2)	514 \pm 41 (3,9)
	[^3H]-лейцин	962 \pm 112 (78,8)	51 \pm 9 (3,2)	37 \pm 7 (2,05)	242 \pm 19 (3,1)	151 \pm 17 (8,4)	189 \pm 16 (4,5)
Этанол	[^{14}C]-ацетат	4628 \pm 554 (86,8)	478 \pm 38* (5,6)	107 \pm 22 (1,4)	481 \pm 52 (1,6)	261 \pm 29 (2,4)	416 \pm 41 (2,2)
	[^3H]-лейцин	1411 \pm 164 (88,2)	87 \pm 11 (4,5)	41 \pm 7 (1,6)	117 \pm 17 (1,2)	43,12* (1,9)	135 \pm 16 (2,6)

при этом повышается отношение НАД·Н/НАД в гепатоцитах [17]. При окислении этанола в печени одновременно повышается концентрация НАД·ФН и ацетил-КоА, используемых в липогенезе [32]. Перенос и реокисление восстановленных эквивалентов являются лимитирующей стадией окисления этанола клетками печени животных [5]. Добавление пирувата и диоксиацетона в корм животных ингибировало накопление триацилглицеридов в печени при действии этанола [14]. Введение аденозина предотвращало индуцированное этанолом ожирение печени путем ускорения утилизации митохондриями восстановленных эквивалентов, образующихся при окислении спирта [18]. Нами показано, что этанол индуцирует синтез жирных кислот и глицериновой части триацилглицеридов в печени крыс. Ранее показано, что введение этанола животным, содержащимся на рационе с низким содержанием жира, индуцирует липогенез из [^{14}C]-ацетата в печени [27]. При однократном введении этанола отмечены ингибирование цитратного цикла, увеличение в печени содержания цитрата, малата и снижение концентрации ацилпроизводных КоА [23]. Известно, что цитрат является аллостерическим активатором ацетил-КоА-карбоксилазы. Можно полагать, что в активации синтеза пальмитата триацилглицеридов из меченого ацетата и лейцина основную роль играют доступность субстратов (ацетил-КоА и НАДФ·Н) и повышение каталитической активности ацетил-КоА-карбоксилазы. В экспериментах *in vitro* на кусочках поджелудочной железы показа-

но, что добавление этанола в среду инкубации приводило к стимулированию синтеза жирных кислот из [^{14}C]-ацетата и [^3H]- H_2O , но не из меченой глюкозы [4].

Этанол увеличивает как содержание олеиновой кислоты в составе триацилглицеридов, так и ее радиоактивность. Активация синтеза пальмитиновой и олеиновой кислот этанолом определена взаимоотношением синтеза жирных кислот *de novo* и активности Δ^9 -десатуразы, превращающей пальмитиновую кислоту в олеиновую [20].

Синтез линолевой кислоты в печени крыс является медленным процессом [10], и этанол не оказывает на него выраженного влияния.

Привлекает внимание различие эффектов этанола на включение меченых ацетата и лейцина в полиненасыщенные жирные кислоты триацилглицеридов и фосфолипидов. Стимуляция этанолом включения ацетата в полиненасыщенные жирные кислоты триацилглицеридов и ингибирование включения метки в те же самые жирные кислоты общих фосфолипидов могут быть обусловлены утилизацией фонда вновь синтезированных жирных кислот, прежде всего в синтезе триацилглицеридов. В то же время этанол весьма интенсивно подавлял биосинтез из [^3H]-лейцина полиеновых жирных кислот, входящих в состав как триацилглицеридов, так и фосфолипидов. Трудно объяснить эти факты; можно лишь высказать предположение, что генерирование ацетил-КоА из метаболитов и его использование для синтеза отдельных классов жирных кислот, по-видимому, регулируют разные меха-

низмы. Судя по имеющимся данным [28], однократное введение этанола подавляет у крыс активность $\Delta 6$ - и $\Delta 5$ -десатуразы, тогда как активность $\Delta 9$ -десатуразы и синтеза жирных кислот меняется только под влиянием диеты.

Мнения исследователей об участии в синтезе триацилглицеридов печени жирных кислот из разных источников противоречивы. В этом процессе участвуют жирные кислоты, как синтезированные *de novo*, так и поступившие с пищей или освобожденные из жировой ткани в процессе гидролиза триацилглицеридов. У предварительно голодавших крыс этанол подавляет синтез жирных кислот [29]. Следовательно, в этих условиях эксперимента основным источником жирных кислот для синтеза триацилглицеридов в печени являются кислоты плазмы крови, поступающие из жировой ткани. Исследование жирнокислотного состава таблетированного корма крыс показало преобладание двух жирных кислот: олеиновой и линолевой. В условиях проводимых экспериментов этанол был введен через 3 ч после прекращения доступа животных к пище. Следовательно, отмеченное усиление синтеза триацилглицеридов в печени после однократного введения этанола могло происходить за счет этерификации жирных кислот, синтезированных в печени (пальмитата), поступивших с пищей (олеата и линолеата) или освобожденных из жировой ткани. Обнаруженное ранее повышение этанолом активности липопротеинлипазы жировой ткани согласуется с результатами, в которых показана мобилизация этанолом жирных кислот из эпидимальной жировой ткани крыс [17].

Метаболизм жирных кислот в печени в конечном счете приводит к их окислению или этерификации. В результате окисления этанола и ацетальдегида, как было указано выше, меняется соотношение окисленных и восстановленных эквивалентов, что приводит к подавлению окисления свободных жирных кислот.

В наблюдениях на людях с использованием меченого триолеина показано, что этанол подавляет окисление жирных кислот [2]. В то же время окисление этанола в печени усиливает включение жирных кислот плазмы крови в триацилглицериды [22], что

связывают отчасти с повышением тока крови через печень. В экспериментах при перфузии печени выявлено, что этанол повышает поглощение меченого пальмита и его включение в ди- и триацилглицериды мембран гепатоцитов [22]. Усиление этерификации жирных кислот, обусловленное этанолом, по-видимому, связано с повышением активности глицерофосфатацилтрансфераз. Однократное введение этанола, как правило, повышает активность фосфатидатфосфогидролазы, что предшествует накоплению триацилглицеридов в печени [30]. Активность фосфатидатфосфогидролазы повышена при ряде физиологических и патологических состояний, при которых наблюдается накопление триацилглицеридов в печени. Индукция микросомальных ферментов, в том числе фосфатидатфосфогидролазы под влиянием фенобарбитала, способствует повышению синтеза триацилглицеридов в печени, что в свою очередь может обуславливать развитие гипертриглицеридемии [15]. Наряду с этим обнаружена временная зависимость между активностью фосфатидатфосфогидролазы и стимулирующим действием этанола на биосинтез триацилглицеридов печени из [^{14}C]-глицеро-3-фосфата [24]. Возрастание активности фосфатидатфосфогидролазы в печени под влиянием этанола может быть, хотя бы частично, обусловлено влиянием кортикостерона [21], уровень которого при введении этанола увеличивается в 3—7 раз [2].

Из приведенных данных следует, что этанол в большей степени активизирует синтез глицериновой части, чем жирных кислот триацилглицеридов. Большинство экспериментальных данных свидетельствует о том, что этанол стимулирует глюконеогенез [35, 38]. Известно, что в биосинтезе глицеролипидов принимает участие пул глицерин-3-фосфата, образованный в результате глюконеогенеза [7]. Глюкокортиконы, при посредстве которых реализуются действия этанола, также являются индукторами глюконеогенеза. Показано, что концентрация α -глицерофосфата является одним из основных факторов, лимитирующих синтез глицеролипидов [8, 26, 33]. Можно предположить, что стимулирующее действие этанола на синтез насыщенных жирных кислот триацилглицери-

дов связано отчасти с активацией глицеронеогенеза.

Известно, что лейцин подвергается катаболизму с образованием ацетоацетана и ацетил-КоА. В связи с этим представляет интерес сопоставление синтеза отдельных фракций липидов и их составных компонентов из ацетил-КоА, образованного из меченого лейцина и ацетата. Полученные результаты показали, что продукты расщепления лейцина — ацетил-КоА и ацетоацетат — используются преимущественно для синтеза фосфолипидов через глицерофосфатмоноацилглицериновый путь. Следовательно, использование ацетил-КоА, происходящего из лейцина, регулируется другими механизмами, чем использование ацетата. Это согласуется с данными работы [37], где указано, что меченый глицерин включается преимущественно в фосфолипиды легких через глицерофосфатный путь, тогда как при синтезе триацилглицеридов используется немеченый эндогенный глицерин. Установлено также, что для синтеза глицериновой части триацилглицеридов и фосфолипидов печени кормленных крыс лейцин используется более эффективно, чем ацетат. Эти данные позволили предположить, что в клетках печени существует компартментализация фондов ацетил-КоА, происходящих из разных предшественников [12, 17]. Далее показано, что компартментализация фондов ацетил-КоА имеет функциональный характер, так как этанол по-разному влияет на использование ацетил-КоА, происходящего из ацетата и лейцина. Этанол стимулирует биосинтез полпеновых жирных кислот триацилглицеридов из ацетата, тогда как при использовании меченого лейцина как предшественника их синтез ингибирован.

ЛИТЕРАТУРА

- Baroana E., Lieber C. S. — J. Lipid Res., 1979, vol. 20, p. 289—313.
- Blomstrand R., Kager L. — Life Sci., 1973, vol. 13, p. 113—123.
- Brindley D. N., Cooling J., Glenny H. P. et al. — Biochem. J., 1981, vol. 200, p. 275—281.
- Calderon P., Furnelle J., Christophe J. — Biochim. biophys. Acta, 1980, vol. 620, p. 387—399.
- Cederbaum A. J., Dicker E., Rubin E. — Arch. Biochem., 1977, vol. 183, p. 638—646.
- Cunningham C., Flus S., Bollenus R. E., Spatch P. I. — Biochim. biophys. Acta, 1982, vol. 712, p. 225—233.
- Curstedt T. — Ibid., vol. 713, p. 589—601.
- Declero P. E., Debeer L. J., Mannaerts G. P. — Biochem. J., 1982, vol. 202, p. 803—806.
- Dudley P. A., Anderson R. E. — Lipids, 1975, vol. 10, p. 589—601.
- Faas F. H., Carter W. J., Wynn L. O. — Arch. Biochem., 1977, vol. 226, p. 71—81.
- Folch J., Lees M., Stoane-Stanley G. H. — J. biol. Chem., 1957, vol. 226, p. 497—509.
- Fricke U. — Analyt. Biochem., 1975, vol. 63, p. 555—558.
- Goheen S. C., Larkin E. C., Rao G. A. — Lipids, 1983, vol. 18, p. 285—290.
- Goheen S. C., Pearson E. E., Larkin E. C., Rao G. A. — Ibid., 1981, v. 16, p. 43—51.
- Goldberg D. M., Roomi M. W., Yu A., Roncar D. A. K. — Biochem. J., 1980, vol. 192, p. 165—175.
- Greenspan M. D., Schroeder E. A., Yudkovitz J. B. — Biochim. biophys. Acta, 1982, vol. 710, p. 15—22.
- Guyon R. V., Kuo Y. J., Shanbour L. L. — Alcoholism, 1982, vol. 6, p. 469—474.
- Hernandez-Munoz R., Santamaria A., Garcia-Sainz A. J. et al. — Arch. Biochem., 1978, vol. 190, p. 155—162.
- Holmström B. — Arkiv Kemi, 1969, vol. 30, p. 333—345.
- Kasturi R., Joshi V. C. — J. biol. Chem., 1982, vol. 257, p. 1224—1230.
- Knox A. M., Sturton R. G., Cooling J., Brindley D. N. — Biochem. J., 1979, vol. 180, p. 441—443.
- Kondrup J., Lundquist F., Damgaard S. E. — Ibid., vol. 184, p. 83—88.
- Kondrup J., Grunnet N. — Ibid., 1973, vol. 132, p. 373—379.
- Lamb R. G., Wood C. K., Fallon H. J. — J. clin. Invest., 1979, vol. 63, p. 14—20.
- Lieber C. S., Spitz N. — Ibid., 1966, vol. 45, p. 1400—1411.
- MacDonald M. J., Grewe B. K. — Biochim. biophys. Acta, 1981, vol. 663, p. 302—313.
- Marsh J. B., Weingtein D. B. — J. Lipid Res., 1966, vol. 7, p. 574—576.
- Nervi A. M., Peluffo R. O., Brenner R. R., Lekin A. I. — Lipids, 1980, vol. 15, p. 263—268.
- Olivercrona T., Hernell O., Johnson O. et al. — Quart. J. Stud. Alcohol., 1972, vol. 33, p. 1—13.
- Savolainen M. J., Hassinen I. E. — Arch. Biochem., 1980, vol. 201, p. 640—645.
- Shakir K. M. M., Sanderman S. G., Margolis S. — J. Lipid Res., 1978, vol. 19, p. 433—442.
- Siess E. A., Brocks D. G., Wieland O. H. — Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 1978, Bd 359, S. 785—798.
- Smith S. B., Prior R. L. — Biochim. biophys. Acta, 1982, vol. 712, p. 640—645.
- Sturton R. G., Butterwith S. C., Burditt S. L., Brindley D. N. — FEBS Letters, 1981, vol. 126, p. 297—300.
- Sugano T., Shiota M., Khono H., Shimada M. — J. Biochem. (Tokyo), 1982, vol. 91, p. 1917—1929.
- Tapscott E. B., Dohm G. L. — J. Chromatogr., 1975, vol. 107, p. 420—422.
- Tombropoulos E. G., Hadley J. G. — Lipids, 1976, vol. 11, p. 491—497.
- Topping D. L., Clark D. G., Storer G. B. et al. — Biochem. J., 1979, vol. 184, p. 97—106.

Поступила 20.01.85

BIOSYNTHESIS OF MAIN COMPONENTS OF TRIACYLGLYCEROLS IN RAT LIVER TISSUE IN PRESENCE OF ETHANOL

V. N. Titov, D. G. Pitsin

All-Union Cardiological Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Content of triacylglycerols was increased in rat liver tissue after administration of ethanol. Independent studies of biosynthesis of fatty acid and glycerol components of glycerolipids exhibited that ^3H -leucine was mainly consumed in synthesis of glycerol moiety of phospholipids and triacylglycerols, whereas ^{14}C -acetate was utilized in synthesis of fatty acids. Ethanol activated most distinctly the synthesis of glycerol moiety as compared with the synthesis of triacylglycerol fatty acids. In rat liver tissue

ethanol caused an accumulation of unsaturated and monoenic fatty acids, while the ratio of arachidonic acid in phospholipids was decreased. Synthesis of triacylglycerol fatty acids was activated in presence of ethanol with simultaneous decrease in the rate of the label incorporation into linoleic and arachidonic acids; synthesis of fatty acids was stimulated *de novo* but the following elongation and desaturation of linoleic acid was inhibited. Ethanol activated more effectively esterification of fatty acids with formation of triacylglycerols as compared with phospholipids. Incorporation of the label into glycerol molecule occurred in response to activation of glycerol-glyconeogenesis by ethanol. Acetyl-CoA, derived from ^{14}C -acetate, was mainly used in synthesis of triacylglycerols, diacylglycerols, free cholesterol and its esters. Acetyl-CoA, produced from ^3H -leucine, was mostly common involved in synthesis of monoacylglycerols and phospholipids.

УДК 616-008.939.15+616.36-008.931:577.152.311]-02:615.9:661.723.64

А. В. Долгов, М. И. Душкин, А. В. Морозов, И. Ю. Морозова

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЛИПИДОВ ПЕЧЕНИ, ПЛАЗМЫ КРОВИ, АОРТЫ И АКТИВНОСТИ ХОЛЕСТЕРОЛЭСТЕРАЗ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ТЕТРАХЛОРМЕТАНА

Институт терапии СО АМН СССР, Новосибирск

Хорошо известно, что введение тетрахлорметана приводит к некрозу и жировой дистрофии печени животных и биохимически выражается в резком нарушении активности ферментов эндоплазматического ретикулаума, белок-синтезирующих систем и как следствие в нарушении синтеза липопротеидов и накоплении триглицеридов в печени [9, 10]. Ряд исследователей полагают, что основным повреждающим механизмом при действии яда является усиление процессов образования перекисей липидов в мембранах эндоплазматического ретикулаума [1]. Изменение метаболизма холестерина при прооксидантном действии CCl_4 мало изучено, хотя известно, что продукты перекисного окисления способны связываться с аминокгруппами белков и фосфолипидов [12], что может приводить к повреждению ферментных систем, и в том числе ферментов, участвующих в биотрансформации холестерина в клетках.

В метаболизме липопротеидов печень занимает центральное место, и нарушение ее функций при остром токсическом действии тетрахлорметана может вызывать существенные изменения в периферических тканях, которые

не подвергаются прямому действию яда.

Целью настоящей работы было изучение липидного спектра печени, аорты и сыворотки крови на фоне изменений активности лизосомальной и цитоплазматической холестеролэстераз (К.Ф.3.1.1.13) печени, относящихся к ключевым ферментам метаболизма холестерина.

Методика

Опыты проведены на 60 крысах-самцах линии Вистар массой тела 200—250 г. Проведено 3 серии экспериментов по 20 животных в серии. Животным вводили через зонд тетрахлорметан в дозе 0,5 мл на 100 г массы тела за 1,7 или 14 сут до забоя. Контрольным животным вводили эквивалентное количество физиологического раствора.

Раствор $[4\text{-C}^{14}]$ -холестерина (2 МБк) в 100 мл ацетона добавляли к 50 мл линофундина 20 (Финляндия). Смесь инкубировали в водяной бане при 37°C под током азота при непрерывном встряхивании до исчезновения запаха ацетона и вводили животным через зонд в дозе 0,5 мл на 100 г массы тела за сутки до забоя.

Крыс декапитировали, печень перфузировали через переднюю полую вену холодным физиологическим раствором. Аорту очищали от жира и адвентиции и нарезали в криостате при -20°C на микротоме (толщина среза 10 мкм).

Ткань печени гомогенизировали в пятикратном объеме 0,25 М раствора сахарозы (1 мМ

Содержание липидов в печени, сыворотке крови и аорте крысы через 24 ч после воздействия тетрахлорметана

Класс липидов	Печень, мкг на 1 мг белка		Сыворотка, мг на 100 мл		Аорта, мкг на 1 мг белка	
	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль
Холестерин	1,65±0,14	1,38±0,11	32,1±2,41	15,1±1,44	1,96±0,12*	1,62±0,14
Эфиры холестерина	2,67±0,24	1,16±0,17	34,2±3,05	48,4±3,76	1,93±0,16	1,01±0,12
Фосфолипиды	24,5±2,04	16,4±1,23	158±16,6	67,6±8,26	2,18±0,20*	2,16±0,12
Триглицериды	7,00±0,53	1,52±0,21	17,2±1,25	30,4±3,07	4,15±0,36	2,14±0,26
НЭЖК	—	—	35,4±4,28	16,7±1,53	—	—

Примечание. НЭЖК—неэстерифицированные жирные кислоты. Все опытные значения, кроме обозначенных звездочкой, статистически достоверно отличаются от контроля ($P<0,05$). Количество животных контрольной группы—10, опытных—9.

ЭДТА, 5 мМ трис-НСI, pH 7,4). Активность холестеролэстераз в гомогенате определяли после 10-кратного замораживания и оттаивания (-20°C , 20°C). Гомогенат центрифугировали при 20 000 g 30 мин и из надосадочной фракции экстрагировали радиоактивный холестерин и его эфиры по методу Folch и соавт. [6].

Для определения содержания липидов ткань печени и аорты гомогенизировали в 5-кратном объеме 0,1 М фосфатного буфера pH 8,6 с 0,4 мМ таурохолат натрия. Липиды экстрагировали, как указано выше [6], и разделяли на классы методом тонкослойной хроматографии [2]. Количественное определение основных классов липидов осуществляли спектрофотометрически после сжигания в серной кислоте [7].

Активность кислой (лизосомальной) и нейтральной (цитоплазматической) холестеролэстераз определяли описанным методом [5], используя 0,2 М буферы — цитратфосфатный pH 4,2 и трис-НСI pH 8,1. В качестве субстрата использовали холестерол [1-C^{14}]-олеат холестерина («Amersham»); 58,0 мКи/ммоль, включенный в липосомы, содержащие лецитин («Calbiochem») и холестеринолеат в молярном соотношении 66 : 1. Радиоактивность подсчитывали на жидкостном сцинтилляционном счетчике в диоксановом сцинтилляторе. Активность ферментов выражали в наномолях гидролизованного холе-

стеринолеата за час на 1 мг белка. Белок определяли методом Лоури [8].

Все полученные результаты обработаны статистически с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Известно, что CCl_4 вызывает значительные нарушения различных метаболических систем в печени [9, 10]. Нарушение белкового синтеза приводит к дефекту сборки и секреции липопротеидов очень низкой плотности, результатом чего является рост уровня триглицеридов в 4,5 раза и фосфолипидов в 1,5 раза по сравнению с контролем (табл. 1). Этим, по-видимому, можно также частично объяснить накопление эфиров холестерина в пораженной печени (см. табл. 1). Однако характер распределения радиоактивной метки в надосадочной фракции (20 000 g 30 мин) свидетельствует о снижении в 1,5 раза доли эфиров холестерина в цитоплазме гепатоцитов экспериментальных животных (табл. 2). Следовательно, основная часть эфиров холестерина сосредоточена в лизосомах, функционирование которых значительно нарушается при воздействии яда. Об этом свидетельствует корреляция между увеличением содержания эфиров холестерина и снижением удельной активности кислой холестеролэстеразы в 2,5 раза через 24 ч после введения тетрахлорметана. Ранее было показано нарушение протеолиза бычьего сывороточного альбумина, меченного C^{14} , у крыс на 2-е сутки после введения CCl_4 [3].

Снижение доли меченых эфиров холестерина в цитозоле клеток печени связано, вероятно, с уменьшением активности ацил-КоА-холестерин-0-ацил-

Таблица 2

Включение C^{14} -холестерина в его эфиры в надосадочной фракции гомогената печени (20 000 g, 30 мин) после воздействия CCl_4 (в % от общего радиоактивного холестерина)

Группа животных	Без инкубации	Инкубация в течение 2 ч при 37°C
1-я	30,0±2,19 (11)	62,5±4,15 (11)
2-я	19,2±3,10* (12)	30,6±6,50* (12)
3-я	26,4±4,92 (9)	48,2±5,70 (9)
4-я	29,2±3,43 (8)	53,6±5,70 (8)

Примечание. Здесь и в табл. 3 в скобках обозначено количество животных; звездочкой отмечены величины, достоверно отличающиеся от контроля ($P<0,05$). 1-я группа—контрольная, 2-я—на 1-е сутки после воздействия CCl_4 , 3-я—на 7-е сутки, 4-я—на 14-е сутки.

трансферазы, которое может возникнуть в результате разобщения дыхания и окислительного фосфорилирования в митохондриях и снижения уровня АТФ в клетках [4]. Это подтверждается уменьшением включения меченого холестерина в его эфиры в течение 2-часовой инкубации надосадочной фракции (20 000 g, 30 мин) при 37 °С по сравнению с контролем (см. табл. 2).

Активность нейтральной (цитоплазматической) холестеролэстеразы через сутки после введения CCl_4 не претерпевает существенных изменений. На 7-е и 14-е сутки активность холестеролэстераз печени (табл. 3) и распределение меченого холестерина (см. табл. 2) возвращаются в результате восстановительных процессов к контрольному уровню.

Изменение липидного спектра (см. табл. 1) в сыворотке крови и аорте является подтверждением взаимосвязи липидного обмена в печени и аорте, осуществляемой через липопротеиды сыворотки крови. После введения CCl_4 в сыворотке наблюдается повышение содержания холестерина в 2,1 раза, снижение концентрации эфиров холестерина в 1,4 раза и триглицеридов в 1,7 раза по сравнению с контролем.

Если в сыворотке крови intactных животных отношение эфиры холестерина/холестерин составляет 3,2, то при интоксикации CCl_4 оно приближается к единице. Вероятно, это связано со значительным снижением активности лецитинхолестеринацилтрансферазы в результате нарушения синтеза фермента в печени.

Аорта не подвергается непосредственному действию токсического агента, поэтому наблюдаемое увеличение содержания в ней триглицеридов и эфиров холестерина в 1,9 раза (см. табл. 1), вероятно, обусловлено дефицитом функционально полноценных липопротеидов высокой плотности, предназначенных для переноса свободного холестерина из тканей. Обращает на себя внимание тот факт, что накопление эфиров холестерина происходит на фоне даже несколько увеличенной гидролитической активности нейтральной холестеролэстеразы аорты (повышение от $72,18 \pm 4,7$ до $146,0 \pm 10,0$ нмоль/ч/мк белка), которая в отличие от мембраносвязанных ферментов, по-видимому, не подвергается

Таблица 3
Холестеролэстеразная активность печени крысы после введения CCl_4 , нмоль на 1 мг белка

Группа животных	Активность кислой холестеролэстеразы	Активность нейтральной холестеролэстеразы
1-я	$53,4 \pm 4,0$ (14)	$25,1 \pm 1,8$ (13)
2-я	$20,8 \pm 3,16^*$ (12)	$20,8 \pm 2,87$ (12)
3-я	$67,8 \pm 10,2$ (10)	$21,9 \pm 1,97$ (8)
4-я	$66,1 \pm 6,45^*$ (9)	$18,8 \pm 2,69$ (8)

атаке продуктами перекисного окисления.

Таким образом, острая интоксикация тетрахлорметаном вызывает резкие изменения в липидном спектре печени, сыворотки крови и аорты и сопровождается изменением активности кислой холестеролэстеразы и ацил-КоА-холестерин-0-ацилтрансферазы в печени. Нарушение функционирования этих ферментов может быть вызвано прямым действием продуктов перекисного окисления, которое резко усиливается под влиянием тетрахлорметана. Известно, что малоновый диальдегид — продукт перекисного окисления липидов участвует в образовании комплексов типа шиффовых оснований с аминокеттогруппами белков и липидов [12]. Возможно, что образование таких комплексов, а также окисление сульфгидрильных групп ферментов может приводить к значительному снижению ферментативной активности. Это предположение нуждается в экспериментальной проверке.

В результате проведенного исследования получено экспериментальное подтверждение взаимосвязи липидного обмена в печени и аорте, опосредуемого липопротеидами сыворотки крови. Это подтверждает предположение, что печень, кровь и аорту можно рассматривать как единую систему, и позволяет предположить, что при токсических поражениях печени, обусловленных усилением образования перекисей липидов, в аорте могут развиваться процессы, приводящие к накоплению эфиров холестерина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972, с. 193—206.
2. Кейтс М. Техника липидологии. Пер. с англ. М., 1975, с. 221.

3. Короленко Т. А., Пупышев А. Б., Малыгин А. Е. — Бюл. exper. биол., 1980, № 12, с. 686—688.
4. Фрундер Х. — Вopr. мед. химии, 1968, № 2, с. 130—141.
5. Brecher P., Chobanian J., Small D. M., Chobanian A. V. — J. Lipid Res., 1976, vol. 17, p. 239—247.
6. Folch J. B., Lees M., Stanley G. H. — J. biol. Chem., 1957, vol. 266, p. 497—509.
7. Marsh J. B., Weinstein D. B. — J. Lipid Res., 1966, vol. 7, p. 574—576.
8. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. — J. biol. Chem., 1951, vol. 193, p. 265—275.
9. Reynolds E. S. — Fed. Proc., 1965, vol. 24, p. 166.
10. Ruhnagel R. O. — Pharmacol. Rev., 1967, vol. 19, p. 145.
11. Stein Y., Friedman G., Stein O. — In: Atherosclerosis Reviews / Ed. A. Gotto, R. Paoletti. New York, 1978, vol. 3, p. 97—108.
12. Tappel A. L. — In: Pathology of Cell Membranes. New York, 1975, vol. 1, p. 145—170.

Поступила 10.01.85

EFFECT OF CCL₄ ON LIPID COMPOSITION IN RAT LIVER TISSUE, BLOOD AND AORTA AS WELL AS ON ACTIVITY OF CHOLESTEROL ESTERASE IN RAT LIVER TISSUE

A. V. Dolgov, M. I. Dushkin, A. V. Morozov, I. Yu. Morozova

Institute of Therapy, Siberian Branch of the Academy of Medical Sciences of the USSR, Novosibirsk

Content of cholesterol esters was increased 2.3-fold, triglycerides — 4.7-fold, phospholipids — 1.5-fold in liver tissue of CCL₄-treated rats. The increase in the content of cholesterol esters and triglycerides correlated with a decrease in activity of lysosomal cholesterol esterase from liver tissue. After CCL₄ intoxication content of free cholesterol was decreased 2.1-fold, free fatty acids — 2-fold, phospholipids — 2.3-fold, triglycerides — 1.75-fold in blood. In aorta an increase in content of cholesterol esters and triglycerides was found to be 2-fold as well as activation of the cytosolic cholesterol esterase was noted. The data obtained suggest that intoxication with CCL₄ affected the accumulation of cholesterol esters in the arterial wall.

УДК 615.276.015.42:612.352.3:577.113

Ц. М. Шерешевская, А. И. Божков, А. И. Скляр, В. Г. Шахбазов

ВЛИЯНИЕ НОВОГО ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРЕПАРАТА ХЛОТАЗОЛА НА НУКЛЕИНОВЫЙ ОБМЕН В КЛЕТКАХ ПЕЧЕНИ КРЫС

Кафедра генетики и цитологии и отдел генетики Харьковского университета

Воспалительные реакции имеют важное значение в патогенезе многих заболеваний. К так называемым медиаторам воспаления относят некоторые биогенные амины, полипептиды, нуклеиновые кислоты и продукты их распада [4, 5, 7]. При ревматизме отмечено снижение активности рибонуклеазы и увеличение содержания РНК в плазме крови и клетках печени [6, 12]. Противовоспалительные средства, которые должны воздействовать на метаболизм нуклеиновых кислот, не всегда достаточно эффективны и часто весьма токсичны [9].

Новый противовоспалительный препарат нестероидной природы хлотазол [3] в отличие от ацетилсалициловой кислоты, индометацина и других нестероидных противовоспалительных средств не оказывает повреждающего влияния на желудочно-кишечный тракт и не вызывает побочных явлений [16].

Вопрос о влиянии противовоспалительных средств на метаболизм тканей здорового организма изучен мало [8,

15]. Особенно важны исследования возможного воздействия новых лекарственных средств на генетический аппарат тканей здорового организма: на процессы редупликации, транскрипции и трансляции [8].

Целью настоящей работы было изучение влияния хлотазола на активность ферментов нуклеинового обмена, скорость синтеза ДНК, РНК и транспорт РНК из ядер в цитоплазму в клетках печени крыс Вистар.

Методика

Опыты проводили на крысах Вистар 3—5-месячного возраста. Хлотазол вводили интубирующе в дозе 5 или 10 мг на 100 г массы тела в 25 % растворе этилового спирта. Животных забивали спустя 0,5, 2 и 3 ч после введения хлотазола; за 30 мин до забоя животным вводили интубирующе ³H-тимидин (80 мкКи на 100 г массы тела) или ¹⁴C-оротовую кислоту (25 мкКи на 100 г массы тела). Ядра выделяли по методу [18], а РНК и ДНК из ядер — по методу [14]. Количество ДНК и РНК рассчитывали, как указано ранее [13]. Радиоактивность фракций ДНК и РНК измеряли на сцинтилляционном счетчике СБС-2 и выражали в

импульсах на 1 мг ДНК или РНК за 1 мин.

Определение скорости транспорта РНК из ядра в цитоплазму. К постядерной фракции прибавляли 42 % HClO_4 (конечная концентрация 5 %). Пробы выдерживали 15 мин при 0 °С и 10 мин центрифугировали при 1000 g. После троекратной отмывки кислоторастворимой фракции к осадку добавляли 2 мл 0,3 н. КОН и проводили щелочной гидролиз РНК цитоплазмы при 37 °С в течение 60 мин. После гидролиза к охлажденным пробам добавляли холодный раствор 42 % HClO_4 (конечная концентрация 5 %) и центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин. В надосадочной жидкости определяли РНК [13]; удельную радиоактивность измеряли на СБС-2.

Определение РНК-полимеразной активности ядер. Влияние хлотазола на РНК-полимеразную активность ядер изучали *in vitro*. Одной группе животных вводили хлотазол в дозе 5 мг на 100 г массы тела, другой — 10 мг на 100 г массы тела. Животных декапитировали через 2 и 24 ч после введения препарата. Ядра выделяли из тканей печени, как описано в работе [2], и ресуспендировали в 20 % растворе глицерина, приготовленного на реактиве А (20 мМ трис- HCl буфер рН 7,6, 25 мМ KCl , 3 мМ $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ и 1,5 мМ β -меркаптоэтанол). 0,2 мл суспензии ядер (концентрация ДНК 180—210 мкг) перенесли в инкубационную смесь (3 мМ MgCl_2 , 800 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 мМ АТФ, 0,1 мМ ЦТФ и 5 мкКи ^3H -УТФ). Инкубацию проводили при 37 °С в течение 20 мин. Реакцию останавливали резким охлаждением пробы и добавлением 3 мл холодного 10 % раствора трихлоруксусной кислоты. Пробы осаждали и промывали на миллипоровых фильтрах. Радиоактивность осадков измеряли на сцинтилляционной установке СБС-2 и выражали в импульсах на 1 мг ДНК в 1 мин. Концентрацию ДНК определяли по методу [1]. Об активности РНК-полимераз судили по включению ^3H -УТФ в РНК.

Определение активности кислой и щелочной РНКаз. Активность РНКаз определяли, как описано в работе [17], инкубируя пробы в течение 2 ч при рН 5,6 и 7,8 при 37 °С. Негидролизованную РНК осаждали 0,25 % раствором уранилacetата, приготовленного на 2,5 % растворе хлорной кислоты. Оптическую плотность надосадочной жидкости измеряли при 260 нм на СФ-4А. Активность ферментов выражали в процентах оптической плотности (A_{260}) опытного образца оптической плотности (A_{260}) контроля. Полученные данные обрабатывали статистически по методу Стьюдента — Фишера.

Результаты и обсуждение

Для характеристики лекарственных препаратов важны сведения об их влиянии на ткани здорового организма. Введение крысам хлотазола в дозах 10 мг на 100 г массы тела (10—20 раз больше терапевтической) не приводило через 0,5, 2 или 3 ч после момента введения к изменению статистически удельной радиоактивности ДНК или РНК по сравнению с контролем ($22\,279 \pm 2398$ или $164\,040 \pm 27\,465$ имп/мин/мг соответственно). Эти данные позволяют заключить, что

Активность РНК-полимеразы (удельная радиоактивность РНК в имп/мин/мг) в изолированных ядрах печени крыс в норме и после введения хлотазола

Доза хлотазола, мг на 100 г массы тела	Время после введения, ч	Активность фермента	P (по сравнению с контролем)
5	2	$19\,549 \pm 745$	$<0,01$
5	24	$18\,223 \pm 709$	$<0,01$
10	2	$15\,396 \pm 742$	$<0,001$
10	24	$22\,238 \pm 850$	$<0,05$
Контроль	2	$25\,838 \pm 1469$	
	24	$25\,748 \pm 1242$	

хлотазол не оказывает влияния на скорость биосинтеза ДНК или РНК в клетках печени здоровых крыс.

Исследование влияния хлотазола на активность РНК-полимеразы в ядрах *in vitro* показало, что через 2 ч после введения препарата активность фермента статистически достоверно снижалась у животных, получавших хлотазол в дозах 5 и 10 мг на 100 г массы тела по сравнению с таковой контрольных животных; степень снижения активности РНК-полимеразы коррелировала с дозой вводимого препарата (см. таблицу). Через 24 ч после введения хлотазола животным наблюдалась обратная зависимость между величиной вводимой дозы и снижением уровня активности РНК-полимеразы. Можно предположить, что хлотазол несколько угнетает скорость синтеза РНК в ядрах клеток печени у здоровых животных.

При воспалительных процессах (в частности, при ревматизме и ревматоидном артрите) было отмечено повышенное содержание РНК в крови и тканях организма. В связи с этим одним из механизмов противовоспалительного действия хлотазола может быть некоторое угнетение скорости синтеза РНК, которые являются медиаторами воспаления.

При изучении воздействия на метаболизм РНК хлотазола представляло интерес выяснить, влияет ли этот препарат на скорость распада РНК. С этой целью исследовали влияние хлотазола на активность кислой и щелочной РНКаз в клетках печени. Животным вводили хлотазол в дозах 5 и 10 мг на 100 г массы тела и спустя 2 и 24 ч после введения препарата животных декапитировали. Обнаруже-

но, что хлотазол не приводит к значительным изменениям активности кислот и щелочной РНКаз в клетках печени здоровых крыс по сравнению с нормой ($131 \pm 5,7$ и $140 \pm 4,2$ соответственно).

Известно, что около 10 % вновь синтезированной РНК транспортируется в цитоплазму, остальная часть РНК распадается в ядре [1]. Хлотазол может привести к угнетению синтеза РНК, транспортируемых в цитоплазму и несущих информацию для синтеза белков, или повлиять на РНК, распадающиеся в ядре и, очевидно, выполняющие регуляторную функцию в клетке. Для того чтобы ответить на поставленный вопрос, мы изучали влияние хлотазола на скорость транспорта РНК из ядра в цитоплазму в клетках печени крыс. О скорости транспорта РНК судили по количеству обнаруживаемой вновь синтезируемой РНК в цитоплазме. Установлено, что хлотазол во все сроки после введения не оказывал влияния на скорость транспорта РНК из ядра в цитоплазму в клетках печени крыс.

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что новое противовоспалительное средство хлотазол в нормальных клетках печени не оказывал заметного влияния на скорость синтеза ДНК, но вызывал угнетения скорости синтеза РНК в ядрах *in vitro*.

При воспалительных процессах наблюдается увеличение содержания РНК, и, возможно, противовоспалительное действие хлотазола связано с угнетением процесса синтеза РНК. Отсутствие влияния хлотазола на ферментативную активность РНКаз и скорость транспорта РНК из ядра в цитоплазму позволяет предположить, что этот препарат влияет на скорость синтеза РНК, действуя на РНК-полимеразы ядер клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Георгиев Г. П. — В кн.: Химия и биохимия нуклеиновых кислот. Л., 1968, с. 74—120.
2. Джохадзе Д. И. Биохимические особенности клеточных ядер различных тканей. Тбилиси, 1977.
3. Дольберг Е. Б., Ясницкий Б. Г., Ведюкова А. И. и др. — Открытия, 1979, № 4, с. 19.

4. Зборовский А. Б., Школьников В. А. — Врач. дело, 1966, № 11, с. 4—7.
5. Зборовский А. Б., Чернышевский Е. П. — Вопр. ревмат., 1972, № 2, с. 19—23.
6. Кин Б. С. — В кн.: Актуальные проблемы ревматологии. Волгоград, 1972, вып. 4, с. 125—127.
7. Кумиев М. Е. — Вопр. ревмат., 1963, № 4, с. 39—45.
8. Курлов О. В., Койфман Э. К., Гольдбер Е. Д. — Антибиотики, 1978, № 6, с. 537—540.
9. Муратов В. К. — Сов. мед., 1972, № 9, с. 57—64.
10. Остерман Л. А. — В кн.: Ультрамикроанализ нуклеиновых кислот. М., 1973, с. 55—76.
11. Покрышкин В. И. — Нов. лекарств. препараты (Экспресс-информ. ВНИИМИ), 1982, № 3, с. 22—24.
12. Пташек Р. С. — Вопр. ревмат., 1976, № 4, с. 538—541.
13. Спирин А. С. — Биохимия, 1958, т. 23, № 4, с. 656—662.
14. Трудюлюбова М. Г. — В кн.: Современные методы в биохимии. М., 1977, с. 313—316.
15. Фармакология. Химотерапевтические средства. Токсикология. Проблемы фармакологии. М., 1973, т. 4, с. 10—68.
16. Хаджай Я. И., Оболенцева Г. В. — В кн.: Всесоюзный съезд геронтологов и гериатров. 4-й. Тезисы докладов. Киев, 1982, с. 7.
17. Шапот В. С., Чудинова В. А., Кречетова Р. Д. — В кн.: Современные методы в биохимии. М., 1964, т. 1, с. 267—281.
18. Blobel G., Potter V. R. — Biochim. biophys. Acta, 1968, vol. 166, p. 48—57.

Поступила 15.01.85

EFFECT OF A NEW ANTIINFLAMMATORY PREPARATION CHLOTOZOL ON METABOLISM OF NUCLEIC ACIDS IN RAT LIVER CELLS

T. M. Shereshevskaya, A. I. Bozhkov,
A. I. Sklyar, V. G. Shakhbazov

Chair of Genetics and Cytology, Department of Genetics, A. M. Gorki State University, Kharkov

Effects of a new antiinflammatory preparation chlotozol on the activity of enzymes participating in metabolism of nucleic acids, on rates of DNA and RNA synthesis and on the transport of RNA from nuclei into cytoplasm were studied in liver cells of Wistar rats. Administration of chlotozol did not distinctly affect the rate of DNA synthesis, the RNAase activity, the rate of RNA transport from nuclei into cytoplasm. Chlotozol caused a decrease of the RNA polymerase activity in nuclei *in vitro*. Thus, chlotozol did not exhibit negative effects on reduplication and transport of RNA from nuclei into cytoplasm in liver cells of intact animals. Inhibitory effect of chlotozol on the RNA-polymerase activity appears to be one of mechanisms responsible for regulation of transcription.

Г. А. Орликов, Г. А. Афанасьева, А. А. Агаджанов

ИНСУЛИН В ЖЕЛУДОЧНОМ СОКЕ ЧЕЛОВЕКА

Рижский медицинский институт

Биологическое значение инсулина в процессах метаболизма хорошо известно. Инсулинчувствительные рецепторы обнаружены во многих тканях [2—4]. Содержание инсулина исследовалось как в сыворотке крови, так и в желчи, моче, спинномозговой жидкости, лимфе, гомогенатах тканей [1, 5, 7]. При язве двенадцатиперстной кишки у ряда больных обнаружена гиперинсулинемия, обусловленная, по мнению ряда авторов, вагусной гиперстимуляцией [6].

В желудочном соке инсулин до сих пор не определяли. Между тем его исследование в желудочном содержимом представляет известный теоретический и клинический интерес, так как процессы гликолиза, регулируемые инсулином, могут являться источником водородных ионов при синтезе соляной кислоты в слизистой оболочке желудка.

Методика

Исследования проведены у 6 здоровых и 10 больных язвой двенадцатиперстной кишки. Желудочную секрецию изучали с помощью внутрижелудочной pH-метрии с использованием двух-электродного pH-зонда, имеющего дополнительный канал для аспирации желудочного содержимого. Положение зонда контролировали рентгенологически так, чтобы верхний электрод находился в фундальном, а нижний — в антральном отделе желудка. Исследования проводили утром натощак не менее чем через 12 ч после последнего приема пищи и медикаментов. Перед введением зонда у исследуемых брали пробы венозной крови для определения содержания инсулина в сыворотке.

Диагноз язвы двенадцатиперстной кишки подтверждался гастроскопией. При исследовании желудочной секреции учитывали объем часового базального секрета, через каждые 15 мин проводили замеры фундального и антрального pH. Секрецию соляной кислоты исследовали титриметрически с использованием фенолового красного и выражали в экв/ч.

Аспирацию желудочного сока производили вручную. Положение исследуемого — лежа на боку.

Спустя час здоровым вводили подкожно 0,1 % раствор солянокислого гистамина из расчета 0,1 мл на 10 кг массы (простой гистаминовый тест), больным дуоденальной язвой вводили подкожно 1 мл 0,1 % раствора сернокислого атропина (атропиновый тест по Н. А. Скуя и А. Я. Данилани).

У 4 больных с дуоденальной язвой через 3—5 дней проводили повторное исследование секреции желудка, причем с использованием гистамина по методике для здоровых.

После введения гистамина или атропина собирали желудочный сок в течение второго часа и проводили замеры фундального и антрального внутрижелудочного pH. Определяли объем желудочного сока и дебит HCl.

Желудочный сок собирали и фильтровали в ледяную баню, нейтрализовали 0,1 н. NaOH до pH 7—8 и замораживали при -10 — -12 °C.

Инсулин в желудочном соке и сыворотке крови определяли радиоиммунологическим способом с использованием набора фирмы СЕА—Sorin (Франция). Нейтрализация желудочного сока немедленно после взятия его оказалась необходимой, так как в кислой среде (pH желудочного сока от 1,8 до 2,2) содержание инсулина было ниже (табл. 1; $P < 0,05$; критерий Вилкоксона).

Результаты и обсуждение

Из табл. 2 видно, что концентрация инсулина в желудочном соке здоровых в 3 раза превышает таковую в сыворотке крови. При язве двенадцатиперстной кишки это соотношение еще выше (табл. 3).

Базальный часовой дебит инсулина достигает больших цифр, причем при дуоденальной язве он в 3 раза выше, чем в норме (см. табл. 2).

Разница в концентрации инсулина в базальном желудочном соке у здоровых и больных дуоденальной язвой незначительна. Это относится и к сыворотке крови (см. табл. 2). Как у здоровых, так и у больных дуоденальной язвой обнаружена положительная корреляция между базальным дебитом

Таблица 1

Содержание инсулина в необработанном и нейтрализованном желудочном соке

Образец со- ка	Необработанный сок		Нейтрализованный сок	
	pH	инсулин, мкед/мл	pH	инсулин, мкед/мл
№ 1	2,0	72	7,5	100
№ 2	2,2	22	7,0	33
№ 3	2,0	36	8,0	26
№ 4	2,0	3	7,0	94
№ 5	1,8	18	7,5	40
№ 6	2,0	100	7,0	55
№ 7	2,0	21	8,0	40

При статистической обработке использовали критерий Стьюдента и непараметрический критерий Вилкоксона для сопряженных пар.

Таблица 2

Параметры желудочной секреции и содержание инсулина в желудочном соке в сыворотке крови у здоровых

Обследованный	Возраст, годы	Пол	Базальные показатели				После подкожного введения гистамина				Концентрация инсулина в сыворотке крови, мкед/мл
			фундальный рН, ед. рН	часовой дебит НСІ, мэкв/ч	концентрация инсулина в желудочном соке, мкед/мл	часовой дебит инсулина, мкед/ч	фундальный рН, ед. рН	часовой дебит НСІ, мэкв/ч	концентрация инсулина в желудочном соке, мкед/мл	часовой дебит инсулина, мкед/ч	
Ц.	55	М	2,5	0,900	33	1650	1,9	3,08	26	1820	10
Р.	26	М	3,3	0,332	72	1656	2,1	1,78	56	1568	40
А.	47	Ж	3,1	0,844	43	2130	1,5	2,86	48	3240	12
Т.	36	Ж	2,4	1,480	58	2016	1,8	2,32	39	2240	14
Қ.	27	М	4,2	1,664	30	1240	1,4	3,56	38	2810	12
С.	38	М	1,6	0,572	68	3120	2,1	1,88	60	3320	16
$M \pm m$			$2,84 \pm 0,36$	$1,14 \pm 0,17$	$50,6 \pm 7,4$	1969 ± 264	$1,8 \pm 0,11$	$2,58 \pm 0,34$ $P < 0,05$	$44,5 \pm 5,16$	2499 ± 300	$17,3 \pm 4,6$

Примечание. P —сравнение с базальным уровнем.

Таблица 3

Параметры желудочной секреции и содержание инсулина в желудочном соке и сыворотке крови у больных дуоденальной язвой

Больной	Возраст, годы	Пол	Базальные показатели				После введения атропина				Концентрация инсулина в сыворотке крови, мкед/мл
			фундальный рН, ед. рН	часовой дебит НСІ, мэкв/ч	концентрация инсулина в желудочном соке, мкед/мл	часовой дебит инсулина, мкед/ч	фундальный рН, ед. рН	часовой дебит НСІ, мэкв/ч	концентрация инсулина в желудочном соке, мкед/мл	часовой дебит инсулина в желудочном соке, мкед/ч	
С.*	46	М	1,3	1,99	100	3500	1,85	2,19	64	2240	30
М.	43	М	1,7	2,12	68	5120	2,00	0,73	20	420	8
А.*	41	Ж	1,7	1,8	94	5640	2,75	1,17	40	1880	31
Г.	38	М	1,4	11,6	36	4716	1,70	3,87	36	1800	10
Р.*	33	М	1,6	7,7	27	3105	2,35	2,97	43	2580	30
Я.*	31	М	1,8	3,97	63	6000	4,6	1,45	62	3100	29
Ш.	52	М	1,3	2,2	55	3025	2,7	0,675	40	1674	8
Ю.	24	М	1,2	3,94	124	8432	1,6	1,624	58	1624	32
Ф.	58	М	2,0	4,03	53	2226	2,6	0,825	24	360	30
Б.	55	М	1,6	6,87	38	7250	1,8	2,19	33	1188	6
$M \pm m$			$1,55 \pm 0,08$ $P_1 < 0,05$	$4,62 \pm 1,0$ $P_2 < 0,05$	$65,1 \pm 6,2$ $P_1 < 0,05$	4901 ± 612 $P_1 < 0,05$	$2,4 \pm 0,28$ $P_2 < 0,05$	$1,76 \pm 0,33$	$42 \pm 3,4$ $P_2 < 0,05$	1686 ± 212 $P_2 < 0,05$	$21,4 \pm 3,7$

Примечание. У больных, отмеченных звездочкой, желудочную секрецию исследовали повторно с использованием в качестве раздражителя 0,1% раствора гистамина; P_1 —сравнение со здоровыми; P_2 —сравнение с базальным уровнем.

HCl и концентрацией инсулина в желудочном соке (соответственно $r_1 = +0,625$; $r_2 = +0,676$). Не обнаружено корреляции между базальным дебитом HCl и базальным дебитом инсулина ни у здоровых, ни у больных.

Отсутствовала корреляция между концентрацией инсулина в желудочном соке и в сыворотке крови как у здоровых ($r = +0,376$), так и у больных ($r = +0,167$). Корреляции между базальным pH и концентрацией инсулина, а также базальным его дебитом не отмечено.

После введения гистамина концентрация инсулина в желудочном соке существенно не изменялась, часовой дебит несколько повышался, однако несущественно.

Из табл. 3 также видно, что закономерная связь между желудочным pH, часовым дебитом HCl и концентрацией инсулина в соке отсутствовала.

Проведенное у больных дуоденальной язвой (больные С., А., Р., Я.) дополнительное исследование с использованием гистамина выявило в общем ту же тенденцию. Базальная концентрация инсулина в желудочном соке у этих больных составила соответственно 44, 78, 58 и 38 мкед/мл, а после стимуляции гистамином 56, 38, 102 и 32 мкед/мл, т. е. закономерных изменений концентрации инсулина в желудочном соке под влиянием гистамина отмечено не было. В то же время у всех 4 пациентов часовой дебит HCl, равнявшийся в базальном соке соответственно 3,4, 2,2, 8,8 и 3,8 мэкв/ч, после стимуляции гистамином значительно возрос (соответственно до 9,0, 6,8, 14,1 и 8,3 мэкв/ч); часовой дебит инсулина при этом увеличился в значительно меньшей степени (в среднем с 3180 ± 694 до 4112 ± 718 мкед/ч), причем это увеличение было статистически недостоверным ($P > 0,05$).

Прим атропина (см. табл. 2) уменьшал как концентрацию, так и часовой дебит инсулина, причем это сопровождалось параллельным повышением внутрижелудочного pH и снижением дебита HCl.

Сам факт обнаружения инсулина в желудочном соке в количествах, значительно превышающих таковые в сыворотке крови, представляет несомненный интерес, хотя объяснение этого факта сопряжено с определенными трудностями. В настоящее время неясно,

какую роль играет освобождающийся с желудочным соком инсулин. Наиболее естественным представляется предположение о возможной роли инсулина как инициатора гликолиза в стимуляции процессов энергообразования, направленных на покрытие значительных энергетических затрат, связанных с синтезом и секрецией HCl.

С этим предположением согласуются полученные нами данные об увеличении содержания инсулина в базальном желудочном содержимом у больных язвой двенадцатиперстной кишки по сравнению с таковым у здоровых.

То обстоятельство, что гистамин существенно не увеличивает содержание инсулина в желудочном соке, находится в соответствии с популярной в настоящее время концепцией о роли гистамина как конечного медиатора паритетальных желез. В то же время тот факт, что атропин снижает выделение инсулина с желудочным соком, свидетельствует в пользу участия инсулина в качестве посредника вагусной стимуляции. В этой связи представляет интерес изучение изменений секреции инсулина после ваготомии.

Возможно, что даже в условиях ваготомированного желудка инсулин оказывает прямое воздействие на паритетальные клетки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бажанов Б. Т. — Сборник науч. трудов Киргиз. мед. ин-та, 1975, т. 105, с. 105—107.
2. Ефимов А. С., Безродный Ю. В., Евдокимова И. Ю. и др. — *Вопр. мед. химии*, 1981, № 5, с. 644—647.
3. Левицкая З. И., Балаболкин М. И. — *Пробл. эндокринологии*, 1981, № 6, с. 83—87.
4. Моренкова С. А., Карелин А. А. — *Бюл. экспер. биол.*, 1980, № 11, с. 557—559.
5. Пронина Т. С., Сапронова А. Я. — В кн.: *Физиология и биохимия онтогенеза*. Л., 1977, с. 160—162.
6. Шварц В. Я., Фролков В. К., Саакян А. Г., Кузнецов Б. Г. — *Тер. арх.*, 1981, № 10, с. 61—65.
7. Daniel P. M., Henderson J. R. — *Lancet*, 1967, vol. 1, p. 1256—1257.
8. Novrankova J., Roth J., Brawnstein M. — *Nature*, 1978, vol. 272, p. 827—829.
9. Hollander F. — *J. biol. Chem.*, 1932, vol. 97, p. 585—604.
10. Dawenport H. W., Fischer R. B. — *Amer. J. Physiol.*, 1940—1941, vol. 135, p. 165—173.
11. Jordan P. H., Condon R. E. — *Ann. Surg.*, 1970, vol. 172, p. 547—563.
12. Smith I. S., Gillespie G., Elder I. B. et al. — *Gastroenterology*, 1972, vol. 62, p. 912—917.

G. A. Orlikov, G. A. Ajanas'eva,
A. A. Agadzhanov

Medical School, Riga

As shown by means of radioimmunoassay high amounts of immunoreactive insulin were first to be found in gastric juice of both healthy

persons and the patients with duodenal ulcer. Content of insulin in gastric juice was 3-fold as high as in blood serum. Atropine decreased slightly the insulin content in gastric juice, whereas histamine did not affect its concentration. Estimation of insulin in gastric juice is of importance to elucidate the dependence on its hypersecretion observed in duodenal ulcer as well as to ascertain the insulin role in formation of the gastric juice main components.

УДК 612.744.14.015.36.547.963.32].014.46:547.821

Р. Е. Лохов

ВЛИЯНИЕ π -ДЕФИЦИТНЫХ ГЕТЕРОСИСТЕМ НА СИНТЕЗ АТФ В МИТОХОНДРИЯХ

Северо-Осетинский университет им. К. Л. Хетагурова, г. Орджоникидзе

В литературе утвердилось представление, что π -дефицитные гетеросистемы (пиридинные соли и др.), т. е. соединения с пониженной энергией π -орбиталей, не могут принимать участие в переносе электрона по дыхательной цепи [1]. Однако эта концепция казалась малоубедительной даже с точки зрения известных литературных данных. Так, в работе [2] было показано, что фосфорилирование аденозинфосфатов может осуществляться неферментативным путем в системах с подходящими акцепторами электронов — гидроксильного радикала $\text{OH}\cdot$, синглетного кислорода I_2 и других промежуточных электроноакцепторных частиц. В этом контексте представлялось вполне реальным участие пиридинных солей как акцепторов электронов в активации субстратов фосфорилирования.

С другой стороны, ранее было показано [3, 4], что соли пиридина по ингибированию цепного перекисного окисления липидов искусственных (БЛМ) и биологических мембран, т. е. по способности акцептировать электроны с таких реакционноспособных частиц, как $\text{OH}\cdot$, O_2 , I_2 , превосходят известные дезактиваторы — этоксипин, дилудин и другие антиоксиданты свободно-радикальных процессов. Следовательно, можно было ожидать, в противоположность известным представлениям [1], ускорения фосфорилирования АДФ и АТФ под влиянием исследуемых π -дефицитных гетеросистем.

Исключительная биологическая роль нуклеиновых кислот и их компонентов в организме животных и человека обуславливает то особое внимание, ко-

торое проявляется к разработке средств или факторов, усиливающих синтез АТФ в матриксе митохондрий и обеспечивающих транспорт его через мембрану.

В предлагаемой работе приводятся экспериментальные данные по влиянию RL-175 на синтез АТФ в скелетных и сердечных мышцах белых беспородных крыс.

Методика

Исследования проводили на беспородных белых крысах массой 180—200 г, которые были разделены на 5 групп (по 5 крыс в каждой). Животные 1-й группы получали перорально RL-175 в этиловом спирте в дозе 10 мг на 100 г, 2-й — аналогичную дозу RL-175, но суспендированную в вазелине, 3-й — перорально 1 мл 30 % водного спирта, 4-й — 1 мл вазелина, крысы 5-й группы служили интактным контролем. Животные получали препарат (1-я и 2-я группы) и растворитель (3-я и 4-я группы) ежедневно в течение 14 дней. Через месяц после прекращения вскармливания исследуемым препаратом животных опытных и контрольной группы декапитировали, после чего немедленно извлекали кусочек скелетной или мышечной ткани, замораживали азотом и через 15—20 мин использовали для исследования.

Точную навеску ткани (400 мг) гомогенизировали в 30 мл 6 % раствора трихлоруксусной кислоты, переносили в пробирку, помещали в ледяную смесь и через 30 мин центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин. Центрифугат сливали, добавляли к нему 4 мл 1 н. раствора соляной кислоты и кипятили в течение 10 мин. Раствор упаривали, к остатку добавляли 10 мл муравьиной кислоты, нагревали при 80 °С 1 ч и подвергали анализу на содержание аденина в исследуемых образцах методами количественной тонкослойной хроматографии (ТСХ) и газожидкостной хроматографии (ГЖХ).

Количественную ТСХ проводили на пластинках «Силуфол UV-254+366» в системе растворителей спирт — хлороформ или диоксан — хлороформ в соотношениях 4 : 1 (объемные). Ме-

Содержание АТФ в различных органах и тканях подопытных животных (в 400 мг сырой ткани белых крыс)

Анализируемая сырая ткань и группы	Метод анализа		
	ТСХ		ГЖХ, г%
	г	мкмоль/г	
Содержание аденина в скелетных мышцах:			
I RL-175 + спирт	0,00216	40,0	1,17±0,03
II RL-175 + масло	0,00109	20,2	0,550±0,04
III K + масло	0,000520	9,7	0,254±0,03
IV K + спирт	0,000494	9,2	0,254±0,03
V контроль (K)	0,000490	9,1	0,254±0,03
Содержание аденина в мышцах сердца:			
I RL-175 (спирт)	0,00068	12,5	
II RL-175 (масло)	0,00058	10,8	
III K + масло	0,00019	3,5	
IV K — спирт	0,0016	3,0	
V контроль (K)	0,0019	3,5	
Среднее значение аденина в тканях контрольных животных	0,000341	6,3	

П р и м е ч а н и е. Содержание аденина в норме, по литературным данным, 6 мкмоль/г [8]. K—контроль.

стоположение разделенных УФ-поглощающих веществ (аденина) определяли, просматривая пластины в УФ-свете под хроматоскопом.

Для количественного определения аденина из целой серии площадей пятен стандартных разбавленных растворов «свидетеля» в муравьиной кислоте, нанесенных на пластину, выбирали те, которые по размерам наиболее приближались к таковым исследуемой серии образцов. Далее находили участки с линейной зависимостью размера площади пятна массы аденин-свидетеля, фотографировали их и вычисляли алгебраическим методом по Пурди и Трутеру [5]:

$$\lg W = \lg W_s + \frac{V\bar{A} - V\bar{A}_s}{V\bar{A}_d - V\bar{A}} \lg d,$$

где W и A — соответственно масса и площадь пятна раствора пробы; W_s и A_s — масса и площадь пятна стандартного раствора; A_d и A — площадь пятна разбавленного раствора пробы и коэффициент разбавления соответственно. Точность этого анализа W_s -методом хроматографических опытов составляет ±2,7 %.

Параллельно с ТСХ проводили количественное определение аденина, входящего в состав исследуемых образцов методом ГЖХ. Анализ проводили на хроматографе ЛХМ-8МД, колонка из нержавеющей стали, 10 % ПЭГ-1000 на хроматоне N-AW-НМОС, предварительно обработанном 2 % NaOH, температура колонки 150 °С, испарителя —250 °С, газ-носитель — азот, скорость 60 мл/мин. Количественные определения проводили по внутреннему эталону (дифенил, муравьиная кислота), чувствительность пламенно-ионизационного детектора 10^{-12} А/мкВ. Идентификацию аденина в опытных образцах проводили сравнением оптической плотности растворов при длине волны ультрафиолетовых лучей 260 нм с образцом известного строения. Оптическую плотность растворов измеряли на спектрофотометре СФ-16 в 1-сантиметровых кварцевых кюветах.

Выделение митохондрий из печени белых крыс и очистку проводили по методике, описанной ранее [6]. Потребление кислорода мито-

хондриями определяли полярографически. В среде инкубации для полярографии, содержащей 0,25 М сахарозы, 0,015 М KCl, 10 мкМ KH_2PO_4 и 10^{-3} М MgCl_2 , вносили 4 мкМ сукцината и 250 мкМ АДФ, рН 7,4. Температура среды 20—22 °С. В каждой серии экспериментов проведено не менее 10 измерений.

Результаты опытов обрабатывали методом статистики с применением критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Ранее было обнаружено [7], что один из исследуемых π -дефицитных гетеросистем (N-фенил-3-оксипиридин) в концентрациях 10^{-4} М вызывает увеличение до 80 % ($P < 0,01$) скорости окисления сукцината митохондриями печени белых крыс. Увеличение дыхательного контроля происходило в состоянии 3 на 4 по Чапсу.

Учитывая, что усиление скорости поглощения кислорода адекватно ускорению фосфорилирования АДФ в АТФ в матриксе митохондрии, можно было ожидать значительного влияния π -дефицитных гетеросистем на синтез эффективного АТФ в клетках различных органов и тканей.

Методом количественной ТСХ в системе не менее чем в двух растворителях показано (см. таблицу), что содержание аденина в скелетных мышцах животных 1-й группы составляет 0,00216 г (40 мкмоль/г), 2-й — 0,00109 г (20,2 мкмоль/г), 3-й — 0,000520 г (9,7 мкмоль/г), 4-й — 0,000494 г (9,9 мкмоль/г), 5-й группы — 0,000490 г (9,1 мкмоль/г), т. е.

синтез АТФ у крыс 1-й группы под влиянием RL-175 был выше относительно контрольных показателей в $4,41 \pm 0,12$ раза.

Методом газожидкостной хроматографии с чувствительностью пламенно-ионизационного детектора 10^{-12} А/мкВ показано, что количество аденина в скелетных мышцах контрольных крыс III и IV групп составляет $0,254 \pm 0,003$ г%; во II опытной группе — $0,550 \pm 0,04$ г% и в I опытной группе — $1,17 \pm 0,035$ г% при достоверности $P < 0,001$, т. е. содержание аденина в 4,6 раза превышало контрольные величины. Близкие совпадающие данные по содержанию АТФ в опытных группах животных относительно контрольных больше в 4,4—4,6 раза, определенные независимыми методами количественной ТСХ и ГЖХ, свидетельствуют о достоверности полученных экспериментальных данных.

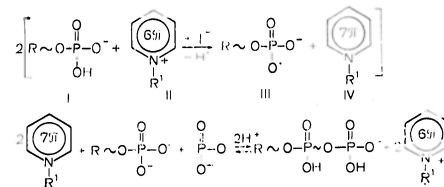
В таблице приведены также данные о содержании аденина в сердечных мышцах подопытных животных, из которых можно заключить, что у крыс 1-й группы количество аденозинтрифосфата в 3,6 раза превышало аналогичные показатели у интактных животных.

Для сравнения укажем, что, по литературным данным [8], содержание аденина в норме для экспериментальных животных составляет в среднем $5,893 \pm 103$ мкмоль/г. Этот результат показывает несколько меньшее содержание аденина в скелетных мышцах контрольных групп белых крыс, по сравнению с аналогичными показателями в мышцах сердца.

Средний результат для двух исследуемых тканей по содержанию аденина в различных тканях будет разным в зависимости от физиологического состояния и вида животного, кормления, условий содержания и т. д., составляет 6,30 мкмоль/г, что удовлетворительно совпадает с литературными данными ($\sim 6,0$ мкмоль/г). Все это свидетельствует, очевидно, о корректности экспериментальных результатов по значительному влиянию π -дефицитных гетеросистем на синтез АТФ в митохондриях, в противоположность сложившимся представлениям.

Указанные соединения имеют описываемую (катионизаряженную) структуру, в связи с чем могут проявлять, как отмечалось выше, свойства акцепторов

электронов с образованием реакционноспособных промежуточных фосфатов F_1 -части комплекса вблизи конца F_0 -канала. В результате переноса двух протонов по каналу $F_1 - F_0$, в соответствии с гипотезой П. Митчелла [9], и взаимодействия метафосфат-иона с фосфорилирующим агентом по аналогии с развиваемой [2] концепции может происходить синтез АТФ в матриксе митохондрий по следующей обратимой вероятной схеме:



Образование анион-радикалов фосфата (III) окислением его ОН-радикалами описано ранее [10]. В литературе [11] широко используются представления π -септета. Согласно этой концепции, в переходном состоянии возможен перенос электрона от донора (I) на антисвязывающую π -орбиталь пиридинового кольца (II) с образованием гетероароматической системы с семью π -электронами (π -септет IV). Экспериментально при полярографическом восстановлении пиридиновых катионов (II) подтверждена возможность образования подобных систем [12, 13]. Некоторые из них были выделены ранее.

Таким образом, возможность обратимой регенерации пиридинового катиона (II) с последующим участием его в катализе фосфорилирования позволяет частично объяснить роль π -дефицитных гетероциклических систем, в частности RL-175, в энергетическом метаболизме клетки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пожарский А. Ф. — Химия гетероцикл. соединений, 1979, № 9, с. 1155.
2. Гончарова Н. В., Гольдфельд М. Г., Масиновский З. Б. и др. — Докл. АН СССР, 1980, т. 251, № 3, с. 734.
3. Лохов Р. Е., Марзоев А. И., Дорошенко Т. Д. — В кн.: Всесоюзная конф. по химии органических пероксидов. 7-я. Волгоград, 1980, с. 333.
4. Лохов Р. Е., Марзоев А. И., Дорошенко Т. Д., Чучук Л. В. Ингибирование цепного перекисного окисления липидов биологических мембран производными ряда моноамина. — Рукопись депонирована во ВНИИТИ. М., 1980, № 3682—80.

5. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография. Пер. с англ. М., 1981, т. 1, с. 349.
6. Биохимическое исследование мембран./ Под ред. Э. Мэдди. М., 1979, с. 54.
7. Лохов Р. Е., Марзоев А. Н., Чигорин А. В., Кнышев Г. Н. Влияние соли N-фенил-3-оксипиридиния на окислительное фосфорилирование митохондрий. — Рукопись депонирована в ВИНТИ. М., 1979, № 4078—79.
8. Zimmer H. G., Ibel H., Steinkopf G. — Science, 1980, vol. 207, p. 18.
9. Mitchell P. — Ibid., 1979, vol. 206, p. 1148.
10. Левин Я. А., Воркунова Б. И. Гомолитическая химия фосфора. М., 1978.
11. Pyridine and Derivatives./ Ed. R. A. Abramovitch. New York, 1973, p. 3.
12. Майрановский С. Г. Каталитические и кинетические волны в полярографии. М., 1966, с. 198.
13. Kythän I., Ferles M., Valnet I., Kosminu N. — Tetrahedron, 1970, vol. 26, p. 4361.

Поступила 02.07.81

THE INFLUENCE OF π -DEFICIENT HETEROSYSTEMS UPON THE ATP SYNTHESIS IN MITOCHONDRIA

P. E. Lokhov

North-Osselian State University, Ordhonikidze

Participation of the π -deficient heterosystems in the enhancement of cell metabolism was shown as distinct from the well-known hypotheses. In presence of chemical preparation RL-175 content of ATP was increased 4.4-4.6-fold and 3.6-fold in rat skeletal and heart muscles, respectively, as compared with control values.

УДК 616.153.922-008.61-092.9-07: [616.153.915+616.153:577.112.856]-074

А. Б. Косухин, Б. С. Ахметова

ЗНАЧЕНИЕ СТРУКТУРНОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ЛИПИДОВ В РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЗМА ЛИПОПРОТЕИДОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ И ЛИМФЕ В УСЛОВИЯХ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИИ У СОБАК

Институт физиологии АН Казахской ССР, Алма-Ата

Ключевыми ферментами метаболизма липидов в стенках кровеносных сосудов являются лецитин-холестерин-ацилтрансфераза (ЛХАТ, КФ 2. 3. 1. 43) и липопротеидлипаза (ЛПЛ, КФ 3. 1. 1. 34), многообразная физиологическая роль которых освещена в специальных обзорах [8, 10, 25]. Сущность реакций, катализируемых ЛХАТ и ЛПЛ, сводится к модифицированию жирнокислотных остатков липидов. ЛХАТ обеспечивает эстерификацию холестерина (ХС) плазмы крови за счет жирной кислоты из C_2 -позиции фосфатидилхолина (ФХ). ЛПЛ проявляет ацилгидролазную активность в отношении C_1 - и C_3 -ацилов триглицеридов (ТГ), а также C_1 -ацила фосфолипидов обеспечивая деградацию липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП) и хиломикронов (ХМ). ЛХАТ действует и в плазме крови, главным образом в ассоциации с липопротеидами высокой плотности (ЛПВП). ЛПЛ фиксирована на мембране эндотелиальной клетки и освобождается из тканевых депо под влиянием инфузии гепарина. Наряду с ЛПЛ при этом освобождается печеночная триглицеридлипаза (ПТГЛ, КФ 3. 1. 1. 3), проявляющая слабую ацилгидролазную активность и специфичность в отношении полиненасыщен-

ных жирных кислот [20]. Фермент, по-видимому, локализован на эндотелии печеночных синусоидов [25].

При атеросклерозе происходят глубокие изменения в составе жирных кислот, обеспечивающих структурную гетерогенность липидов [1, 2]. Поскольку активность ЛХАТ, ЛПЛ и ПТГЛ тесно сопряжена с процессами атерогенеза, представляет интерес выяснить закономерности влияния состава жирных кислот на активность соответствующих ферментов, что и входило в задачу нашей работы.

Методика

Опыты были поставлены на 20 беспородных собаках-самцах. Экспериментальную гиперхолестеринемию вызывали скормливанием животным *ad libitum* атерогенной пищи, содержащей 2,5 % жира и включавшей ХС и мерказолил (тиреостатик) из расчета соответственно 1 г и 5 мг на 1 кг массы собаки в течение 20 нед. Состав потребляемого жира (в %): пальмитата 35, стеарата — 5, олеината — 40, линолата — 20. Подавление функций щитовидной железы является условием развития гиперхолестеринемии у собак при кормлении их натуральной пищей [21]. У человека гиперхолестеринемия и атеросклероз, с одной стороны, и гипотиреоз — с другой, тесно взаимосвязаны [3, 7, 27]. Контрольную группу животных (12 собак) содержали на том же рационе, но без добавления ХС и мерказолила.

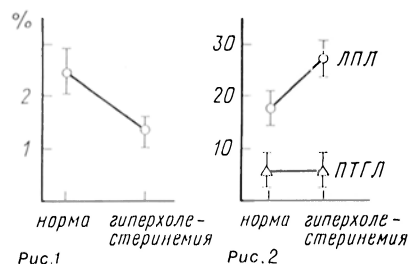


Рис. 1. Активность ЛХАТ в плазме крови собак (измеренная по убыли свободного ХС в процентах от его первоначальной концентрации в течение 1 ч инкубации плазмы крови) в условиях нормы и гиперхолестеринемии (проведенные через соответствующие точки вертикальные отрезки иллюстрируют ошибки средних величин).

Рис. 2. Активность ЛПЛ (в мкмоль свободных жирных кислот на 1 мл за 1 ч) и ПТГЛ плазмы крови собак в норме и при гиперхолестеринемии.

В условиях нормы и гиперхолестеринемии у собак исследовали плазму крови и лимфу кишечного ствола, которые получали после 18–24-часового голодания под морфинно-гексеналовым наркозом. Липопротеиды разделяли методом марганец-гепаринового осаждения [6]. Липиды экстрагировали хлороформ-метаноловой смесью (2:1), разделяли методом одномерной тонкослойной хроматографии на пластинках «Silufol UV-254» (ЧССР) в две стадии в системах растворителей: 1) диэтиловый эфир — 70° петролейный эфир — уксусная кислота (65:35:0,5) с прохождением фронта до $\frac{2}{3}$ пластинки; 70° петролейный эфир — диэтиловый эфир (90:6) с прохождением фронта до конца пластинки [23]. Количественно определяли ХС в свободной и эстерифицированной форме [12], ТГ [24] после соскабливания соответствующих пятен. Фосфолипиды разделяли в системе растворителей хлороформ — метанол — вода (65:25:4) [5]. Спектр высших ацилов фракций липидов анализировали методом газовой хроматографии на хроматографе «Chrom 5» (ЧССР) после экстракции, гидролиза и метилирования жирнокислотных остатков [28]. Применяли пламенно-ионизационный детектор, колонки из нержавеющей стали длиной 2,5 м, внутренним диаметром 3 мм. Твердой фазой служил хроматон NAW-HMDS, жидкой — полиэтиленгликольсукцинат. Соотно-

шение фаз было 2:1. Газ-носитель — азот, температура термостата 180 °С, испарительной камеры 210 °С. Пики на хроматограммах идентифицировали по времени удерживания стандартных метиловых эфиров жирных кислот. Об активности ЛХАТ судили по убыли концентрации свободного ХС после 8-часовой инкубации проб с эндогенными липопротеидами [26]. Активность ЛПЛ и ПТГЛ тестировали потенциометрически по скорости освобождения жирных кислот при инкубации постгепариновой плазмы крови, взятой через 5 мин после внутривенного введения гепарина (100 ЕД на 1 кг массы), в субстратной смеси, содержащей коммерческую жировую эмульсию «Липофундин С» («Leigas», Финляндия) [15]. При определении активности ПТГЛ в качестве ингибитора ЛПЛ в субстратную смесь вносили натрия хлорид в концентрации 1 М [10, 11].

Результаты и обсуждение

Экспериментальная гиперхолестеринемия у собак (концентрация общего ХС $8,0 \pm 0,9$ мМ против $2,9 \pm 0,4$ мМ в норме) сопровождалась существенным качественным изменением эфиров ХС плазмы крови. На фоне возрастания концентрации ХС отмечено увеличение процентного содержания насыщенных и мононасыщенных ацилов. При этом скорость реакции ЛХАТ, измеренная по степени увеличения эстерификации ХС в результате инкубации эндогенных липопротеидов, резко снижалась (рис. 1).

Гиперхолестеринемия у собак сопровождалась главным образом аккумуляцией пальмитата ХС в плазме крови (до $38,4 \pm 1,4$ % против $28,1 \pm 1,4$ %) по отношению к другим эфирам холестерина. Накопление пальмитата ХС у собак касается как ЛПВП, так и суммарной фракции ЛПОНП и липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) плазмы крови и лимфы (табл. 1). Поскольку важнейшим источником эфиров ХС плазмы крови является реакция, катализируемая ЛХАТ [25], представляет

Таблица 1

Концентрация (в мМ) свободного и эстерифицированного ХС и процентное содержание пальмитата в эфирах ХС плазмы крови и лимфы кишечного ствола собак в условиях нормы и гиперхолестеринемии

Биологическая жидкость	Условия опыта	ЛПВП			ЛПНП+ЛПОНП		
		свободный ХС	эстерифицированный ХС	% пальмитата	свободный ХС	эстерифицированный ХС	% пальмитата
Плазма крови	Норма	$0,42 \pm 0,06$	$1,69 \pm 0,08$	$29,4 \pm 5,7$	$0,23 \pm 0,05$	$0,72 \pm 0,04$	$28,4 \pm 2,1$
Лимфа	»	$0,32 \pm 0,07$	$0,63 \pm 0,10$	$29,4 \pm 3,9$	$0,41 \pm 0,03$	$0,80 \pm 0,12$	$42,5 \pm 3,1$
Плазма крови	Гиперхолестеринемия	$1,03 \pm 0,12$	$1,82 \pm 0,10$	$34,2 \pm 2,7$	$0,41 \pm 0,13$	$3,78 \pm 0,31$	$39,5 \pm 3,8$
Лимфа	Гиперхолестеринемия	$0,42 \pm 0,11$	$0,70 \pm 0,21$	$32,5 \pm 2,0$	$0,43 \pm 0,09$	$1,34 \pm 0,32$	$30,5 \pm 2,8$

Процентное содержание остатков высших жирных кислот ФХ и ТГ в плазме крови и лимфе кишечного ствола в норме и при гиперхолестеринемии у собак

Символ ацила	ФХ				ТГ			
	плазма крови		лимфа кишечного ствола		плазма крови		лимфа кишечного ствола	
	норма	гиперхолестеринемия	норма	гиперхолестеринемия	норма	гиперхолестеринемия	норма	гиперхолестеринемия
C _{16:0}	22,3±2,6	23,7±3,2	25,2±2,6	24,4±0,9	28,2±2,3	38,3±4,2*	25,2±8,6	30,0±5,2
C _{18:0}	28,7±2,4	33,6±2,4	25,1±4,9	23,8±3,8	17,1±3,3	12,2±0,9	23,6±5,9	13,3±1,6
C _{18:1}	18,9±4,1	19,6±1,8	23,0±1,2	18,2±4,0	25,6±3,9	19,7±3,0	25,4±8,3	21,5±2,7
C _{18:2}	8,7±1,4	9,2±2,0	11,8±2,9	7,9±1,2	13,1±1,4	9,3±1,2*	9,3±2,7	13,5±2,5
Индекс насыщенности	1,6±0,2	2,0±0,4	1,5±0,1	1,6±0,1	1,4±0,3	1,8±0,4	1,8±0,3	1,5±0,2

Примечание. Представленные данные отражают истинное процентное содержание каждого ацила и не приведены к 100%. Звездочка— $P<0,05$.

интерес сопоставление жирнокислотного спектра эфиров ХС и ФХ. Жирнокислотный состав ФХ ЛПВП как в лимфе, так и в плазме крови не отличается от такового в суммарной фракции ЛПОНП и ЛПНП, что позволило свести соответствующие значения в единый вариационный ряд. Основными ацилами в молекулах ФХ, составляющими до 90 % всех жирнокислотных остатков, были пальмитиновая (C_{16:0}), стеариновая (C_{18:0}), олеиновая (C_{18:1}), линолевая (C_{18:2}) кислоты, процентное содержание которых приведено в табл. 2. Как видно из этой таблицы, при гиперхолестеринемии у собак отмечается некоторое возрастание содержания стеарата в ФХ ($P<0,05$). Вследствие этого меняется индекс насыщенности ФХ. Результаты данного наблюдения совпадают с результатами исследований плазмы крови при гиперхолестеринемии у людей [9]. Известно, что предпочтительными субстратами ЛХАТ являются ненасыщенные ацилы [14]. Следовательно, угнетение скорости эстерификации ХС в плазме крови может в известной мере определяться перестройкой спектра жирных кислот в ФХ. В то же время из характеристики фосфолипидного субстрата ЛХАТ следует, что пальмитат ХС не может быть главным продуктом данной реакции и при гиперхолестеринемии.

Ранее нами показано, что пальмитат ХС — главный компонент эфиров ХС лимфы кишечного ствола, куда он попадает в составе ЛПОНП и

ХМ [4], образующихся в стенке тонкой кишки. Из табл. 1 видно, что в норме существует статистически достоверное различие ($P<0,02$) в процентном содержании пальмитата ХС в суммарной фракции ЛПНП и ЛПОНП лимфы и плазмы крови. Нивелирование этого различия при гиперхолестеринемии, вероятно, связано с изменением гематолимфатических взаимоотношений. В частности, гиперхолестеринемия, по-видимому, приводит к фильтрации через гематолимфатический барьер больших количеств плазменных липопротеидов, что может маскировать специфику спектра ацилов эфиров ХС интестинальной генерации. Известно, что скорость гидролиза пальмитата ХС в печени сравнительно низка [7], что может задерживать окисление ХС в желчные кислоты (основной путь его элиминации).

Характерно, что статистически значимых различий процентного содержания пальмитата ХС в ЛПВП и суммарной фракции ЛПОНП и ЛПНП в плазме крови нет. Один из возможных путей аккумуляции пальмитата ХС в составе ЛПВП — липолитическая деградация богатых ТГ липопротеидов, ремнантами которых являются ЛПВП [16]. Таким образом, перегрузка ЛПВП ХС, отмечающаяся при гиперхолестеринемии, сочетается с накоплением в них медленно гидролизуемого пальмитата ХС. Известно, что эфиры ХС являются мощными ингибиторами ЛХАТ [18]. Поэтому, несмотря на некоторое возрастание ХС ЛПВП в условиях гиперхолестеринемии,

стеринемии (см. табл. 1), их антиатерогенная активность сравнительно невысока, чем отчасти объясняется снижение активности ЛХАТ. Характерно, что у собак при гиперхолестеринемии зарегистрировано значительное накопление свободного ХС ЛПВП (см. табл. 1), что согласуется со снижением активности ЛХАТ.

Спектр ацилов ТГ ЛПВП, как и в случае с ФХ, идентичен ЛПНП и ЛПОНП и представлен в основном теми же жирнокислотными радикалами (см. табл. 2). Активность ЛПЛ, как видно на рис. 2, при гиперхолестеринемии возрастает, с чем, вероятно, связано отсутствие выраженной аккумуляции ТГ ($28,8 \pm 4,5 \cdot 10^{-2}$ мМ в норме; $62,0 \pm 16,4 \cdot 10^{-2}$ мМ при гиперхолестеринемии) в плазме крови собак. В то же время активность ЛТГЛ не увеличивается. В этих условиях спектр ацилов ТГ может играть решающую роль в обеспечении адекватного функционирования ЛТГЛ, проявляющей выраженную избирательность в отношении полиненасыщенных ацилов [20]. Если ЛТГЛ, как предполагается, участвует в липидировании ЛПВП₂ с образованием ЛПВП₃ [19], то спектр ацилов ТГ может оказывать и косвенное влияние на активность ЛХАТ, поскольку именно ЛПВП₃ являются ее предпочтительным субстратом [13]. Интересно, что повышение насыщенности ТГ отмечено при атеросклерозе и ишемической болезни сердца у людей [1].

Подводя итог изложенному, можно постулировать наличие следующей патогенетической связи жирнокислотного состава и липопротеидного метаболизма при экспериментальной гиперхолестеринемии у собак. Поступление из кишечника в составе богатых ТГ липопротеидов повышенного количества ХС, эстерифицированного пальмитатом, приводит в силу относительно низкой скорости гидролиза последнего к его аккумуляции в плазме крови, в том числе пальмитата ХС ЛПВП. Наличие дополнительных эфиров ХС в ЛПВП ингибирует ЛХАТ. Определенное значение в угнетении холестеринэстерифицирующей активности плазмы имеет относительно высокая насыщенность как ФХ — липидного субстрата ЛХАТ, так и ТГ, отчего зависит количество липопротеидного субстрата, образующегося при участии ЛТГЛ в печени. Угнетение ЛХАТ приводит к накопле-

нию ХС на поверхностной пленке ЛПВП. В результате должна нарушаться функция оттока из плазматических мембран эндотелия избытка свободного ХС. Последний в норме поступает на оболочку ЛПВП в силу градиента концентрации, возникающего благодаря непрерывной эстерификации ХС при участии ЛХАТ и перемещению его в гидрофобное ядро ЛПВП [25]. Можно предполагать, что создающаяся ситуация оказывает воздействие и на активность липопротеидлиполиза. В частности, биологический смысл торможения активности ЛПЛ в модельной системе при увеличении концентрации свободного ХС [17] может *in vivo* состоять в индикации отсутствия его акцепторов — ЛПВП. Это должно блокировать высвобождение новых количеств свободного ХС в результате липопротеидлиполиза. В условиях наших экспериментов с относительно нерезко выраженной гиперхолестеринемией понижения активности ЛПЛ отмечено не было. Однако ретроспективная оценка данных других авторов [22], зарегистрировавших ингибирование ЛПЛ при экспериментальной гиперхолестеринемии у собак, дает основания предположить подобный механизм.

Таким образом, экстраплазменные системы, определяющие жирнокислотный состав классов липидов, оказывают заметное влияние на метаболизм липопротеидов плазмы крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алимova Е. К., Ендакова Э. А. — *Вопр. мед. химии*, 1970, № 3, с. 310—316.
2. Бавина М. В. — *Труды Казан. мед. ин-та*, 1970, т. 33, с. 22—23.
3. Борjak П. М., Калинин А. П. — *Кардиология*, 1978, № 4, с. 139—146.
4. Дукравец П. А., Косухин А. Б., Пикутин Б. Н. — *Вопр. мед. химии*, 1983, № 3, с. 88—91.
5. Кирхнер Ю. *Тонкослойная хроматография*. Пер. с англ. М., 1981, т. 2, с. 52—115.
6. Климов А. Н., Никульчева Н. Г. — В кн.: *Дислипидемии и ишемическая болезнь сердца* / Под ред. Е. И. Чазова, А. Н. Климова. М., 1980, с. 26—82.
7. Лопухин Ю. М., Арчаков А. И., Владимиров Ю. А., Коган Э. М. *Холестериноз*. М., 1983.
8. Пикуфорова А. А. — В кн.: *Биохимия липидов и их роль в обмене веществ* / Под ред. С. Е. Северина. М., 1981, с. 95—105.
9. Озерова И. И., Герасимова Е. И., Курданов Х. А. — В кн.: *Всесоюзный симпозиум по медицинской энзимологии*. 4-й. Алма-Ата, 1983, с. 194—195.
10. Солитернова И. Б., Никульчева Н. Г. — *Кардиология*, 1980, № 8, с. 34—38.

11. Хеначишвили Г. Г., Никульчева Н. Г. — Успехи биол. химии, 1980, т. 21, с. 163—184.
12. Abell B. B., Levy R. I., Brodie B. B., Kendall P. E. — J. biol. Chem., 1952, vol. 185, p. 357—376.
13. Albers J. J., Cheung M. C. — В кн.: Липопротеиды высокой плотности и атеросклероз / Под ред. А. Н. Климова, Р. Леви. М., 1983, с. 37—51.
14. Assmann G. — In: Phosphatidylcholine / Ed. H. Peeters. Berlin, 1976, p. 34—36.
15. Boberg J. — Lipids, 1970, vol. 5, p. 452—456.
16. Eisenberg S. — In: Lipoprotein Metabolism / Ed. S. Eisenberg. Basel, 1979, p. 139—165.
17. Fielding C. J. — Biochim. biophys. Acta, 1970, vol. 218, p. 221—226.
18. Fielding C. J., Shore V. C., Fielding P. E. — Ibid., 1972, vol. 270, p. 513—518.
19. Grool P. H. E., Scheek L. M., Jansen H. — Ibid., 1983, vol. 751, p. 393—400.
20. Hülsmann W. C., Oerlemans M. C., Jansen H. — Ibid., 1980, vol. 618, p. 364—369.
21. Mahley R. W. — In: Atherosclerosis 5 / Ed. A. M. Gotto et al. New York, 1980, p. 355—358.
22. Mahley R. W., Weisgraber K. H., Innerarity T. — Circulat. Res., 1974, vol. 35, p. 722—733.
23. Manners M. J., Kidder D. E., Parsons P. M. — J. Chromatogr., 1969, vol. 43, p. 277—278.
24. Nelson C. J. — In: Blood Lipids and Lipoproteins: Quantitation, Composition and Metabolism / Ed. G. J. Nelson. New York, 1972, p. 26—73.
25. Nilsson-Ehle P., Garfinkel A. S., Schotz M. C. — Ann. Rev. Biochem., 1980, vol. 49, p. 667—693.
26. Rulenberg H. L., Soloff L. A. — Nature, 1971, vol. 230, p. 123—125.
27. Starr P. — In: Advances in Lipid Research / Ed. R. Paoletti, D. Kritchevsky. New York, 1978, vol. 16, p. 345—371.
28. Stoffel W., Chu F., Ahrens E. N. — Analyt. Chem., 1959, vol. 31, p. 307—308.

Поступила 23.07.81

ROLE OF THE STRUCTURE HETEROGENEITY OF THE CIRCULATING LIPIDS IN REGULATION OF LIPOPROTEIN METABOLISM IN BLOOD PLASMA AND LYMPH UNDER CONDITIONS OF HYPERCHOLESTEROLEMIA IN DOGS

A. B. Kosukhin, B. S. Akhmetov

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

Fatty acid spectrum of lipoproteins was studied in intestinal steam lymph and blood plasma of dogs with alimentary hypercholesterolemia. Mechanism of cholesterol accumulation in blood plasma appears to relate to increase in content of cholesterol palmitate which is secreted from intestine into lymph and hydrolyzed slowly in liver tissue. Alterations in composition of fatty acid acyls of cholesterol esters, of phosphatidyl cholines and triacyl glycerides as well as effect of these alterations on the lecithin-cholesterol acyl-transferase reaction and lipoprotein lipolysis are discussed.

УДК 612.46.015.13:577.152.344 + 616.61-008.931:577.152.344

А. А. Жлоба, И. Г. Шербак

АКТИВНОСТЬ КАТЕПСИНА В И СЕРИНОВЫХ ТРИПСИНОПОДОБНЫХ ПЕПТИДГИДРОЛАЗ В ЭКСТРАКТАХ ПОЧКИ ЧЕЛОВЕКА

I Ленинградский медицинский институт

Катепсин В (КФ 3.4.22.1) относится к числу наиболее изученных лизосомальных эндонуклеаз [12]. Выявлены некоторые свойства катепсина В из печени [6], плаценты [10, 18], селезенки [5], почек человека [4, 11, 14]. Препараты катепсина В из различных источников весьма сходны по действию на синтетические субстраты, имея высокое сродство к пептидам, содержащим пару основных аминокислот (карбобензоксиг - L - аланил - L - аргинил - L - аргинил-4-метокси-β-нафтиламид) [7, 15]. До настоящего времени наиболее доступными и широко используемыми для исследований катепсина В остаются синтетические хромогенные субстраты трипсина: N, α-бензоил-D, L-аргинин - паранитроанилидгидрохлорид

(БАПНА) и N, α-бензоил-D, L-аргинин-β-нафтиламидгидрохлорид (БАНА).

В данной работе изучена возможность использования БАПНА и БАМЭ (N, α-бензоил-D, L-аргининметилового эфира) для оценки активности катепсина В и сериновых пептидгидролаз со сходной субстратной специфичностью в тканях почек человека.

Методика

В работе использованы глутатион восстановленный (ГSH) и окисленный (ГSSG), цистеин, дитиоэритритол (ДТИ), ЭДТА динатриевая соль, рибонуклеаза, альбумин сыворотки крови человека, яичный альбумин, СМ-целлюлоза, трис, БАМЭ фирмы «Reanal» (Венгрия), сефадексы и голубой декстран (Мг —

2 000 000) фирмы «Pharmacia» (Швеция), параклормеркурибензойной кислоты натриевая соль (ПХМБ) фирмы «Chemarol» (Чехословакия), феназинметосульфат (ФМС) фирмы «Sevga» (ФРГ), фосфорорганический ингибитор ГД-42 (метилсульфометилат-О-этил-S-[β-этилмеркаптоэтил] метилтиофосфоната), суммарный препарат гистонов из тимуса телят, трипсин кристаллический марки А, неорганические соли, уксусная кислота, БАПНА, паранитроанилин отечественного производства.

Определение активности катепсина В по отношению к синтетическим субстратам. Активность к БАПНА в качестве субстрата определяли спектрофотометрическим методом по приросту светопоглощения при 405 нм за счет высвобождения паранитроанилина [9, 16]. Активность в экстрактах почки регистрировали с применением ряда воздействий, которые в опытах с очищенным катепсином В полностью блокируют либо тиоловые, либо сериновые ферменты. Эти эксперименты проведены с использованием в параллельных опытах навесок коркового слоя одной и той же почки человека. Каждый образец ткани массой примерно 200 мг сразу после взятия заливали экстрагирующим раствором из расчета 0,1 мл на 1,0 мг ткани.

При получении экстрактов использованы буферные растворы, содержащие 10 мМ ЭДТА: а) 0,01 М фосфатный буфер pH 6,2 без добавления или с добавлением тритона X-100 в конечной концентрации 1,0 г/л; б) 0,01 М ацетатные буферные системы pH 5,1 или 4,0, содержащие 1,0 г/л тритона X-100. Помещенные в охлажденные экстрагирующие растворы навески ткани измельчали с помощью ножниц и экстрагировали в течение 20 ч при 4°C при постоянном интенсивном перемешивании магнитной мешалкой, обеспечивающем фактически полную гомогенизацию ткани. Затем осуществляли центрифугирование при 12 000 g при 4°C в течение 10 мин. Полученные экстракты доводили до pH 6,2 добавлением малых порций (10 мкл) HCl под контролем pH-метра и использовали для определения тиолзависимой и пептилзависимой ферментативных активностей по отношению к БАПНА, а также для определения белка по Лоури.

По 2 мл каждого из экстрактов подвергали 30-минутной инкубации при pH 8,0 (20°C); при этом использовали 10 М NaOH и HCl под контролем pH-метра.

БАПНА-гидролазную активность определяли при pH 6,2, используя 0,01 М фосфатный буфер с ЭДТА в конечной концентрации 10 мМ. В пробы вносили по 0,4 мл экстрактов и смешивали с 1,0 мл буфера. Активаторы и ингибиторы вносили в объеме 0,1 мл. Реакция гидролиза продолжалась 240 мин при 37°C после прибавления 1 мл 2 мМ БАПНА. В пробы затем добавляли по 0,3 мл ТХУ (500 г/л), перемешивали и оставляли при 4°C на 10 мин. После охлаждения проб осадки отделяли центрифугированием в течение 7 мин при 8000 об/мин при комнатной температуре. Надосадочную жидкость быстро переносили в пробирки с 1 мл нейтрализующего раствора (1 М трис и 1 М NaOH при соотношении объемов 1:1). В контрольные пробы экстракты вносили непосредственно перед прибавлением ТХУ. Фотометрию производили при длине волны 405 нм.

Для определения эстеразной активности препаратов в отношении БАМЭ использовали

потенциометрический метод [3]. Метод основан на непрерывной регистрации подкисления на 0,01—0,05 ед. pH слабо буференной среды. Такое небольшое изменение pH в ходе реакции не влияет существенно на активность фермента. Реакции проводили при 37°C. Для проведения анализа 0,05—1,0 мл содержащего фермент экстракта смешивали с равным объемом 4 мМ цистеина и выдерживали в течение 1 ч при постоянном перемешивании, после чего добавляли 7 мл 0,8 % раствора натрия хлорида. Растворами (1—10 мМ) соляной кислоты или едкого натра смесь доводили до pH 5,1, а затем добавляли 0,8 % раствор натрия хлорида до конечного объема 9,0 мл. В инкубационную смесь вносили 1 мл 10 мМ раствора БАМЭ, предварительно доведенного до pH 5,1. Сдвиг pH за счет ферментативного расщепления субстрата регистрировали в течение 5—30 мин с помощью самопишущего потенциометра ЛКД-4-003, подключенного к pH-метру. После завершения регистрации ферментативной реакции pH инкубационной смеси доводили 5 мМ раствором щелочи до 5,1. Калибровку рабочей зоны смещения pH осуществляли добавлением в инкубационную смесь точно измеренной порции (обычно 100 мкл) 0,1 мМ раствора соляной кислоты и измерением величины «скачка» пера самописца, вызванного внесенным количеством кислоты. Для оценки точности предложенного метода сопоставили скорость гидролиза БАМЭ препаратами трипсина, регистрируемую потенциометрически и общепринятым спектрофотометрическим методом [17]. При этом получено хорошее совпадение результатов. Интерес к высокочувствительному варианту потенциометрического метода вызван тем, что в литературе имеются противоречивые данные о чувствительности БАМЭ к каталитическому действию очищенных препаратов катепсина В, а также отсутствием данных об участии катепсина В, содержащегося в неочищенных препаратах фермента, в гидролизе БАМЭ.

Молекулярную массу катепсина В определяли методом гель-фильтрации [1].

Содержание белка в препаратах определяли по методу Лоури [13].

Очистка катепсина В. Катепсин В выделяли из трупной почки человека, полученной в течение 1 ч после гибели от несчастного случая через отделение трансплантации почки нашего института, используя метод, разработанный для очистки катепсина В из селезенки человека [5]. Этот метод позволяет отделить от катепсина В сопутствующие тканевые тиоловые протеиназы [2, 10, 15].

Все операции по очистке катепсина В проводили при 4—6°C. Замороженные навески тканей (96 г) помещали в раствор (на 1 г тканей приходилось 4 мл раствора) натрий-фосфатного 0,005 М буфера pH 6,2—6,4, содержащего ЭДТА в конечной концентрации 10 мМ и тритон X-100 в конечной концентрации 2,0 г/л. Измельчение тканей почки с помощью размельчителя РТ-1 проводили в течение 20 мин. Измельченный препарат тканей оставляли на 18 ч при постоянном перемешивании на магнитной мешалке. Осадок отделяли центрифугированием при 10 000 g в течение 30 мин (эти же условия центрифугирования использовали на последующих этапах очистки). Надосадочную жидкость подвергали обработке в кислой среде, постепенно прибавляя порции 0,5 М раствора кислоты и доводя зна-

чение pH до 3,5—4,2. Образующийся осадок отделяли центрифугированием. Из надосадочной жидкости получали белковую фракцию, осаждающуюся между 35 и 75 % насыщения раствора сульфатом аммония. Осадок растворяли в ацетатном 0,02 М буфере pH 5,1 (из расчета 0,5 мл буфера на 1 г исходной ткани). Препарат фракционировали ацетоном, отбирая фракцию, осаждающуюся между 30 и 60 % (объем/объем). Осадок растворяли в 0,02 М ацетатном буфере pH 5,1 (0,2 мл буфера на 1 г исходной ткани). Осадок отделяли центрифугированием, надосадочную жидкость фракционировали на колонке сефадекса G-400 (40—45 см), уравновешенной указанным ацетатным буфером, отбирая для дальнейшей работы фракции, содержащие катепсин В с молекулярной массой 20 000—30 000. Препараты, полученные в результате гель-фильтрации, фракционировали на колонке КМ-целлюлозы (15—2,0 см), уравновешенной ацетатным буфером, в ступенчатом градиенте хлорида натрия. Фракции катепсина В, элюируемые при концентрации соли 0,1 М, использовали для дальнейшей очистки на колонке ДЭАЭ-сефадекса-A50 (20—2,0 см), уравновешенной 0,02 М натрий-фосфатным буфером pH 6,2. Фракции катепсина В элюировали при концентрации NaCl 0,22 М. Полученный препарат использовали для изучения свойств катепсина В. Выход фермента составил 8,5 % исходной активности гомогената, измеренной в реакции гидролиза БАПНА. Была достигнута очистка в 960 раз. Удельная активность полученного препарата составляла 0,08 мкмоль/мин на 1 мг белка.

Результаты и обсуждение

Очищенный препарат катепсина В из почки человека обладал наибольшей активностью к БАПНА при pH 5,6—6,4, в присутствии 2 мМ ЭДТА и цистеина, что соответствует свойствам фермента из других источников [6, 9, 10, 12, 16, 18]. Молекулярная масса катепсина В, по данным гель-фильтрации, составила 24 000—26 000. Препарат фермента катализировал гидролиз сывороточного альбумина человека при pH ниже 4,5. Протеолитическая активность очищенного препарата катепсина В была обнаружена также по отношению к суммарному препарату гистонов из тимуса телят, но в более широкой зоне pH — от 4,0 до 6,6. Амидазную активность препарата катепсина В и протеолитическую активность по отношению к альбумину и гистонам полностью подавлял 0,1 мМ ПХМБ. Эстеразная активность препарата к БАМЭ составляла 0,89 мкмоль/мин на 1 мг белка; только 25 % этой активности блокировал 0,1 мМ ПХМБ, что свидетельствует о примесях нефиловых эстераз в препарате катепсина В. Полученные результаты свидетельст-

Таблица 1
Чувствительность очищенного препарата катепсина В из почки человека к некоторым активирующим и ингибирующим воздействиям

Активирующий или угнетающий фактор	Конечная концентрация, мМ	Активность к БАПНА при pH 6,2 мкмоль/мин на 1 мг белка
Цистеин	2	0,080
ДТИ	1	0,081
GSH	2	0,074
GSSG	3	0,015
НАДФ·Н	1	0,075
ФОИ и 2 мМ цистеин	0,1	0,081
	3	0,078
ПХМБ	0,1	0,002
ФМС	0,001	Не обнаружена
Йодацетамид	0,1	То же
Ингибитор трипсина из бобов сои и 2 мМ цистеин	0,5 мкг/мл	0,080
Контрикал и 2 мМ цистеин	0,5 мкг/мл	0,079
Предобработка при pH 8,0 в течение 60 мин в присутствии 2 мМ цистеина (20 °С)	—	Не обнаружена
Предобработка при pH 4,0 в течение 60 мин в присутствии 2 мМ цистеина (20 °С)	—	0,079

вуют, что для выявления активности катепсина В в препаратах тканей почки (по всей вероятности, и других тканей) более приемлемы субстраты с амидной гидролизуемой связью, но не с эфирной, поскольку гидролиз последних катализируют также и сопутствующие нефиловые эстеразы. В подтверждение этого положения следует отметить, что активность БАМЭ-эстераз в начальном экстракте была весьма высокой (68 мкмоль/мин на 1 мг белка), причем компонент активности, чувствительный к ПХМБ, зарегистрировать не удалось. По-видимому, содержание нефиловых эстераз в неочищенном материале значительно превышает содержание катепсина В.

В табл. 1 суммированы полученные нами данные о чувствительности очищенных препаратов катепсина В из почки человека к некоторым активирующим и ингибирующим влияниям при гидролизе БАПНА. Препарат фермента наивысшую активность проявлял в присутствии цистеина, GSH,

Активность к БАПНА экстрактов из тканей коры 4 почек человека

Экстракт почки	Особенности процедуры получения экстракта	Активность экстрактов к БАПНА (в нмоль/мин на 1 мг белка), обработанных				
		4 мМ цистеином	0,04 мМ ПХМБ	0,001 мМ ФМС	0,04 мМ ФОИ	при pH 8,0
№ 1	Без обработки тритоном X-100 при pH 6,2	0,080 ± 0,020	0,046 ± 0,035	0,042 ± 0,026	0,041 ± 0,019	0,048 ± 0,026
№ 2	С обработкой тритоном X-100 при pH 6,2	0,232 ± 0,069	0,084 ± 0,045	0,078 ± 0,053	0,148 ± 0,039	0,087 ± 0,050
№ 3	С обработкой тритоном X-100 при pH 5,1	0,231 ± 0,048	0,064 ± 0,024	0,067 ± 0,028	0,168 ± 0,044	0,080 ± 0,035
№ 4	С обработкой тритоном X-100 при pH 4,0	0,398 ± 0,095	0,008 ± 0,002	0,012 ± 0,002	0,388 ± 0,102	0,008 ± 0,002

ДТИ или НАДФ-Н, тогда как ПХМБ и йодацетамид подавляли катализируемый катепсином В гидролиз БАПНА. Фосфорорганический ингибитор, ингибитор трипсина из бобов сои и контрикал не оказывали влияния на активность фермента. Очищенный препарат фермента характеризовался весьма низкой активностью по отношению к лейцилнафтиламиду (0,0021 мкмоль/мин на 1 мг белка), что свидетельствует о низком содержании характерной для катепсина Н аминопептидазной активности [11, 14].

Представленные результаты свидетельствуют, что тиолзависимая гидролазная активность, измеряемая в реакции гидролиза БАПНА, в почках человека проявляется за счет присутствия катепсина В. Другие тиоловые лизосомальные эндопептидазы (катепсин Н) почек человека, по-видимому, вносят небольшой вклад в гидролиз этого субстрата [7, 12, 14]. В очищенном препарате катепсина В отсутствуют катализирующие гидролиз БАПНА гидролазы серинового типа, поскольку ферментативную активность не угнетал фосфорорганический ингибитор, тогда как предобработка при pH 8,0 полностью блокировала активность катепсина В.

Ранее нами было показано, что в нефракционированных экстрактах почек человека наряду с тиоловой содержится значительная сериновая гидролазная активность, измеряемая в реакции гидролиза БАПНА [4]. В настоящей работе осуществлена сравнительная оценка приемов, позволяющих выявлять сериновый и тиоловый компоненты гидролазной активности, измеряемой в реакции гидролиза БАПНА, в нефракционированных тканевых экстрактах. Выявление величины тиолза-

висимой гидролазной активности в экстрактах тканей представляло интерес и в связи с тем, что в литературе имеются указания [2, 6] на возможность возрастания активности катепсина В при обработке тканевых экстрактов в кислой среде (pH 3,5—4,5), тогда как очищенные препараты фермента не изменяют своей активности после предобработки при pH 4,0 (см. табл. 1).

Результаты полученные при сравнительном исследовании экстрактов коркового вещества 4 почек человека, представлены в табл. 2. Экстракция как тиолзависимой, так и нетиоловой гидролазной активности значительно улучшается в присутствии тритона X-100. Использование этого детергента при pH 6,2 увеличивает нетиоловую активность в 2 раза, тиолзависимую активность в 3,5—4 раза. Большое влияние тритона X-100 на экстракцию катепсина В, чем сериновых гидролаз, катализирующих гидролиз БАПНА, можно объяснить тем, что катепсин В локализован в лизосомах [8].

В настоящее время сериновые гидролазы, катализирующие гидролиз БАПНА, еще не идентифицированы. Результаты, представленные в табл. 2, показывают, в частности, что для разделения общей гидролазной активности на сериновую и тиолзависимую пригодны многие процедуры, поскольку обработка ПХМБ, ФМС, фосфорорганическим ингибитором, инкубация при pH 8,0 приводят к сходному результату. Так, в экстрактах № 2 доля нетиоловой активности в присутствии ПХМБ и ФМС составляла 0,084 и 0,078 нмоль/мин на 1 мг белка, а доля сериновой активности, угнетаемой ФОИ, составляла (0,232—0,148) = 0,084 нмоль/мин на 1 мг белка. Таким образом, в экстрактах отсутствовали какие-либо иные типы гидролаз-

ной активности, кроме тиолзависимой и сериновой. В экстрактах, полученных при pH 6,2, выявлялась как тиолзависимая, так и сериновая активность, причем для исследованных 4 трупных почек здоровых доноров тиолзависимая активность почти в 2 раза превышала сериновую. Как было показано нами ранее [4], сериновая и тиолзависимая активность к БАПНА может быть полностью разделена путем гель-фильтрации на колонках сефадекса G-75: сериновую активность удавалось элюировать в свободном объеме; она характеризовалась относительной молекулярной массой не менее 80 000, тогда как тиолзависимую активность (катепсин В) элюировали во фракциях, характеризующихся относительной молекулярной массой 24—28 000. Однако ранее для гель-фильтрации нами были использованы препараты, полученные после солевого фракционирования, а не первичные экстракты гомогенатов тканей. Гель-фильтрация экстрактов, полученных при pH 6,2 с использованием тритона X-100, на колонках сефадекса G-100 привела к аналогичному разделению сериновой и тиолзависимой активности: ферментативная активность сериновых гидролаз характеризовалась относительной молекулярной массой не менее чем 80 000—100 000 и составляла $35 \pm 8\%$, а тиоловая — относительной молекулярной массой около 25 000— $60 \pm 7\%$ от общей гидролазной активности, нанесенной на колонку. Таким образом, разделение общей гидролазной активности на сериновую и тиоловую посредством гель-фильтрации экстрактов указывало на величины их соотношения, подобные получаемым при ингибиторном анализе (см. табл. 2).

Получение экстрактов в более кислой среде (экстракты № 3) приводило, как было впервые установлено нами, к уменьшению активности серинового типа. Так, при pH 4,0 отмечали почти полное исчезновение активности сериновых пептидгидролаз, но активность тиолзависимых гидролаз увеличивалась более чем в 2 раза. Увеличение тиолзависимой гидролазной активности при обработке экстрактов в кислой среде обычно связывают с инактивацией эндогенных ингибиторов тиолесвых протеиназ [2, 6].

В совместной нашей работе В. Я. Плоткиным был проведен ана-

лиз гидролазной активности в экстрактах бионатов (5—10 мг) почек больных с нефротическим синдромом. У 22 больных тиолзависимая гидролазная активность в содержащих тритон X-100 экстрактах, полученных при pH 6,2, колебалась в пределах 0,09—0,60 нмоль/мин на 1 мг белка, а сериновая — 0,06—0,30 нмоль/мин на 1 мг белка.

Приведенные в настоящей работе результаты свидетельствуют о применимости ряда ингибирующих воздействий для отдельного определения пептидгидролаз серинового и тиолового типа в экстрактах почки человека. Из двух широко доступных субстратов — БАПНА и БМЭ, которые гидролизуются в присутствии очищенных препаратов катепсина В, для выявления катепсин-В-подобной активности экстрактов почки человека можно рекомендовать БАПНА.

ЛИТЕРАТУРА

1. Детерман Г. Гель-хроматография. Пер. с нем. М., 1970.
2. Локишина Л. А., Гуреева Т. А., Лубкова О. Н., Орехович В. Н. — Биохимия, 1982, т. 47, № 8, с. 1299—1307.
3. Розенгайт В. И., Щербак Н. Г., Шмелева В. Г. — Там же, 1966, т. 31, № 6, с. 1111—1116.
4. Щербак Н. Г., Жлоба А. А. — Там же, 1979, т. 44, № 12, с. 2218—2226.
5. Baici A., Gyger-Marazzi M. — Europ. J. Biochem., 1982, vol. 129, p. 33—41.
6. Barrett A. J. — Biochem. J., 1973, vol. 131, p. 809—822.
7. Barrett A. J. — In: Proteinases in Mammalian Cells and Tissues. Amsterdam, 1977, p. 735.
8. Bouma J. M. W., Gruber M. — Biochim. biophys. Acta, 1966, vol. 113, p. 350—358.
9. Etherington D. J. — Biochem. J., 1974, vol. 137, p. 547—557.
10. Evans P., Etherington D. J. — Europ. J. Biochem., 1978, vol. 83, p. 87—97.
11. Gounaris A. D., Slater E. E. — Biochem. J., 1982, vol. 205, p. 295—302.
12. Kirschke H., Langner J., Riencann S. et al. — In: Protein Degradation in Health and Disease. Amsterdam, 1980, p. 417.
13. Lowry O. H., Rosebrough J. H., Farr A. L., Randall R. J. — J. biol. Chem., 1951, vol. 193, p. 265—275.
14. Luetscher J. A., Bialek J. W., Grisilis G. — Clin. exp. Hypertens, 1982, vol. 4-A, N 11—12, p. 2149—2158.
15. Mac Gregor R. R., Hamilton J. W., Shofstall R. R., Cohn D. V. — J. biol. Chem., 1979, vol. 254, p. 4423—4427.
16. Otto K. — Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 1967, Bd 348, S. 1449—1460.
17. Schwert C. W., Takenaka C. — Biochim. biophys. Acta, 1955, vol. 16, p. 570—575.
18. Swanson A. A., Martin B. G., Spicer S. S. — Biochem. J., 1974, vol. 137, p. 223—228.

Поступила 05.03.85

A. A. Zhloba, I. G. Scherbak

I. P. Pavlov I Medical School, Leningrad

A potentiality to use the available substrates
BAPNA and BAME was studied in estimation

of activities of cathepsin B and other trypsin-like hydrolases in extracts of human kidney cortex. In these extracts the BAME-hydrolyzing activity of cathepsin B was difficult if impossible to detect due to high level of attendant non-thiol esterases. At the same time, BAPNA might be used for this purpose as a substrate in estimation of cathepsin B- and trypsin-like peptide hydrolase activities in biopsies of human kidney.

УДК 616.12-008.3+616.12-008.9]-02:613.863]-092:612.014.49

Ф. З. Меерсон, В. В. Малышев, Е. Н. Екимов, В. А. Петрова,
В. И. Лифантьев

ВЛИЯНИЕ АДАПТАЦИИ ОРГАНИЗМА К КОРОТКИМ СТРЕССОРНЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ НА РЕАЛИЗАЦИЮ СТРЕСС-РЕАКЦИИ, НАРУШЕНИЕ МЕТАБОЛИЗМА И СОКРАТИТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ СЕРДЦА, ВЫЗВАННЫЕ ДЛИТЕЛЬНОМ ЭМОЦИОНАЛЬНО-БОЛЕВЫМ СТРЕССОМ

Лаборатория патофизиологии сердца Института общей патологии и патофизиологии
АМН СССР, Москва, ЦНИЛ и кафедра фармакологии Иркутского медицинского инсти-
тута

Результаты исследований показали, что под влиянием эмоционально-болевого стресса (ЭБС) возникает значительное возбуждение адренергической и гипоталамико-адреналовой систем [3, 11], ведущее к активации перекисного окисления липидов, липаз, фосфолипаз [11], и, следовательно, к нарушению окисления и фосфорилирования в митохондриях сердца [7], развитию очаговых контрактурных и некротических изменений в миокарде [14], депрессии сократительной функции сердечной мышцы [5, 11]. Показано также, что адаптация организма животных к коротким стрессорным воздействиям значительно повышает резистентность миокарда предсердий к стрессорному нарушению сократительной функции предсердий, сердца, гипоксии и избытку кальция [12], а также предупреждает очаговые повреждения структуры миокарда [4]. Однако в таком важном вопросе, как профилактический эффект адаптации к коротким стрессорным воздействиям, остается ряд неясных аспектов. Так, например, неизвестно, в какой мере этот защитный эффект обусловлен угасанием реакции различных стресс-реализующих систем при повторном предъявлении стрессорной ситуации, а в какой мере он зависит от повышения резистентности самого миокарда к катехоламинам и другим стресс-гормонам. Цель данной работы состояла

в том, чтобы сопоставить параметры, характеризующие возбуждение адренергической и гипоталамико-адреналовой систем, с одной стороны, и повреждение сердца, с другой, после длительного эмоционально-болевого стресса у предварительно адаптированных и интактных животных.

Методика

Опыты были проведены на 172 белых крысах-самцах массой 190–230 г. Животные были разделены на 4 группы: 1-ю составили контрольные животные, 2-ю — крысы, адаптированные к коротким стрессорным воздействиям, 3-ю — животные, подвергнутые 6-часовому ЭБС, 4-ю — адаптированные животные, подвергнутые ЭБС. ЭБС моделировали в форме невроза тревоги, как описано ранее [19]. Адаптацию животных к коротким стрессорным воздействиям осуществляли в течение 45 дней (40-минутный ЭБС 1 раз в день, 6 раз в неделю). Для оценки функционального состояния адренергической и гипоталамико-адреналовой систем животных через 2 ч после окончания ЭБС деканитировали и в плазме крови, сердце, надпочечниках определяли содержание кортикостерона (КС). Экстракцию гормона осуществляли метилхлоридом с последующей хроматографией на колонках с силикагелем [8]. Содержание адреналина (А) и норадреналина (НА) в сердце и надпочечниках определяли флюорометрическим методом [9]. В предыдущих исследованиях было показано, что наряду с уровнем глюкокортикоидов и катехоламинов интегративным показателем функциональной активности адренергической и гипоталамико-адреналовой систем является длительность эозинопении после стрессорного воздействия [3, 6]. Для определения этого параметра через каждые 3 ч после окончания эмоционально-болевого воздействия в течение

2,5 сут определяли число эозинофилов в 1 мкл периферической крови (в камере Горяева с окраской по Хникельману), взятой из хвостовой вены. Такой подход позволяет точно определить, когда вызванная стрессом эозинопения сменяется эозинофилией, время возникновения которой соответствует формированию максимальных альтеративных изменений метаболизма, структуры и функции сердца [5, 6].

Для оценки состояния сердечной мышцы исследование процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях проводили через 45 ч после окончания ЭБС — в момент выраженной эозинофилии и наибольшего угнетения функции митохондрий сердца [7]. Выделение митохондрий из сердечной мышцы и изучение их окислительной и фосфорилирующей функции проводили полярографическим методом по описанной ранее схеме [7]. Рассчитывали следующие показатели: V_3 и V_4 — скорости потребления кислорода (в наноатомах на 1 мг белка в 1 мин) соответственно при добавлении АДФ и после его расходования; DK_r — дыхательный коэффициент по Чансу $\left(\frac{V_3}{V_4}\right)$;

АДФ/О — эффективность фосфорилирования; АДФ/и — скорость окислительного фосфорилирования (в микромолях АДФ на 1 мг белка в 1 мин). Сократительную функцию сердца в условиях относительного покоя и изометрического режима (пережатие аорты на 30 с) оценивали также через 45 ч после окончания ЭБС, при этом учитывали следующие параметры: величину развиваемого давления (в мм рт. ст.), скорость сокращения (V_c) и расслабления (V_p) (в мм рт. ст. за 1 с), показатель интенсивности функционирования структур (ИФС), равный произведению частоты сердечных сокращений на развиваемое давление, отнесенное к массе желудочка (в мм рт. ст. на 1 мг в 1 мин). Исследования проводили под нембуталовым наркозом (8 мг на 100 г массы) при открытой грудной клетке и искусственном дыхании. Давление в полости левого желудочка измеряли с помощью электроманометра ВПБ-6ТН с фоторегистрацией на осциллографе Н-105 [1].

Результаты и обсуждение

Из результатов, представленных в табл. 1, следует, что адаптация животных к коротким стрессорным воздействиям вызвала увеличение содержания

катехоламинов в исследуемых органах. Так, концентрация А в надпочечниках повысилась на 31 %, а НА в сердце — на 45,6 %. Уровень КС в плазме крови и органах не изменился. ЭБС у интактных животных вызывает активацию адренергической и гипофизарно-адреналовой систем, проявляющуюся в 2—3-кратном увеличении содержания КС в плазме крови, сердце и надпочечниках, снижении в 2 раза уровня НА в сердце и в 3 раза содержания А в надпочечниках, а также развитии первоначальной эозинопии с последующей кратковременной эозинофилией через 45 ч после окончания ЭБС. Выявленное уменьшение содержания катехоламинов, составляющее закономерный компонент этого комплекса сдвигов, связано с тем, что при стрессе усиленный выброс катехоламинов из адренергических нервных окончаний не может быть компенсирован сниженным в этих условиях синтезом и нейрональным захватом [10].

Из табл. 1 видно также, что у животных, предварительно адаптированных к коротким эмоционально-болевым воздействиям, длительный ЭБС в значительно меньшей степени вызывает активацию адренергической и гипофизарно-адреналовой систем, чем у интактных животных. Изменений содержания катехоламинов в сердце и надпочечниках под влиянием стресса у адаптированных животных не произошло. По-видимому, это связано с увеличением мощности системы ресинтеза моноаминов, которое наблюдается обычно при многократных повторных стрессорных воздействиях [15, 18]. Содержание КС в плазме крови возрастало, но было в 1,5—2 раза ниже, чем у животных, подвергнутых ЭБС без предварительной адаптации

Таблица 1

Влияние ЭБС на содержание КС и катехоламинов у животных, адаптированных к стрессорным воздействиям ($M \pm m$)

Группа животных	КС, мкг/%			А, мкг/г		НА, мкг/г	
	плазма крови	сердце	надпочечники	сердце	надпочечники	сердце	надпочечники
1-я	5,4 ± 0,7	11,1 ± 1,6	1082 ± 96	0,013 ± 0,004	415 ± 38	0,79 ± 0,06	70,8 ± 8,1
2-я	5,2 ± 0,6	13,2 ± 1,4	1196 ± 110	0,03 ± 0,008	545,2 ± 41*	1,15 ± 0,09*	90,0 ± 7,6
3-я	16,2 ± 1,9***	26,2 ± 3,4***	2694 ± 210***	0,06 ± 0,009***	134,6 ± 15,8***	0,4 ± 0,06***	59,8 ± 5,2
4-я	10,8 ± 0,9*	18,2 ± 2,8*	1483 ± 186	0,03 ± 0,007	449 ± 36	0,91 ± 0,07	81,2 ± 9,4

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 в каждой группе было по 12 животных; одна звездочка — $P < 0,05$, две — $P < 0,01$, три — $P < 0,001$.

к коротким стрессорным воздействиям. Доказательством меньшей стрессорной активации адренергической и гипофизарно-адреналовой систем у адаптированных животных является и уменьшение длительности наблюдаемой при стрессе эозинонии, продолжительность которой, как известно, пропорциональна выраженности стресс-реакции [3, 6]. Время с момента окончания эмоционально-болевого воздействия до появления пика эозинофилии, следующего за эозинонией, сократилось с 45 до 36 ч. Следовательно, полученные результаты свидетельствуют о том, что адаптация животных к коротким стрессорным воздействиям предотвращает чрезмерную активацию адренергической и гипофизарно-адреналовой систем, характерную для длительного ЭБС.

Исследование окислительной и фосфорилирующей функции митохондрий, выделенных из сердечной мышцы животных, адаптированных к коротким стрессорным воздействиям, позволило установить, что показатели, характеризующие процессы окисления и фосфорилирования в митохондриях, достоверно не отличаются от контроля (табл. 2).

Вместе с тем необходимо отметить, что у адаптированных животных наблюдается тенденция к разобщению окисления и фосфорилирования, некоторому снижению эффективности использования кислорода и скорости окислительного фосфорилирования. По-видимому, многократное повторение коротких стрессорных воздействий, сопровождающееся периодическим увеличением содержания катехоламинов [17, 20], способствующих, как известно, накоплению Ca^{2+} в миокардиоцитах [21], может в конечном счете привести к развитию больших альтеративных изменений функции митохондрий сердца и соответственно к некото-

рому снижению в них сопряжения окисления и фосфорилирования.

В митохондриях сердца животных, подвергнутых ЭБС, выявлены значительные нарушения как окисления, так и фосфорилирования. Так, V_3 снижен на 36 %, $\text{ДК}_\text{ч}$ уменьшен на 40 %, АДФ/0 и АДФ/1 — соответственно на 34 и 50 %.

Следует отметить, что ЭБС сопровождается угнетением преимущественно фосфорилирующей функции митохондрий, о чем свидетельствует большее угнетение их функции в активном состоянии (V_3).

Хотя ЭБС, воспроизводимый у животных, предварительно адаптированных к коротким стрессорным воздействиям, и приводил к снижению изучаемых параметров функций митохондрий, однако эти изменения в большинстве своем достоверно не отличались от соответствующих показателей в контроле. Лишь $\text{ДК}_\text{ч}$, характеризующий сопряженность процессов окисления и фосфорилирования, оказался достоверно уменьшенным у животных этой группы, однако его величина была на 25 % выше ($P < 0,05$), чем у интактных животных, подвергнутых ЭБС.

Таким образом, предварительная адаптация животных к коротким стрессорным воздействиям является эффективным способом предупреждения вызываемых ЭБС нарушений окисления и фосфорилирования в митохондриях сердца.

Результаты исследования сократительной функции сердца (табл. 3) свидетельствуют о том, что адаптация животных к коротким стрессорным воздействиям ведет к некоторому снижению величин изучаемых показателей, однако эти изменения достоверно не отличаются от контроля. Из данных табл. 3 следует, что ЭБС у интактных животных вызывал выраженную де-

Таблица 2

Влияние ЭБС на окислительную и фосфорилирующую функции митохондрий сердца крыс, адаптированных к стрессорным воздействиям ($M \pm m$)

Группа животных	V_3	$\text{ДК}_\text{ч}$	АДФ/0	АДФ/1
1-я	$253,3 \pm 22,9$	$2,86 \pm 0,2$	$1,95 \pm 0,1$	$522,2 \pm 40,9$
2-я	$238,4 \pm 21,6$	$2,43 \pm 0,15$	$1,68 \pm 0,11$	$455,0 \pm 38,0$
3-я	$161,7 \pm 13,8^{**}$	$1,7 \pm 0,1^{***}$	$1,3 \pm 0,2^*$	$275,7 \pm 39,2^{***}$
4-я	$229,6 \pm 20,0$	$2,28 \pm 0,14^*$	$1,72 \pm 0,2$	$425,9 \pm 34,3$

Влияние ЭБС на сократительную функцию сердца крыс, адаптированных к стрессорным воздействиям ($M \pm m$)

Показатель	Группа животных	Относительный покой	Пережатие аорты	
			5 с	25 с
Развиваемое давление	1-я	106±7	210±13	215±18
	2-я	90,3±8,8	182,4±18	184,8±11,9
	3-я	87,3±5,1*	133,3±12,9***	117,6±15,4***
	4-я	101,5±7,9	161±11,4*	169,5±5,9*
Частота сердечных сокращений в минуту	1-я	408±30	396±30	392±30
	2-я	390±12	370±18	370±10
	3-я	320±21*	296±20*	272±20**
	4-я	365±16	362±14	360±16
ИФС	1-я	81±9	160±16	156±19
	2-я	74±7,3	152±12	143±13
	3-я	74,5±7,7	104,2±6,6**	84±10**
	4-я	72,3±6,3	125,1±7,1	126,4±7,9
V_c	1-я	3960±359	6955±270	7100±494
	2-я	3400±389	6383±467	6700±849
	3-я	3250±369	4417±744**	3560±658***
	4-я	3658±395	6319±485	6900±264
V_p	1-я	2520±358	3836±295	3580±208
	2-я	2217±180	2900±197	3000±216
	3-я	1717±221	1667±161***	1500±122***
	4-я	2434±184	2589±273**	2473±154***

прессию сократительной функции сердца. При этом наиболее значительное уменьшение всех показателей выявлялось при максимальной нагрузке на сердце, вызванной пережатием аорты. Так, через 5 с работы сердца в изометрическом режиме развиваемое давление, ИФС и V_c были уменьшены в среднем на 35 %, а V_p — на 56,6 %. Через 25 с пережатия аорты исследованные показатели (см. табл. 3) оказались сниженными соответственно на 45,3, 46,2, 49,9 и 58,1 %. Выявленная значительная депрессия сократительной функции сердца у животных через 45 ч после ЭБС соответствует глубоким нарушениям процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях миокарда. По-видимому, эти нарушения активности митохондрий, приводящие к снижению энергообеспечения, в значительной мере и обуславливают угнетение сократительной функции сердца.

Из табл. 3 также видно, что у животных, предварительно адаптированных к коротким стрессорным воздействиям, через 45 ч после ЭБС, т. е. в момент, когда у интактных крыс, подвергнутых стрессорному воздействию, развиваются максимальные альтеративные изменения метаболизма, структуры и функции сердца, не наблюдается столь существенного снижения па-

раметров сократительной функции сердца по сравнению с таковыми у животных контрольной группы. Необходимо подчеркнуть, что у этих животных снижение таких параметров, как ИФС и V_c , отсутствовало даже в условиях максимальной нагрузки на сердце, вызванной пережатием аорты, а величины развиваемого давления и скорости расслабления хотя и снижались, но оказались на 20—25 % выше, чем у интактных животных, подвергнутых ЭБС. Следует также отметить, что все показатели сократительной функции сердца у животных 4-й группы как в условиях покоя, так и в изометрическом режиме достоверно не отличались от соответствующих показателей у крыс, адаптированных к коротким стрессорным воздействиям.

В целом эти данные свидетельствуют о повышении резистентности сердца животных, адаптированных к коротким стрессорным воздействиям, к повреждающему действию тяжелого и длительного стресса.

Оценивая полученные результаты, можно прийти к следующему заключению. Адаптация животных к коротким стрессорным воздействиям, не вызывая существенных изменений функционального состояния гипофизарно-адреналовой системы, приводит к некоторому снижению параметров окис-

ления и фосфорилирования в митохондриях сердечной мышцы, а также показателей сократительной функции сердца. Выявленные изменения, хотя статистически и незначимы, являются своеобразным выражением так называемой «цены» адаптации [11, 12], что, возможно, связано с выбором достаточно жесткого и продолжительного режима адаптации в данной работе. Следовательно, перспективны исследования по подбору оптимального режима адаптации животных к стрессорным воздействиям. Это позволит, уменьшая «цену» адаптации, сохранить на этом уровне или даже повысить резистентность организма к повреждающему действию длительных и тяжелых стрессоров.

Результаты исследования свидетельствуют также о том, что у адаптированных животных в ответ на стрессорные воздействия отсутствует чрезмерная активация адренергической и гипофизарно-адреналовой систем и поэтому не возникает нарушение процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях сердечной мышцы, а также сократительной функции сердца.

Анализируя механизмы повышенной резистентности организма адаптированных животных к ЭБС, следует иметь в виду, что при стрессорных воздействиях происходит активация тормозных систем головного мозга: ГАМК-эргической [13], системы энкефалинов [2] и др. При многократных повторяющихся стрессорных воздействиях и соответственно при повторных активациях этих систем, происходящих в процессе адаптации, их функциональные возможности могут увеличиться. В свою очередь это может приводить к ограничению стрессорной реакции и соответственно выхода в кровь АКТГ, стрессорных гормонов и, следовательно, к предупреждению стрессорных повреждений.

Необходимо также учитывать, что действие избытка катехоламинов при стрессе закономерно сопровождается активацией клеточных регуляторных механизмов, ограничивающих адренергический эффект на сердце, а именно системы простагландинов [22], системы, ответственной за продукцию аденозина [16], антиоксидантных систем [11]. Постепенное увеличение активно-

сти этих систем в процессе адаптации животных к коротким стрессорным воздействиям могло быть причиной снижения адренореактивности сердца, доказанного нами в предыдущих исследованиях и играющего, по-видимому, важную роль в ограничении повреждающего действия катехоламинов при тяжелом и длительном ЭБС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Екимов Е. И., Малышев В. В. — В кн.: Совещание изобретателей и рационализаторов. Материалы. Иркутск, 1981, с. 8.
2. Кулдыбаев Г. А., Кареева Д. Н. — Здрав. охр. Казахстана, 1980, № 6, с. 37.
3. Малышев В. В. — В кн.: Всесоюзный биохимический съезд. 4-й. Тезисы. М., 1979, т. 3, с. 136.
4. Малышев В. В. — В кн.: Адаптация человека в различных климатогеографических и производственных условиях. Новосибирск, 1981, т. 2, с. 73.
5. Малышев В. В. — В кн.: Повреждение и регуляторные процессы организма. М., 1982, с. 140.
6. Малышев В. В., Екимов Е. И., Каменева Н. С. и др. — В кн.: Физиология экстремальных состояний и индивидуальная защита человека. М., 1982, с. 528.
7. Малышев В. В., Лифантьев В. И., Меерсон Ф. З. — Кардиология, 1982, № 6, с. 113.
8. Малышев В. В., Попова Н. С., Петрова В. А. — В кн.: Конференция рационализаторов и изобретателей. Тезисы. Иркутск, 1980, с. 68.
9. Манухин Б. И., Бердышева Л. В., Волина Е. В. — Вопр. мед. химии, 1975, № 3, с. 317.
10. Мухин Б. И., Павлова В. И., Путинцева Т. Г. и др. — Физиол. журн. СССР, 1981, № 8, с. 1182.
11. Меерсон Ф. З. Адаптация, стресс и профилактика. М., 1981.
12. Меерсон Ф. З., Каткова Л. С., Козлов Ю. И. и др. — Бюл. экспер. биол., 1983, № 12, с. 311.
13. Меерсон Ф. З., Лифшиц Р. И., Павлова В. И. и др. — Вопр. мед. химии, 1981, № 1, с. 35.
14. Меерсон Ф. З., Малышев В. В., Каган В. Е. и др. — Арх. пат., 1980, № 2, с. 9.
15. Bassett I. R., Cairncross K. D. — Pharmacol. Biochem. Behav., 1976, vol. 4, p. 35.
16. Dobson F. G. — Fed. Proc., 1980, vol. 39, p. 1173.
17. Keim L., Sigg E. — Pharmacol. Biochem. Behav., 1976, vol. 4, p. 289.
18. Kvetnansky R. — In: Catecholamines and Stress. New York, 1980, p. 7.
19. Desiderato O., McKinnon I., Hisson H. — J. comp. Physiol. Psychol., 1974, vol. 87, p. 208.
20. Mikulaj L., Kvetnansky R., Murgas K. — Rev. Csl. Med., 1974, vol. 20, p. 162.
21. Vassort G., Rougier O., Garnier D. et al. — Pflügers. Arch. ges. Physiol., 1969, Bd 309, S. 70—81.
22. Wennmalm A. — Prostaglandins, 1978, vol. 15, p. 113.

Поступила 12.10.84

ROLE OF BODY ADAPTATION TO SHORT-TERM STRESSORY ACTIONS IN REALIZATION OF STRESS-REACTION, IMPAIRMENTS OF METABOLISM AND THE HEART CONTRACTILE FUNCTION, CAUSED BY THE PROLONGED EMOTIONAL-PAINFUL STRESS

F. Z. Meerson, V. V. Malyshev, E. N. Ekimov,
V. A. Petrova, V. I. Lifan'ev

Institute of General Pathology and Pathophysiology, Academy of Medical Sciences of the

USSR, Moscow, Central Research Laboratory, Chair of Pharmacology, Medical School, Irkutsk

Adaptation of animals to short-term stressory actions was shown to prevent an excessive stimulation of adrenergic and hypophysis-adrenal system, impairments of oxidation and phosphorylation in heart muscle mitochondria as well as the contractile function of heart muscle, occurred after the prolonged emotional-painful stress.

УДК 616.36-002-092.9-07:616.36-008.931-02:615.322:577.117.2

М. А. Ташмухамедова, К. Т. Алматов, З. А. Хушбакова, В. Н. Сыров,
М. Б. Султанов

**ВЛИЯНИЕ ФИТОЭКДИСТЕРОИДОВ И СТЕРАНОБОЛОВ
НА АКТИВНОСТЬ И СТАБИЛЬНОСТЬ МЕМБРАННО-СВЯЗАННЫХ
ФЕРМЕНТОВ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГЕПАТИТЕ**

Институт химии растительных веществ АН Узбекской ССР, Ташкент

Ранее мы сообщали, что фитоэкдистерониды, выделенные из левзеи сафлоровидной и живучки туркестанской, оказывают положительное влияние на обменные процессы в печени млекопитающих [6], чем, по-видимому, объясняется их лечебный эффект при токсическом поражении этого органа [7]. Однако нельзя иметь полное представление о механизме гепатопротекторного действия фитоэкдистеронидов, не изучив их влияние на биоэнергетику клеток печени в условиях гепатита, характеризующегося прежде всего резкими изменениями функционирования митохондрий [2]. В настоящей работе приводятся результаты экспериментов, касающиеся действия экдистерона и туркестерона на активность и стабильность полиферментных систем мембран митохондрий печени крыс при введении им CCl_4 . Поскольку по многим параметрам биологической активности фитоэкдистерониды близки к препаратам анаболического типа действия [6], соответствующие исследования проводили в сравнении с анаболическим стероидным препаратом нероболом.

Методика

Опыты проводили на крысах-самцах массой 180—200 г. CCl_4 им вводили в виде 50 % масляного раствора из расчета 0,12 мл на 100 г массы тела 2 раза в неделю. Начиная с 21-го дня эксперимента наряду с CCl_4 животные получали orally экдистерон и туркестерон в дозе 5 мг/кг и неробол в дозе 10 мг/кг.

Через 15 дней после введения препаратов животных декапитировали. Митохондрии выделяли из печени в условиях, идентичных описанных ранее [5], и хранили в замороженном состоянии. Активность сукцинатоксидазы, цитохром С-оксидазы и НАД·Н-оксидазы измеряли полярографически [3]. Активность НАД·Н-оксидазы измеряли как в отсутствие, так и в присутствии 2 мкг ротенона (ротенон использовали для блокады внутреннего пути окисления НАД·Н₂). Активность НАД·Н-дегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы определяли спектрофотометрически [8]. При необходимости проводили тепловую обработку митохондрий при 36 °С в среде, содержащей 10 мМ трис-НСl pH 7,4 и 0,25 М сахарозы. Действие фосфолипазы А₂ и трипсина на активность ферментов изучали при 20 °С [3]. Белок определяли по [9].

Результаты и обсуждение

При гепатите, вызванном введением животным CCl_4 , в митохондриях печени происходят существенные изменения активности мембранно-связанных ферментов [2]. В наших экспериментах это проявлялось повышением активности сукцинатдегидрогеназы, сукцинатоксидазы, ротеноннечувствительной НАД·Н-оксидазы и НАД·Н-дегидрогеназы на 18—76 % (активность ротеноннечувствительной НАД·Н-оксидазной и цитохром С-оксидазной систем существенно не отличалась от нормы). У крыс, получавших одновременно с CCl_4 экдистерон, туркестерон и неробол, активность исследованных ферментов заметно отличалась от таковой в контроле (см. таблицу). Под действием экдистерона наблюдали либо

Влияние фотоэкдистероидов и неробола на активность полиферментных систем мембран митохондрий печени крыс с гепатитом ($n = 8-10$)

Фермент	Интakтные животные	Животные с развившимся гепатитом			
		контроль (без гормонов)	+экдистерон	+туркестерон	+неробол
Сукцинатдегидрогеназа	$29,0 \pm 1,3$	$34,4 \pm 1,5$ $P_1 < 0,02$	$33,3 \pm 1,3$ $P_2 > 0,5$	$36,4 \pm 1,6$ $P_2 > 0,25$	$42,2 \pm 2,0$ $P_2 < 0,01$
Сукцинатоксидаза	200 ± 25	260 ± 21 $P_1 > 0,05$	268 ± 27 $P_2 > 0,5$	400 ± 70 $P_2 > 0,05$	270 ± 20 $P_2 > 0,5$
НАД·Н-дегидрогеназа	$7,3 \pm 0,7$	$12,9 \pm 1,1$ $P_1 < 0,001$	$11,6 \pm 1,4$ $P_2 > 0,25$	$12,1 \pm 1,6$ $P_2 > 0,5$	$10,0 \pm 1,0$ $P_2 > 0,05$
Ротенончувствительная НАД·Н-оксидаза	$79,4 \pm 5,4$	$83,2 \pm 5,5$ $P_1 > 0,5$	$67,2 \pm 4,8$ $P_2 < 0,05$	$113,3 \pm 11,2$ $P_2 < 0,05$	$69,2 \pm 4,4$ $P_2 > 0,05$
Ротеноннечувствительная НАД·Н-оксидаза	$19,2 \pm 1,3$	$24,4 \pm 1,3$ $P_1 < 0,02$	$20,1 \pm 1,5$ $P_2 < 0,05$	$20,0 \pm 1,6$ $P_2 < 0,05$	$17,6 \pm 0,9$ $P_2 < 0,001$
Цитохром С-оксидаза	300 ± 27	291 ± 50 $P_1 > 0,5$	283 ± 24 $P_2 > 0,5$	284 ± 35 $P_2 > 0,5$	260 ± 26 $P_2 > 0,5$

Примечание. Активность оксидазы выражена в наноатомах O_2 в 1 мин на 1 мг белка, дегидрогеназы — в мкМ 2,6-дихлордифенилиндифенола в 1 мин на 1 мг белка митохондрий. P_1 дано по отношению к интактным животным, P_2 — по отношению к контролю без гормональных препаратов.

тенденцию к нормализации, либо полную нормализацию активности НАД·Н-дегидрогеназы, ротенончувствительной и ротеноннечувствительной НАД·Н-оксидазы. Туркестерон, нормализуя активность ротеноннечувствительной НАД·Н-оксидазы, способствовал также повышению активности сукцинатоксидазы и ротенончувствительной НАД·Н-оксидазы в 1,5 и 1,4 раза соответственно. Анаболический стероидный препарат неробол, понижая до уровня, свойственного интактным животным, активность НАД·Н-дегидрогеназной и НАД·Н-оксидазной систем дыхательной цепи митохондрий, способствовал более значительному, чем в контроле, повышению активности сукцинатдегидрогеназы и сукцинатоксидазы.

Повышение активности ряда полиферментных систем при токсическом поражении печени, а также разнонаправленное влияние на них фотоэкдистероидов и неробола, по-видимому, отражают целый комплекс взаимодействий, происходящих в гепатоцитах в условиях проводимого эксперимента, включающих в себя, с одной стороны, повреждение мембран и улучшение доступа субстрата к активному центру полиферментной системы [3, 5], а с другой — мембраностабилизирующее действие исследуемых препаратов,

особенно фотоэкдистероидов [4], а также их анаболическую активность [6]. Поэтому оценка состояния митохондрий путем измерения только активности полиферментных систем не может быть в данном случае достаточным критерием определения ни тяжести патологического процесса, ни эффективности используемых при нем фотоэкдистероидов и неробола.

Более полная информация о состоянии мембран митохондрий может быть получена лишь при изучении их деградации под влиянием различных внешних факторов (воздействие тепла или контролируемых количеств экзогенных литических ферментов) [1, 3, 5]. Проведенные в этом направлении эксперименты показали, что кинетические изменения мембранно-связанных ферментов митохондрий печени леченых животных при воздействии теплового фактора заметно отличаются от таковых у нелеченых и приближаются к показателям, свойственным интактным крысам. Так, на рис. 1 показано, что оксидазы и дегидрогеназы внутренней мембраны митохондрий печени крыс с развившимся гепатитом теряют свою активность с большой скоростью, тогда как эти системы у крыс, получавших исследуемые гормональные препараты, становятся довольно устойчивыми к действию тепла. При этом при

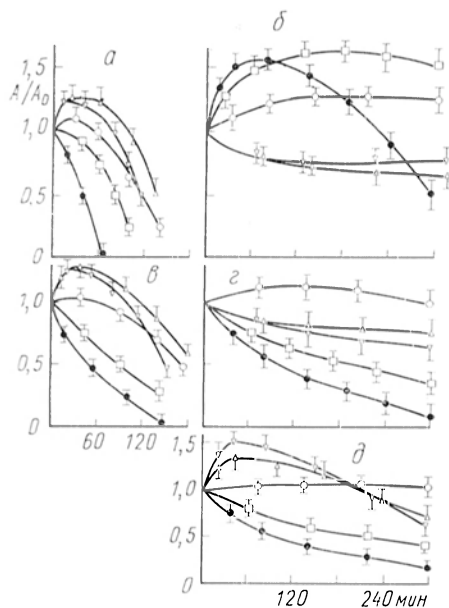


Рис. 1. Влияние фитоэкдистероидов и неробола на термостабильность (36°C) полиферментных систем мембран митохондрий печени при гепатите.

а — ротеиночувствительная НАД·Н-оксидаза; б — НАД·Н-дегидрогеназа; в — сукцинатоксидаза; г — сукцинатдегидрогеназа; д — цитохром С-оксидаза. Светлые кружки — норма (интактные); темные кружки — гепатит (без гормонов); треугольники острием вверх — гепатит + экдистерон; треугольники острием вниз — гепатит + туркестерон; квадраты — гепатит + неробол. A_0 — активность до инкубации; A/A_0 — относительная активность.

выдерживании митохондрий печени животных, подвергнутых воздействию фитоэкдистероидов, при 36°C отмечена выраженная фаза активации оксидазных систем, а у животных, получавших неробол, аналогичные явления наблюдали только в отношении НАД·Н-дегидрогеназы.

При расчете полупериода инактивации НАД·Н-оксидазных систем митохондрий, выделенных из печени контрольных животных, было установлено, что оно составляет всего лишь 40 мин (в норме полупериод инактивации равен 115 мин). У животных с патологией печени, получавших экдистерон, туркестерон и неробол, это время составляло 130, 115 и 80 мин соответственно. Аналогичные закономерности отмечены и для других оксидазных и дегидрогеназных систем дыхательной цепи митохондрий.

Известно, что одной из причин повышенной стабильности мембраносвязанных ферментов к воздействию тепла является прочная взаимосвязь

между фосфолипидами белками мембран, что обычно выражается в их трудной доступности энзиматической атаке контролируемых количеств фосфолипаз и протеаз [1—3, 5]. Именно такое явление обнаружено нами при оценке состояния структуры мембран митохондрий печени животных, леченных исследуемыми препаратами. Об этом свидетельствуют результаты, полученные в опытах с фосфолипазой A_2 и трипсином при их действии на изолированные митохондрии из печени контрольных и подопытных крыс. Как видно из рис. 2, активность НАД·Н-дегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы при инкубации митохондрий печени леченых животных с фосфолипазой A_2 за одно и то же время снижается в меньшей мере, чем у нелеченых крыс. Так, если активность НАД·Н-дегидрогеназы митохондрий печени контрольных крыс под действием фосфолипазы A_2 уменьшалась в 2 раза в течение 20 мин инкубации, то у животных, получавших на фоне гепатита экдистерон, туркестерон и неробол, это время удлинялось до 50, 60 и 86 мин соответственно (в норме 75 мин). Через 40 мин инкубации НАД·Н-дегидрогеназа митохондрий печени нелеченных животных теряла 60 % своей активности, экдистерон препятствовал этим

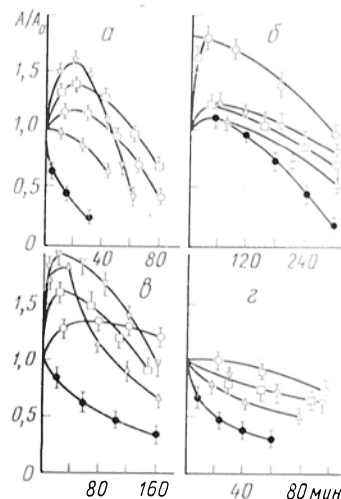


Рис. 2. Влияние фосфолипазы A_2 (а, б) и трипсина (в, г) на активность НАД·Н-дегидрогеназы (а, в) и сукцинатдегидрогеназы (б, г) митохондрий печени.

Фосфолипаза A_2 по 0,05 мкг/мг белка, трипсин по 130 мкг/мг белка митохондрий. Температура инкубации 20°C. A_0 — активность дегидрогеназы до, A — после добавления литических ферментов. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

изменениям, а туркестерон и неробол действовали даже эффективнее на активность НАД·Н-дегидрогеназы по сравнению с ее первоначальным уровнем. Что касается сукцинатдегидрогеназы, то, как и в первом случае, при инкубации митохондрий первоначальная фаза активации сменялась ингибированием ее активности, причем с наиболее высокой скоростью это происходило в митохондриях печени леченных животных. Так, если активность этого фермента в митохондриях печени контрольных животных в присутствии фосфолипазы A_2 уменьшалась в 2 раза через 230 мин инкубации, то у крыс, получавших экдистерон, туркестерон и неробол, полупериод инактивации равнялся 320, 430 и 360 мин соответственно (в норме 440 мин).

Аналогичные данные были получены и с протеолитическим ферментом трипсином (см. рис. 2).

Таким образом, введение крысам с экспериментальным гепатитом как фитозекдистерондов, так и анаболического стероидного препарата неробола вызывало определенную перестройку активности полиферментных систем мембран митохондрий печени (с полной нормализацией некоторых из них), повышение их стабильности и устойчивости к действию экзогенных факторов, способствующих деградации митохондрий (воздействие тепла, литических ферментов). Эти изменения, обусловленные установлением прочной взаимосвязи в структурном сопряжении между фосфолипидами и белками внутренней мембраны митохондрий, способствуют нормализации всей дыхательной цепи и внешнего пути переноса электронов в гепатоцитах крыс, которым вводили CCl_4 .

ЛИТЕРАТУРА

1. Агзамов Х., Алматов К. Т., Гулямов Т. Д., Рахимов М. М. — *Вопр. мед. химии*, 1981, № 5, с. 658—662.
2. Алматов К. Т., Рахимов М. М. — Там же, 1978, № 6, с. 740—747.
3. Алматов К. Т., Агзамов Х., Рахимов М. М., Туракулов Я. Х. — Там же, 1982, № 4, с. 50—56.
4. Гримова Т. А., Прусаченко В. К., Яцюк П. К. — В кн.: *Фармакологическая коррекция кровоснабжения, метаболизма и жизнеспособности ишемизированного миокарда*. Воронеж, 1977, с. 66—68.
5. Рахимов М. М., Алматов К. Т. — *Биохимия*, 1977, т. 42, № 10, с. 1852—1863.
6. Сыров В. Н. Сравнительное изучение анаболической активности фитозекдистеронов, их 6-кетоаналогов и неробола в организме экспериментальных животных. Автореф. дис. канд. мед. наук. Ташкент, 1979.
7. Сыров В. Н., Мельникова Е. В., Султанов М. Б. — Докл. АН УзССР, 1981, № 5, с. 36—38.
8. King T. E. — *Meth. Enzymol.*, 1967, vol. 10, p. 322.
9. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. — *J. biol. Chem.*, 1951, vol. 193, p. 265—275.

Поступила 20.10.81

EFFECT OF PHYTOECDISTEROIDS AND STERANOBOLS ON ACTIVITY AND STABILITY OF MEMBRANE-BOUND ENZYMES IN LIVER MITOCHONDRIA UNDER CONDITIONS OF EXPERIMENTAL HEPATITIS

M. A. Tashmukhamedova, K. T. Almatov,
Z. A. Khushbaktova, V. N. Syrov,
M. B. Sultanov

Institute of Chemistry of Plant Substances,
Academy of Sciences of the Uzbek SSR, Tashkent

After administration of phytoecdisteroids (ecdisterone, turkesterone) at a dose of 5 mg/kg and the anabolic steroid preparation nerobol at a dose of 10 mg/kg into rats with experimental hepatitis caused by CCl_4 poisoning, positive alterations were found in activity of the polyenzymatic systems in membranes of liver mitochondria simultaneously with an increase in their stability and resistance to the effect of exogenous factors producing the mitochondria degradation (controlled heating, treatment with phospholipase A_2 or trypsin). These alterations, which appear to occur due to development of strong binds between phospholipids and proteins of inner mitochondrial membrane, promoted normalization of the respiratory chain and the outer pathway of electron transport in hepatocytes of rats with hepatitis.

В. В. Просвирнин, Н. М. Мартынюк, И. Ф. Паскевич

БИОСИНТЕЗ БЕЛКОВ В РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНАХ БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПЕРИТОНИТЕ

Кафедра биохимии Харьковского медицинского института

Проблема острого гнойного перитонита брюшной полости является одной из ведущих в современной хирургии ввиду как частоты данного заболевания, так и трудностей, связанных с его предупреждением [7, 10]. Биохимические аспекты возникновения и течения перитонита во многом остаются невыясненными, хотя очевидно, что их изучение может способствовать разработке целенаправленных патогенетических методов лечения этого заболевания. Особое значение для понимания механизма развития и лечения перитонита имеет изучение состояния белоксинтезирующего аппарата в функционально различных органах и тканях.

Ранее нами было показано [4—6], что при перитоните брюшной полости в печени и селезенке белых крыс происходят значительные нарушения биосинтеза и процессинга различных классов РНК, особенно выраженные для про-мРНК и мРНК и в меньшей степени — для тРНК и рРНК. В связи с этим представляло интерес в аналогичных условиях изучить синтез белков и состояние полисом, что дало бы возможность сравнить характер изменений биосинтеза РНК и белков в процессе развития заболевания.

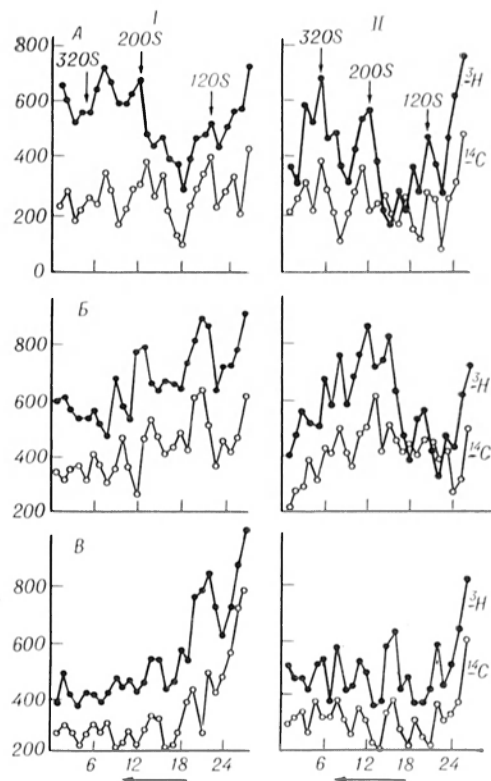
Методика

Опыты проведены на годовалых крысах-самках линии Вистар. Исследовали печень и селезенку в сроки 6, 12, 24 и 48 ч после развития перитонита. Методика экспериментального гнойного перитонита, обоснование выбора сроков и органов для исследований описаны ранее [4—6].

В качестве меченых предшественников использовали ^{14}C -белковый гидролизат хлореллы (удельная радиоактивность 37 МБк/г, ЧССР), который вводили внутривентриально в количестве 1,85 МБк за 1 ч до забоя, и ^3H -оротовую кислоту (удельная радиоактивность 899 МБк/мМ, ЧССР), которую вводили внутривентриально в количестве 3,7 МБк за 1 ч до забоя. Выделение полисом, ультрацентрифугирование их в градиенте концентрации сахарозы и определение констант седиментации проводили по методу [8], выделение белков и изучение фонда предшественников — по методу [3]. Количество белка определяли по Лоури [11], удельную радиоактивность — на счетчике «Ультра-бета» (Швеция) в толуольном эцинтиляторе по методу [6].

Результаты и обсуждение

Поскольку важным компонентом белоксинтезирующей системы являются полисомы, мы исследовали их, используя двойную метку: по ^{14}C - и ^3H -предшественникам (см. рисунок). Из полученных данных видно, что полисомы печени и селезенки нормальных животных представлены довольно гетерогенным материалом с константами седиментации до 320—350S. Через 6 ч после начала перитонита седиментационный профиль изменяется незначительно: в селезенке увеличивается радиоактивность преимущественно в зоне 180—320S, а в печени отмечается син-



Центрифугирование в градиенте концентрации сахарозы полисом печени (I) и селезенки (II) нормальных и подопытных животных.

A — контроль, B — 6 ч, B — 48 ч после перитонита. По оси ординат — имп/мин/проба; по оси абсцисс — номера проб. Условия центрифугирования: градиент сахарозы 5—20 %, ротор SW-25 (MSE), 2,5 ч при 4 °C. Стрелкой указано направление седиментации.

жение включения метки в зоне «тяжелых» полисом и возрастание ее в области 120—200S. Через 48 ч в обоих органах наблюдаются значительное снижение удельной радиоактивности и деградация полисомного материала (см. рисунок, В). На основании сравнения синтеза мРНК [3—5] и полисомного спектра, приведенного выше, можно полагать, что одной из причин изменения полисом является нарушение способности мРНК связываться с рибосомами. Это предположение вытекает из результатов изучения включения меченых предшественников в белки и нуклеиновые кислоты полисом: удельная радиоактивность полисом при применении ^{14}C -белкового гидролизата изменяется в меньшей степени, чем при использовании в качестве меченого предшественника ^3H -оротовой кислоты (см. рисунок). Следовательно, важным фактором, определяющим изменение активности белоксинтезирующего аппарата, может быть не столько нарушение синтеза и процессинга мРНК, приводящее к уменьшению валового количества транскрипта, сколько его структурные и физико-химические изменения, приводящие к нарушению образования активных полисомных комплексов. Аналогичные результаты получены и при других видах экстремальных воздействий на организм [2, 3, 9].

Одновременное изучение синтеза белков в обоих органах при аналогичных экспериментальных условиях показало, что через 6 ч после начала перитонита происходит резкое угнетение включения меченых предшественников в белки, сохраняющееся в течение всего периода наблюдений (48 ч; см. таблицу).

Удельная радиоактивность белков печени и селезенки экспериментальных животных (в имп/мин/мг)

Время опыта, ч	Печень	Селезенка
6	975±95	339±27
12	954±261	716±118
24	1126±172	890±138
48	662±118	981±124
Контроль	2960±250	2410±105

Примечание. Каждая величина — среднее из результатов 4 опытов. В качестве контроля использовали интактных животных.

При изучении синтеза про-мРНК и мРНК в аналогичных экспериментальных условиях [4—6] было показано, что в печени их биосинтез угнетается особенно сильно, начиная с 24 ч, а в селезенке, напротив, в начальный период развития перитонита (6—12 ч) наблюдалась активация процессов транскрипции и лишь в дальнейшем (24—48 ч) происходило угнетение включения меченых предшественников в мРНК. Синтез тРНК и рРНК в обоих органах изменялся незначительно. Из приведенных выше результатов исследования полисом видно, что они в основном отражали картину синтеза РНК, тогда как синтез белков в указанных органах при перитоните значительно подавлялся. С чем могут быть связаны различия синтеза мРНК и белков? Одним из факторов, существенно влияющих на процессы биосинтеза, является состояние фонда предшественников: аминокислот и аминоацил-тРНК. Нами показано, что в печени содержание предшественников синтеза белков уменьшается примерно на 20 % в различные сроки развития перитонита. В селезенке уровень аминокислот снижается на 30—40 % в первые часы (6—12 ч) после начала перитонита, а в дальнейшем (24—48 ч) лишь незначительно отличается от контроля. Следовательно, можно полагать, что изменения фонда аминокислот вносят определенный, но не решающий вклад в нарушение синтеза белков. Как известно [7, 10], развитие перитонита характеризуется быстрой интоксикацией организма, приводящей к подавлению тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования, что в свою очередь является одной из причин угнетения биосинтетических реакций. Одновременно происходит нарушение структурной целостности лизосом, результатом чего является высвобождение протеаз и усиление внутриклеточного протеолиза [10]. В связи с этим возможно, что более важное значение в нарушении биосинтеза белка при перитоните имеют такие факторы, как нарушение энергообеспечения и активация внутриклеточных протеаз. О правомочности этого предположения свидетельствуют результаты проведенного нами исследования количественного содержания белков в указанных органах: в начальный период развития перитони-

та (6—12 ч) этот показатель изменяется незначительно, однако в дальнейшем (24—48 ч) содержание белков снижается более заметно, достигая 60—70 % от контроля.

Тот факт, что максимальное угнетение синтеза белков наблюдается в наиболее раннем периоде развития заболевания (6 ч) можно, очевидно, объяснить, исходя из блочного принципа регуляции метаболизма [9]. Согласно этому принципу в экстремальных условиях в клетках происходит быстрое адаптивное переключение многих биохимических процессов, направленное на восстановление ключевых реакций метаболизма. В частности, как показано при введении сублетальных доз циклогексамида [9], регуляция синтеза белка осуществляется не на уровне отдельных генов, а единым сигналом для группы (блока) генов, объединенных функционально, в результате чего происходят перестройка трансляционного аппарата и перепрограммирование его на синтез в первую очередь белков, необходимых или способствующих восстановлению гомеостаза. Отражением этих реакций и является, по всей вероятности, обнаруженная нами картина нарушений биосинтеза, характерная, кстати, и для других экстремальных состояний организма [1, 2, 4, 8].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что развитие перитонита приводит к быстрому нарушению биосинтеза белков и нуклеиновых кислот, что наряду с изменениями других биохимических процессов [7, 10] является причиной гибели животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Галкин А. П., Столяров И. В., Паскевич И. Ф., Тодоров И. И. — Докл. АН УССР, 1975, № 6, с. 528—531.

2. Лиходед В. С., Паскевич И. Ф. — Радиобиология, 1972, т. 12, с. 592—595.
3. Паскевич И. Ф. Молекулярные механизмы регуляции процессов транскрипции генетической информации в органах облученных животных. Автореф. дис. докт. биол. наук. Л., 1974.
4. Пастернак Е. В., Просвирнин В. В. — В кн.: Ядерные белки и экспрессия генома. Киев, 1983, с. 67.
5. Пастернак Е. В., Просвирнин В. В., Паскевич И. Ф. — В кн.: Биохимические механизмы регуляции генетической активности. Киев, 1984, с. 101—102.
6. Пастернак Е. В., Просвирнин В. В., Паскевич И. Ф. — Вопр. мед. химии, 1984, № 2, с. 57—60.
7. Савчук Б. Д. Гнойный перитонит. М., 1979.
8. Тодоров И. И. Исследование субклеточных и молекулярных изменений биосинтеза рибонуклеиновых кислот и белков на ранних этапах острого лучевого поражения организма. Автореф. дис. докт. мед. наук. Киев, 1969.
9. Тодоров И. И. — В кн.: Биохимические механизмы регуляции генетической активности. Киев, 1984, с. 136—137.
10. Шалимов А. А., Шапошников В. И., Пинчук М. И. Острый перитонит. Киев, 1981.
11. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. — J. biol. Chem., 1951, vol. 193, p. 265—271.

Поступила 23.10.84

PROTEIN BIOSYNTHESIS IN VARIOUS TISSUES OF RATS WITH EXPERIMENTAL PERITONITIS

V. V. Prosvirnin, N. M. Martynyuk,
I. F. Paskevich

Chair of Biochemistry, Medical School, Kharkov

Protein biosynthesis and the state of polyosomes were studied in rat liver and spleen tissues under conditions of acute purulent peritonitis of abdominal cavity. In the both tissues studied synthesis of proteins was markedly inhibited at the initial period of the peritonitis development within 6 hrs, these patterns were further increased within 12-48 hrs but they remained lower the control values. The structure-functional impairments of polyosomes were most distinct within 24-48 hrs after the disease beginning.

УДК 616.71-007.2-053.1-02:616-008.939.631-055.5/.7-07:616.633.963.1-074

О. Н. Одинокова, М. А. Бялик, К. Д. Краснопольская, С. А. Яковлев

ХАРАКТЕРИСТИКА ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ И ЭКСКРЕТИРУЕМЫХ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ ПРИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ МУКОПОЛИСАХАРИДОЗАХ

Институт медицинской генетики АМН СССР, Москва

Мукополисахаридозы (МПС) — группа моногенно наследующихся дефектов внутрилизосомной деградации

гликозаминногликанов (ГАГ) [1, 11]. Причиной этих тяжелых заболеваний, включающих более 10 нозологических

единиц и характеризующихся поражением скелета, интеллекта, внутренних органов и органов чувств, является мутационное нарушение функции лизосомных ферментов (экзогликозидаз, сульфатаз). Для оказания медико-генетической помощи семьям, в которых встречаются МПС, была разработана программа их биохимической диагностики и организован рабочий семинар по методам их первичного выявления для врачей-биохимиков медико-генетических кабинетов страны [3]. За 2,5 года, прошедших после семинара, диагноз МПС, включая идентификацию пазологических единиц, был поставлен 66 больным из 58 семей. В серии статей предполагается дать сравнительную характеристику биохимических фенотипов различных МПС. Биохимическим маркером МПС являются внутриклеточное накопление и гиперэкскреция ГАГ. В связи с выраженным клиническим полиморфизмом, генетической гетерогенностью МПС и наличием их генокопий идентификация и характеристика этого маркера являются необходимым звеном в диагностике МПС. Для этой цели используются довольно широкий спектр биохимических методов, каждый из которых в отдельности не обеспечивает необходимой точности или полноты характеристики маркера. В данной работе представлены результаты исследования внутриклеточных и экскретируемых ГАГ при разных типах МПС с помощью широкого спектра методов и оценивается информативность последних.

Методика

Материалом для исследования были: 1) образцы мочи (суточной и полученной в период от 9 до 18 ч, когда экскреция креатинина не изменяется) больных МПС, обратившихся в Центр по медико-генетическому консультированию Института медицинской генетики АМН СССР; 2) образцы мочи, полученные в сроки от 9 до 18 ч в контрольной группе ($n=172$), состоящей из здоровых школьников, детей из комбината ясли—сад и поворожденных; 3) культуры кожных фибробластов от здоровых лиц и больных МПС, выращенные в культуральных сосудах на 100 мл [2]. В работе использовали стандарты ГАГ фирмы «Seikagaku»; стандарт гепарансульфата был приготовлен из мочи больного с МПС III A путем преципитации ГАГ цетилапиридинийхлоридом (ЦПХ) и последующего переваривания хондритиназой ABC (фирма «Seikagaku»).

Исследование экскретируемых ГАГ. Полуколичественный нефелометрический скрининг-

тест на гиперэкскрецию ГАГ и осаждение ГАГ 10 % раствором ЦПХ осуществляли по методу [13]. Диализ образцов мочи против дистиллированной воды проводили в течение 18 ч. Количественное определение ГАГ по содержанию уроновых кислот и гексоз осуществляли стандартными методами [4]. Величины соотношения высокомолекулярные (ВМ)/низкомолекулярные (НМ) ГАГ определяли методами последовательной ионообменной колонной хроматографии на эктола-целлюлозе и Дауэкс 1×2, Cl^- , 200—400 меш (фирма «Serva», ФРГ) [8]. Электрофоретическое фракционирование ГАГ осуществляли на ацетат-целлюлозных пленках (целлогель, фирма «Serva», ФРГ) в 0,1 М $\text{Ba}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ и в системе 0,1 М пиридин—0,47 М муравьиная кислота, pH 3,0 при силе тока 8 мА и напряжении 100 В в течение 2 ч. ГАГ выделяли путем осаждения ЦПХ [9] и перерастворяли в 200—500 мкл воды. На пленку наносили 1—5 мкл образца полосой 5 мм. Фракции ГАГ окрашивали 0,1 % раствором ализанового синего в 0,2 % CH_3COOH . После окраски в течение 30 мин пленки отмывали водой до получения светло-голубого фона. Результат оценивали визуально или путем денситометрии на спектрофотометре «Gilford 250» при $\lambda=600$ нм. Для количественного фракционирования ГАГ использовали принцип метода [6], разработанного для количественного определения стандартов ГАГ. После электрофоретического разделения ГАГ на ацетат-целлюлозных пленках их окрашивали 30 мин в 0,2 % растворе ализанового синего, содержащем 10 % этанола, 0,1 % уксусной кислоты и 0,03 М MgCl_2 . Избыток неспецифически связавшейся краски отмывали. Каждую окрашенную фракцию вырезали в виде полоски 4×7 см; в качестве контроля использовали соответствующие полоски окрашенной пленки в анодной зоне. Вырезанные полоски высушивали на воздухе, растворяли в 1 мл диметилсульфоксида, содержащего 5 мкл концентрированной H_2SO_4 , при 37 °C в течение 30 мин. Содержание индивидуальных ГАГ оценивали по калибровочной кривой для стандартных растворов хондритинсульфата (ХС) и гепарансульфата (ГС) в диапазоне концентраций 0,1—1,5 мг/мл.

Исследование внутриклеточных ГАГ. Монослой фибробластов промывали двукратно физиологическим раствором, затем обрабатывали для удаления перичеселлярных ГАГ 0,25 % раствором трипсина 15 мин при 37 °C. Трипсин инактивировали добавлением 1 мл физиологического раствора, содержащего 5 % сыворотки крупного рогатого скота. Клетки собирали центрифугированием (200 g, 10 мин), дважды отмывали и суспендировали в 1 мл физиологического раствора, разрушали пятикратным замораживанием—оттаиванием в смеси сухой лед—ацетон. Белки клеточного гомогената переваривали папаином (100 мкг папаина в 1 мл 0,2 М ацетатного буфера pH 5,5, содержащего 20 мМ ЭДТА и 20 мМ β-меркаптоэтанол, 18 ч при 60 °C). После центрифугирования (200 g, 10 мин) ГАГ из надосадочной жидкости осаждали 0,2 % раствором ЦПХ, содержащим не менее 20 мМ NaCl (18 ч при 4 °C). Собранный центрифугированием осадок (25 000 g 20 мин при 4 °C) перерастворяли в 1 мл 2 М NaCl и пересаждали 5 мл абсолютного этанола (4 ч при 4 °C). Осадок последовательно отмывали центрифугированием в 5 мл 80 % этанола и 5 мл эфи-

Количественная характеристика экскретируемых ГАГ в возрастных группах

Возраст обследованных, годы	Число обследованных	Единиц ЦПХ/г креатинина (тест с ЦПХ)	Осаждаемые ЦПХ ГАГ		Недизализуемые ГАГ	
			К	А	К	А
Новорожденные	14	30±91 (433—150)	67,0±19,5 (84—31)	95,0±46,0 (160—36)	62,0±13,6 (75—40)	91,2±29,0 (114—59)
1—2	13	166±48 (255—107)	27,9±5,4 (36—16)	36,1±17,4 (79—12)	62,3±18,1 (79—39)	105,2±26,1 (150—70)
2—3	18	151±38 (232±89)	26,5±4,0 (33—19)	29,2±9,1 (50—18)	63,0±13,4 (78—39)	96,0±31,9 (165—40)
3—4	25	139±67 (230—51)	25,3±3,7 (30—19)	24,0±6,8 (41—18)	57,5±15,0 (77—30)	76,9±25,0 (122—41)
4—5	30	128±44 (212—60)	22,2±3,4 (28—17)	21,9±3,9 (28—12)	57,0±9,1 (69—36)	58,8±21,5 (102—28)
5—6	20	99±49 (175—57)	19,2±3,2 (22—13)	15,6±5,0 (24—9)	54,1±5,2 (62—34)	50,5±5,9 (63—41)
6—7	28	89±32 (140—53)	17,3±3,1 (22—13)	16,2±2,2 (22—14)	52,1±7,3 (60—42)	47,4±5,1 (53—40)
7—9	16	88±39 (145—30)	12,6±3,9 (22—7)	19,6±4,2 (25—8)	33,4±9,6 (50—20)	55,1±10,9 (70—33)
9—12	8	55±9 (106—25)	10,0±1,2 (17—5)	17,0±1,2 (24—13)	29,0±1,4 (40—15)	40,0±1,7 (50—36)

Примечание. Здесь и в табл. 2: К — карбазоловая реакция — отношение уроновых кислот (в мг) к креатинину (в г); А — антроповая реакция — отношение гекеоз (в мг) к креатинину (в г). Цифры в скобках — пределы колебаний.

ра и перерастворяли в 50 мкл дистиллированной воды. Условия электрофореза и окраски фореграмм идентичны таковым для экскретируемых ГАГ.

Результаты

Для установления гиперэкскреции ГАГ использовали полуколичественный нефелометрический скрининг-тест (тест с ЦПХ). О количестве экскретируемых ГАГ судили по содержанию уроновых кислот и гекеоз, используя различные методы выделения или очистки ГАГ мочи от мешающих измерению веществ, а именно: осаждение ЦПХ и диализ. Использование двух этих процедур основывалось на литературных данных, согласно которым осаждение ЦПХ и диализ позволяют измерять лишь частично перекрывающиеся фракции экскретируемых ГАГ в норме, причем соотношение этих фракций при МПС изменяется [13]. Изменение молекулярной массы экскретируемых ГАГ при МПС [8] обусловило включение параметра соотношение ВМ/НМ ГАГ в программу исследования экскретируемых ГАГ. Поскольку экскреция ГАГ является величиной, зависимой от возраста [17], исследовали нормальные уровни экскретируемых ГАГ по всем параметрам программ в разных возрастных группах, соответствующих возрасту боль-

ных МПС, обращавшихся в Центр по медико-генетическому консультированию (табл. 1). Анализ данных этой таблицы выявляет широкий разброс результатов исследований, проводимых при помощи теста с ЦПХ во всех возрастных группах. При этом следует подчеркнуть, что тест с ЦПХ является лучшим из всех «просеивающих» тестов на МПС, так как он дает только 5 % ложноположительных результатов и не дает ложноотрицательных [13]. Автор метода предлагает пользоваться максимальными значениями, полученными в каждой возрастной группе; им была показана динамика снижения этих показателей с возрастом. Результаты количественного определения экскретируемых ГАГ характеризуются меньшим разбросом данных в возрастных группах и наряду с применением теста с ЦПХ имеют тенденцию к снижению с возрастом. Соотношение ВМ/НМ ГАГ не зависело от возраста и колебалось в пределах от 0,32 до 0,77, составляя в среднем $0,61 \pm 0,05$. В табл. 2 представлены результаты исследования экскретируемых ГАГ по той же программе у больных с разными типами МПС, выраженные в единицах стандартного отклонения для возрастной группы, к которой принадлежит больной [14]. Эта стандартизация позволила ниве-

Характеристика экскретируемых ГАГ при МПС

Тип МПС	Число обследо- ванных	Тест с ЦПХ	Осаждаемые ЦПХ ГАГ		Недиализуемые ГАГ	
			К	А	К	А
I Г	6	8,4±1,2 (3,6—12,3)	81,2±14,8 (40,7—137,4)		28,8±5,8 (10,6—43,1)	
I Г/III	3	5,2±1,3 (2,7—6,8)	18,8±4,5 (10,0—25,0)		6,7±1,2 (4,9±9,0)	
II/т. ф.	7	9,1±1,6 (2,1—14,1)	55,3±5,0 (25,9—129,6)		22,4±4,8 (12,6—49,8)	
II/п. ф.	7	6,8±1,2 (1,6—11,6)	26,0±5,8 (14,7—57,8)		11,2±3,3 (3,4—26,1)	
III А	9	4,1±0,5 (1,8—6,5)	19,9±2,6 (11,1—31,5)		9,9±1,3 (7,5—15,7)	
III В	4	4,6±1,5 (2,2—8,5)	8,7±2,2 (3,2—14,1)		4,3±2,2 (0,7—10,4)	
IV А	4	3,1±0,8 (0,7—4,5)	3,1±1,1 (1,5—5,2)	16,8±7,1 (4,5—35,8)	1,7±1,1 (0,1—4,9)	13,2±1,8 (10,1—17,8)
IV В	1	0,7	0,4	3,6	5,4	7,3
VI	1	8,1	20,3		4,4	

Примечание. Г — МПС I, тип Гурлер; Г/III — МПС I, тип Гурлер — Шейе; т. ф. — тяжелая форма; п. ф. — промежуточная форма. Классификация МПС дана по [10].

лизовать вклад возрастных различий и оценить синдромальный вклад в результаты измерения всех определяемых параметров. Анализ данных табл. 2 показывает, что все диагностированные типы МПС характеризовались гиперэкскрецией ГАГ (все значения положительные). Степень гиперэкскреции варьирует широко как в пределах отдельных синдромов, так и между ними, что соответствует литературным данным [5]. В количественном отношении гиперэкскреция ГАГ при МПС I и II превышает таковую при МПС III и IV. При МПС IV экскреция ГАГ, оцененная с помощью теста с ЦПХ, вообще оказалась в пределах нормы у некоторых больных, что было описано в литературе [11]. Для всех диагностированных типов МПС количественное определение осаждаемых ЦПХ ГАГ по содержанию уроновых кислот, а для МПС IV А и В по содержанию гексоз даст наиболее отчетливые результаты как по сравнению с нормой, так между типами и в пределах типа (МПС I, II, III, IV). Это свидетельствует о преимущественной гиперэкскреции ВМ/ГАГ при МПС. Действительно, соотношение ВМНМ ГАГ при МПС составило $1,55 \pm 0,14$ при разнице колебаний от 1,0 до 2,8. Обращает на себя внимание тот факт, что соотношение осаждаемых ЦПХ и недиаализуемых ГАГ при МПС изменяется по сравнению с тако-

вым в норме в сторону преобладания осаднения ЦПХ ГАГ. Количественное выражение осаждаемых ЦПХ и недиаализуемых ГАГ в единицах стандартного отклонения соответствующих возрастных групп позволяет различать легкие и тяжелые формы МПС I и II, а также дифференцировать МПС III А и В. Средние значения этих показателей примерно в 2 раза выше при тяжелых формах МПС I и II, чем при легких, а также при МПС III А по сравнению с МПС III В, однако индивидуальные показатели в сравниваемых группах частично перекрываются. Различия в количестве выявленных больных с разными типами МПС ограничивают пока возможность более детального межлокусного анализа количественных параметров экскретируемых ГАГ.

Кроме количественной оценки экскретируемых ГАГ и их характеристики по молекулярной массе, большое значение для дифференциальной диагностики МПС имеет исследование состава экскретируемых ГАГ. Для этих исследований мы использовали электрофорез на ацетат-целлюлозных пленках ГАГ, выделенных осаждением ЦПХ из мочи и фибробластов. На рис. 1, см. вклейку представлены результаты электрофоретического фракционирования экскретируемых и внутриклеточных ГАГ. Как можно видеть, основные, значимые для дифференци-

альной диагностики МПС ГАГ хорошо разделяются в 0,1 М ацетате бария. Исключение составляет кератансульфат, гиперэкскретируемый при МПС IV А и В, поскольку он не содержит в своей полимерной гетеросахаридной цепи гексуроновых кислот, с которыми преимущественно взаимодействует $\text{Ba}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ [7]. Для идентификации экскретируемого кератансульфата электрофоретическое разделение ГАГ проводили в системе 0,1 М пиридин — 0,47 М муравьиная кислота, рН 3,0 (см. рис. 1, В). В норме с мочой экскретируется ХС и следовые количества ГС, тогда как с мочой больных МПС в зависимости от типа экскретируются дерматансульфат (МПС VI), ГС (МПС III), кератансульфат (МПС IV) или дерматансульфат в сочетании с ГС (МПС I, II, VII). Спектры внутриклеточных ГАГ соответствуют спектрам экскретируемых при МПС, за исключением МПС IV, так как кератансульфат не синтезируется фибробластами.

Для исследования экскретируемых или внутриклеточных ГАГ мы применили метод [6], разработанный для количественной оценки стандартных растворов ГАГ. Метод основан на спектрофотометрическом измерении концентрации альцианового синего, связавшегося с индивидуальными ГАГ, после разрушения комплекса краситель — ГАГ диметилсульфоксидом. Для корректного применения этого метода необходимо было добиться того,

Таблица 3
Фракционирование экскретируемых ГАГ при синдроме Санфилиппо

Тип МПС и больные	ГАГ (ХС+ГС) (в мг)/крема- тиниин, (в г)	ГС, %	ХС, %
III А:			
К.	85,8	71,1	28,9
Г. С.	161,1	50,7	49,3
З.	265,2	70,0	30,0
Ф.	111,3	62,5	37,5
Д.	75,9	64,8	35,2
А.	191,4	60,7	39,3
Ш.	174,0	51,9	48,1
В.	254,4	56,7	43,3
III В:			
Г. К.	87,9	61,0	39,0
М.	157,2	68,1	31,9
Ш.	225,9	67,2	32,8
Норма (n = 10)	24,0—34,2	0—10	30—100

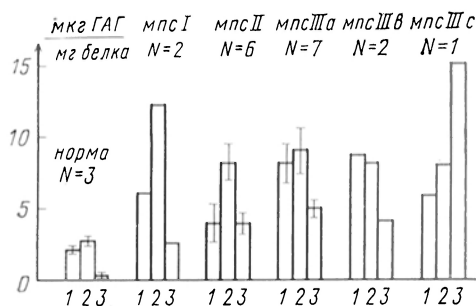


Рис. 2. Фракционирование внутриклеточных ГАГ.

1 — ХС; 2 — дерматансульфат; 3 — ГС.

чтобы никаких существенных количеств ГАГ не оставалось на стартовой линии. Из ряда применявшихся методов только метод, описанный Ли и соавт. [9] для выделения ГАГ мочи, удовлетворял этому требованию. В табл. 3 приведены результаты фракционирования ГАГ при синдроме Санфилиппо. У всех больных МПС III выражена гиперэкскреция ГС, хотя уровни гиперэкскреции этого ГАГ при МПС III А и В перекрываются. Используемый нами метод количественного фракционирования экскретируемых ГАГ дает хорошее соответствие с результатами фракционирования экскретируемых ГАГ методом ионообменной колоночной хроматографии на Дауэкс 1×2, Cl^- (200—400 меш), но гораздо менее трудоемок [16]. Результаты фракционирования внутриклеточных ГАГ приведены на рис. 2. В нормальных фибробластах основные типы ГАГ представлены дерматансульфатом и ХС. При различных типах МПС количественное соотношение фракций внутриклеточных ГАГ существенно изменяется.

Обсуждение

На основании клинической картины заболевания у больных МПС четко разграничивают только 2 фенотипа — гурлерподобный, характерный для МПС I, II, III А, В, С и D, VI, VII, и моркиоподобный, характерный для МПС IV А и В. Полуколичественное и количественное определение экскретируемых ГАГ, а также их электрофоретическое фракционирование позволяют: 1) исключить генокопии МПС с гурлер- и моркиоподобными фенотипами (маннозидоз, фукозидоз, GM_1 -ганглиозидоз, муколипидоз, гипотиреоз, множественный артрогриппоз Диггви — Мельхиор — Клаузена,

спондилоэпифизарные дисплазии); 2) подразделить больных с МПС на 4 фенотипических класса, характеризующихся изолированной гиперэкскрецией дерматансульфата (МПС VI), ГС (МПС III), кератансульфата (МПС IV) и сочетанной гиперэкскрецией дерматан- и гепарансульфатов (МПС I, II, VII). Сочетание методов количественной оценки экскретируемых ГАГ с их количественным фракционированием имеет важное значение для диагностики МПС, так как, по литературным данным и по нашим наблюдениям, встречаются больные МПС с нормальными или субнормальными уровнями экскретируемых ГАГ. Однако характеристика параметров экскретируемых ГАГ, по-видимому, не допускает локусной и аллельной дифференцировки МПС. Исследование содержания недиализуемых ГАГ не имело важного диагностического значения для болезней накопления ГАГ, но, как было показано [15], существенно для выделения такой генокопии МПС IV, как болезнь Диггви — Мельхор — Клаузена. Не исключено также, что этот показатель будет иметь диагностическое значение и будет играть определенную роль в изучении патогенеза других системных заболеваний скелета, имеющих фенотипическое сходство с МПС. Фракционирование внутриклеточных ГАГ также имеет важное диагностическое значение, так как в класс болезней накопления ГАГ входят муколипидозы II и III, имеющие ярко выраженный гурлер-подобный фенотип, внутриклеточное накопление ГАГ при нормальных уровнях их экскреции. Наконец, кроме МПС, имеется не менее 80 моногенно наследуемых форм с врожденной системной патологией скелета, биохимический дефект при которых не расшифрован [12]. Исползованная нами программа биохимического исследования экскретируемых и внутриклеточных ГАГ может оказаться полезной для выявления биохимических маркеров при этих заболеваниях. Обнаружение таких маркеров в свою очередь позволит оценить вклад нарушений метаболизма протеогликанов в этиологию этих нозологических единиц.

ЛИТЕРАТУРА

1. Краснопольская К. Д. — В кн.: Генетика человека. М., 1980, т. 5, с. 42—84.
2. Кухаренко В. И., Кулиев А. М., Грин-

- берг К. И. и др. — Цитология, 1974, № 10, с. 1228—1232.
3. Лебедева Т. В., Одиноква О. И., Яковлев С. А. — В кн.: Всесоюзный съезд медицинских генетиков. 1-й. Тезисы докладов. М., 1983, с. 187—188.
4. Bitter T., Muir H. M. — *Analyt. Biochem.*, 1962, vol. 4, p. 330—334.
5. Hopwood J., Muller V., Harrison R. et al. — *Med. J. Aust.*, 1982, vol. 1, p. 257—260.
6. Hronovski L., Anastasiades T. P. — *Analyt. Biochem.*, 1979, vol. 93, p. 60—72.
7. Johnson E. A. — *Pharmacol. Res. Commun.*, 1982, vol. 14, p. 289—320.
8. Lacatos M., di Ferrante N. — *Biochem. Med.*, 1974, vol. 9, p. 256—260.
9. Lee G. J. L., Evans J. E., Tieckelmann H. et al. — *Clin. chim. Acta*, 1980, vol. 104, p. 65—75.
10. McKusick V. A. J. — *Johns Hopk. med. J.*, 1980, vol. 146, p. 71—79.
11. McKusick V. A., Neufeld E. F., Kelly T. E. — In: *The Metabolic Basis of Inherited Disease* / Ed. J. B. Sranburi et al. New York, 1978, p. 1282—1307.
12. Monson C. B., Seegmiller R. E. — *J. Bone Jt. Surg.*, 1981, vol. 63, p. 637—644.
13. Pennock C. A. — *J. clin. Path.*, 1976, vol. 22, p. 111—123.
14. Rao D. C., Mac Leon C. J., Morton N. E. et al. — *Amer. J. hum. Genet.*, 1975, vol. 27, p. 509—520.
15. Rastogi S. C. — In: *Glucosaminoglycans and Proteoglycans in Physiological and Pathological Processes of Body Systems* / Ed. R. S. Varma, R. Varma. Basel, 1982, p. 290—298.
16. Rastogi S. C., Clausen J., Melchior J. C. — *Clin. chim. Acta*, 1977, vol. 78, p. 55—69.
17. Rosenfeld L. — *Ibid.*, 1971, vol. 31, p. 263—269.

Поступила 09.10.84

CHARACTERISTICS OF INTRACELLULAR AND EXCRETED GLYCOSAMINOGLYCANS IN HEREDITARY MUCOPOLYSACCHARIDOSES

O. N. Odinkova, M. A. Bialik,
K. D. Krasnopol'skaya, S. A. Yakovlev

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

A system for detection and diagnostication of mucopolysaccharidoses (MPS) was organized to ensure the medico-genetic service of the families, where these diseases occurred. Content of intracellular and urinary glycosaminoglycans (GAG) was studied by means of a number of methods in various types of MPS. Amount of excreted GAG's was expressed as relative units to reduce the age differences. In all the patients with MPS hyperexcretion of GAG's was found, except of some cases of MPS IV, as well as the spectrum of non-dialyzed and cetyl pyridinium chloride precipitated GAG's was altered, where the latter fraction was increased and high molecular GAG's were also prevailed as compared with normal state. All the patients were divided into four classes depending on the spectrum of GAG's excreted as shown by means of electrophoresis. The data obtained in estimation of GAG's using electrophoretic technique corresponded to the results of column chromatographic analyses but the electrophoretic procedure was distinctly less labour-consuming.

*Т. А. Макарова, И. Е. Смирнов, И. В. Вережкина, К. К. Шатемирова
Х. М. Марков, В. З. Горкин*

НАРУШЕНИЕ ДЕЗАМИНИРОВАНИЯ БИОГЕННЫХ АМИНОВ ПРИ СПОНТАННОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР и Институт педиатрии АМН СССР, Москва

В патогенезе гипертонической болезни существенную роль играет состояние симпатико-адреналовой системы. В качестве адекватной модели для изучения гипертонической болезни у человека обычно используют крыс со спонтанной гипертензией, у которых симпатическая нервная система находится в состоянии повышенной активности [3, 7, 9]. На различных стадиях развития гипертензии у крыс нарушены процессы нейронального захвата и утилизации норадреналина, в результате чего создаются условия для поступления больших количеств норадреналина к специфическим адренорецепторам [8].

Имеются также данные о нарушении процессов синтеза и катаболизма катехоламинов в этих условиях. Активности таких катехоламинсинтезирующих ферментов, как тирозингидроксилаза, дофамин- β -гидроксилаза, фенилэтаноламин-N-метилтрансфераза и ДОФА-декарбоксилаза в тканях крысы со спонтанной гипертензией значительно увеличены [17, 25].

Предполагается, что на стадии хронической гипертензии в действие вступает компенсаторный механизм, который нормализует концентрацию свободного норадреналина и тем самым предотвращает дальнейшее повышение артериального давления [7]. Возможно, что в основе действия компенсаторного механизма, приводящего к снижению уровня норадреналина, лежит ускорение захвата норадреналина и увеличение активности моноаминоксидазы (МАО) и катехоламин-О-метилтрансферазы [7]. Как известно, ингибиторы катехоламинсинтезирующих ферментов обладают гипотензивным действием [25]. Показано также, что введение кроликам очищенных препаратов МАО снижает кровяное давление, повышенное в результате предварительного введения норадреналина [11].

Активность МАО в гомогенатах ря-

да тканей крыс со спонтанной гипертензией, как правило, выше таковой контрольных крыс Вистар — Киото. Хотя за последнее время этот вопрос изучается в ряде лабораторий [18, 25, 32, 33], данные, полученные на гомогенатах тканей, иногда противоречивы. Полной информации об изменениях активности МАО типов А и В жизненно важных органов крыс со спонтанной гипертензией все еще не получено.

Митохондриальные МАО по чувствительности к действию хлоргиллина условно подразделяют на типы А и Б [20, 21, 29]. Принято считать, что в печени крысы субстратами МАО типа А являются норадреналин и серотонин, для МАО типа Б — бензиламин и 2-фенилэтиламин [19, 26, 30]. Тирамин обычно считают так называемым смешанным субстратом, окисляемым МАО обоих типов [4], хотя имеются указания на возможность существования особого типа фермента (активного центра), участвующего в окислении тирамина [4]. Субстратная специфичность и соотношение типов МАО значительно варьируют в различных органах и у животных различных видов [14, 15]. Так, имеются значительные различия в окислении норадреналина, дофамина и других аминов при участии МАО типов А и Б в тканях грызунов и приматов [16, 24].

Целью настоящей работы было исследование активности МАО типов А и Б с использованием в качестве субстратов серотонина, тирамина, 2-фенилэтиламина в митохондриальной фракции различных тканей крыс со спонтанной гипертензией. Известно, что МАО локализована не только в митохондриальных мембранах, но и в других мембранных структурах клетки [4]. Для оценки активности МАО различных типов в тканях крыс со спонтанной гипертензией мы проводили определения аминоксидазной активности в митохондриальной фракции.

Методика

В опытах использовали крыс-самцов линии со спонтанной гипертензией (опытная группа) массой $332 \pm 6,5$ г. Эти животные являются потомками линии, выведенной японскими исследователями [27]. Артериальное давление у неанестезированных животных измеряли плетизмографическим методом, используя автоматический сфигмоманометр фирмы «Natsun» KN 209. В качестве контрольной группы служили крысы-самцы Вистар—Кнотто с той же массой тела.

После декапитации у животных быстро извлекали мозг, сердце, печень и почки. Ткани промывали охлажденным физиологическим раствором и готовили 10 % гомогенаты на 0,25 М растворе сахарозы. Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования, как описано ранее [6], промывали 0,01 М фосфатным буфером pH 7,4, суспендировали в объеме того же буфера, равном массе, взятой для приготовления гомогената ткани, и хранили до использования при -20°C .

Перед экспериментом суспензию митохондрий промывали в 10-кратном объеме 0,01 М фосфатным буфером pH 7,4 и осаждали при 12 000 g. Осадок, представляющий собой фрагменты митохондриальных мембран [5], использовали в качестве биологического материала, содержащего MAO.

Об активности MAO судили по количеству аммиака, освобожденного в процессе инкубации суспензии митохондрий в 0,05 М фосфатном буфере pH 7,4 с одним из аминов в атмосфере кислорода при 37°C . В пробы вносили 1—7 мг белка митохондриальных фракций (в зависимости от величины удельной активности содержащихся в них MAO). Длительность инкубации в опытах с 2-фенилэтиламином в качестве субстрата составляла 15 мин, в опытах с тирамином или серотонином — 30 мин. После завершения инкубации пробы фиксировали трихлоруксусной кислотой (конечная концентрация 5 %), образовавшийся осадок отделяли центрифугированием, а в надосадочной жидкости определяли аммиак методом изотермической диффузии с последующей нesslerизацией.

В качестве субстратов использовали серотонина креатинин-сульфат («Reanal», Венгрия), тирамина гидрохлорид («Merk», ФРГ), 2-фенилэтиламина гидрохлорид (отечественный). В опытах с митохондриями мозга крысы субстраты использовали в следующих оптимальных концентрациях (в мкмольях на пробу с конечным объемом 1,8 мл): тирамин — 8, серотонин — 12, 2-фенилэтиламин — 1, для митохондрий печени — соответственно

10, 6 и 0,8, для митохондрий сердца крысы — 6, 12, 1, для митохондрий почек крысы — 8, 3 и 1.

Блок определяли по методу Лоури, используя в качестве стандарта альбумин сыворотки крови быка. При статистической обработке данных для оценки достоверности различий между величинами использовали критерий Стьюдента [1].

Результаты

В табл. 1 приведены некоторые физиологические параметры, характеризующие животных опытной и контрольной групп. Артериальное давление у крыс опытной группы, по литературным данным, достигает 180 мм рт. ст. в возрасте 12—14 нед и затем стабилизируется на этом уровне [25]. У крыс опытной группы, использованных в настоящей работе, артериальное давление также не превышало 180 мм рт. ст. (см. табл. 1).

В табл. 2 представлены данные о дезаминировании биогенных аминов фрагментами митохондриальных мембран тканей крыс опытной и контрольной групп. Активность MAO типов А (субстрат серотонин) и Б (субстрат 2-фенилэтиламин) в митохондриях мозга крыс опытной группы несколько выше, чем в митохондриях контрольных животных, но эти различия были статистически недостоверны. Однако активность MAO мозга, определенная с тирамином в качестве субстрата, у крыс опытной группы почти в 1,5 раза превышала таковую контрольных животных ($P < 0,02$). Возможно, это объясняется тем, что тирамин в ткани мозга дезаминируется обоими типами MAO [19, 30], не исключено и существование в митохондриях мозга особого типа MAO, участвующего в дезаминировании тирамина [4].

Активность MAO митохондрий крыс опытной группы, измеренная с тремя субстратами, значительно превышала таковую митохондрий сердца крыс

Т а б л и ц а 1

Общая сравнительная характеристика животных опытной и контрольной групп

Группа крыс	Артериальное давление, мм рт. ст.	Частота сердечных сокращений в минуту	Масса тела, г
Контрольная (n=22)	$123 \pm 1,8$	$385 \pm 5,4$	$315 \pm 11,8$
Опытная (n=40)	$178,8 \pm 2,5^*$	$355,8 \pm 5,8^*$	$322 \pm 6,5$

П р и м е ч а н и е. В скобках — число крыс. Звездочкой отмечено $P < 0,001$.

Т а б л и ц а 2

Дезаминирование биогенных аминов фрагментами митохондриальных мембран тканей крыс опытной и контрольной групп

Ткань	Группа крыс	Дезаминирование, нмоль аммиака на 1 мг белка за время инкубации		
		2-фенилэтиламин	тирамин	серотонин
Мозг	Контрольная	126,6±9,1 (4)	685,6±43,1 (4)	289,1±26,8 (4)
	Опытная	161,2±11,4 (5)	920,8±68,5 (5)*	379,0±29,8 (5)
Сердце	Контрольная	94,5±6,4 (7)	1120±109,6 (7)	840,8±87,7 (7)
	Опытная	130,3±15,5 (3)**	1903±197,1 (3)***	1456±188,3 (3)***
Печень	Контрольная	96,0±9,03 (3)	443,2±71,7 (3)	203,1±6,3 (3)
	Опытная	262,5±10,6 (6)4*	1484,2±150,7 (6)***	524,4±58,0 (6)***
Почки	Контрольная	94,4±6,3 (8)	342,0±39,7 (8)	152,9±20,1 (8)
	Опытная	55,4±2,7 (4)	344,9±23,5 (4)	140,3±13,1 (4)

П р и м е ч а н и е. Одна звездочка — $P<0,02$, две — $P<0,05$, три — $P<0,01$, четыре — $P<0,001$.

контрольной группы (см. табл. 2). Известно, что в сердце крыс МАО представлена только типом А [4, 14]. Полученные нами данные об увеличении активности МАО типа А в митохондриях сердца крыс SHR по сравнению с таковой группы WKY согласуются с данными Стролин-Бенедетти и соавт., определявших активность МАО в гомогенатах сердечной мышцы с использованием нескольких субстратов [18].

В митохондриях печени крысы примерно 60—80 % активности МАО представлено типом Б [13]. Как видно из наших данных (см. табл. 2), активность МАО типов А и Б (субстраты серотонин и 2-фенилэтиламин соответственно) в митохондриях печени SHR в 2,6—2,7 раза выше таковой митохондрий печени контрольных животных. Активность МАО в печени крыс опытной группы, измеренная с тирамином в качестве субстрата, превышает таковую контрольных животных в 3,3 раза.

Нам не удалось обнаружить изменений в активности МАО в митохондриях почек крыс опытной группы по сравнению с таковой контрольной группы животных (см. табл. 2). По данным ингибиторного анализа, митохондрии этой ткани крыс содержат оба типа МАО [23], хотя в почках быка была обнаружена только МАО типа Б [10].

Обсуждение

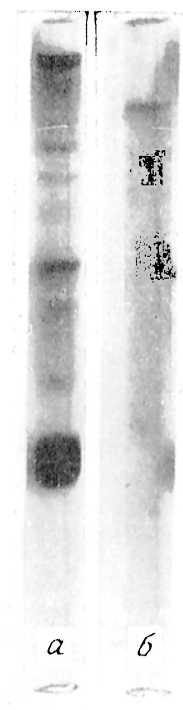
Увеличение активности симпатико-адреналовой системы при спонтанной гипертензии у крыс, характеризующееся повышением уровня катехоламинов, приводит к возникновению местных

компенсаторных реакций, выражающихся, очевидно, в увеличении активности ферментов катаболизма катехоламинов [7]. Известно, что введение крысам L-ДОФА вызывает увеличение активности МАО в сердце, почках и мозге [22]. Имеются также данные об увеличении уровня полиаминов и активности диаминоксидазы в сердце крыс опытной группы по сравнению с таковыми контрольных животных [28]. Показано, что клеточные мембраны ряда тканей опытной группы отличаются по нескольким критериям от таковых контрольной, причем полагают, что эти изменения могут быть генетически детерминированы [12].

Поскольку сердце, сосуды, мозг, печень и почки особенно важны для поддержания кровяного давления в организме, можно ожидать изменения активности ферментов, участвующих в катаболизме катехоламинов (в частности, МАО) именно в этих органах.

По нашим данным, активность МАО типа А в митохондриальной фракции сердца крысы увеличена в 1,5—1,7 раза по сравнению с таковой контрольных животных при использовании в качестве субстрата серотонина, тирамина и 2-фенилэтиламина. По данным японских авторов [33], в гомогенатах сердца крыс опытной группы в возрасте 7 нед активность МАО, определенная с тирамином и серотонином в качестве субстратов, была почти в 2 раза выше таковой гомогенатов контрольной группы. Стролин-Бенедетти и соавт. также нашли значительное увеличение активности МАО в гомогенатах тканей сердца, аорты и артерий [18].

К ст. В. И. Миськовой и соавт.



Электрофорез препарата ЭСА человека в 7,5 % полиакриламидном геле.
а — электрофореграмма abortивного материала;
б — электрофореграмма очищенного препарата ЭСА.

К ст. В. В. Честкова
и соавт.

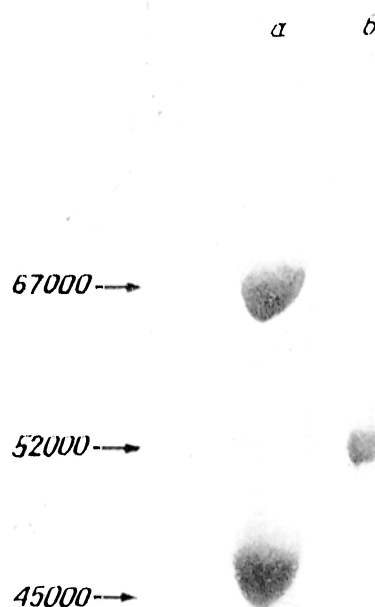


Рис. 6. Электрофорез очищенной ФГ печени крыс.

На дорожку (а) нанесены маркерные белки: 5 мкг альбумина бычьей сыворотки (67 000 Д) и 5 мкг овальбумина (45 000 Д). Дорожка (б) — очищенная после 2-й фенилсефаарозы ФГ — 3 мкг.

дельных животных снижаются примерно до нормы [25]. В печени крыс опытной группы изменения активности МАО в зависимости от возраста животных могут носить несколько иной характер.

По данным японских авторов [33], определявших активность МАО с серотонином в качестве субстрата в четырех отделах головного мозга крыс опытной и контрольной групп, актив-

типов А и Б в печени по сравнению с таковыми контрольных животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беленький М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Л., 1963.
2. Вережкина И. В., Аснина В. В., Горкин В. З., Машковский М. Д. — Вопр. мед. химии, 1983, № 5, с. 118—123.

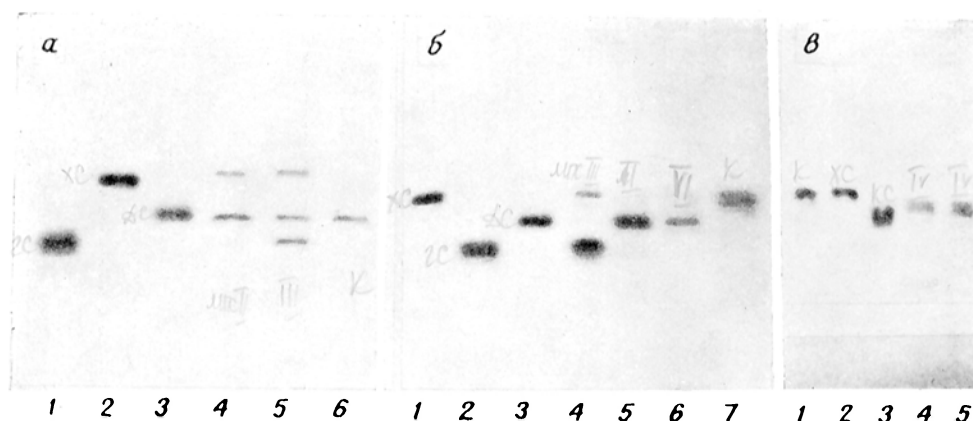


Рис. 1. Электрофореграммы экскретируемых и внутриклеточных ГАГ.
 А — внутриклеточные ГАГ; электрофорез в 0,1 М ацетате бария. 1 — стандарт ГС; 2 — стандарт ХС; 3 — стандарт дерматансульфата; 4 — клетки больного МПС II; 5 — клетки больного МПС III; 6 — контроль. В — экскретируемые ГАГ; условия электрофореза те же. 1 — стандарт ХС; 2 — стандарт ГС; 3 — стандарт дерматансульфата; 4 — моча больного МПС III; 5 — моча больного МПС II; 6 — моча больного МПС VI; 7 — контроль. В — экскретируемые ГАГ; электрофорез в системе 0,1 М пиридин — 0,17 М муравьиная кислота. 1 — моча обследованных контрольной группы; 2 — стандарт ХС; 3 — стандарт кератансульфата; 4, 5 — моча больных МПС IV.

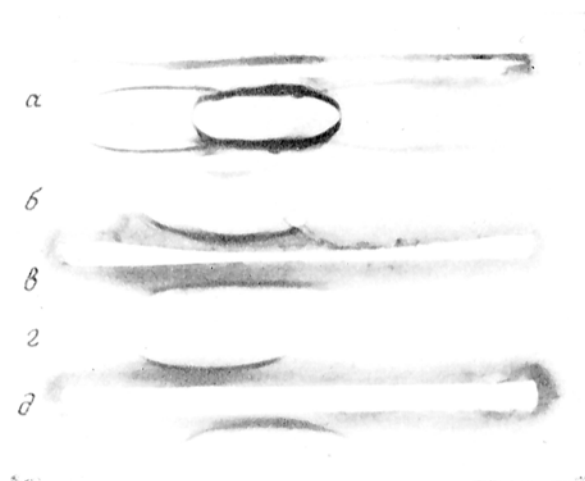


Рис. 2. Иммуноэлектрофорез препаратов лактопероксидазы с антисывороткой к частично очищенному препарату лактопероксидазы.
 а — частично очищенная лактопероксидаза; б — фракция I, полученная при ИЭФ в борат-полиольной системе; в — фракция II; г — коммерческий препарат лактопероксидазы; д — объединенная фракция III+IV.

О НАРУШЕНИЯХ СВОЙСТВ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ МОНОАМИНОКСИДАЗЫ МОЗГА ПРИ ШИЗОФРЕНИИ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Моноаминоксидазы (МАО, КФ 1.4.3.4) представляют собой мембраносвязанные, флавиносодержащие, липидзависимые ферменты, функции которых существенно модифицируются в условиях, благоприятствующих перекисному окислению липидов (ПОЛ) биомембран [4]. Так, МАО митохондрий головного мозга быка или человека уже в процессе выделения и очистки претерпевают пинципируемое частичным окислением тиоловых групп качественное изменение (трансформацию) каталитической активности, в результате чего имеет место не только снижение активности этих ферментов, но и появление качественно новых свойств дезаминировать азотистые соединения, не являющиеся субстратами МАО (например, гистамин) [7, 18]. Одной из характерных особенностей трансформации МАО оказалась обратимость этого процесса: обработка препаратов МАО, содержащих частично окисленные тиоловые группы, восстановителем (в частности, дитиотрейтолом — ДТТ) возвращает содержание тиоловых групп и каталитические свойства МАО к исходному уровню, т. е. происходит их ретрансформация [4].

Нарушения функций МАО, и в частности трансформация их каталитической активности, были обнаружены при целом ряде патологических состояний, сопровождающихся стимуляцией ПОЛ в организме [1, 4]. Хотя при шизофрении доказана стимуляция ПОЛ в организме больных и, в частности, в тканях головного мозга [10, 11], подавляющее большинство современных данных свидетельствует об отсутствии изменения активности МАО в тканях мозга больных шизофренией, по сравнению с таковой людей, не страдавших шизофренией при жизни (см. [14, 19] и работы, цитированные в этих источниках). Однако все опубликованные данные были, к сожалению, получены в результате исследований неочищенных препаратов МАО, без разделения множественных форм этих ферментов. При

сопоставлении свойств МАО мозга больных шизофренией и людей, не страдавших этим заболеванием, не было учтено также способности МАО претерпевать обратимую трансформацию каталитической активности.

В настоящей работе была предпринята попытка повторно исследовать проблемы нарушений активности МАО при шизофрении с использованием электрофоретически гомогенных препаратов одной (количественно преобладающей) выделенной из солюбилизованных митохондриальных мембран мозга человека методом аффинной хроматографии на АН-Сефарозе 4Б формы МАО, названной МАО-11б [5]. Сведения о субстратной специфичности и чувствительности к действию ингибиторов этой и других форм МАО опубликованы нами ранее [5, 8, 9]. Кроме того, в настоящей работе, в отличие от исследований, описанных в литературе [14, 19], сопоставление свойств МАО мозга больных шизофренией и людей, не страдавших этой патологией, проводили не только в опытах с «исходными» (выделенными и очищенными при обычных условиях [3]) ферментными препаратами, но также с препаратами МАО, которые предварительно инкубировали либо в условиях, способствующих окислению тиоловых групп и благоприятствующих трансформации каталитических свойств МАО, либо, наоборот, в условиях, препятствующих окислению тиоловых групп и обеспечивающих восстановление окисленных тиоловых групп (в присутствии 10 мМ ДТТ), что приводит к ретрансформации МАО. Именно этот подход дал возможность обнаружить различия в свойствах МАО мозга людей, не болевших шизофренией, и людей, страдавших этой патологией. При шизофрении оказался нарушенным именно процесс ретрансформации МАО, что не могло быть выявлено при обычно применяемых («стандартных») условиях исследований.

3. Геллер Р. Д., Мак-Гифф Д. С. — В кн.: Артериальная гипертензия. М., 1980, с. 101—109.
4. Горкин В. З. Аминоксидазы и их значение в медицине. М., 1981, с. 54.
5. Горкин В. З., Веревкина И. В. — Вopr. мед. химии, 1963, № 3, с. 315—317.
6. Горкин В. З. и др. — В кн.: Современные методы в биохимии. М., 1968, т. 2, с. 155—157.
7. Маркель А. Л. — Успехи физиол. наук, 1983, т. 14, с. 67—84.
8. Марков Х. М., Полицук В. С. — Кардиология. 1977, № 10, с. 93—98.
9. Постнов Ю. В. — Арх. пат., 1974, № 19, с. 3—9.
10. Цукерман Д. Б., Веревкина И. В., Горкин В. З. — Вopr. мед. химии, 1978, т. 24, с. 544—548.
11. Чикваидзе В. Н., Гаришвили Т. Г., Гонгадзе Н. В., Кандаваки Е. Н. — Сообщ. АН Груз. ССР, 1983, т. 112, с. 429—432.
12. Devynck M. A., Pernollet M. G., Nunez A. M. et al. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1982, vol. 79, p. 5057—5060.
13. Edwards D. J., Park K. J. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1979, vol. 86, p. 350—357.
14. Fowler C. J., Norqvist A., Orelund L. — Comp. Biochem. Physiol., 1981, vol. 68-C, p. 145—149.
15. Fowler C. J., Orelund L., Callingham B. A. — J. Pharm. Pharmacol., 1981, vol. 33, p. 341—347.
16. Garrick N. A., Murphy D. L. — Biochem. Pharmacol., 1982, vol. 31, p. 4061—4066.
17. Globecher H., Roizen M. F., Weina V. et al. — Nature, 1975, vol. 258, p. 267—271.
18. Guffroy C., Strolin-Benedetti M. — Life Sci., 1984, vol. 34, p. 535—546.
19. Houslay M. D., Tipton K. F., Youdim M. B. H. — Ibid., 1975, vol. 19, p. 476—487.
20. Johnston J. P. — Biochem. Pharmacol., 1968, vol. 17, p. 1285—1290.
21. Knoll J. — Horisonts Biochem. Biophys., 1978, vol. 5, p. 37—64.
22. Lyles G. A. — Life Sci., 1978, vol. 22, p. 603—610.
23. Lyles G. A., Shaffer C. J. — Biochem. Pharmacol., 1979, vol. 28, p. 1099—1106.
24. Murphy D. L., Garrick N. A., Cohen R. M. — In: Antidepressant. New York, 1983, p. 209—227.
25. Nagatsu T., Mizutani K., Nagatsu I. et al. — Molec. Cell. Biochem., 1973, vol. 1, p. 107—113.
26. Neff J. N., Yang H.-Y. — Life Sci., 1974, vol. 19, p. 2061—2070.
27. Okamoto K., Aoki K. — Jap. Circulat. J., 1963, vol. 27, p. 282—285.
28. Perin A., Sessa A., Desiderio M. A. — Biochim. biophys. Acta, 1983, vol. 755, p. 344—350.
29. Squires R. F. — Advanc. Biochem. Psychopharmacol., 1978, vol. 5, p. 355—362.
30. Suzuki O., Katsumata Y., Oya M. — Life Sci., 1979, vol. 24, p. 2227—2230.
31. Trippodo N. C., Frohlich E. D. — Circulat. Res., 1981, vol. 48, p. 309—319.
32. Urdin M., Fuentes J. A. — Biochem. Pharmacol., 1983, vol. 32, p. 2345—2347.
33. Yasuhara H., Tonooka M., Wada I. et al. — Jap. J. Pharmacol., 1983, vol. 33, p. 1057—1064.
34. Waldmeier P. C., Delini-Stula A., Maitre L. — Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 1976, Bd 292, S. 9—14.

Поступила 19.10.81

IMPAIRMENT OF BIOGENIC AMINES DEAMINATION IN SPONTANEOUS HYPERTENSION

T. A. Makarova, I. Ye. Smirnov, I. V. Veryovkina, K. K. Shatemirova, Kh. M. Markov, V. Z. Gorkin

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

Activity of monoamine oxidases (MAO) of the types A and B (substrates: 5-hydroxytryptamine, 2-phenylethylamine, tyramine) has been studied in mitochondrial fractions from brain, heart, liver and kidney of 24-week-old rats of the normotonic strain Wistar Kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR). As compared with the WKY rats, in the SHR strain the activity of MAO-A in heart mitochondria was increased 1.5-1.7-fold; in liver mitochondria the activities of both MAO-A and -B were increased 2.6-2.7-fold. In brain mitochondria there was noted only slight tendency towards an increase in MAO-A (substrate: 5-hydroxytryptamine) and MAO-B (substrate: 2-phenylethylamine) activities in the SHR strain as compared with the normotonic animals of the same age. However, in experiments with tyramine as a substrate of MAO the enzymatic activity in SHR brain mitochondria was increased 1.5-fold ($P < 0.05$) as compared with the WKY rats. In kidney mitochondria of SHR the activity of MAO (substrates: 5-hydroxytryptamine, 2-phenylethylamine, tyramine) did not exhibit any alterations as compared with the control WKY rats.

аминазной активности. При шизофрении инкубация препаратов МАО-Пб головного мозга с восстановителем позволила выявить существенное различие, по сравнению с нормой, в опытах с дезаминированием гистамина: скорость этой реакции после инкубации с ДТГ не только не уменьшалась, как это было в норме, но, наоборот, значительно возрастала. Одновременно нарастали, как это было и в норме, фенилэтиламиндезаминазная активность и содержание тиоловых групп, тогда как скорость дезаминирования серотонина не изменялась.

Примеры (из серий, включающих 14 человек больных шизофренией и 8 лиц контрольной группы) исследований воздействия мочевины (8 М) на содержание тиоловых групп в препаратах МАО-Пб головного мозга человека свидетельствуют об отсутствии нарастания числа титруемых 5,5'-дитиобис(2-нитробензоатом) («растворимый реактив Элмана») тиоловых групп после обработки фермента мочевиной при шизофрении, в противоположность тому, что имеет место в норме, когда содержание SH-групп нарастало от 10 до 14 моль на 10^5 D белка.

Ранее в опытах с очищенными препаратами МАО из стволовой части мозга быка была отмечена высокая лабильность их тиоловых групп, которые легко подвергались обратимому окислению при хранении, что инициировало трансформацию каталитических свойств МАО с появлением качественно новых гистамин- или ГАМК-дезаминазных активностей; обработка окисленного фермента восстановителями (ДТГ, восстановленный глутатион) вызывала ретрансформацию каталитической активности до исходного состояния, причем содержание тиоловых групп возрастало до 15 на 10^5 D белка [7, 18]. С этими данными полностью согласуются результаты, полученные в настоящей работе при исследовании высокоочищенных препаратов одной из множественных форм МАО (МАО-Пб) мозга человека в тех случаях (8 человек), когда исследовали мозг людей, не страдавших при жизни шизофренией. Однако в тканях мозга больных шизофренией (14 случаев) процесс ретрансформации каталитической активности МАО был нарушен: обработка ферментного препа-

рата ДТГ, хотя и восстанавливала содержание тиоловых групп в молекуле фермента до исходного уровня, однако не только не снижала, но и существенно увеличивала гистаминдезаминазную активность. Это поразительное явление никогда не наблюдалось в системах с МАО мозга людей, не болевших шизофренией, и не было отмечено ранее при экспериментальных патологических состояниях, сопровождавшихся стимуляцией ПОЛ [4], но постоянно имело место в опытах с МАО мозга всех исследованных больных шизофренией, вне зависимости от возраста, пола, длительности основного заболевания и характера его лечения. В настоящей работе, как и в опубликованных ранее сообщениях [14, 19], проблема исключения возможных эффектов психотропных лекарственных средств не была решена, поскольку эти средства получали по медицинским показаниям все обследуемые больные. Однако высокая воспроизводимость обнаруженного феномена нарушения процесса ретрансформации МАО при шизофрении и отсутствие зависимости от условий медикаментозной терапии свидетельствуют против предположения о возможной обусловленности нарушений ретрансформации МАО воздействиями психотропных лекарственных средств.

Можно предполагать, что при шизофрении имеют место определенные изменения (по сравнению с контрольной группой людей, не болевших шизофренией) структуры МАО мозга. Так, по нашим данным, препараты МАО-Пб из мозга больных шизофренией содержали значительно больше титруемых 5,5'-дитиобис(2-нитробензоатом) тиоловых групп, чем аналогичные препараты из мозга людей, не страдавших при жизни шизофренией. Кроме того, воздействие на очищенные препараты МАО головного мозга человека мочевины в концентрации, достаточной для разрушения водородных связей в белковых молекулах, не изменяло содержания титруемых тиоловых групп при шизофрении, но увеличивало на 40 % содержание тиоловых групп в норме.

Полученные данные о том, что выделенные и очищенные до электрофоретической гомогенности препараты МАО из головного мозга человека обнаруживали гистаминдезаминазную активность и содержали лишь 2 моля

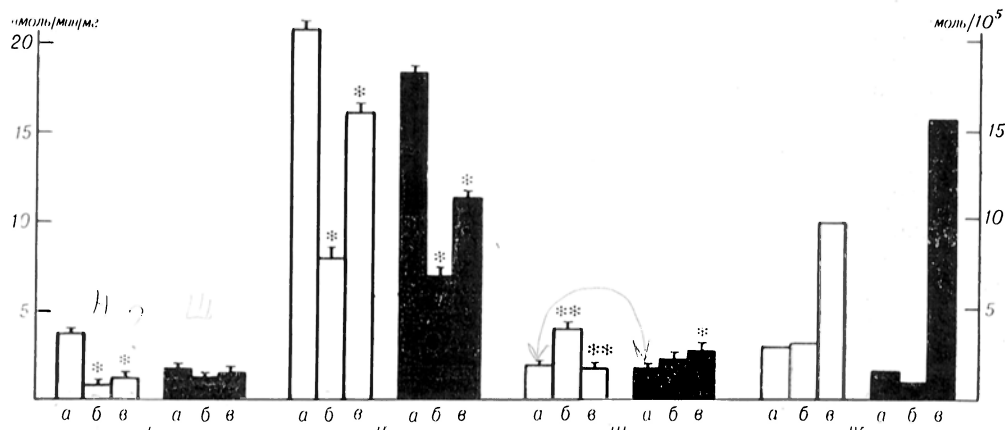
Ткань мозга людей (8 человек), не страдавших диагностированными расстройствами функций ЦНС и умерших от сердечно-сосудистых заболеваний, получали из морга I ММИ им. И. М. Сеченова; ткань мозга людей, страдавших психозами и умерших от сердечно-сосудистых заболеваний (14 человек), получали из морга Института клинической психиатрии Всесоюзного научного центра психического здоровья АМН СССР. Во всех случаях ткань получали через 4—19 ч после смерти. Для исследований брали преимущественно навески ткани коры больших полушарий головного мозга. Весь материал до начала исследований хранили при -20°C .

Об окислительном дезаминировании азотистых соединений судили по количеству освобождаемого в инкубационных пробах аммиака [5]. Стандартные методы были использованы для определения содержания белка [17] и тиоловых групп [15].

Результаты и обсуждение

Из типичного результата сравнительного исследования свойств одной из высокоочищенных форм МАО мозга (МАО-116) больных психозами (темные столбики) и людей, не страдавших при жизни психозами (светлые столбики), следует, что данный ферментный препарат в норме катализировал дезаминирование в пробах, содержащих оптимальные (подобранные в специальных предварительных опытах) концентрации аминов (не только 5-окситриптамин (серотонин) и

2-фенилэтиламин, но также гистамин] и включал в себя 2 тиоловые группы на 10^5 Д белка (см. рисунок). При шизофрении было отмечено некоторое снижение серотониндезаминазной активности и содержания тиоловых групп при одновременном повышении гистаминдезаминазной активности, — по сравнению с нормой. Инкубация ферментных препаратов при 37°C в течение 180 мин (при аэробных условиях) в норме снижала серотонин- и фенилэтиламиндезаминазные активности, усиливала дезаминирование гистамина, но не изменяла содержания тиоловых групп. При шизофрении инкубация препаратов МАО мозга в этих же условиях приводила к снижению только фенилэтиламиндезаминазной активности, но гистаминдезаминазная активность, а также содержание тиоловых групп не изменялись. Инкубация препаратов МАО мозга при 37°C в течение 180 мин в присутствии достаточно высокой концентрации ДТТ (10 мМ) для предотвращения окисления тиоловых групп (и восстановления образовавшихся продуктов окисления тиоловых групп) в норме значительно повышала содержание тиоловых групп, существенно увеличивая скорость дезаминирования 2-фенилэтиламина и резко снижая скорость дезаминирования гистамина при одновременном дальнейшем снижении серотониндеза-



Дезаминирование биогенных аминов (вертикальная ось слева) и содержание тиоловых групп (вертикальная ось справа) в пробах с очищенным препаратом МАО-116 из митохондрий мозга больных психозами (темные столбики) и людей, не страдавших психозами (светлые столбики) без преинкубации (а), после преинкубации в течение 3 ч при 37°C (б), в тех же условиях в присутствии 10 мМ ДТТ (в).

Освобождение аммиака (в нмоль на 1 мг белка в 1 мин) в пробах с серотонином, креатининсульфатом (1,5 мМ) (I), 2-фенилэтиламином HCl (0,2 мМ) (II) и гистамином HCl (14 мМ) (III) в качестве субстратов. Содержание тиоловых групп (IV) (в молях на 10^5 Д белка) определяли после гель-фильтрации через сефадекс G-25 (см. [18]). Представлены примеры типичных опытов. Каждая цифра — средняя величина по данным 3 параллельных определений. Светлый столбик, отражающий величину гистаминдезаминазной активности III, в, в 2 раза меньше (0,8) III, а.

фосфолипидов биомембран) [4]. Вместе с тем результаты этой работы указывают на наличие определенных, специфичных для шизофрении особенностей, а именно на нарушения процесса ретрансформации МАО, что не наблюдалось при других патологических состояниях, сопровождающихся стимуляцией ПОЛ.

Определенные различия между активностью МАО в тканях мозга людей, не болевших при жизни шизофренией, и таковых пациентов, страдавших шизофренией, наблюдались и ранее [21]. Так, при детальном изучении распространения МАО (субстрат — серотонин) в различных анатомических структурах головного мозга было установлено, что если принять активность МАО в коре больших полушарий головного мозга за 100 %, то в норме активность МАО в *corpus striatum* существенно (на 30—40 %) выше, а при шизофрении, наоборот, значительно ниже, чем в коре мозга.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акопян А. С., Промыслов М. Ш. — *Вопр. мед. химии*, 1984, № 1, с. 75—77.
2. Вайсфельд И. Л., Кассиль Г. Н. Гистамин в биохимии и физиологии. М., 1981, с. 59; 87.
3. Гаришвили Т. Г., Горкин В. З. — *Сообщ. АН СССР*, 1978, т. 89, № 1, с. 185—188.
4. Горкин В. З. Аминоксидазы и их значение в медицине. М., 1981.
5. Камышанская И. С., Москвитина Т. А. — *Вопр. мед. химии*, 1981, № 2, с. 261—265.
6. Машковский М. Д., Каминка М. Э., Горкин В. З. и др. — *Хим.-фарм. журн.*, 1980, № 6, с. 11—14.
7. Москвитина Т. А., Камышанская И. С., Каверина Л. И. и др. — *Вопр. мед. химии*, 1977, № 3, с. 352—357.
8. Москвитина Т. А., Кучина Н. Е., Горкин В. З. — Там же, 1982, № 5, с. 127—130.
9. Москвитина Т. А., Кучина Н. Е., Горкин В. З. — *Биохимия*, 1983, № 1, с. 119—124.
10. Прилипко Л. Л., Лидеман Р. Р. — *Вестн. АМН СССР*, 1982, № 1, с. 33—37.
11. Соловьева Ж. В., Орловская Д. Д. — *Журн. невропатол. и психиатр.*, 1977, № 7, с. 1040—1044.
12. Baumanis E. A., Kalnina I. E., Kaminka

- M. E. et al. — *Agents a. Actions*, 1981, vol. 11, p. 685—692.
13. Domino E. F. — *Schizophr. Bull.*, 1980, v. 6, p. 292—297.
14. Eckerl B., Gottfries C.-G., von Knorring L. et al. — *Progr. Neuro-Psychopharmacol.*, 1980, vol. 4, p. 57—68.
15. Ellmann G. L. — *Arch. Biochem.*, 1959, vol. 82, p. 70—77.
16. Kanof P. D., Greengard P. — *Nature*, 1978, vol. 272, p. 329—333.
17. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al. — *J. biol. Chem.*, 1951, vol. 193, p. 265—275.
18. Moskvitina T. A., Kamyschanskaya N. S., Kaverina L. P., Gorkin V. Z. — *J. Neurochem.*, 1976, vol. 26, p. 209—210.
19. Reveley M. A., Glover V., Sandler M. et al. — *Arch. gen. Psychiat.*, 1981, vol. 38, p. 663—668.
20. Shaff R. E., Beavan M. A. — *Biochem. Pharmacol.*, 1976, vol. 25, p. 1057—1062.
21. Utena H., Kanamura H., Suda S. et al. — *Proc. Jap. Acad.*, 1968, vol. 44, p. 1078—1083.
22. Winblad B., Gottfries C.-G., Orelund L. et al. — *Med. Biol.*, 1979, vol. 57, p. 129—132.

Поступила 19.10.84

ON THE IMPAIRMENTS OF BRAIN MITOCHONDRIAL MONOAMINE OXIDASE IN SCHIZOPHRENIA

T. A. Moskvitina, N. S. Kamyschanskaya, V. Z. Gorkin

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

A highly purified individual form of monoamine oxidase (MAO-11b) has been isolated by means of affinity chromatography on All-Sepharex 4B after solubilization of biomembranes from schizophrenic or normal brain tissues. The enzyme preparations obtained catalyzed deamination (both in schizophrenia and normal state) not only of serotonin and 2-phenylethylamine but also of histamine and contained about 2 SH-groups per 10^5 dalton of protein which is characteristic for "transformed" MAO with partially oxidized SH-groups. Preincubation of MAO-11b from normal brain with 10 mM dithiothreitol caused "re-transformation" of MAO: there was a marked decrease in histamine deaminating activity with simultaneous increase in the MAO activity and in content of SH-groups. In schizophrenia the re-transformation of MAO was impaired: preincubation of MAO-11b under the same conditions led to an increase in content of SH-groups and in MAO activity but the preincubation with a reducing agent did not decrease (causing, to the contrary, a marked increase) the deamination of histamine.

тиоловых групп на 10^5 D белка, согласуются с ранее описанными свойствами трансформированной МАО из мозга быка [18]. Наши данные о весьма высокой скорости дезаминирования 2-фенилэтиламина (по сравнению с серотонином) в присутствии МАО-116 согласуются с литературными данными, полученными иными методами в опытах с гомогенатами тканей мозга человека [22].

Как и следовало ожидать на основании данных о стимуляции ПОЛ при шизофрении [10], в препаратах МАО из мозга людей, страдавших при жизни этим заболеванием, мы обнаружили, в частности, снижение серотониндезаминазной активности и содержания тиоловых групп при одновременном повышении гистаминдезаминазной активности, по сравнению с нормой. Эти данные указывают на возможность трансформации МАО мозга при шизофрении.

Ранее было показано [18], что инкубация при аэробных условиях в отсутствие восстановителей способствует трансформации МАО. С этими данными согласуются результаты, полученные в настоящей работе, в опытах с препаратами МАО из мозга людей, не болевших шизофренией. Однако при шизофрении признаки трансформации МАО (в частности, усиление гистаминдезаминазной активности) были столь значительно выражены, что инкубация при аэробных условиях в использованном нами режиме почти не приводила к дальнейшему стимулированию трансформации МАО.

Существенные различия в свойствах МАО мозга при шизофрении и в норме были обнаружены в условиях инкубации ферментных препаратов с восстановителем ДТТ. В норме мы отметили признаки характерной ретрансформации: значительное уменьшение гистаминдезаминазной активности при одновременном нарастании 2-фенилэтиламиндезаминазной активности и содержания тиоловых групп. Серотониндезаминазная активность, в противоположность ожидаемому, не только не нарастала, но даже снижалась. Выявление возможных причин этого явления, которое согласуется с наблюдениями [4] о высокой лабильности серотониндезаминазной активности при разнообразных воздействиях на препараты МАО, не было предметом

данной работы. При шизофрении инкубация с ДТТ привела к однократному, по сравнению с мозгом людей, не болевших шизофренией, изменению 2-фенилэтиламин- и серотониндезаминазных активностей и содержания тиоловых групп. Но опыты с исследованием гистаминдезаминазной активности указали на явное нарушение при шизофрении процесса ретрансформации МАО. Оценить в полной мере возможные последствия этого явления для функций мозга пока трудно. Можно предполагать, в частности, что при шизофрении в тканях мозга будет усилено дезаминирование гистамина без его предварительного метилирования. Возможное значение нарушений гистаминергических систем мозга [2] в биохимических механизмах развития депрессии и шизофрении было предметом обсуждения работ [13, 16]. Установлено, что в норме гистаминазная активность крайне мала и локализована лишь в определенных структурах мозга [20]. Можно допустить, что появление гистаминдезаминазной активности иных локализаций и мощности могло бы иметь определенное патогенетическое значение при шизофрении, в частности в связи с известным фактом угнетения проявлений аллергии у людей, страдающих шизофренией [13].

Известно, что направленное повышение гистаминдезаминазной активности в тканях сопровождается значительным уменьшением токсических эффектов гистамина [6, 12]. Предположения о вероятной патогенетической роли гистаминдезаминазной активности в мозге больных шизофренией можно было бы проверить косвенно, например клинко-фармакологическими методами с использованием ингибиторов трансформированных МАО (в частности, гидразида и его производных) [4] в качестве возможных лекарственных средств при шизофрении.

Полученные в настоящей работе данные согласуются с представлениями о трансформации МАО как процессе, не специфичном для какого-либо одного заболевания, но имеющем место при развитии разнообразных патологических состояний, когда создаются благоприятные условия для частичного окисления тиоловых групп белков (в первую очередь в результате стимуляции перекисного окисления непереносимых жирнокислотных ацилов

дение исследуемого белка следующими солями: хлоридами цинка и бария (в концентрации от 2 до 20 %), сульфатами цинка (в концентрации от 5 до 35 %) и меди (в 10 % концентрации). Белок высаливается сульфатом аммония в интервале 50—70 % насыщения. Другие изучаемые соли этот белок не осаждают. 50 % растворы спирта и ацетона не осаждают данный антиген при 0° С, но дают возможность отделить значительную часть балластных белков.

Исследуемый ЭСА не разрушается при действии ДНКазы и РНКазы, но теряет свою антигенную активность при действии трипсина. Мол. масса белка, определенная методом гель-фильтрации, равна $290\,000 \pm 5000$ дальтон.

Поскольку действие эстрогенов опосредуется через стереоспецифические клеточные рецепторы этих гормонов, обнаружение ЭСА может послужить основой для изучения иммунохимическими методами взаимоотношений развивающейся опухолевой ткани человека и эстрогенных гормонов, отражающих функциональное состояние малигнизированной ткани.

Изучение физико-химических свойств ЭСА позволяет отделить его от основной массы балластных белков и выделить в полуочищенном виде, что дает возможность получения моноспецифических антисывороток к ЭСА для дальнейшего изучения его биологической роли в организме.

ЛИТЕРАТУРА

1. Детерман Г. Гель-хроматография. Пер. с нем. М., 1970.
2. Мицкевич М. Гормональные регуляции в онтогенезе животных. М. с., 1978, с. 9—20.
3. Нейфах А. А., Тимофеева М. Я. — В кн.: Молекулярная биология процессов развития. М., 1977, с. 190—201.
4. Пчелкина З. М., Матаев Б. П., Рыкунов Э. И., Терентьев А. А. — Вopr. мед. химии, 1980, № 1, с. 78—81.
5. Туркова Я. Аффинная хроматография. Пер. с англ. М., 1980, с. 179; 197.
6. Уриель Ж. — В кн.: Грабер П., Буртэн П. Иммуноэлектрофоретический анализ. Пер. с франц. М., 1963, с. 50—52.
7. Храмова Н. И., Абелев Г. И. — Бюл. экпер. биол., 1961, № 12, с. 107—111.
8. Baxter J. D. — Pharmacol. a. Ther., 1976, vol. 2, p. 605—609.

Поступила 09.10.84

PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF THE ESTROGEN-BINDING HUMAN α -GLOBULIN

V. I. Miskova, Z. M. Pchelkina,
A. A. Terentjev, Yu. S. Tatarinov

Immunochemical Laboratory for Research of Malignant and Embryonal Tissues, Chair of Biochemistry, N. I. Pirogov II Medical School, Moscow

Human estrogen-binding α -globulin (EBG) was shown to be a thermolabile glycoprotein with molecular mass of 290,000 daltons, its isoelectric point occurred at pI 6.02-6.04. The globulin was salted out with 50-70 % of ammonium sulfate. Some organic and inorganic acids precipitated EBG. DNAase and RNAase did not affect the glycoprotein but trypsin hydrolyzed its molecule. The EBG preparation obtained may be used for production of monospecific antiserum in order to study the glycoprotein functions in a body.

УДК 616.132.2-004.6-092:616.155.1-008.939.624-097-07

Д. Д. Петрунин, Ю. С. Татаринов, В. В. Мурашко, А. П. Баранов,
А. В. Каменец, Г. А. Олефиренко

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ 4 РАСТВОРИМЫХ АНТИГЕНОВ ЭРИТРОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ КОРОНАРНЫМ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ

II ММИ им. Н. И. Пирогова

Несмотря на многочисленные исследования, интенсивно проводимые во всем мире, этиология и патогенез атеросклероза до сих пор остаются неясными; в настоящее время существует более 25 теорий патогенеза этого заболевания, каждая из которых по-своему трактует ведущее звено патологии [1]. За последние годы особое внимание обращают на изменение функцио-

нального и морфологического состояния эритроцитов при атеросклерозе, в частности в связи с избыточным накоплением холестерина в эритроцитарной мембране [2]. Молекулярные основы изменений функционального состояния эритроцитов при атеросклерозе изучены недостаточно, что связано с ограниченностью используемых методических подходов [2].

В. И. Миськова, З. М. Пчелкина, А. А. Терентьев, Ю. С. Татаринов

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЭСТРОГЕНСВЯЗЫВАЮЩЕГО α -ГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА

Кафедра биохимии и проблемная лаборатория по иммунохимии злокачественных и эмбриональных тканей И ММИ им. Н. И. Пирогова

Стероидные гормоны, будучи регуляторами клеточного метаболизма, участвуют также в дифференцировке органов и тканей в норме и при патологии [2, 3]. Высококонцентрированное регуляторное влияние стероидных гормонов осуществляется в процессе взаимодействия с белками-рецепторами [8]. Можно предположить, что при канцерогенезе происходит существенное качественное и количественное изменение белков, связывающих стероидные гормоны. Изучение стероидсвязывающих белков представляет интерес для более глубокого понимания патогенетических механизмов малигнизации.

Одним из белков, связывающих гормоны, является эстрогенсвязывающий α -гликопротеин, который обнаруживается в экстрактах и сыворотках крови больных с опухолями почек [4].

Цель данной работы — изучить физико-химические свойства эстрогенсвязывающего α -глобулина (ЭСА) человека.

Методика

ЭСА выделяли из бутанольного экстракта абортивного материала человека методом аффинной хроматографии на сорбенте, содержащем иммобилизованный на сефарозе 4В 17-эстрадиол. Эстрадиол конъюгировали с сефарозой 4В с помощью триазинового метода иммобилизации [5].

Бутанольный экстракт пропускали через колонку с 50 мл приготовленного сорбента. Элюцию проводили 1 М раствором NaCl, собирая фракции по 5 мл. Оптическую плотность выходящих фракций контролировали при помощи проточного денситометра «Uvicord S» (фирма «ЛКВ», Швеция) при 280 нм.

Выделенным препаратом эстрогенсвязывающего белка проводили иммунизацию кроликов по обычной схеме с адъювантом Фрейнда. Полученную антисыворотку тестовали белками плазмы доноров и получали моноспецифическую тест-систему с препаратом, который использовали для иммунизации.

Имунохимическое изучение эстрогенсвязывающего белка проводили методом иммунодиффузии с применением стандартной тест-системы, как описано Н. И. Храмковой и Г. И. Абелевым [7]; чувствительность метода составляла около 5 мкг/мл. Ряд физико-химиче-

ских свойств изучали методом окрашивания линии преципитации для выявления углеводного и липидного компонентов [6], а также путем воздействия на ЭСА человека некоторых осаждающих веществ (см. рисунок на вклейке). Молекулярную массу белка [1] определяли методом гель-фильтрации на сефадексе G-200 с последующим иммунодиффузионным изучением фракций. Также изучали устойчивость белка к воздействию ряда ферментов.

Результаты и обсуждение

Физико-химические свойства ЭСА представлены в таблице. Этот белок является гликопротеином, окрашивающимся по методу Шиффа с применением йодной кислоты [6], и не содержит липидного компонента, термолабилен, относительная электрофоретическая подвижность изучаемого белка по сравнению с альбумином составляет $0,88 \pm 0,07$, что соответствует таковой сывороточных α -глобулинов. Методом изоэлектрического фокусирования установлено pI 6,02 и 6,04.

Как видно из таблицы, ЭСА осаждается 2 % трихлоруксусной, 0,2 М сульфосалициловой, 0,3 М хлорной и 0,25 М фосфорновольфрамовой кислотами, но растворим в 0,4 % водном риваноле. Также было изучено осаж-

Отношение ЭСА к действию осаждающих реагентов

Реагент, действующий на белок	Наличие ЭСА	
	в осадке	в надосадочной фракции
Трихлоруксусная кислота 2 %	+	—
Сульфосалициловая кислота 0,2 М	+	—
Хлорная кислота 0,3 М	+	—
Фосфорновольфрамовая кислота 0,25 М	+	—
Риванол 0,4 %	—	+
ZnCl ₂ (2,5—20 %)	—	+
ZnSO ₄ (5—35 %)	—	+
BaCl ₂ (3—30 %)	—	+
CuSO ₄ 10 %	—	+
Раствор сульфата аммония 50 % насыщения	—	+
Раствор сульфата аммония 70 % насыщения	+	—

Сравнительная физико-химическая характеристика РАЭ

Свойства РАЭ	РАЭ-1	РАЭ-2	РАЭ-3	РАЭ-4
Молекулярная масса, дальтон	80 000±9 000	130 000±15 000	60 000±5 000	80 000±6 000
Относительная электрофоретическая подвижность	0,46±0,03	0,31±0,03	0,37±0,02	0,56±0,03
Окраска на гликопротеиды	+	+	—	+
Окраска на липопротеиды	—	—	—	—
Связывание с КонА-сефарозой	+	—	—	+
Термолабильность	+	+	+	+
Высаливание сульфатом аммония, % насыщения	30—55	35—60	30—55	30—50
Осаждение 0,4 % риванолом	+	—	—	+
Осаждение 0,6M сульфосалициловой кислотой	+	+	+	+
Осаждение 2 % трихлоруксусной кислотой	+	+	+	+
Устойчивость к действию трипсина	+	—	+	—

фу. Характерной особенностью РАЭ-1 является его устойчивость к протеолитическому действию трипсина. Как видно из табл. 1, РАЭ-2 представляет собой наиболее крупный из 4 идентифицированных РАЭ термолабильный β_2 -гликопротеид с мол. массой 130 000 дальтон, устойчивый к воздействию 0,4 % риванола. Несмотря на то что РАЭ-2 дает положительное окрашивание на гликопротеиды, он не связывается с КонА-сефарозой и осаждается сульфосалициловой кислотой. В отличие от РАЭ-1 РАЭ-2 разрушается под действием трипсина.

РАЭ-3 представляет собой термолабильный β -глобулин, устойчивый к воздействию трипсина и осаждению риванолом (см. табл. 1). В составе РАЭ-3 с помощью использованных методов нам не удалось выявить углеводный или липидный компонент.

Как видно из табл. 1, РАЭ-4 является термолабильным α_2 -гликопротеидом, который осаждается риванолом, сульфосалициловой и трихлоруксусной кислотами и весьма чувствителен к действию трипсина.

Содержание всех 4 идентифицированных РАЭ в эритролизате, приготовленном путем однократного замораживания и оттаивания, практически не отличалось от такового при использовании длительной процедуры экстракции с применением в качестве детергентов тритона X-100 и твинна-80 [3], что свидетельствует об отсутствии тесной связи РАЭ-1, РАЭ-2, РАЭ-3 и РАЭ-4 с мембранами эритроцитов.

При сравнительном иммунодиффузионном анализе РАЭ-1, РАЭ-2, РАЭ-3 и РАЭ-4 не давали перекрестных иммунологических реакций между собой, а также с гемоглобином. В пределах чувствительности стандартных тест-систем эти антигены не были обнаружены в сыворотках крови здоровых доноров, но закономерно определялись во всех без исключения образцах гемолизатов, в связи с чем идентифицированные нами РАЭ нельзя отнести к изоантигенам. Содержание всех 4 РАЭ в гемолизатах новорожденных и плодов второй половины беременности практически было таким же, как и у взрослых людей. Не выявлено заметных отличий содержания этих антигенов в гемолизатах лиц с удаленной селезенкой (показаниями для операции были травмы и болезнь Верльгофа).

При определении РАЭ у больных коронарным атеросклерозом (табл. 2)

Таблица 2

Сравнительный иммунодиффузионный анализ 4 РАЭ в гемолизатах больных коронарным атеросклерозом, мг%

РАЭ	Здоровые доноры (n=9)	Острый инфаркт миокарда (n=24)	Коронарный атеросклероз с постинфарктным кардиосклерозом (n=19)
РАЭ-1	27,5±4,5	43,6±5,3	25,9±2,1
РАЭ-2	94,0±11,5	158,7±14,0*	187,5±29,0*
РАЭ-3	16,8±1,9	18,0±1,1	17,7±2,6
РАЭ-4	8,5±1,2	9,3±0,6	10,1±0,8

* Разница статистически достоверна ($P<0,05$) по сравнению с группой контрольных доноров.

Следует отметить, что в метаболизме эритроцитов принимает участие, помимо гемоглобина, множество веществ белковой природы, в частности разнообразных ферментов [4]. Ранее нами был применен для характеристики функционального состояния лейкоцитов крови комплексный иммунохимический тест на систему растворимых антигенов лейкоцитов [3]. Представляется целесообразным разработать для характеристики функционального состояния эритроцитов аналогичный комплексный иммунохимический тест на систему растворимых антигенов эритроцитов (РАЭ) и с его помощью исследовать статус эритроцитарного звена при атеросклерозе.

Целью настоящей работы является попытка сравнительного иммунохимического исследования на основе ограниченной системы из 4 индивидуальных РАЭ, идентифицированных нами к настоящему времени, функционального состояния эритроцитов при некоторых формах коронарного атеросклероза.

Методика

Эритроциты отделяли от лейкоцитов с помощью осаждения фитогемагглютинином. Эритролизат получали путем однократного замораживания и оттаивания. Сравнительные исследования индивидуальных РАЭ у больных атеросклерозом проводили на цельных гемолизатах, приготовленных аналогичным способом [3].

Схема иммунизации кроликов и определения физико-химических параметров белков описаны нами ранее [3]. Так, для определения углеводного компонента в молекулах антигена применяли окрашивание линий преципитации реактивом Шиффа под контролем сыывороточного спектра белков и известных гликопротеинов (орозомукоида, трофобластического β -глобулина), а также проводили тест на связывание с конканавалинА-сефарозой (КонА-сефароза). Молекулярную массу антигенов определяли методом тонкослойной хроматографии на сефадексе G-200 с иммунопроявлением, для чего слой сефадекса снимали последовательно полосами в 1 см перпендикулярно направлению пробега антигенов и вносили в лунку в агаровом геле, где антигены определяли с помощью иммунодиффузионного анализа, тестируя их соответствующими моноспецифическими антисыворотками. Указанная модификация позволяет определять молекулярную массу исследуемых антигенов без предварительного получения очищенных препаратов антигенов, причем при построении калибровочной кривой эталонные белки с известной молекулярной массой также можно предварительно не выделять из белковых смесей, если к ним имеются стандартные моноспецифические тест-системы. В качестве эталонных белков были использо-

ваны такие хорошо изученные протеины, как сыывороточный альбумин человека, иммуноглобулин А, трофобластический β -глобулин, плацентарный лактоген, α -фетопроин, цитохром С, сыывороточный α_2 -макроглобулин и α_1 -анти-трипсиин.

Термолабильность антигенов определяли путем прогревания проб при различной температуре в течение 0,5 ч. Относительную электрофоретическую подвижность антигенов определяли сравнительно с сыывороточным альбумином.

Моноспецифические антисыворотки к РАЭ получали путем иммунизации кроликов соответствующими полуочищенными препаратами с добавлением аломокалевых квасцов в качестве адьюванта и истощением полученных иммунных сыывороток смешанной плазмой доноров и лейколизатом. Полноту истощения антисывороток и их моноспецифичность подтверждали параллельно в иммуноэлектрофорезе и с помощью иммунодиффузионного анализа. Принцип приготовления полуочищенного препарата РАЭ-1 для иммунизации заключался в сорбции на КонА-сефарозе из трипсилизированного эритролизата этого антигена с последующей элюцией, диализом и лиофилизацией. Принцип получения препарата РАЭ-2 состоял в пересаживании риванолового фильтрата из эритролизата сульфатом аммония (60 % насыщения), а препарат РАЭ-3 для иммунизации получали аналогично, но из предварительно трипсилизированного эритролизата. Полуочищенный препарат РАЭ-4 приготавливали с помощью адсорбционной хроматографии на каолине (элюция 10 % раствором углекислого натрия) с последующим пересаживанием полунасыщенным раствором сульфата аммония, диализом и лиофилизацией.

Имунодиффузионный анализ проводили с использованием стандартных моноспецифических тест-систем [5], чувствительность которых для РАЭ-1, РАЭ-3 и РАЭ-4 принимали равной 0,5 мг%, а для РАЭ-2 -- 1,0 мг%.

Венозную кровь брали в первые часы после поступления больных в стационар до начала лечения. Диагноз ставили на основании данных клинического и лабораторного обследования. Выделение группы больных с хроническим течением коронарного атеросклероза при наличии постинфарктного кардиосклероза свидетельствовало, по нашим представлениям, об определенной «злокачественности», атеросклеротического процесса.

Результаты и обсуждение

С помощью моноспецифической антисыворотки к РАЭ-1 в составе эритролизата из венозной крови доноров был идентифицирован β_1 -глобулин, физико-химическая характеристика которого представлена в табл. 1. Этот термолабильный антиген (полностью теряет свою антигенную активность при нагревании до 65° С) легко осаждается риванолом, сульфосалициловой и трихлоруксусной кислотами. РАЭ-1 имеет гликопротеидную природу, поскольку связывается с КонА-сефарозой и положительно окрашивается по Шиф-

[5], что согласуется с эффективным ограничением отмеченных процессов с помощью ингибиторов ПОЛ [4].

Данная работа посвящена сопоставлению динамики синтеза РНК и репаративного синтеза ДНК при стрессе с целью выявления временных соотношений и взаимосвязи этих процессов.

Методика

Работу проводили на крысах-самцах линии Вистар, голодавших в течение суток до и во время эксперимента. Работу выполняли в январе — феврале. Стрессорное воздействие осуществляли путем фиксации животных на спине [10] в течение 1, 2 и 6 ч.

Классическим методом выявления повреждения ДНК в виде ее одонитевых разрывов является седиментация ДНК в щелочном градиенте сахарозы [13]. Таким способом было установлено повреждение ДНК при эмоционально-болевым стрессе [4]. Этот метод, однако, оказался недостаточным чувствительным для выявления повреждений ДНК при более слабом иммобилизационном воздействии, использованном в данной работе. Поэтому мы обратились к технике седиментации депротенизированных ядер (нуклеондов), основанной на снижении компактности ДНК в ядрах и соответствующем снижении скорости их осаждения в нейтральном сахарозном градиенте при появлении разрывов ДНК [9]. Ядра выделяли в присутствии ЭДТА [11]. ДНК выделяли с хлороформом [12]. Состав оснований ДНК, в том числе содержание 5-метилцитозина (МЦ), определяли с помощью тонкослойной хроматографии [1].

Для оценки репаративного синтеза ДНК за 1,5 ч до декапитации животным внутрибрюшинно под легким эфирным наркозом (как и в контроле) вводили оксимочевину, ингибирующую полуконсервативный синтез ДНК [14], в дозе 50 мг/мл 0,9 % NaCl pH 7,4 на 100 г массы, через 0,5 ч после чего вводили ^3H -тимидин в дозе 250 мкКи/мл 0,9 % NaCl на 100 г массы.

Для оценки синтеза РНК тем же животным за 0,5 ч до забоя также внутрибрюшинно вводили ^{14}C -уридин в дозе 100 мкКи/мл 0,9 % NaCl на 100 г массы.

Извлеченные органы гомогенизировали на холоду в 10 объемах раствора, содержащего 0,15 М NaCl, 0,024 М ЭДТА, 1 % додецилсульфат натрия pH 7,4. Гомогенат фильтровали через 4 слоя марли и центрифугировали в течение 10 мин при 5000 g. Осадок отбрасывали. К надосадочной жидкости добавляли 2,5 объема этанола и выпадающий осадок, содержащий нуклеиновые кислоты, вновь растворяли в 0,015 М NaCl pH 7,4 с последующими пересаживаниями спиртом. Далее материал частично депротенизировали и подвергали щелочной обработке для разделения ДНК и РНК [15] с последующим нанесением на миллипоровые фильтры с размером пор 0,45 мкм. ДНК-содержащий материал наносили в виде осадка, а рибонуклеотиды — продукты щелочного гидролиза РНК (0,5 н.КОН) — наносили на фильтры при подсушивании в токе воздуха с гидролизатом после его нейтрализации 1,5 н. HClO_4 и удаления перхлората центрифугированием.

Радиоактивность просчитывали в сцинтилляторе, содержащем 4 г РРО, 400 мг РОРОР, 300 мл метилцеллосольва и 700 мл толуола. В целях сопоставимости расчет радиоактивности в обоих случаях производили на количество ДНК, определявшиеся в реакции с дифениламином [7].

Результаты и обсуждение

Как видно из представленных на рис. 1 данных, в результате экспериментов, проведенных с использованием ядер миокарда, выявлено, что 6-часовой иммобилизационный стресс сопровождается появлением разрывов ДНК, которое снижает ее молекулярную массу и плотность внутриядерной упаковки, что следует из смещения зоны седиментации ядер из миокарда подопытных животных к вершине градиента по сравнению с таковым в контроле. При этом профиль седиментации в контроле представлен одним пиком, а в группе подопытных животных — тремя, что свидетельствует в пользу гетерогенности ядер по резистентности к повреждающему (скорее всего свободнорадикальному) воздействию. В определенной мере отмеченные разрывы ДНК можно отнести за счет снижения содержания МЦ в ДНК подопытных животных. Так, в норме в ДНК миокарда и печени содержание этого основания составляло $1,00 \pm 0,01 \%$, а после 6-часового стресса в ДНК миокарда оно снизилось до $0,82 \pm 0,3 \%$, а в ДНК печени — до $0,87 \pm 0,02 \%$. Отличий в содержании других азотистых оснований ДНК при этом не обнаружено. Независимо от того, вызвано ли снижение содержания МЦ в ДНК действием нуклеаз или свободных радикалов, результатом может быть одонитевый разрыв ДНК, т. е. ее инцизирование.

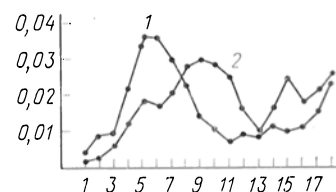


Рис. 1. Профили седиментации нуклеондов, полученных из миокарда контрольных (1) и подопытных (подвергавшихся иммобилизации) (2) крыс.

По оси абсцисс — номера фракций (начиная от дна центрифужной пробирки); по оси ординат — оптическая плотность при 260 нм, измеренная после лизиса нуклеондов путем добавления к фракциям градиента $\frac{1}{2}$ объема 0,2 н. NaOH.

не удалось выявить статистически достоверных изменений содержания в гемолизатах РАЭ-1, РАЭ-3 и РАЭ-4 по сравнению с контрольной группой здоровых доноров. В то же время установлено статистически достоверное повышение уровня РАЭ-2 как при остром инфаркте миокарда (более чем в 1,5 раза), так и при хроническом коронарном атеросклерозе с постинфарктным кардиосклерозом (в 2 раза). На наш взгляд, это представляет особый интерес, поскольку, как известно [4], в циркулирующих эритроцитах невозможен синтез каких-либо белков в связи с отсутствием нуклеиновых кислот (в метаболизме эритроцитов используется, в частности, набор ферментов, синтезированных в клетках костного мозга, т.е. на той стадии процесса, когда эритроцит имел ядро).

Наиболее вероятным представляется предположение, что при атеросклерозе происходят определенные изменения в кроветворении, приводящие к выбросу в кровь эритроцитов с измененным содержанием некоторых внутриклеточных белков (скорее всего ферментов). Носят ли эти изменения компенсаторный характер или **имеют** непосредственное отношение к атерогенезу, остается неясным, поскольку функциональное значение РАЭ-2 пока не расшифровано. Конечно, теоретически полученные результаты могут быть интерпретированы на основе и других допущений. Например, можно предположить, что при атеросклерозе происходит укорочение периода полужизни эритроцитов с более низким содержанием РАЭ-2, или можно исходить из предположения о существовании определенных клонов эритроцитов, метаболизм которых существенно различается (в одних эритроцитах

РАЭ-2 есть, в других нет вообще). При таком допущении во главу угла встанет активация клона предшественников эритроцитов, содержащих РАЭ-2.

Таким образом, с помощью разработанного комплексного иммунохимического теста на систему из 4 индивидуальных РАЭ нами установлены избирательные изменения в спектре этих антигенов при развитии коронарного атеросклероза за счет резкого увеличения содержания РАЭ-2 в эритроцитах. Диагностическое значение иммунохимического теста на РАЭ-2 для объективной оценки степени тяжести атеросклеротического процесса подлежит специальному дополнительному изучению.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анестиади В. Х., Нагорнев В. А. — Арх. пат., 1984, № 3, с. 10—18.
2. Лопухин Ю. М., Арчаков А. Н., Владимиров Ю. А., Коган Э. М. Холестериноз. М., 1983.
3. Петрунин Д. Д., Лопухин Ю. М., Шевченко О. П. — Бюл. экпер. биол., 1983, № 7, с. 72—74.
4. Рябов С. И., Шостка Г. Д. Молекулярно-генетические аспекты эритропоэза. Л., 1973.
5. Храмова Н. И., Абелев Г. И. — Бюл. экпер. биол., 1961, № 12, с. 107—111.

Поступила 10.10.84

IMMUNOASSAY OF FOUR SOLUBLE ANTIGENS IN ERYTHROCYTES OF PATIENTS WITH CORONARY ATHEROSCLEROSIS

D. D. Petrunin, Yu. S. Talarinov, V. V. Murashko, A. P. Baranov, A. V. Kamenets, G. A. Olefirenko

N. I. Pirogov II Medical School, Moscow

Four individual soluble antigens were identified in human erythrocytes. According to the universally accepted classification these antigens were denoted as RAE-1, RAE-2, RAE-3 and RAE-4. Physico-chemical properties of the antigens were studied. The immunoassay exhibited that level of RAE-2 was increased in patients with coronary atherosclerosis.

УДК 613.863-07:616-008.939.633.2-074

Ф. З. Меерсон, В. К. Васильев

СООТНОШЕНИЕ ТРАНСКРИПЦИИ И РЕПАРАЦИИ ДНК ПРИ СТРЕССЕ

Институт общей патологии и патологической физиологии АМН СССР, Москва

Ранее выполненное исследование показало, что при эмоционально-болевым стрессе после короткого периода угнетения синтеза РНК и белка следует длительная активация этих процессов

[6]. Одновременно наблюдается повреждение ДНК с последующей активацией ее репаративного синтеза [2] как следствие выраженной активации перекисного окисления липидов (ПОЛ)

8. Chessin H., Summers W. C. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1970, vol. 38, p. 40.
9. Cook P. R., Brazell I. A. — J. Cell Sci., 1975, vol. 19, p. 261.
10. Kvetnansky R., Weise V. K., Kopin I. J. — Endocrinology, 1970, vol. 87, p. 744.
11. Lilja H. S., Hyde E., Longnecker D. S. — Cancer Res., 1977, vol. 37, p. 3925.
12. Marmur J. — J. molec. Biol., 1961, vol. 3, p. 208.
13. McGrath R. A., Williams R. W. — Nature, 1966, vol. 212, p. 534.
14. Rajevisky M. F. — Exp. cell. Res., 1970, vol. 60, p. 269.
15. Schmidt G., Thannhauser S. I. — J. biol. Chem., 1945, vol. 161, p. 83.

Поступила 10.11.84

THE RATIO BETWEEN REPAIR AND TRANSCRIPTION OF DNA IN STRESS

F. Z. Meerson, V. K. Vasil'ev

Institute of General Pathology and Pathophysiology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Stress-induced DNA breaking may occur partially as a result of decrease in 5-methyl cytosine content. Poststressory activation of transcription was shown to follow the stimulation of the DNA repair synthesis. The processes studied involved two phases and were tissue-dependent.

УДК 616.89-008.441.13-092.9-07:[616.831-008.94:577.175.822+616.831-008.934.663

И. В. Маслова, Н. В. Шевченко, А. И. Балаклеевский

ОБМЕН АЦЕТИЛХОЛИНА И γ -АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ В БАЗАЛЬНЫХ ГАНГЛИЯХ И ЛИМБИЧЕСКОЙ КОРЕ МОЗГА КРЫС НА РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЯХ ФОРМИРОВАНИЯ АЛКОГОЛЬНОЙ ЗАВИСИМОСТИ

Проблемная лаборатория биохимии нейрого르몬ов Минского медицинского института

Выявление и анализ нарушений в обмене нейромедиаторов мозга при алкоголизме, изменений состояния отдельных нейромедиаторных систем и особенно их взаимодействия в структурах мозга на различных стадиях развития алкогольной зависимости имеют первостепенное значение как для понимания механизмов патогенеза, так и для изыскания новых методов и средств лечения алкоголизма [1, 6, 11, 20]. Показана важная роль нейромедиаторных систем катехоламинов (дофамина, норадреналина), серотонина и энкефалинов в механизме развития влечения к алкоголю и значительные изменения в состоянии этих систем при хронической алкоголизации животных [1, 3, 6, 20].

Имеющиеся в литературе данные о состоянии обмена γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) и ацетилхолина в мозге при хронической алкоголизации весьма противоречивы, что, очевидно, в значительной степени определяется различиями использованных авторами моделей алкоголизации, видов животных, исследуемых структур мозга и т. д. [11, 29]. Не обнаружено значительных различий в обмене и транспорте ГАМК в коре больших полушарий и базальных ганглиях мозга крыс, предпочитающих этанол или воду [5]. Однако при хроническом потреблении

раствора этанола в мозге мышей, предпочитающих этанол воде, уже через 2 нед обнаруживается снижение числа рецепторов с низким сродством к ГАМК [26], а через 7 мес снижаются плотность и особенно чувствительность бензодиазепиновых рецепторов [16], через которые, как полагают, реализуются угнетающие влияния на нейрональные структуры мозга.

Отмечается также ослабление тормозных регуляторных влияний со стороны ГАМК-рецепторов на активность дофаминовых нейронов в базальных ганглиях и лимбической коре мозга после длительного (5 и 9 мес) потребления крысами этанола [21].

В мозге мышей с генетически обусловленной предрасположенностью к потреблению алкоголя обнаружены более высокое содержание и скорость синтеза ацетилхолина и уменьшение активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ), причем после введения таким животным ингибитора синтеза ацетилхолина наблюдается снижение потребления ими этанола [19]. Химическое разрушение серотонинергических нейронов в мозге таких мышей приводит к резкому возрастанию потребления ими алкоголя, которое вновь нормализуется после угнетения синтеза ацетилхолина [19]. Выявлены реципрокные отношения в изменении активности до-

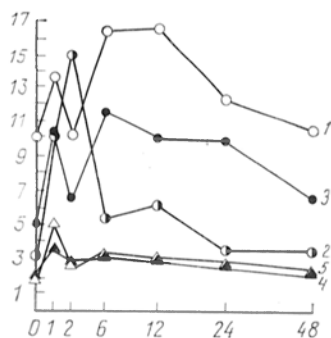


Рис. 2. Динамика интенсивности РС ДНК (в имп/мин/мг ДНК · 10⁻²) после иммобилизационного стресса.

Стандартное отклонение представленных значений в пределах 8%. По оси абсцисс — время (в ч от начала стрессорного воздействия). В контроле — суточные колебания в пределах ошибки. 1 — печень; 2 — мозг; 3 — почки; 4 — сердце; 5 — селезенка.

Иницирование ДНК, по-видимому, наблюдается не только в исследованной временной точке (т. е. сразу после окончания 6-часового стрессорного воздействия), но и раньше, что видно из динамики репаративного синтеза (РС) ДНК, представленной на рис. 2. Стресс вызывает активацию РС во всех исследованных органах, но в разной степени. В норме уровни РС (по нисходящей) располагаются в следующей последовательности: печень, почки, мозг, сердце, селезенка. Активация РС развивается в две фазы. Первая — короткая, пик которой приходится на 1—2 ч от начала стрессорного воздействия, вторая — длительная, завершающаяся через 2 сут от начала воздействия. В первую фазу активация РС наиболее выражена в тканях мозга и менее — в ряду селезенка, почки, печень, сердце. Вторая фаза активации

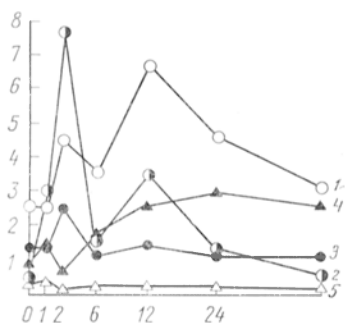


Рис. 3. Динамика синтеза РНК после иммобилизационного стресса.

По оси ординат — радиоактивность материала, содержащего рибонуклеотиды — продукты щелочного гидролиза РНК — в расчете на ДНК (имп/мин/мг ДНК · 10⁻¹). В контроле — суточные колебания в пределах ошибки, не превышающей 10% от представленных значений. Остальные обозначения те же, что на рис. 2.

РС в печени, почках и сердце выражена не менее, чем первая, но в тканях мозга и селезенки это явление выражено меньше.

Результаты исследования уровня синтеза РНК показывают (рис. 3), что по этому признаку исследованные органы в норме располагаются в следующей последовательности: печень, почки, сердце, мозг, селезенка. Стресс вызывает активацию транскрипции во всех органах, за исключением селезенки. Активация транскрипции развивается в две фазы. По интенсивности первая фаза сильно выражена в тканях мозга и в почках, достаточно отчетливо выражена в печени и слабо — в сердце и селезенке. Вторая фаза наиболее значительно выражена в сердце, достаточно отчетливо выражена в печени и мозге и слабо выражена в селезенке и почках.

При сопоставлении РС и синтеза РНК по исследованным органам прямой корреляции их уровней не наблюдалось, из чего, однако, не следует, что эти процессы не имеют взаимосвязи. Так, например, по нашим данным (см. рис. 2, 3), фазы постстрессорной активации транскрипции, как правило, отстают от соответствующих фаз РС и никогда их не опережают, в чем усматривается аналогия с радиационным воздействием, при котором установлено явление активации транскрипции после умеренного повреждения матрицы ДНК [8]. В свете современных представлений [3] это явление можно объяснить тем, что разрывы полинуклеотидной цепи облегчают расхождение комплементарных цепей ДНК, что способствует связыванию молекул РНК-полимеразы и ее продвижению в ходе транскрипции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильев В. К. — Науч. докл. высш. школы. биол. науки, 1971, № 9, с. 118.
2. Васильев В. К., Меерсон Ф. З. — Вопр. мед. химии, 1984, № 2, с. 112.
3. Газарян К. Г., Тарантул В. З. Геном эукариот. Молекулярная организация и экспрессия. М., 1983.
4. Меерсон Ф. З., Васильев В. К. — Вопр. мед. химии, 1982, № 2, с. 115.
5. Меерсон Ф. З., Каган В. Е., Прилипко Л. Л. и др. — Бюл. eksper. биол., 1979, т. 88, с. 404.
6. Меерсон Ф. З., Павлова В. И., Сухих Г. Т. и др. — Пат. физиол., 1982, № 5, с. 3.
7. Burton K. — Meth. Enzymol., 1968, vol. 12-B, p. 163.

гировали 10 мин при 3000 об/мин; надосадоочную фракцию экстрагировали хлороформом (1:1 об/об), водный слой высушивали при 100 °С в фарфоровых тиглях досуха. Разгонка аминокислот проводилась на бумаге F № 3 (ГДР) в системе бутанол — уксусная кислота — вода (4:1:5).

После окраски пятна аминокислот элюировали 3 мл 0,005 % раствора сульфата меди в 75 % растворе этанола. Оптическую плотность измеряли на микроколориметре при 54 нм.

Активность глутаматдекарбоксилазы ГДК и ГАМК-аминотрансферазы (ГАМК-Т) определяли описанными методами [8,12] с хроматографическим разделением и колориметрическим определением содержания целевых продуктов ферментных реакций.

Об активности ГДК судили по приросту ГАМК, используя в качестве субстрата L-глутаминную кислоту. Активность ГАМК-Т измеряли по накоплению глутамата с использованием ГАМК и α -кетоглутаровой кислоты в качестве субстратов. После часовой инкубации при 37 °С пробы обрабатывали, как и при определении аминокислот. Содержание белка определяли по методу Лоури [22]. Результаты опытов обрабатывали статистически с расчетом критериев t и P [10].

Результаты и обсуждение

В таблице представлены показатели обмена ГАМК и ацетилхолина в базальных ганглиях мозга крыс у контрольных, «малопьющих» и «многопьющих» животных. На I стадии алкоголизма (период формирования влечения к этанолу) у «многопьющих» животных по сравнению как с контролем,

так и с группой «малопьющих» отмечаются повышение содержания ацетилхолина, активация холинацетилтрансферазы и АХЭ. Изменений содержания ГАМК в базальных ганглиях «многопьющих» и «малопьющих» животных не обнаружено, однако у первых повышается содержание глутаминовой кислоты. У «малопьющих» крыс отмечаются незначительное угнетение активности ГАМК-Т и активация ГДК по сравнению с контролем и группой «многопьющих» крыс. В лимбической коре мозга «многопьющих» крыс отмечаются менее выраженные изменения показателей обмена ацетилхолина и ГАМК, обнаружены только активация АХЭ на 25 % и снижение активности ГАМК-Т на 18 % по сравнению с контрольной группой (см. рисунок).

На рисунке показаны изменения показателей обмена ацетилхолина и ГАМК в базальных ганглиях и лимбической коре мозга крыс на различных стадиях экспериментального алкоголизма. Через 4 мес контакта с этанолом у «многопьющих» крыс в базальных ганглиях мозга отмечается еще большее повышение содержания ацетилхолина по сравнению с таковым у контрольных животных. Более значительные изменения происходят в обмене ГАМК: снижается содержание этой кислоты на фоне угнетения актив-

Показатели обмена ацетилхолина и ГАМК в базальных ганглиях мозга крыс с различной степенью влечения к этанолу ($n = 5$)

Изучаемый показатель	Группа животных		
	контроль	«малопьющие»	«многопьющие»
Содержание ацетилхолина, нмоль/г ткани	17,3 \pm 1,15	16,1 \pm 0,49	21,5 \pm 0,96 $P_1 < 0,05$ $P_2 < 0,01$
Активность холинацетилтрансферазы, мкмоль/мг белка/мин	0,034 \pm 0,001	0,036 \pm 0,001	0,039 \pm 0,001 $P_1 < 0,01$ $P_2 < 0,01$
Активность АХЭ, мкмоль/мг белка/мин	8,91 \pm 0,28	10,29 \pm 0,55 $P_1 < 0,05$	12,11 \pm 0,48 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,05$
Содержание ГАМК, мкмоль/г ткани	2,70 \pm 0,10	2,69 \pm 0,03	2,90 \pm 0,10
Содержание глутаминовой кислоты, мкмоль/г ткани	5,05 \pm 0,12	5,00 \pm 0,07	5,72 \pm 0,20 $P_1 < 0,05$ $P_2 < 0,05$
Активность ГАМК-Т, нмоль/мг белка/мин	5,50 \pm 0,42	4,50 \pm 0,20 $P_1 < 0,01$	5,30 \pm 0,20 $P_1 < 0,001$
Активность ГДК, нмоль/мг белка/мин	2,30 \pm 0,05	2,54 \pm 0,05 $P_1 < 0,05$	2,26 \pm 0,05 $P_2 < 0,05$

Примечание. P_1 — по сравнению с контролем, P_2 — с группой «малопьющих» крыс.

фаминергических и ацетилхолинергических нейронов в базальных ганглиях мозга крыс во время их алкоголизации, в период сформированной алкогольной зависимости и после отмены этанола [20]. Эти данные, очевидно, могут свидетельствовать о непосредственном участии холинергических структур мозга в развитии влечения к алкоголю и зависимости от него.

Учитывая широкое распространение и важнейшее значение в деятельности мозга нейромедиаторных систем ацетилхолина и ГАМК как почти универсальных систем возбуждения и торможения [9], а также тесную функциональную связь между ними в различных структурах мозга [2, 4, 9, 15, 20], мы поставили задачу провести сравнительный анализ показателей обмена ацетилхолина и ГАМК в базальных ганглиях и лимбической коре мозга крыс на различных стадиях формирования и развития экспериментального алкоголизма. Обе указанные структуры мозга участвуют в регуляции эмоционального статуса и психомоторной активности организма, относятся к числу структур, наиболее богатых дофамин-, ГАМК-, энкефалин- и холинергическими рецепторами, и функционально связаны между собой [4, 15, 23, 24].

Методика

В опытах использовали беспородных крыс-самцов массой тела 150—170 г, которая в поздние сроки хронической алкоголизации достигала 350 г.

Животные контрольной группы в качестве жидкости получали воду, животные опытных групп имели доступ к двум индивидуальным поилкам: с водой и 15 % раствором этанола. Животных содержали на сухом корме. При моделировании экспериментального алкоголизма были использованы методические рекомендации Фармакологического комитета Минздрава СССР.

Формировались следующие группы подопытных животных: «малопьющие» крысы, потреблявшие 5—15 мл 15 % раствора этанола на 1 кг массы в сутки после 10-дневного контакта с этанолом; «многопьющие» крысы, потреблявшие 30—50 мл 15 % раствора этанола на 1 кг массы в сутки после 10-дневного контакта с этанолом в условиях свободного выбора (I стадия экспериментального алкоголизма). В группу со II стадией алкоголизма брали «многопьющих» крыс после 4—4,5 мес контакта с этанолом. В группу с III стадией экспериментального алкоголизма брали «многопьющих» крыс после 9 мес контакта с этанолом.

Крыс декантывали, быстро извлекали на холоду головной мозг. Базальные ганглии и лимбическую (фронтальную) кору мозга вы-

деляли в соответствии с указаниями литературы [17, 21]. Структуры мозга немедленно замораживали в жидком азоте, взвешивали и гомогенизировали на холоду в дистиллированной воде в соотношении 1:10. Показатели обмена ГАМК и ацетилхолина определяли в одних и тех же образцах тканей.

Содержание ацетилхолина в экстрактах отделов мозга определяли биологическим способом на желудочке изолированного по Штраубу сердца лягушки [7]. Гомогенат обрабатывали в присутствии 10^{-4} М прозерина при pH 4,0. Пробы помещали в водяную баню при 90 °C на 10 мин, центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин, доводили pH до 7,2 с помощью 0,1 н. NaOH. Надосадочную фракцию разводили раствором Рингера для холоднокровных в зависимости от чувствительности сердца лягушки. Для исключения нехолинергических влияний на сердце лягушки пробы тестировались дважды, до и после обработки сердца 10^{-4} М раствором атропина.

Автоматическую регистрацию и запись амплитуды сокращений изолированного желудочка сердца лягушки осуществляли на специально сконструированной нами оптроной установке.

Активность холинацетилтрансферазы определяли радиометрическим методом [13]. Среда инкубации содержала следующие компоненты: 50 мкл гомогената мозга (1:10) на воде и 50 мкл 0,01 М фосфатного буфера pH 7,4, содержащего $MgCl_2$ —10 мМ, тритон X-100—0,5 %, NaCl—30 мМ, физостигмина салицилат — 0,2 мМ, холина хлорид — 10 мМ, сывороточный альбумин — 0,05 %, $[1-^{14}C]$ -ацетил-КоА с удельной активностью 50 мКи/ммоль (фирма «Amersham», Англия) и ацетил-КоА в конечной концентрации 0,05 %. Инкубация 30 мин при 37 °C. Реакцию заканчивали путем переноса проб в ледяную баню и добавления 2 мл охлажденного 10 мМ фосфатного буфера pH 7,4, содержащего 0,02 мМ ацетилхолин-хлорида.

К пробам добавляли по 1 мл раствора тетрафенилбората натрия в бутилацетате (15 мг/мл), встряхивали 5 мин, центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин. 300 мкл органической фазы помещали во флакон со сцинтилляционной жидкостью Бреля; радиоактивность проб измеряли на счетчике «Beckman Mate II» и пересчитывали в микромоли синтезированного ацетилхолина.

Активность АХЭ определяли методом Элмана в модификации [18]. К 0,1 мл 10 % гомогената мозга добавляли 0,1 мл 0,008 М раствора ацетилтихолина йодида и 0,3 мл 0,1 М фосфатного буфера, pH 7,6. Инкубация 30 мин при 37 °C. Реакцию останавливали добавлением 1,5 мл охлажденного раствора 5,5'-дитио-бис-2-нитробензойной кислоты (ДТБНБ) в фосфатэтанольном буфере, содержащем 12,4 мг ДТБНБ, 120 мл 96 % этанола, 80 мл дистиллированной воды, 50 мл 0,1 М фосфатного буфера pH 7,6. После центрифугирования измеряли оптическую плотность проб на микроколориметре при 425 нм. Калибровочный график строили со стандартными растворами тхолина йодида, проведенными через все этапы описанной процедуры.

Содержание ГАМК и глутаминовой кислоты определяли с помощью нисходящей бумажной хроматографии [14]. К 0,5 мл 10 % гомогената мозга на холоду добавляли 2 мл 96 % этанола. Пробы встряхивали, центрифуги-

щего влияния через ГАМК-рецепты на ацетилхолинергические нейроны очевидно, может также способствовать наблюдаемой в наших опытах активации ацетилхолиновых структур в базальных ганглиях и лимбической коре.

На основании имеющихся данных литературы [4, 20] и ранее полученных нами результатов [2, 3] можно предположить, что активация ацетилхолиновых нейронов в базальных ганглиях может быть обусловлена также ослаблением активности дофаминергических нервных окончаний, что в свою очередь связано со стимулирующим влиянием этанола или его метаболитов на опиатные рецепторы [23, 24], осуществляющие ингибиторный контроль над дофаминергическими структурами в базальных ганглиях [4].

Учитывая данные литературы о патогенетической значимости активации ацетилхолиновых нейронов мозга в фармакологически индуцированном усилении потребления этанола [19], можно рассматривать обнаруженное нами повышение активности ацетилхолиновых структур в базальных ганглиях мозга (и частично в лимбической коре) в качестве важного нейрохимического механизма формирования влечения к этанолу на I стадии алкоголизма.

При длительной алкоголизации животных отмечается ослабление обмена ацетилхолина и снижение его содержания в базальных ганглиях. В механизме снижения активности ацетилхолиновых нейронов на поздних стадиях экспериментального алкоголизма определенное значение может иметь возрастание числа и чувствительности ГАМК-рецепторов в базальных ганглиях мозга [24], оказывающих угнетающее влияние на активность ацетилхолиновых нейронов [4, 9].

Наиболее существенные изменения обмена ГАМК в мозге зафиксированы на II стадии экспериментального алкоголизма. Они характеризуются ослаблением активности ГДК, разнонаправленными изменениями содержания ГАМК в базальных ганглиях и лимбической коре мозга крыс и свидетельствуют об ослаблении функциональной активности ГАМК-структур, особенно в лимбической коре.

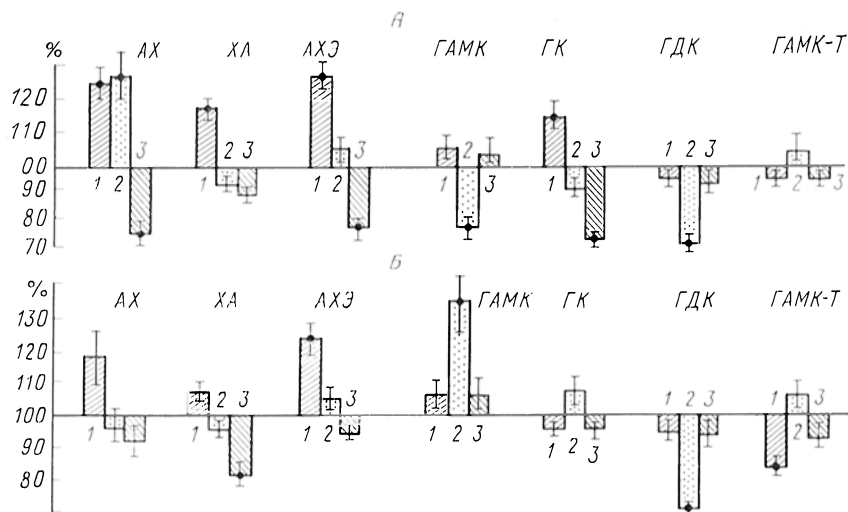
На III стадии алкоголизма показатели обмена ГАМК уже нормализуют-

ся, за исключением понижения уровня глутамата в базальных ганглиях.

Характерно, что в те же сроки хронической алкоголизации животных (5 и 9 мес) в базальных ганглиях и лимбической коре мозга крыс отмечается ослабление угнетающих влияний со стороны ГАМК-рецепторов на дофаминергические нервные окончания, которые также выходят из-под тормозного контроля со стороны собственных ауторецепторов [21]. Следствием такой активации дофаминергических структур может быть усиление их угнетающих влияний на активность ацетилхолиновых нейронов. Это может приводить вначале к нормализации повышенной активности этих нейронов (II стадия), а затем и к подавлению их активности (III стадия алкоголизма), особенно в базальных ганглиях.

Таким образом, отмечается фазность в изменении обмена ацетилхолина и ГАМК в исследованных структурах мозга в зависимости от стадии хронической алкоголизации животных. На I стадии формирования алкогольной зависимости происходит активация системы ацетилхолина. На стадии сформировавшейся алкогольной зависимости приобретают большее значение изменения в обмене ГАМК и происходит, по-видимому, ослабление процессов высвобождения и утилизации медиатора. Далее, при 9-месячной алкоголизации животных отмечается ослабление различных звеньев системы ацетилхолина и угнетение его высвобождения.

Обращает на себя внимание выраженная корреляция между характером фазных изменений обмена ацетилхолина и содержания глутамата в базальных ганглиях мозга крыс с различной степенью алкогольной зависимости. На I стадии отмечаются активация системы ацетилхолина и повышение уровня глутамата, на III стадии алкоголизма угнетение системы ацетилхолина сочетается со значительным снижением содержания глутамата. Учитывая роль глутаминовой кислоты в мозге как медиатора возбуждения и наличие мощной активирующей афферентации ацетилхолиновых нейронов в базальных ганглиях со стороны глутаматных кортико-стриатальных нейронов [25], можно полагать, что фазные изменения активности ацетилхолиновых нейронов на I и III стадии экспериментального алкоголизма зависят от функциональ-



Показатели обмена ацетилхолина и ГАМК в базальных ганглиях (А) и лимбической коре (Б) мозга крыс-самцов на различных стадиях формирования алкогольной зависимости (в % по отношению к контролю, принятому за 100).

АХ — ацетилхолин; ХА — холинацетилтрансфераза; АХЭ — ацетилхолинэстераза; ГАМК — γ-аминомасляная кислота; ГК — глутаминовая кислота; ГДК — глутаматдекарбоксилаза; ГАМК-Т — ГАМК-аминотрансфераза. 1 — I стадия экспериментального алкоголизма (10 дней контакта с этанолом); 2 — II стадия экспериментального алкоголизма (4 мес контакта с этанолом); 3 — III стадия экспериментального алкоголизма (9 мес контакта с этанолом).

ности ГДК. В лимбической коре мозга крыс изменений обмена ацетилхолина в этот момент не обнаружено, а содержание ГАМК значительно повышено при еще более существенном снижении активности ГДК.

Эти данные свидетельствуют об ослаблении активности ГАМК-структур в базальных ганглиях и лимбической коре на стадии сформированной алкогольной зависимости, в основе которой лежит угнетение синтеза ГАМК. В лимбической коре, несмотря на резкое ослабление синтеза ГАМК, наблюдается не снижение уровня ГАМК (как в базальных ганглиях), а, напротив, значительное его повышение. Это указывает, очевидно, на ослабление процессов высвобождения ГАМК в лимбической коре.

III стадия экспериментального алкоголизма характеризуется снижением содержания ацетилхолина при угнетении активности АХЭ в базальных ганглиях и ослаблением активности холинацетилтрансферазы в лимбической коре мозга крыс. Изменений в содержании ГАМК и активности ферментов ее обмена не отмечено, однако заметно снижается содержание глутамата в базальных ганглиях мозга.

Таким образом, на I стадии экспериментального алкоголизма обнаружена избирательная активация нейромедиаторной системы ацетилхолина в ба-

зальных ганглиях мозга у «многопьющих» крыс, которая характеризуется повышением содержания и синтеза медиатора и, очевидно, усилением высвобождения ацетилхолина в синапсы, следствием чего является адаптивная активация АХЭ [7]. При этом в базальных ганглиях не отмечается компенсаторной активации тормозной системы ГАМК. У «малопьющих» животных не наблюдается значительных изменений в системе ацетилхолина в базальных ганглиях (лишь слабая активация АХЭ). Следовательно, избирательная активация системы ацетилхолина в базальных ганглиях только «многопьющих» животных, очевидно, свидетельствует о специфичности этого феномена и его прямой связи с состоянием повышенного влечения к алкоголю. В лимбической коре достоверные изменения содержания ацетилхолина и активности холинацетилтрансферазы отсутствуют, но наблюдается активация АХЭ.

Система ГАМК, по-видимому, не участвует непосредственно в механизмах, обеспечивающих формирование влечения к этанолу. Тем не менее нельзя исключить возможности ослабления угнетающих влияний ГАМК в этот период через ГАМК-рецепторы, число которых в мозге уменьшается в ранний период добровольного потребления этанола [26]. Подобное ослабление уг-

role of the phase alterations observed in metabolism of the brain neurotransmitters and in activity of AC- and GABA-structures during development of alcohol dependency are discussed.

The data obtained suggest that the specific steps of alcoholism should be taken into consideration in the differential treatment using neurotransmitter drugs.

*И. И. Денисова, А. И. Крашенюк, Г. Ю. Ажицкий, Т. К. Шараева,
Е. А. Умовская Л. Б. Хазенсон, Ф. С. Носков*

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ЛАКТОНЕРОКСИДАЗЫ ИЗ КОРОВЬЕГО МОЛОКА

Институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Ленинград

Лактопероксидаза — один из факторов неспецифической защиты организма от инфекций. Этот фермент обнаружен во внешних секретах: молоке, слюне и слезах некоторых млекопитающих [1]. Содержание его в коровьем молоке, по данным литературы [2], составляет 22 мкг/мл. Антимикробное действие лактопероксидазы показано по отношению к ряду микроорганизмов: стрептококкам [3—5], стафилококкам, молочнокислым бактериям [6, 7], эшерихиям, псевдомонадам, сальмонеллам [8, 9]. Механизм воздействия лактопероксидазы на микроорганизмы во многом неясен. Конечным этапом ее антимикробного действия считают окисление сульфгидрильных групп белковых компонентов бактериальной клетки, что приводит к нарушению ее обмена веществ и гибели [10]. Установлено, что для проявления активности лактопероксидазы необходимы ионы тиоцианата и перекись водорода [11]. Считают возможным использовать бактерицидные свойства системы лактопероксидазы для борьбы с кишечными инфекциями [8], воздействия на инфекционные агенты ротовой полости [12], стерилизации молочных продуктов без термической обработки [13]. Лактопероксидаза применяется для йодирования белков и липидов при постановке радиоиммунологических методов исследования.

Описано несколько способов выделения и очистки лактопероксидазы из человеческой слюны [14, 15] и молока коров [16, 17]. Комбинации методов очистки завершает, как правило, изоэлектрофокусирование (ИЭФ) на амфолитах. Однако использование амфолитов связано с рядом трудностей (длительность процесса, способность амфолитов-носителей образовывать комплексы с разделяемыми белками, высокая стоимость амфолитов и др.),

осложняющих применение этих носителей для препаративного разделения белков. В Крымском медицинском институте разработан способ ИЭФ в искусственном градиенте pH, создаваемом путем последовательного наложения борат-полиольных буферных растворов с различными значениями pH [18, 19].

Основная задача данной работы заключалась в применении борат-полиольной системы для очистки лактопероксидазы коровьего молока.

Методика

Использовали коровье молоко 3—5-го дня лактации с максимальной пероксидазной активностью [2]. Активность лактопероксидазы определяли по окислению *p*-фенилендиамина [20] и выражали в единицах оптической плотности при 576 нм. Концентрацию белка определяли методом Лоури [21]. Электрофорез в полиакриламидном геле проводили в кислой среде [22]. С целью иммунохимического анализа чистоты полученного препарата готовили антисыворотку к частично очищенной лактопероксидазе. Для этого кроликам внутримышечно вводили 1 мг частично очищенного фермента в 0,5 мл раствора вместе с 0,5 мл полного адьюванта Фрейнда; инъекции повторяли 3 раза через 7—10 дней. Иммуноэлектрофорез проводили в агаровом геле [23]. В качестве свидетеля использовали коммерческий препарат лактопероксидазы фирмы «Sigma» (США). Результаты опытов обрабатывали статистически [24].

Результаты и обсуждение

В основу способа выделения и очистки лактопероксидазы положен метод, описанный в литературе [17] и включающий ионообменную хроматографию на КМ-сефадексе С-50, выделение сульфатом аммония при 60—80 % насыщении и ИЭФ на амфолитах (см. схему). Однако на этапе сорбции на КМ-сефадексе казеин выпадает в осадок. Твердые частицы казеина способствуют агрегации сефадекса, что препятствует присоединению лактопероксидазы, затрудняет ее последую-

ного состояния глутаматных нейронов коры больших полушарий.

Выявленные фазные изменения обмена медиаторных систем ацетилхолина и ГАМК в обеих мотивационных структурах мозга (базальные ганглии и лимбическая кора) в процессе формирования и развития алкогольной зависимости указывают на необходимость дифференцированного назначения нейромедиаторных соединений различных классов в качестве противоалкогольных средств в зависимости от стадии алкоголизма. Для коррекции активности нейромедиаторных систем в базальных ганглиях мозга и ослабления алкогольной мотивации представляется целесообразным применение стимуляторов ГАМКергических структур и холиноблокаторов на начальных стадиях формирования алкогольной зависимости, назначение стимуляторов синтеза ГАМК и ГАМК-рецепторных структур при сформировавшейся зависимости к этанолу, а также активаторов глутаматергических структур в поздние стадии алкоголизма.

Полученные нами к настоящему времени результаты по коррекции потребления этанола нейротропными препаратами при экспериментальном алкоголизме подтверждают обоснованность и перспективность изысканий в этом направлении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анохина Н. П., Коган Б. М., Нечаев П. В. — В кн.: Этанол и обмен веществ. Минск, 1982, с. 55—71.
2. Балаклеевский А. Н., Маслова Н. В. — Докл. АН БССР, т. 23, № 4, с. 372—375.
3. Балаклеевский А. Н., Маслова Н. В., Шевченко П. В. и др. — В кн.: Нейропсихофармакология и биологические аспекты алкоголизма. М., 1983, с. 9.
4. Биглио Ж., Корда М. Ж., Козу М., Гесса Г. Л. — В кн.: Эндорфини. М., 1981, с. 228—242.
5. Боброва Н. П. — В кн.: Этанол и обмен веществ. Минск, 1982, с. 104—117.
6. Буров Ю. В. — Вестн. АМН СССР, 1982, № 5, с. 72—77.
7. Маслова Н. В. Регуляция обмена ацетилхолина в мозгу некоторыми нейротропными препаратами. Автореф. дис. канд. биол. наук. Л., 1982.
8. Острецова Н. Б., Сытинский Н. А. — Укр. биохим. журн., 1962, т. 34, № 3, с. 456—474.
9. Роберте Е. — Журн. эволюц. биохим., 1973, т. 9, № 5, с. 445—463.
10. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. Минск, 1973.
11. Сытинский Н. А. Биохимические основы действия этанола на центральную нервную систему. М., 1980.

12. Сытинский Н. А., Авенирова Е. Л. — В кн.: Нервная система. Л., 1967, т. 8, с. 73—78.
13. Тучек С. Синтез ацетилхолина в нейронах. Пер. с англ. М., 1981.
14. Шатунова Н. Ф., Сытинский Н. А. — В кн.: Нервная система. Л., 1962, т. 3, с. 12—16.
15. Fonnum F., Storm-Mathisen J. — In: Handbook of Psychopharmacology. New York, 1978, vol. 9, p. 357—401.
16. Freund I. — Life Sci., 1980, vol. 27, p. 987—992.
17. Glowinski J., Iversen L. L. — J. Neurochem., 1966, vol. 13, p. 665—669.
18. Govin V., Proinov J., Baltescu V. et al. — Analyt. Biochem., 1978, vol. 86, p. 324—326.
19. Ho A. K. S., Kissin B. — In: Alcohol Intoxication and Withdrawal. New York, 1975, vol. 2, p. 303—310.
20. Hunt W. A., Maychrowicz E., Dalton T. K. et al. — Alcoholism, 1979, vol. 3, p. 359—363.
21. Liljequist S., Engel J. — J. Neural Transmiss., 1979, vol. 46, p. 195—204.
22. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. — J. biol. Chem., 1951, vol. 193, p. 265—275.
23. Reggiani A., Barbaccia M. L., Spano P. F., Trabucchi M. Substance Alcohol Actions / Misuse, 1980, vol. 1, p. 151—158.
24. Reggiani A., Barbaccia M. L., Spano P. F., Trabucchi M. — J. Neurochem., 1980, vol. 35, p. 34—37.
25. Schwarz R., Coyle J. T. — Brain Res., 1977, vol. 127, p. 235—249.
26. Ticku M. K., Burch T. — J. Neurochem., 1980, vol. 34, p. 417—423.

Поступила 10.11.84

THE STATE OF ACETYLCHOLINE AND GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID METABOLISM IN RAT BRAIN BASAL GANGLIA AND LIMBIC CORTEX DURING DIFFERENT STEPS OF ALCOHOL DEPENDENCY

I. V. Maslova, N. V. Shevtchenko,
A. I. Balakleevsky

Laboratory of Neurohormone Biochemistry,
Medical School, Minsk

An increase in content of acetylcholine (AC) as well as stimulation of choline acetyltransferase and acetylcholinesterase were observed in basal ganglia of rat brain during development of alcohol dependency, thus indicating the activation of the AC structures. Less distinct activation of the AC structures occurred in limbic (frontal) cortex. At the step of complete alcohol dependency the patterns of AC metabolism were considerably normalized in the both brain structures; at the same time, activity of the gamma-aminobutyric acid (GABA) system was decreased, which occurred due to inhibition of the GABA synthesis. At the III step of experimental alcoholism with "physical" dependency on ethanol synthesis and release of the AC were lowered, especially distinct in basal ganglia. These phase alterations in the activity of the AC structures in basal ganglia were accompanied by the similar alterations in content of glutamate: an increase of glutamate at the I step of alcoholism and a decrease — at the III step. Possible mechanisms and pathogenetic

**Характеристика фракций, полученных при очистке лактопероксидазы ИЭФ
в борат-полиольной системе**

Фракция	Изоэлектрическая точка (pI)	Степень чистоты (RZ)	Удельная активность	Степень очистки	% от общего количества
I	11,40—11,60	$0,84 \pm 0,05$	$220,5 \pm 10,3$	1,9	12 ± 5
II	11,30—11,40	$0,79 \pm 0,06$	$200,3 \pm 16,8$	1,7	25 ± 4
III	11,05—11,13	$0,75 \pm 0,05$	$215,2 \pm 5,9$	1,9	49 ± 6
IV	10,49—10,65				
V	10,29—10,40	$0,67 \pm 0,07$	$211,0 \pm 13,2$	1,8	14 ± 3

Примечание. Степень чистоты (RZ) — отношение оптической плотности при 412 нм к оптической плотности при 280 нм; степень очистки — отношение удельной активности фракции к удельной активности исходного материала.

тервале рН 10,3—11,6 и различаются на 0,1—0,2 и в одном случае на 0,6 единицы рН (см. таблицу). При ИЭФ на амфолитах лактопероксидаза также образует 5 фракций, одна из которых содержит 2 субфракции [16]. Разница 0,1—0,2 единицы рН соответствует единице заряда и обусловлена гидролизом лабильной амидной группы аминокислотного остатка. Значения рI, установленные при ИЭФ в борат-полиольной системе, выше, чем при ИЭФ на амфолитах. Это обусловлено, по-видимому, отсутствием влияния амфолитов.

Фракции III и IV (см. рис. 1) очень слабо разделены, и, кроме того, при отборе их из колонки происходит значительное перемешивание проб, поэтому проводили анализ фракций I, II, объединенной фракции III и IV и частично V. Фракция I, наиболее удаленная от зоны внесения белка в колонку в катодном направлении, оказалась наиболее чистой по показателю RZ (см. таблицу). Удельная активность всех фракций приблизительно одинакова. Степень очистки в сравнении с частично очищенным препаратом, который вносили в колонку, рав-

на приблизительно 2, а в сравнении с исходной лактосывороткой — приблизительно 85. Соотношение фракций рассчитано по площади, занимаемой пиками. Большую часть составляет объединенная фракция III и IV — 49 %.

В иммуноэлектрофорезе с антисывороткой к частично очищенной лактопероксидазе (рис. 2 см. на вклейку) исследовали фракции I, II и III+IV, полученные при ИЭФ в борат-полиольной системе. Каждая фракция образует одну расщепленную на концах дугу преципитации в анодной области. При электрофорезе в полиакриламидном геле (рис. 3) лактопероксидаза, очищенная ИЭФ в искусственном градиенте рН, обнаруживала две близко расположенные белковые зоны. В препаратах частично очищенной и коммерческой лактопероксидазы обнаружены две дополнительные диффузные белковые зоны.

Таким образом, модифицированный нами метод [26] позволяет получить высокоочищенный, активный препарат лактопероксидазы в сравнительно короткий срок и с помощью доступных отечественных реактивов. Этот способ может быть применен в препаративных целях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Morrison M., Steele W. — In: Biology of the Mouth / Ed. Ph. Person. Washington, 1968, p. 89—110.
2. Korhonen H. — J. sci. agric. Soc. Finland, 1977, vol. 49, p. 434—447.
3. Mickelson M. N. — J. gen. Microbiol., 1966, vol. 43, p. 31—43.
4. Pruitt K. M., Adamson M., Arnold R. — Infect. a. Immun., 1979, vol. 25, p. 304—308.
5. Tenovuo J., Moldoveanu Z., Mestecky J. et al. — J. Immunol., 1982, vol. 128, p. 726—731.
6. Klebanoff S. J., Clem W. H., Luebke R. P. — Biochim. biophys. Acta, 1966, vol. 117, p. 63—72.

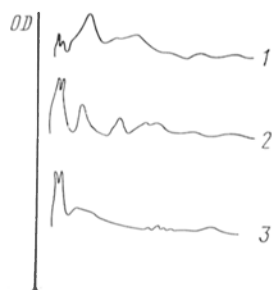


Рис. 3. Денситометрический профиль разделения лактопероксидазы при электрофорезе в полиакриламидном геле.

1 — коммерческий препарат; 2 — частично очищенная лактопероксидаза; 3 — фермент, очищенный ИЭФ в борат-полиольной системе.

Способ Thorell и Johansson (1971) [17]	Модифицированный способ [26]
<p>Молоко</p> <p>↓ Ионообменная хроматография на КМ-сефадексе</p> <p>Элюат</p> <p>↓ Дробное высаливание сульфатом аммония</p> <p>Частично очищенная лактопероксидаза</p> <p>↓ ИЭФ на амфолитах</p> <p>Очищенная лактопероксидаза</p>	<p>Молоко</p> <p>↓ Обезжиривание и удаление казеина</p> <p>Лактосыворотка</p> <p>↓ Ионообменная хроматография на КМ-сефадексе</p> <p>Элюат</p> <p>↓ Ультрафильтрация</p> <p>Концентрированный элюат</p> <p>↓ Дробное высаливание сульфатом аммония</p> <p>Частично очищенная лактопероксидаза</p> <p>↓ ИЭФ в искусственном градиенте pH</p> <p>Очищенная лактопероксидаза</p>

щую элюцию и исключает возможность многократного использования КМ-сефадекса. В связи с этим нами был введен (см. схему) этап предварительного осаждения казеина при pH 4,0—4,5. Низкая концентрация белка в элюате приводит к его потерям при дробном высаливании сульфатом аммония согласно методу [17], так как при добавлении соли образуется тонкая взвесь белка, которую трудно извлечь из раствора. Для облегчения этого этапа выделения фермента и устранения его потерь мы предварительно концентрировали элюат ультрафильтрацией. ИЭФ проводили в искусственном градиенте pH в борат-полнольной системе [19, 25].

Молоко обезжиривали центрифугированием при 1500 g в течение 30 мин. Казеин осаждали при pH 4,0—4,5, добавляя 0,5 M HCl, и удаляли центрифугированием при 1500 g в течение 30 мин. Затем проводили сорбцию лактопероксидазы на КМ-сефадексе С-50 (1 г сухого необработанного сефадекса на 1 л лактосыворотки) в течение 5 ч при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Сефадекс отделяли на воронке Бюхнера, промывали дистиллированной водой и проводили элюцию лактопероксидазы 0,02 M трис-HCl-буфером, содержащим 0,2 M NaCl pH 7,4. Элюат концентрировали методом ультрафильтрации приблизительно в 10 раз. Затем проводили дробное высаливание сульфатом аммония. Белок, полученный при 60—80 % насыщении соли (частично очищенная лактопероксидаза), исполь-

зовали для дальнейшей очистки в ИЭФ.

Искусственный градиент pH готовили на основе буферного раствора 0,001 M тетраборат Na-трис-NaOH pH 11,5 путем формирования градиента сахарозы, в результате чего получали растворы pH 9,0, 9,3, 9,6, 9,8, 10,1, 10,4, 10,7, 11,0, 11,2, 11,5. Эти растворы последовательно насаживали в колонку для ИЭФ объемом 50 мл [25]. Пробу белка, dialизованного против основного буферного раствора, помещали в колонку в соответствии с градиентом плотности. В качестве электродного буферного раствора использовали 0,001 M тетраборат Na-трис-NaOH pH 11,5. ИЭФ проводили при напряжении 36 В/см и плотности тока 2—4 мА/см² в течение 24 ч.

В процессе электрофореза положительно заряженные в данной буферной системе молекулы лактопероксидазы движутся к катоду и образуют в соответствии с pI этого фермента 5 фракций (рис. 1). Изоэлектрические точки лактопероксидазы расположены в ин-

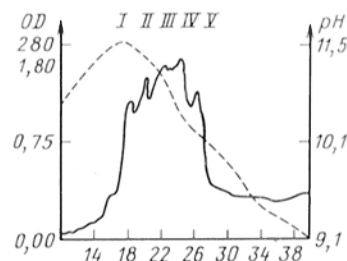


Рис. 1. ИЭФ лактопероксидазы в борат-полнольной системе.

Пунктирная линия — градиент pH, сплошная — кривая распределения белка.

ные факторы. Особый интерес в этом отношении представляет лечебная грязь Куяльницкого лимана, успешно используемая при лечении заболеваний сердечно-сосудистой, опорно-двигательной систем, желудочно-кишечного тракта и болезней неврологического профиля [3—5]. В то же время имеются лишь единичные работы, в которых изучались содержание и обмен коферментных форм витаминов при пеллоидотерапии заболеваний опорно-двигательного аппарата [3].

В связи с изложенным выше нам представлялось целесообразным изучить содержание и обмен тиаминна и его коферментной формы — ТДФ в миокарде и печени животных при моделировании аллергического миокардита и наружном применении целоида.

Методика

Опыты проводили на кроликах породы Шиншилла массой 1,6—2,1 кг, которые находились на стандартном рационе вивария.

Аллергический миокардит вызывали путем сенсибилизации кроликов внутривенным введением 10 мл нормальной лошадиной сыворотки с последующей инъекцией на 14—15-й день разрешающей дозы 1 мл внутривенно [5]. Наличие миокардита подтверждалось данными гистологического анализа.

В отдельных сериях экспериментов животные получали курс аппликаций грязи Куяльницкого лимана (8 процедур через день на выстриженную поверхность спины, площадь аппликации 400 см², температура 46 °С). Распределение грязевых процедур у животных, у

которых воспроизводили аллергический миокардит, было следующим: 3 грязевые аппликации с интервалом 1—2 дня проводили до сенсибилизации кроликов, последующие 5 грязевых процедур — после сенсибилизации с тем же интервалом между процедурами. Как правило, разрешающую инъекцию антигена производили неделю спустя после последней грязевой аппликации.

Субклеточные фракции тканей печени и других органов получали с использованием соответствующих модификаций метода дифференциального центрифугирования [14, 16]. Концентрацию белка определяли модифицированным методом Лоури [15]. Содержание тиаминна и ТДФ определяли флюориметрически с использованием методов ионообменной хроматографии [17], ТДФ определяли также энзиматическим методом [19]. Активность ТДФ-киназы (КФ 2. 7. 6. 2) определяли в цитоплазматических фракциях тканевых гомогенатов [13, 18], об активности ТДФазы (КФ 3. 6. 1. 6) судили по приросту неорганического фосфата в процессе инкубации [12].

Полученные результаты обработаны методом вариационной статистики.

Результаты и обсуждение

Развитие аллергического миокардита вызывало резкое снижение содержания ТДФ в мышце сердца, в то же время концентрация свободного тиаминна в этих условиях в миокарде уменьшалась не столь значительно (табл. 1). В ткани печени содержание ТДФ при миокардите также заметно уменьшается; при этом количество нефосфорилированной формы тиаминна даже несколько возрастает.

Исследование ферментов фосфорилирования тиаминна и расщепления

Таблица 1

Концентрация тиаминна (I) и ТДФ (II) (в нмоль на 1 г ткани) в тканях кроликов при миокардите и воздействии целоида ($M \pm m$)

Условия эксперимента	Печень	Субклеточные фракции печени		Мышца сердца
		митохондрии	надосадочная фракция	
Контроль (15):				
I	2,83±0,80	0,43±0,02	1,16±0,04	1,63±0,05
II	13,86±0,31	4,29±0,07	5,96±0,14	12,3±0,24
Миокардит (12):				
I	3,26±0,10	0,37±0,03	1,56±0,037	1,36±0,08
II	11,34±0,41	3,37±0,08	4,88±0,14	7,12±0,28
Миокардит + грязевые аппликации (12):				
I	2,69±0,12*	0,498±0,027*	1,36±0,03	1,76±0,13
II	12,26±0,57*	3,87±0,097	5,51±0,11	9,29±0,46
Грязевые аппликации (12):				
I	2,16±0,11	0,57±0,027	0,83±0,03	1,36±0,09
II	16,59±0,49	5,54±0,11	8,13±0,15	13,90±0,40

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 различия по отношению к контролю достоверны ($p < 0,05$), за исключением значений, отмеченных звездочкой. В скобках указано количество животных.

7. Klebanoff S. J. — J. exp. Med., 1967, vol. 126, p. 1063—1078.
8. Reiter B., Marshall X., Bjork L., Rosen C.-G. — Infect. a. Immun., 1976, vol. 13, p. 800—807.
9. Purdy M. A., Tenovuo J., Pruitt K. M., White W. E. — Ibid., 1983, vol. 39, p. 1187—1195.
10. Aune T. M., Thomas E. L. — Biochemistry (Wash.), 1978, vol. 17, p. 1005—1010.
11. Oram J. D., Reiter B. — Biochem. J., 1966, vol. 100, p. 373—381.
12. Koch G., Edland K., Hoogendorn H. — Odontol. Revy, 1973, vol. 24, p. 367—372.
13. Bjork C., Rosen C.-G. — Biotechnol. a. Bioeng., 1976, vol. 18, p. 1463—1472.
14. Iwamoto J., Nakamura R., Watanabe T., Tsunemitsu A. — J. dent. Res., 1972, vol. 51, p. 503—507.
15. Makinen K. K., Tenovuo J. — Acta Odont. scand., 1976, vol. 34, p. 141—150.
16. Carlström A., Vesterberg O. — Acta chem. scand., 1967, vol. 21, p. 271—278.
17. Thorell J., Johansson B. — Biochim. biophys. Acta, 1971, vol. 251, p. 363—368.
18. Троицкий Г. В., Завьялов В. П., Абрамов В. А. — Докл. АН СССР, 1974, т. 214, с. 955—958.
19. Ажицкий Г. Ю., Петренко В. Ф., Троицкий Г. В., Жигис Л. С. — В кн.: Электрофоретические методы анализа белков. Новосибирск, 1981, с. 44—57.
20. Wright R. C., Tramer J. — J. Dairy Res., 1958, vol. 25, p. 104—118.
21. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. — J. biol. Chem., 1951, vol. 193, p. 265—275.
22. Panyim S., Chalkley R. — Arch. Biochem., 1969, vol. 130, p. 337—346.
23. Scheidegger J. J. — Int. Arch. Allergy, 1955, vol. 7, p. 103—110.
24. Ашмарин И. П., Васильев И. И., Амбросов В. А. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов. Л., 1975.
25. Ажицкий Г. Ю., Шараева Т. К., Хурса А. И., Троицкий Г. В. — Вопр. мед. химии, 1984, № 1, с. 48—51.
26. Крашениук А. И., Денисова И. И., Ажицкий Г. Ю. и др. — А. с. 1024501 — Открытия, 1983, № 23, с. 86, авт. свид. № 1024501.

Поступила 15.11.84

ISOLATION AND PURIFICATION OF LACTO-PEROXIDASE FROM COW MILK

I. I. Denisova, A. I. Krashenyuk, G. Yu. Azhitsky, T. K. Sharaeva, E. A. Umovskaya, L. B. Khazenson, F. S. Noskov

L. Paster Institute of Epidemiology and Microbiology, Leningrad

A procedure is described for isolation and purification of lactoperoxidase from cow milk. The procedure involved the following steps: isolation of casein from milk, sorption of lactoperoxidase on CM-Sephadex, concentration of the eluate using ultrafiltration, salting out with ammonium sulfate; isoelectric focusing was carried out in the borate-polyol system. Highly purified, active preparation of lactoperoxidase was obtained within a relatively short period by means of the procedure, where the available reagents were used.

УДК 616.127-002.17-056.43-092.9-085.838.7-036.8-07:616.127-008.93:577.164.11

Н. Ф. Лейс

СОДЕРЖАНИЕ И ОБМЕН ТИАМИНДИФОСФАТА ПРИ АЛЛЕРГИЧЕСКОМ МИОКАРДИТЕ И ВОЗДЕЙСТВИИ ПЕЛОИДА

Одесский НИИ глазных болезней и тканевой терапии им. акад. В. П. Филатова

При изучении патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний существенно обмена и функций витаминов придается существенное значение [6—9, 11]. В ряде исследований с моделированием адреналинового миокардита выявлены нарушения процессов биосинтеза и деградации никотинамидных и тиаминовых коферментов [1, 2, 6—8]. В условиях гипоксии в зоне инфаркта обнаружены нарушения обмена и функции тиамина [8, 9].

Однако, несмотря на ряд исследований, посвященных изучению отдельных витаминов при патологии сердечно-сосудистой системы, значение нарушений обмена и функции витаминов в патогенезе указанных заболеваний изучено

недостаточно. При аллергических поражениях миокарда обмен коферментных форм витаминов вообще не исследован. До настоящего времени не проводились систематические исследования, направленные на разработку методов нормализующего воздействия на обмен метаболитически активных форм витаминов с целью повышения эффективности витаминотерапии, включаемой обычно в комплекс лечебно-профилактических мероприятий при сердечно-сосудистых заболеваниях.

В настоящее время в комплексном лечении и реабилитации больных с ранними и хроническими заболеваниями сердечно-сосудистой системы все шире используются природные лечеб-

ТДФ, а при развитии экспериментального миокардита ограничивает подъем активности ТДФазы.

Таким образом, пеллоид, не оказывая значительного влияния на уровень и компартиментализацию ТДФ в интактных клетках мышцы сердца, при развитии воспалительного процесса в миокарде в значительной мере стабилизирует состояние пула ТДФ, способствуя выравниванию метаболического баланса в системе синтеза и распада кофермента главным образом за счет избирательного ограничения стимуляции активности ТДФазы при развитии патологического процесса.

Сравнительный анализ диапазона изменений активности ферментов синтеза и распада ТДФ при миокардите в мышце сердца и ткани печени показывает, что процессы катаболизма коэнзимов являются наиболее лабильным звеном в регуляции внутриклеточного пула и компартиментализации коферментных форм витаминов при патологических состояниях. Применение пелоида, оказывая заметное стимулирующее действие на функцию ТДФкиназы и ТДФазы в интактных тканях, при развитии миокардита избирательно предотвращает дальнейший подъем активности ТДФазы в субклеточных компартаментах печени и митохондриях мышцы сердца. Таким образом, стабилизация активности катаболических ферментов является важным моментом в механизме регулирующего действия изученного природного лечебного фактора на уровень коферментной формы тиамина при аллергическом миокардите.

Выявленные изменения концентрации ТДФ под влиянием курсового воздействия пелоида тесно связаны со стимулирующим воздействием последнего на энергетические и биосинтетические процессы в организме и раскрывают важное звено метаболического механизма лечебно-профилактического действия пелоида [4].

ЛИТЕРАТУРА

1. Бойко С. С. — *Вопр. мед. химии*, 1968, № 6, с. 373—376.
2. Бойко С. С., Цейтлин Л. А. — *Там же*, 1970, № 1, с. 83—86.

3. Горчакова Г. А., Леус Н. Ф. — *Вопр. курортол.*, 1972, № 5, с. 418—422.
4. Лецинский А. Ф., Зуза З. И. — *Пеллоиды и фармакотерапия при воспалительных заболеваниях*. Киев, 1985.
5. Литвиненко А. Г. — В кн.: *Курортология и физиотерапия*. Киев, 1979, вып. 12, с. 20—23.
6. Северин С. Е., Цейтлин Л. А., Бойко С. С. — *Вопр. мед. химии*, 1968, № 4, с. 622—627.
7. Северин С. Е., Цейтлин Л. А., Бойко С. С. — *Там же*, 1970, № 1, с. 33—37.
8. Хмелевский Ю. В. — В кн.: *Всесоюзный симпозиум по тиамину. Материалы*. Минск, 1966, с. 443—444.
9. Хмелевский Ю. В., Розанов А. Я. *Обмен витаминов при сердечно-сосудистых заболеваниях*. Киев, 1975.
10. Цейтлин Л. А. — *Вопр. мед. химии*, 1962, № 3, с. 279—283.
11. Энштейн М. М., Никонова В. А., Спилюти З. И. и др. — В кн.: *Современные проблемы биохимии дыхания и клиника*. Иваново, 1972, с. 5—6.
12. Cheetham R. D., Morre D. J., Pannek C. et al. — *J. Cell Biol.*, 1971, vol. 49, p. 899—905.
13. Deus B., Blum H. E., Holzer H. — *Analyt. Biochem.*, 1969, vol. 27, p. 492—501.
14. Fleischer S., Kervina M. — *Meth. Enzymol.*, 1974, vol. 31, p. 6—39.
15. Harlree E. F. — *Analyt. Biochem.*, 1972, vol. 48, p. 422—427.
16. Li G. T., Li S. C., Shellar M. R. — *Cancer Res.*, 1965, vol. 25, p. 1225—1231.
17. Rindi G., Guiseppe L. — *Biochem. J.*, 1961, vol. 78, p. 602—606.
18. Santolo S. M., Reinaner H., Hollman S. — *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 1977, vol. 47, p. 315—330.
19. Ullrich J. — In: *Methods of Enzymatic Analysis*. New York, 1974, p. 2186—2193.

Поступила 22.08.85

THE LEVEL AND METABOLISM OF THIAMIN PYROPHOSPHATE IN ALLERGIC MYOCARDITIS AND AFTER TREATMENT WITH PELOID

N. F. Leus

N. P. Filatov Institute of Ophthalmology and Tissue Therapy, Odessa

Enzymatic systems involved in thiamin metabolism were studied in experimental allergic myocarditis. Development of inflammation in myocardium was accompanied by a distinct activation of thiamin pyrophosphatase which catalyzed the most important step responsible for deterioration of the coenzyme functions. The stabilizing effect of peloid on the intracellular pool and compartmentalization of thiamin in myocarditis involved equilibration of the anabolic and catabolic reactions in the coenzyme metabolism, mainly due to selective inhibition of the thiamin pyrophosphatase activity stimulated under these conditions.

Т а б л и ц а 2

**Скорость синтеза ТДФ (в нкат на 1 г белка)
в тканях кроликов при миокардите
и воздействии пелонда ($M \pm m$)**

Условия эксперимента	Печень	Мышца сердца
Контроль (15)	$0,134 \pm 0,007$	$0,191 \pm 0,005$
Миокардит (12)	$0,109 \pm 0,007$	$0,152 \pm 0,011$
Миокардит + -/- грязевые апликации (10)	$0,118 \pm 0,008^*$	$0,170 \pm 0,012^*$
Грязевые ап- пликация (12)	$0,170 \pm 0,009$	$0,215 \pm 0,010$

ТДФ показало, что при аллергическом миокардите на фоне некоторого ослабления процесса биосинтеза коферментной формы витамина значительно повышалась скорость гидролитического ее расщепления в субклеточных компартментах тканей миокарда и печени (табл. 2, 3). Таким образом, в механизме наблюдаемого снижения уровня коферментной формы тиамина при миокардите в мышце сердца и печени значительную роль играет нарушение соотношения процессов синтеза и гидролиза ТДФ, обусловленное главным образом преимущественной активацией ферментов, расщепляющих кофермент.

В определенной степени дисбаланс процессов синтеза и расщепления коферментной формы тиамина наблюдался также при адреналиновом миокардите и формалиновом артрите [1—3].

Следовательно, воспалительные процессы различной этиологии и локали-

зации вызывают выраженные нарушения соотношения активности ферментов синтеза и расщепления ТДФ, обусловленные избирательной активацией процессов катаболизма коферментной формы тиамина и приводящие в итоге к значительному изменению внутриклеточного пула и компартиментализации кофермента.

Наружное применение пелонда, заметно интенсифицируя обмен коферментной формы тиамина, вызывало отчетливое повышение содержания ТДФ в тканях и субклеточных структурах органов здоровых животных. Сходное действие пелонда на уровень и обмен коферментной формы тиамина выявлено в условиях экспериментальной патологии. Содержание нефосфорилированного тиамина в указанных органах при этом существенно не изменялось.

Таким образом, применение пелонда в опытах с моделированием миокардита приводило к отчетливой стабилизации концентрации тиамина и повышению устойчивости уровня его коферментной формы в мышце сердца.

Обращает на себя внимание отчетливое регулирующее воздействие пелонда на процессы расщепления кофермента в цитоплазме клеток печени и мышцы сердца (см. табл. 3). Данные, полученные при исследовании ткани печени, убедительно свидетельствуют, что характер действия природного фактора на ТДФазу зависит от условий эксперимента: у интактных животных в цитоплазме печени пелонд повышает скорость расщепления

Т а б л и ц а 3

**Скорость расщепления ТДФ (в нкат на 1 мг белка) в печени (I) и сердце (II) кроликов
при миокардите и воздействии пелонда ($M \pm m$)**

Условия эксперимента	Субклеточные фракции печени и сердца		
	ядра	митохондрии	надосадочная фракция
Контроль (15):			
I	$0,13 \pm 0,005$	$0,22 \pm 0,005$	$0,38 \pm 0,012$
II	$0,082 \pm 0,0031$	$0,069 \pm 0,0038$	$0,13 \pm 0,008$
Миокардит (12):			
I	$0,17 \pm 0,008$	$0,32 \pm 0,010$	$0,56 \pm 0,021$
II	$0,13 \pm 0,011$	$0,14 \pm 0,007$	$0,21 \pm 0,009$
Миокардит +/- грязевые апликации (10):			
I	$0,15 \pm 0,004$	$0,31 \pm 0,010$	$0,52 \pm 0,036$
II	$0,13 \pm 0,008$	$0,098 \pm 0,0071$	$0,17 \pm 0,010$
Грязевые апликации (12):			
I	$0,14 \pm 0,006^*$	$0,28 \pm 0,005$	$0,50 \pm 0,018$
II	$0,10 \pm 0,003$	$0,089 \pm 0,0026$	$0,11 \pm 0,004$

плотности элюата при 276 нм. Элюированный фермент собирали по фракциям объемом 10 мл и анализировали электрофоретически и на энзиматическую активность.

Регенерацию фенил-сефарозы проводили последовательной промывкой колонки растворами 5 % додецилсульфата натрия, водой, 50 % этанола, этанолом, бутанолом, этанолом, 50 % этанолом, водой и 20 мМ ЭДТА.

Ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе и ДЭАЭ-гойперле проводили в колонках размером 0,9×8 см. К фракциям элюата с фенил-сефарозы, содержащим ФГ, добавляли KCl до 0,02 М и наносили на колонку со скоростью 7 мл/ч. Фермент элюировали 30 мл градиента концентрации KCl от 0,02 до 0,4 М в буфере № 5 со скоростью 12,5 мл/ч.

Концентрирование образцов ФГ проводили в ячейках для ультрафильтрации фирмы «Amicon» с мембранами XM-50.

Повторную хроматографию на фенил-сефарозе проводили в колонках размером 1,1×12 см. Колонку уравнивали буфером, в котором наносили фермент, затем — образцы ФГ, собранные с ДЭАЭ-носителей, и проводили элюцию буфером № 5. Активацию очищенной ФГ осуществляли прогреванием в буфере № 4 при 25 °С 10 мин. Все растворы пропускали через колонку со скоростью 12 мл/ч.

Электрофорез образцов ФГ проводили в 15 % полиакриламидном геле, как описано Лэммли [16]. Пластины геля окрашивали кумаси R-250.

Активность ФГ определяли флюориметрическим методом по скорости образования тирозина [21]. Величины K_m ФГ для фенилаланина определяли графическим методом Лайнуивера — Берка.

Концентрацию белка во фракциях измеряли по изменению окраски кумаси G-250 в присутствии белка [4].

Иммуноэлектрофорез проводили в пластине (6×6 см) 1 % агарозы в 0,5 М веронал-медициновом буфере [18]. В гель вносили 30—100 мкг экстракта клеток и проводили электрофорез при 200 В в течение 1—2 ч. Затем вносили 1 % агарозу с 5—10 % антисывороткой в веронал-медициновом буфере. К гелю в области внесения экстракта клеток добавляли 0,3—0,5 мкг очищенной ФГ и проводили электрофорез во втором направлении 17 ч при 140 В. Гель агарозы после иммунопреципитации отжимали и промывали 4—6 раз 2 М NaCl, сушили на воздухе и окрашивали 1 % кумаси R-250.

Результаты и обсуждение

На первом этапе очистки ФГ из активированного экстракта на печени крыс использовали хроматографию на

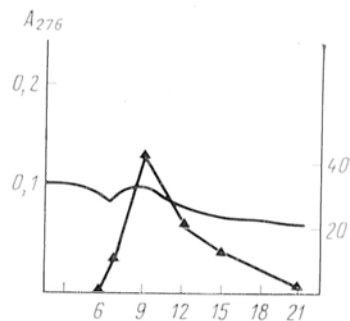


Рис. 1. Элюция ФГ с 1-й колонки фенил-сефарозы.

По оси абсцисс — номера фракций; по оси ординат — активность ФГ (в нмоль тирозина/мл/мин). Сплошная линия — изменение оптической плотности элюата при 276 нм; треугольники — изменение активности ФГ по фракциях элюата. Элюат собирали по фракциям объемом 10 мл.

фенил-сефарозе [20]. Результаты типичного эксперимента представлены на рис. 1. Фермент удавалось элюировать с колонки фенил-сефарозы после выхода буфера № 4, содержащего фенилаланин, что контролировали по снижению оптической плотности элюата. Элюируемый материал проявляет активность ФГ; при электрофорезе образцов выявляется 1 доминирующий компонент с подвижностью, характерной для ФГ. Как можно видеть из таблицы, на этом этапе удается достигнуть 140-кратной очистки.

Многократное использование фенил-сефарозы приводит к постепенному снижению сродства ФГ с ней. На образцах свежей фенил-сефарозы наибольший количественный выход ФГ удается получить при использовании буферов № 4 и 5 с концентрацией глицерина 20 %. В зависимости от состояния фенил-сефарозы мы проводили очистку ФГ, начиная с концентрации глицерина 20 % в буфере № 4 и 5, постепенно снижали ее до 15 %.

Для дальнейшей очистки ФГ предлагали пропускать элюат через вторую, меньшую, колонку с фенил-сефарозой [20]. Нам не удалось в аналогичных экспериментах достичь значитель-

Очистка ФГ из печени крыс

	Содержание белка, мг/мл	Объем, мл	Удельная активность, нмоль тирозина/мг/мин	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	70	210	0,15		
Экстракт	58	160	0,37	100	
Фенил-сефароза (фракция 8—18)	0,32	110	51,8	53	140
ДЭАЭ-гойперл	2,9	8,0	75,3	51	205
Фенил-сефароза II	1,1	8,7	87,1	24	225

В. В. Честков, Ю. В. Кузкова, Л. И. Ковалев, С. С. Шишкин

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ВЫСОКООЧИЩЕННОЙ
ФЕНИЛАЛАНИНГИДРОКСИЛАЗЫ ИЗ ПЕЧЕНИ КРЫС

Институт медицинской генетики АМН СССР, Москва

Одним из важных этапов в изучении молекулярно-генетической гетерогенности наследственных заболеваний является получение высокоочищенных препаратов исследуемых белков. Для фенилкетонурии — одной из наиболее распространенных наследственных энзимопатий — таким белком является фенилаланин-гидроксилаза (ФГ; КФ 1.14.16.1). Высокая степень гомологии между ФГ крысы и человека [3, 5, 10] позволяет рассматривать ФГ из печени крыс не только как доступный материал для анализа, но и как антиген для получения антисыворотки, реагирующей с ФГ из печени человека.

Разработка методов очистки ФГ началась с выделения ФГ из печени крысы [15]. В настоящее время имеется 4 принципиально различных подхода к выделению этого фермента: 1) комплексе традиционных методов фракционирования макромолекул (хроматография, осаждение и др.) [7, 12—14, 22]; 2) аффинная хроматография с использованием птериновых кофакторов ФГ [2, 8, 9]; 3) аффинная хроматография на иммуносорбентах [4]; 4) аффинная хроматография на фенил-сефарозе [20]. Последний из этих подходов привлекает сравнительной простотой и быстротой выделения, наличием коммерческих реактивов и др. Однако биологические модификации и нестабильность фермента [14, 19] значительно ограничивают использование данного метода, который, однако, продолжают совершенствовать [14].

Данная работа посвящена поискам такой модификации метода выделения ФГ, которая позволила бы получать в препаративных количествах высокоочищенный фермент на основе аффинной хроматографии на фенил-сефарозе. Предлагаемая модификация включает аффинную хроматографию на фенил-сефарозе, ионообменную хроматографию и повторную гидрофобную хроматографию на фенил-сефарозе, позволяющих с максимальной эффективностью получать высокоочищенные препараты ФГ из печени крыс. Прове-

дена оптимизация различных этапов очистки фермента. Исходя из электрофоретической подвижности, определена молекулярная масса субъединиц. Препаратами очищенной ФГ иммунизировали кроликов и получили моноспецифическую антисыворотку к ФГ крысы, что подтверждает высокую степень очистки фермента. Отработаны условия хранения фермента без существенного снижения ферментативной активности.

Методика

В работе использовали отечественные реактивы марки ОСЧ, фенил-сефарозу (фирма «Pharmacia», Швеция), трис, твин-80, β-меркаптоэтанол, додецилсульфат натрия, 2-амино-4-гидрокси-6-7-диметил-5,6,7,8-тетрагидронтерин, фенилаланин (фирма «Serva», ФРГ), агарозу (фирма «Bio-Rad Laboratories», США), адьювант Фрейнда (фирма «DIFCO Laboratories», США), ДЭАЭ-целлюлоза (фирма «Wathman», США), ДЭАЭ-тойонерл (фирма «Toyosoda», Япония).

Для очистки ФГ из печени крыс использовали следующие растворы: буфер № 1 — 0,2 М KCl (0,02 М фенилаланин), 0,03 М трис-HCl pH 7,25; буфер № 2 — 0,2 М KCl (0,02 М фенилаланин), 0,1 % твин-80 (0,03 М трис-HCl pH 7,25; буфер № 3 — 0,2 М KCl (0,01 М фенилаланин), 4,8 % диметилформамид (0,03 М трис-HCl pH 7,25; буфер № 4 — 15 % глицерин (объем/объем) (0,01 М фенилаланин), 0,037 % твин-80 (0,05 мМ ЭДТА), 0,03 М трис-HCl pH 7,25; буфер № 5 — 15 % глицерин (0,037 М твин-80), 0,05 мМ ЭДТА (0,03 М трис-HCl pH 7,25).

Гомогенат печени беспородных крыс получали по описанному в литературе методу [20] с модификациями [1]. Экстракт печени крыс получали после центрифугирования при 100 000 g в течение 1 ч при 20 % гомогената, приготовленного в буфере № 1. Первый этап очистки проводили методом аффинной хроматографии на фенил-сефарозе [20] с некоторыми модификациями. К экстракту печени крыс добавляли фенилаланин и трис до конечной концентрации 50 мМ (каждый). Экстракт прогревали 10 мин при 25 °C [14] и охлаждали до 4 °C. К экстракту добавляли твин-80 до конечной концентрации 0,1 % и наносили на колонку фенил-сефарозы (2,5×20 см), предварительно уравновешенную с буфером № 2. После нанесения экстракта колонку промывали 100 мл буфера № 1 со скоростью 200 мл/ч. Затем колонку промывали последовательно 1 л буфера № 3, 100 мл буфера № 1, 1 л буфера № 4 со скоростью 400 мл/ч. Элюцию ФГ проводили буфером № 5 при скорости 30 мл/ч. Все операции проводили при 4 °C под контролем оптической

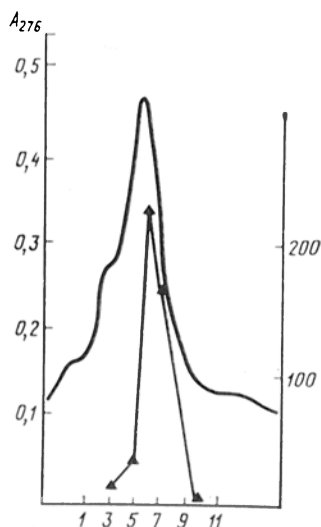


Рис. 5. Хроматография предварительно активированной ФГ на 2-й колонке фенил-сефарозы. Фермент после элюции с ДЭАЭ-тойоперла активировали в буфере № 4 и наносили на колонку фенил-сефарозы. Элюцию ФГ проводили буфером № 5.

тический анализ препаратов ФГ после этого этапа очистки не выявляет балластных компонентов (рис. 6 см. вклейку). При «перегрузке» геля (до 15 мкг белка на дорожку) выявляется слабая полоса белка с мол. массой около 100 000 Д.

Предложенная нами комбинация методов очистки ФГ обладает рядом преимуществ. Предлагаемая процедура характеризуется большой надежностью, поскольку промежуточным этапом очистки является ионообменная хроматография с почти полным отсутствием потерь при элюции фермента. Кроме того, на этом этапе достигается концентрирование фермента, необходимое для успешного проведения повторной хроматографии на фенил-сефарозе и для иммунизации животных.

Нестабильность фермента является существенным фактором, ограничивающим длительность эксперимента. Многократная активация изменяет физико-химические свойства ФГ [1, 14] и затрудняет дальнейшую очистку. По-видимому, это является одной из причин низкого выхода ФГ на третьем этапе очистки. В связи с этим выбор условий хранения ФГ, позволяющих сохранять не только ферментативную активность, но и способность фермента к активации фенилаланином, представляется необходимым этапом разработки метода выделения ФГ.

Высокоочищенные препараты ФГ хранили в буфере № 5 с добавками 50 % глицерина, 10 мМ $MgCl_2$ при -20 и $-70^\circ C$. Активность фермента определяли каждые 2 нед. Показано, что фермент теряет не более 15 % активности и сохраняет способность к активации при хранении в буфере № 5 при $-70^\circ C$ в течение 10 нед.

По электрофоретической подвижности белка нами определена молекулярная масса субъединицы ФГ, которая составила 52 000 Д. В некоторых очищенных препаратах обнаруживали также наличие второй субъединицы с мол. массой 50 000 Д.

Наличие двух и более субъединиц ФГ обнаружено ранее [6, 15]. Предполагалось, что L-субъединица с мол. массой 49 000 Д, является продуктом деградации H-субъединицы [6]. Однако было показано, что H- и L-субъединицы ведут себя как белки аллельных генов [17]. Таким образом, можно предположить, что беспородные крысы, использованные нами для экспериментов, гетерогенны по этому признаку, и в некоторых партиях имелись животные, несущие ген L-субъединицы ФГ.

Величина K_m очищенного фермента и в экстрактах печени крыс для фенилаланина составила $4,43 \cdot 10^{-3} M$, что в 3—5 раз превосходит значения K_m , полученные ранее [13]. По-видимому, такое расхождение можно объяснить использованием различных производных кофакторов в нашей работе и в работах других авторов.

Препараты электрофоретически гомогенной ФГ печени крыс использовали для иммунизации кроликов. Полученные антисыворотки были охарактеризованы в реакции двойной иммунопреципитации и иммуноэлектрофорезом с очищенной ФГ крысы, цитоплазматической фракцией печени крыс и человека, цитоплазматической фракцией культивированных фибробластов. Полученные антисыворотки были моноспецифическими, так как давали одну дугу преципитации с очищенным ферментом и гомогенатом печени. В цитоплазматических экстрактах культивированных фибробластов иммунореактивного материала не обнаруживали. ФГ печени человека дает перекрестную реакцию с антисывороткой к ФГ крысы.

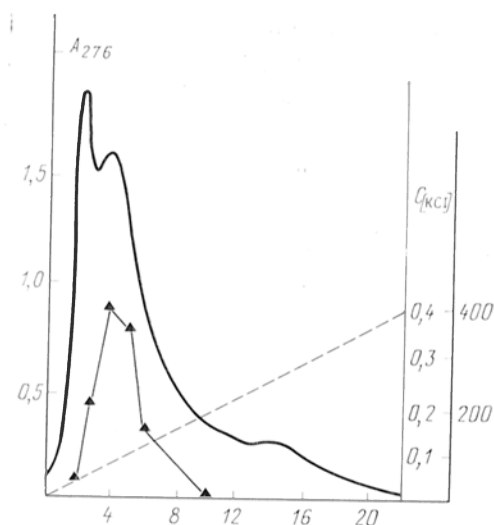


Рис. 2. Элюция ФГ с ДЭАЭ-целлюлозы. Объем фракций элюата 1,5 мл, пунктирная линия — изменение концентрации КСІ М (в %) в элюирующем буфере. На колонку наносили ФГ из фракций № 8—18 элюата с фенил-сефарозы. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

ной очистки фермента. По-видимому, это связано с низким сродством неактивированной ФГ к фенил-сефарозе, что приводило к почти одновременной элюции с колонки фенил-сефарозы балластных белков и ФГ.

Эти трудности удалось устранить при нанесении на вторую колонку фенил-сефарозы сконцентрированных активированных образцов ФГ. Из не-

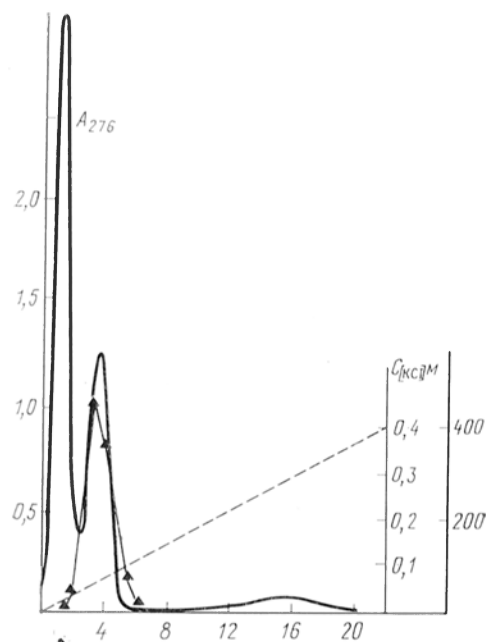


Рис. 3. Элюция ФГ с ДЭАЭ-тойоперла. Обозначения те же, что на рис. 1 и 2.

пользованных систем концентрирования (ионообменная хроматография и ультрафильтрация) первой мы отдали предпочтение, поскольку при элюции градиентом ионной силы раствора удается достичь дополнительной очистки фермента. Таким образом, вторым этапом предлагаемой нами схемы очистки стала ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе или ДЭАЭ-тойоперле, результаты которой представлены на рис. 2 и 3. В наших условиях при использовании ДЭАЭ-тойоперла удавалось достичь лучшего разделения компонентов и, таким образом, получать более очищенные препараты ФГ.

Дальнейшую очистку ФГ проводили на второй колонке фенил-сефарозы меньших размеров. При пропускании ФГ, очищенной на ДЭАЭ-тойоперле, в условиях, предложенных ранее [20], заметной очистки нам достичь не удалось (рис. 4). Снижение концентрации глицерина до 5 %, которое должно было усилить гидрофобное взаимодействие ФГ с носителем, не привело к заметному эффекту.

В этой связи на колонку наносили предварительно активированный фермент в буфере, содержащем 10 мМ фенилаланина, и элюировали ФГ буфером № 5. На рис. 5 можно видеть, что предварительная активация ФГ приводит к адсорбции ее на фенил-сефарозе и элюции буфером, не содержащим фенилаланина. Электрофоре-

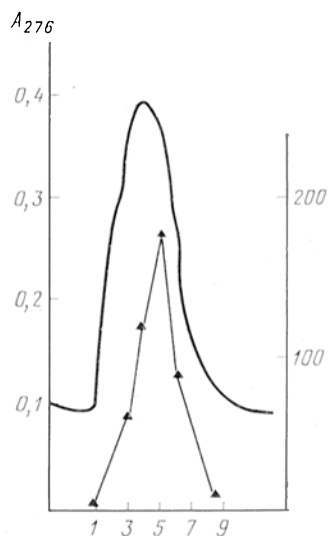


Рис. 4. Хроматография неактивированной ФГ на 2-й колонке фенил-сефарозы.

Обозначения те же, что на рис. 1. Фермент после элюции с ДЭАЭ-тойоперла наносили на колонку фенил-сефарозы и элюировали буфером № 5.

холестеринного обмена в клетках [12, 13].

Холестеролэстераза (ХЭ) осуществляет гидролиз нерастворимых в водной среде эфиров холестерина (ЭХ) на границе фаз липид — вода, эффективность катализа в значительной степени зависит от физических свойств субстрата [2]. Для определения активности ХЭ использовали радиоактивно меченные ЭХ в виде микрокристаллической суспензии [5], диспергированные в альбумине и тритоне X-100 [12] или в яичном лецитине и глицерине [10] и включенные в состав липопротендов [9].

Наиболее широкое применение в настоящее время находит метод, в котором в качестве субстрата использовали униламеллярные липосомы, полученные ультразвуковой обработкой смеси ЭХ и яичного лецитина [4]. Этот метод имеет высокие чувствительность и воспроизводимость, но весьма трудоемок и требует соблюдения режима ультразвуковой обработки. Раствор, содержащий липосомы, остается стабильным только в течение 1—2 нед; его физико-химические характеристики изменяются при возрастании ионной силы раствора [6]. Мы предлагаем простой метод получения субстрата для определения активности ХЭ, основанный на свойстве фосфатидилхолинов с ненасыщенными жирнокислотными остатками эмульгировать ЭХ. Приготовление субстрата не требует ультразвуковой обработки, его свойства не изменяются при хранении более 3 мес, при повышении ионной силы раствора; по чувствительности измерения степени предлагаемый нами метод гидролиза ЭХ не уступает методике, основанной на использовании в качестве субстрата липосом. В отличие от широко используемого способа приготовления мицеллярного субстрата на основе яичного лецитина и глицерина [10] предлагаемый метод использования в качестве компонентов субстрата ненасыщенных фосфатидилхолинов — потенциальных стимуляторов активности ХЭ — имеет то преимущество, что обеспечивает более высокую скорость гидролиза ЭХ, исключая наличие в инкубационной среде таких поверхностно-активных веществ, как глицерин.

Методика

Крыс-самцов Вистар массой 200—250 г (30 особей) декапитировали, печень перфузировали через верхнюю полую вену раствором 0,25 М сахарозы, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-НСl pH 7,4, гомогенизировали и лизо-

сомальную фракцию получали, как описано ранее [14]. Фракцию цитозоля гепатоцитов получали центрифугированием гомогената при 105 000 g в течение 60 мин.

Холестерол (1—C¹⁴) олеат (55 мКи/мМ) фирмы «Amersham» (Англия) радиоактивностью 8 мКи в растворе бензола вносили в стеклянный бюкс и помещали его в водяную баню (60 °C). Бензол выпаривали под азотом, 60 мг фосфатидилхолина, содержащего 70 % остатков линолевой и 30% линоленовой кислоты («Sigma», США), ресуспендировали в 6 мл раствора 0,1 М NaCl и 10 мМ трис-НСl pH 7,4, затем добавляли в стеклянный бюкс и размешивали на магнитной мешалке 4 ч при 2 °C. Полученную эмульсию использовали для определения активности ХЭ.

Определение активности ХЭ осуществляли, как описано в работе [4], с отдельными модификациями. Инкубационная смесь состояла из 0,2 мл 0,2 М цитратно-фосфатного буфера pH 4,3 или 0,2 М трис-НСl-буфера pH 8,1, 0,1 мл раствора, содержащего фермент, и 20 мкл раствора субстрата. Параллельно с использованием эмульсии ЭХ в фосфатидилхолине в инкубационную смесь вносили ЭХ эквивалентной радиоактивности в виде микрокристаллической суспензии [5] или в составе липосом [4]. Инкубацию проводили при 37 °C в течение 2 ч. Реакцию останавливали добавлением 3 мл смеси бензола, хлороформа и метанола в объемных соотношениях 1 : 0,5 : 1,2 и 0,6 мл 0,3 М NaOH. Смесь равномерно встряхивали 20 с и центрифугировали при скорости 3000 об/мин в течение 10 мин. 1 мл верхней фазы добавляли к 10 мл диоксанового сцинтиллятора с повышенной эффективностью счета [3]. Радиоактивность подсчитывали на β-счетчике «Mark-3» (США) по программе № 2 с учетом тушения. Эффективность счета прибора составляла 97,34 %. Активность фермента выражали в процентах радиоактивности гидролизованного олеата в пробе от общей радиоактивности холестерололеата в пробе. Белок определяли по методу Lowry и соавт. [8]. Данные обрабатывали статистически, используя критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Известно, что ненасыщенные фосфатидилхолины активируют гидролазы ЭХ [7] и имеют тенденцию к спонтанному образованию мицелл в водных растворах [15]. Эмульсия, приготовленная на основе ненасыщенных фосфатидилхолинов (70% линолевой и 30% линоленовой кислот), содержала 97% исходной радиоактивности. Светопропускание эмульсии (T₄₅₀) не изменялось при повышении концентраций NaCl в среде от 0,02 до 0,2 М [1]. При гель-фильтрации эмульсии через сефарозу 2 В [4] фосфолипиды и 98% радиоактивных ЭХ удавалось элюировать в «свободном объеме», что свидетельствует о мицеллярной природе субстрата. Основные физико-химические свойства и активность ХЭ при хранении эмульсии в присутствии 0,02% азидна натрия не изменялись.

Таким образом, нами разработан метод получения высокоочищенной ФГ печени крыс и получены моноспецифические антитела к ней. Это позволит нам приступить к анализу структуры ФГ печени человека, а также попытаться выделить и РНК ФГ, что открывает широкие возможности молекулярно-генетического анализа структуры гена ФГ в норме и при фенилкетонурии.

Авторы благодарны В. Г. ФЕДОТОВОЙ за большую техническую помощь при проведении экспериментальной работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Честков В. В., Ковалев Л. Н., Шишкин С. С., Анненков Г. А. — *Вопр. мед. химии*, 1985, № 4, с. 60.
2. Al-Janabi J. M. — *Arch. Biochem.*, 1980, vol. 200, p. 603—608.
3. Ayling J. E., Pirson W. D., Al-Janabi J. M., Helfand G. D. — *Biochemistry (Wash.)*, 1974, vol. 13, p. 78—85.
4. Bradford M. M. — *Analyt. Biochem.*, 1976, vol. 72, p. 248—254.
5. Choo K. H., Jennings I. G., Colton R. G. H. — *Biochem. J.*, 1981, vol. 199, p. 527—536.
6. Choo K. H., Colton R. G. H., Danks D. M., Jennings I. G. — *Ibid.*, 1979, vol. 181, p. 285—294.
7. Colton R. G. H. — *Biochim. biophys. Acta*, 1971, vol. 235, p. 61—72.
8. Colton R. G. H. — *FEBS Lett.*, 1974, vol. 44, p. 290—292.
9. Colton R. G. H., Grattan P. J. — *Europ. J. Biochem.*, 1975, vol. 60, p. 427—430.
10. Colton R. G. H., Jennings I. G., Choo K. H., Fowler K. — *Biochem. J.*, 1980, vol. 191, p. 777—783.
11. Fairbanks G., Steck T. L., Wallach D. F. H. — *Biochemistry (Wash.)*, 1971, vol. 10, p. 2606—2617.

12. Friedman P. A., Kaufman S. — *Biochim. biophys. Acta*, 1973, vol. 293, p. 56—61.
13. Gillam S. S., Woo S. L. C., Woolf L. I. — *Biochem. J.*, 1974, vol. 139, p. 731—739.
14. Gottschall D. W., Dietrich R. F., Benkovic S. J., Shiman R. — *J. biol. Chem.*, 1982, vol. 257, p. 845—849.
15. Kaufman S., Fisher D. B. — *Ibid.*, 1970, vol. 245, p. 4745—4750.
16. Laemmli U. K. — *Nature*, 1970, vol. 227, p. 680—685.
17. Mercer J. F. B., Hunt S. M., Cotton R. G. H. — *J. biol. Chem.*, 1983, vol. 258, p. 5854—5757.
18. Minchin-Clarke H. G., Freeman T. — *Clin. Sci.*, 1968, vol. 35, p. 403—406.
19. Parniack M., Hasegawa H., Wilgus H., Kaufman S. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1981, vol. 99, p. 707—714.
20. Siman R., Gray D. W., Pater A. — *J. biol. Chem.*, 1979, vol. 254, p. 11300—11306.
21. Waalkes T. P., Udenfriend S. — *J. Lab. clin. Med.*, 1957, vol. 50, p. 733—736.
22. Woo S. L. C., Gillam S. S., Woolf L. I. — *Biochem. J.*, 1974, vol. 139, p. 741—749.

Поступила 30.11.84

ISOLATION AND PROPERTIES OF PHENYLALANINE HYDROXYLASE FROM RAT LIVER TISSUE

V. V. Chestkov, Yu. V. Kugukova, L. I. Kovalev, S. S. Shishkin

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

Electrophoretically homogenous phenylalanine hydroxylase was isolated from rat liver tissue using a number of methods involving affinity chromatography on phenyl-Sepharose, ion exchange chromatography on DEAE-Toyoperle and hydrophobic rechromatography on phenyl-Sepharose. Molecular mass of the enzyme was equal to 50,000 Da and $K_m = 4.4 \cdot 10^{-3}$ M with phenylalanine as a substrate. The enzymatic preparations were used for immunization of rabbits and the monospecific antiserum towards phenylalanine hydroxylase was produced.

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 616-008.931:577.152.311-074

А. В. Долгов, М. И. Душкин

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НЕНАСЫЩЕННЫХ ФОСФАТИДИЛХОЛИНОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ХОЛЕСТЕРОЛЭСТЕРАЗ В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

Институт терапии СО АМН СССР, Новосибирск

Гидролазы эфиров холестерина (КФ 3.11.13) были обнаружены в лизосомах, микросомах и цитозоле различ-

ных тканей и клеток [2, 11], что явилось началом широкого изучения роли этих ферментов в физиологии и патологии

в присутствии 0,3 М концентрации NaCl. Вероятно, эти отличия связаны с различной природой мицелл и липосом.

Определение активности ХЭ с применением фосфатидилхолинов, содержащих насыщенные остатки жирных кислот, которые по сравнению с насыщенными являются потенциальными активаторами гидролиза ЭХ [7], в отличие от применяемого другими авторами мицеллярного субстрата на основе смеси янчных фосфатидилхолинов и глицерина [10] позволяло достигать более высокой скорости гидролиза и в то же время исключало наличие в среде инкубации таких поверхностно-активных веществ, как глицерин [10] или альбумин и тритон X-100 [12], способных модифицировать активность фермента.

Преимуществами предлагаемого метода перед известным методом, описанным в работе [4], являются сохранение стабильности эмульсии при хранении в течение 3 мес, доступность и простота метода, который исключает ультразвуковую обработку и дает возможность использовать более дешевую аппаратуру при меньших затратах времени. Кроме того, предлагаемый метод дает возможность измерять активность ХЭ в клеточных культурах, в растворах с высокой осмотической активностью, т. е. практически во всех культуральных средах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барсуков Л. И., Груше Р., Батраков С. Г., Бергельсон Л. Д. — В кн.: Биофизика мембран. М., 1981, с. 17—22.
2. Брокерхоф Х., Дженсен Р. — Липолитические ферменты. М., 1978, с. 219—239.
3. Остерман Л. А. Исследование биологических макромолекул электрофокусирова-

нием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. М., 1983, с. 204—205.

4. Brecher P., Chobanian J., Small D. M. et al. — J. Lipid Res., 1976, vol. 17, p. 239—247.
5. Deykin D., Goodman D. S. — J. biol. Chem., 1962, vol. 237, p. 3649—3656.
6. Haley N. Y., Fowler S., de Duve C. — J. Lipid Res., 1980, vol. 21, p. 961—969.
7. Imanaka T., Amanuma-Muto K., Ohkuma S., Takano T. — J. Biochem. (Tokyo), 1983, vol. 93, p. 1517—1521.
8. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al. — J. biol. Chem., 1951, vol. 193, p. 265—275.
9. Nilsson A., Norden H., Wilhelmson L. — Biochim. biophys. Acta, 1973, vol. 296, p. 593—603.
10. Severson D. L., Fletcher T. — Atherosclerosis, 1978, vol. 31, p. 21—32.
11. Stein Y., Friedman G., Stein O. — In: Atherosclerosis Reviews. New York, 1978, vol. 3, p. 97—108.
12. Stokke K. T. — Biochim. biophys. Acta, 1972, vol. 270, p. 156—166.
13. Subbiah K. T. — Steroids, 1979, vol. 33, p. 305—313.
14. Teng M. H., Kaplan A. — J. biol. Chem., 1974, vol. 249, p. 1064—1070.
15. Tompson T. E., Henn F. A. — In: Membranes of Mitochondria and Chloroplasts./ Ed. E. Racke. New York, 1970, p. 35.

Поступила 28.05.84

USE OF UNSATURATED PHOSPHATIDYL CHOLINES FOR ESTIMATION OF THE CHOLESTEROL ESTERASE ACTIVITY IN BIOLOGICAL MATERIAL

A. V. Dolgov, M. I. Dushkin

Institute of Therapy, Siberian Branch of the Academy of Medical Sciences of the USSR, Novosibirsk

A relatively simple method for preparation of a new substrate used in highly effective estimation of cholesterol esterase activity is described. Emulsion containing cholesterol $1\text{-}^{14}\text{C}$ oleate and unsaturated phosphatidyl cholines (70% linolic and 30% linolenic acids) was stabilized within three months.

УДК 616.127-005.8-036.11-616.153.963.42-074

Г. А. Ермолин, М. М. Диков, А. В. Соловьев

ТВЕРДОФАЗНЫЙ ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИОГЛОБИНА В ДИАГНОСТИКЕ ОСТРОГО ИНФАРКТА МИОКАРДА

Институт экспериментальной кардиологии ВКНЦ АМН СССР, Москва,
Донецкий медицинский институт

Ранняя диагностика острого инфаркта миокарда (ОИМ) и определение его размеров остаются актуальными и сложными проблемами здравоохранения. Распознавание инфаркта миокарда основывается на клинической картине,

данных ЭКГ, определении активности и содержания ферментов и белков в биологических жидкостях [3, 5, 11]. Значительные трудности представляют диагностика ОИМ при безболевом течении или нетипичной болевой лока-

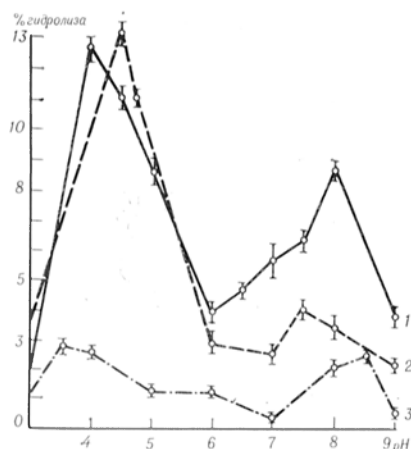


Рис. 1. Зависимость активности ХЭ от свойств субстрата и рН гомогената печени крысы.

По оси ординат — активность ХЭ, выраженная в % гидролиза радиоактивного холестерина олеата на 1 мг белка за 2 ч инкубации. 1 — субстрат, включающий ненасыщенные фосфатидилхолины; 2 — субстрат, состоящий из лецитиновых липосом; 3 — субстрат в виде микрокристаллической суспензии ЭХ. Число измерений в каждой точке $n=9$.

Профиль зависимости активности гидролиза ЭХ в гомогенате печени от рН (рис. 1) свидетельствует о присутствии двух ферментов, имеющих 2 максимума активности в диапазонах рН 3,5—5,0 и 7,5—8,5, что соответствует кислой ХЭ лизосом и щелочной ХЭ цитозоля [4]. Активность ферментов при использовании предлагаемого субстрата в 5 раз выше, чем в случае применения ЭХ аналогичной концентрации в виде микрокристаллической суспензии. Величины активности ХЭ в отношении субстратов липосомальной и мицеллярной природы были сходными.

В ходе инкубации степень гидролиза субстрата линейно возрастала в течение 60 мин; линейный рост гидролиза ЭХ наблюдали также при повышении содержания белка гомогената печени крысы в инкубационной среде до 10 мг/мл (рис. 2).

Результаты, представленные в таблице, свидетельствуют об активности лизосомальной и цитоплазматической ХЭ при воздействии поверхностно-активных веществ, влияющих на физико-химические свойства субстрата. Тритон Х-100 в концентрации 0,1% ингибировал активность ХЭ. По мере возрастания концентрации таурохолатов наблюдали снижение активности кислой ХЭ, в то время как активность щелочной ХЭ возрастала на 20% при концентрации таурохолатов 2 мМ. По литературным данным [6], таурохолат активировал гидролиз ЭХ, включен-

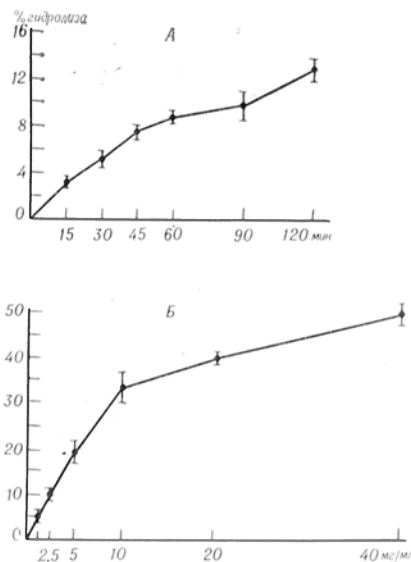


Рис. 2. Зависимость активности кислой ХЭ от длительности инкубации (А) и содержания белка (Б) в пробах. По оси абсцисс: А — длительность инкубации (в мин); Б — содержание белка в пробе (в мг/мл).

Число измерений в каждой точке $n=12$.

ных в состав липосом, в концентрациях от 0,5 до 2,2 мМ, а высокие концентрации NaCl и растворы солей, используемых при выращивании клеточных культур, ингибировали активность ферментов. При использовании субстрата, полученного предлагаемым методом, активность ХЭ практически не изменялась

Влияние поверхностно-активных веществ на активность лизосомальной и цитоплазматической ХЭ печени крысы ($M \pm m$)

Добавленное вещество	Гидролиз холестеролеата, %	
	лизосомальная ХЭ	цитоплазматическая ХЭ
Контроль	$68,1 \pm 5,2$	$8,9 \pm 0,46$
Альбумин (0,1%)	$58,2 \pm 4,8$	$12,5 \pm 0,56^*$
Тритон Х-100 (0,1%)	$38,4 \pm 4,2^*$	$3,81 \pm 0,4^*$
Таурохолат Na, мМ	$63,3 \pm 3,2$	$8,9 \pm 0,86$
0,5	$60,4 \pm 4,3$	$9,3 \pm 0,49$
1	$42,82 \pm 3,3^*$	$9,1 \pm 0,54$
1,5	$39,3 \pm 3,4^*$	$10,5 \pm 0,44^*$
2	$35,6 \pm 4,3^*$	$8,3 \pm 0,31$
4	$66,2 \pm 6,7$	$8,7 \pm 0,6$
NaCl (0,3 M)		

Примечание. Активность кислой ХЭ в лизосомальной фракции (1 мг белка в пробе) и активность щелочной ХЭ в надосадочной жидкости, полученной после центрифугирования при 105 000 g в течение 60 мин (0,25 мг белка в пробе), измеряли после инкубации в течение 2 ч. Звездочкой отмечены достоверные различия по сравнению с контрольными показателями ($P < 0,05$). Число измерений $n=8$.

цифичность препаратов антител подтверждена наличием одной линии преципитации при иммунодиффузии и иммуноэлектрофорезе экстракта мышц и очищенного глобина.

Синтез конъюгата антитела — пероксидаза. Синтез конъюгата антител к глобину с пероксидазой из корня хрена (ВПО «Биохимреактив», Олайн; $R_x=3,0$, $A_{уд}=1300-1400$ ед/мг) проводили методом периодатного окисления [16]. Концентрацию белка в растворе конъюгата определяли согласно [8]. Конъюгат лиофильно высушивали из ФСБ с 4 % маннита.

Иммуноферментный анализ. Анализ глобина проводили в полистирольных плоскодонных планшетах с размером лунок 8×12 (фирма «Flow», США, или производства Института экспериментальной медицинской техники, Москва). Для сорбции антител в лунки помещали по 0,2 мл раствора антител 5 мкг/мл в 0,01 М буфере $NaHCO_3-Na_2CO_3$ pH 9,5 и инкубировали 15—18 ч при 20—22 °С, после чего раствор удаляли и планшеты промывали 6 раз 0,05 % раствором твинна-20 (фирма «Merck», ФРГ).

Для получения стандартных препаратов глобина готовили 8 растворов глобина с концентрацией 0—175 мг/мл в нормальной сыворотке крови козы, разливали по 0,6 мл и лиофильно высушивали. Перед использованием препараты растворяли в 0,6 мл ФСБ с 0,05 % твинна-20. Стандартные растворы глобина для анализа мочи готовили, растворяли образцы глобина в моче донора, разведенной в 80 раз ФСБ с твинном-20 непосредственно перед использованием.

Исследуемые образцы сывороток (объем не менее 0,015 мл) разбавляли в 40 раз ФСБ с твинном-20, мочи — в 80 раз тем же буфером. В лунки каждого планшета с иммобилизованными антителами вносили в дубли по 0,2 мл растворов стандартов и исследуемых образцов и инкубировали содержимое 30 мин при 37 °С при перемешивании. Затем планшеты промывали, как описано выше, и в лунки вносили по 0,2 мл раствора конъюгата 0,5 мкг/мл в ФСБ с твинном-20 и инкубировали 45 мин при 37 °С при перемешивании. Планшеты промывали и вносили по 0,2 мл субстратной смеси (10^{-5} М H_2O_2 и 1 мг/мл о-фенилдиамин в 0,01 М цитратном буфере pH 4,7). После 10-минутной инкубации при комнатной температуре при перемешивании реакцию прерывали, добавляя по 0,05 мл 50 % H_2SO_4 .

Величину поглощения растворов в каждой лунке определяли при 492 нм на автоматическом спектрофотометре «Flow». Количество глобина в исследуемых образцах определяли графически по калибровочной кривой, построенной для стандартных растворов глобина.

При визуальной оценке содержание глобо-

бина определяли по совпадению интенсивности окрашивания исследуемых и стандартных растворов.

Уровень глобина определяли в сыворотках 20 больных ОИМ, поступивших в Донецкий медицинский институт. Кровь брали через 3—10 ч после начала болей. Контрольную группу составили 70 практически здоровых мужчин и женщин 17—50 лет и 25 детей до 7 лет, у которых проводили разовое взятие крови. Кроме того, в 10 случаях кровь брали с 3-часовым интервалом в течение суток. Сыворотки до анализа хранили при —20 °С.

Результаты и обсуждение

На рис. 2 представлена зависимость величины оптической плотности от концентрации глобина в стандартных растворах глобина в сыворотке козы и моче. Для построения калибровочной кривой использовали интервал 0—17,5 нг/мл.

Для определения специфичности метода в сыворотки с известным содержанием глобина добавляли различные количества гемоглобина человека или креатинфосфокиназы, лактатдегидрогеназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Различия в результатах определения глобина между исходными сыворотками и сыворотками, содержащими указанные белки, в концентрации 1—500 мкг/мл не превышало 10 %.

Точность метода определяли, анализируя образцы сыворотки или мочи человека, в которые были добавлены известные количества очищенного глобина. Зависимость между количеством добавленного и определенного глобина в обоих случаях линейна и описывается уравнениями $y=30,3\pm 1,04x$, $y=0,94x$ соответственно.

Для определения ошибки метода по 3 образца сыворотки и мочи с различным содержанием глобина анализировали при многократных повторях на одном и на разных планшетах (см. таблицу).

Определение ошибки иммуноферментного метода определения глобина в сыворотке и моче

Параметр	Сыворотка			Моча		
	40	40	30	40	40	30
Количество анализов	40	40	30	40	40	30
Среднее содержание глобина, нг/мл	30,3	257,4	501,8	20,1	309,5	587,0
Дисперсия	2,7	16,0	39,6	1,9	22,0	50,8
Ошибка	8,9	6,2	7,9	9,5	7,1	8,6

лизации, повторные инфаркты и в ряде случаев дифференциальная диагностика [3].

В последние годы особую ценность в качестве биохимического маркера ОИМ приобрел миоглобин — гемсодержащий белок скелетных мышц и миокарда, выполняющий роль внутриклеточного переносчика кислорода [6, 8]. Миоглобин появляется в крови и моче раньше других известных биохимических маркеров — через 1—4 ч после начала болевых приступов [4, 6, 15]. Благодаря его быстрому появлению и выведению из кровотока повторные определения содержания миоглобина в сыворотке или плазме крови позволяют следить за динамикой заболевания, распространением очага некроза и диагностировать повторные инфаркты. Вопрос о возможности определения размеров ОИМ по уровню миоглобина окончательно не решен [5, 6]. Однако, как правило, более высокий уровень миоглобина в сыворотке крови или моче соответствует большей тяжести заболевания [7, 14, 15].

Применяемый в настоящее время радиоиммунологический метод количественного определения миоглобина не получил широкого распространения из-за высокой стоимости регистрирующей аппаратуры, короткого срока жизни меченых реагентов и необходимости проведения исследований в специализированных лабораториях. Более перспективными являются иммунохимические тесты, основанные на использовании в качестве маркеров реакции антиген—антитело или собственной пероксидазной активности миоглобина [10, 12].

В данной работе предложен быстрый и доступный иммуноферментный метод количественного определения миоглобина в сыворотке крови и моче и описано его применение в диагностике ОИМ. «Сэндвич»-метод основан на взаимодействии миоглобина с антителами к нему, иммобилизованными на твердой фазе (полистироле), с последующим определением образовавшегося комплекса с помощью конъюгата антител с ферментом (пероксидазой) (рис. 1) [1].

Методика

Выделение миоглобина. Миоглобин выделен из скелетных мышц человека по методике, включающей разрушение материала, ионообмен-

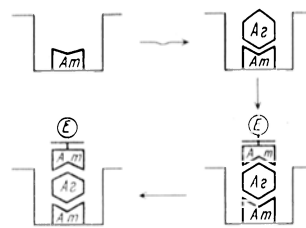


Рис. 1

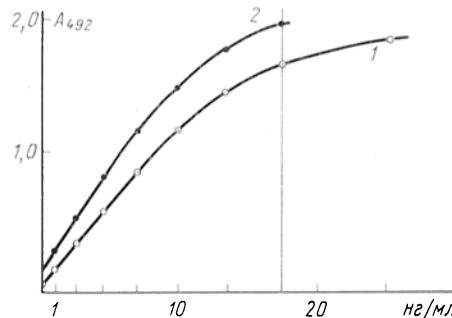


Рис. 2

Рис. 1. Принципиальная схема твердофазного иммуноферментного метода.

Am — антиген; At — антитела; At-E — конъюгат антитела — фермент.

Рис. 2. Зависимость величины оптической плотности от концентрации миоглобина в стандартных растворах.

1 — сыворотка козы; 2 — моча.

ную хроматографию на QAE-сефадексе С-50 и гель-фильтрацию на сефадексе G-50 [9]. При электрофорезе полученного препарата в 10 % полиакриламидном геле pH 8,9 наблюдали одну полосу при прокрашивании кумасси G-250. Концентрацию растворов миоглобина определяли, используя кумасси G-250 [13].

Получение антисыворотки. Иммунизацию барана проводили 0,4 % раствором миоглобина в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), 0,01 NaH_2PO_4 — Na_2HPO_4 , 0,15 М NaCl, pH 7,2 [2]. При иммунодиффузии и иммуноэлектрофорезе в геле агарозы гомогената мышц человека с полученной антисывороткой наблюдали одну линию преципитации, соответствующую миоглобину. Гомогенат мышц и очищенный миоглобин давали реакцию идентичности при иммунодиффузии в агаровом геле с данной антисывороткой.

Выделение антител. Антитела к миоглобину из антисыворотки выделяли на сорбенте, полученном иммобилизацией очищенного миоглобина (10 мг белка на 1 г носителя) на BrCN-сефарозе 4В (фирма «Pharmacia», Швеция) или BrCN-агарозе (производство Института химии АН Эстонской ССР), по стандартной методике.

Сорбцию антител к миоглобину осуществляли при циркуляции антисыворотки (20 мл на 1 г носителя) через колонку с иммуносорбентом, уравновешенную ФСБ. Элюировали антитела 0,2 М глицин-HCl-буфером с 0,15 М NaCl pH 2,25. Антитела диализовали против 0,01 М буфера Na_2CO_3 — NaHCO_3 pH 9,5 и лиофильно высушивали. О чистоте антител свидетельствует одна линия преципитации на иммуноэлектрофоретических графиках, проявленных антисывороткой кролика к белкам сыворотки крови барана. Сис-

3. Малая Л. Т., Власенко М. А., Микляев М. Ю. Инфаркт миокарда. М., 1981.
4. Масенко В. П., Филиппов Н. К., Староверов Н. И. и др. — В кн.: Лабораторная диагностика. М., 1979, с. 120—122.
5. Руководство по кардиологии. М., 1982, т. 3.
6. Староверов Н. И. — Тер. арх., 1980, № 7, с. 135—142.
7. Шурыгин Д. Я., Шумилов Ю. Н., Грачев А. М. — Сов. мед., 1982, № 5, с. 62—65.
8. Kagen L. J. Myoglobin. Biochemical, Physiological and Clinical Aspects. New York, 1973.
9. Malvano R., Massaglia A., Marshisio M. et al. — J. nucl. Med., 1978, vol. 22, p. 169—179.
10. Olsson T., Brunijs G., Carlsson H. E., Thore A. — J. immunol. Meth., 1979, vol. 22, p. 127—135.
11. Rotkopf M., Boerner J., Stone M. et al. — Circulation, 1979, vol. 59, p. 268—274.
12. Schmechta H., Nugel E., Porstmann B. et al. — Exp. Med., 1982, Bd 25, S. 1336—1339.
13. Spector T. — Analyt. Biochem., 1978, vol. 86, p. 142—146.
14. Sylven C. — Europ. J. Cardiol., 1979, vol. 9, p. 483—491.
15. Tomasso C. L., Salzeider K., Arij M., Klutz W. — Amer. Heart J., 1980, vol. 99, p. 149—154.
16. Wilson B. M., Nakane P. K. — In: Immunofluorescence and Related Staining Techniques / Ed. K. H. Knapp, G. Wick. Amsterdam, 1978, p. 215—244.

Поступила 22.11.84

SOLID-PHASE IMMUNOASSAY OF MYOGLOBIN IN DIAGNOSIS OF ACUTE MYOCARDIUM INFARCTION

G. A. Ermolin, M. M. Dikov, A. V. Solov'ev
Institute of Experimental Cardiology, All-Union Cardiological Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

A solid-phase immunoassay was developed for quantitative estimation of myoglobin in human biological fluids. This technique was used for analyses of blood serum and plasma from patients with acute myocardium infarction. The method developed was similar to radioimmunoassay by its diagnostic characteristics but more simple and available. The immunoassay might be used in diagnosis of myocardium infarction as well as in estimation of the disease severity at least in clinics.

УДК 616.153.3-008.939.633.2-074-078

К. О. Блох, И. Ф. Паскевич

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ДНК В ЛЕЙКОЦИТАХ КРОВИ

Лаборатория патофизиологии Харьковского НИИ эндокринологии и химии гормонов, кафедры биохимии Харьковского медицинского института

Существующие методы определения содержания ДНК по поглощению ультрафиолетовых лучей азотистыми основаниями [5] и цветным реакциям на углеводы [2] в настоящее время получили широкое распространение благодаря их относительной простоте и хорошей воспроизводимости. Однако при исследовании микроколичеств ДНК в присутствии различных примесей эти методы не всегда оказываются пригодными из-за их относительно низкой чувствительности и специфичности. Более чувствительные флуоресцентные методы определения ДНК [1, 9] также в ряде случаев могут оказаться неэффективными при определении микроколичеств ДНК в присутствии большого количества примесей. Для определения низких концентраций ДНК был предложен высокочувствительный и специфичный микробиологический тест [8], основанный на ферментативном гидролизе ДНК до нуклеотидов с последующим использованием бактериальной культуры,

дефицитной по дезоксирибонуклеозидмонофосфатам. Скорость роста культуры пропорциональна содержанию дезоксирибонуклеотидов в пробе. К недостаткам данного микробиологического способа следует отнести его трудоемкость и сложность количественного ферментативного извлечения ДНК из тканей.

Целью настоящего исследования явилась разработка способа, сочетающего в себе экстракцию ДНК из тканей в кислой среде при высокой температуре с последующим микробиологическим определением ее концентрации, что позволило значительно упростить анализ и сократить длительность его проведения.

Методика

Опыты проводили на 10 крысах-самцах линии Вистар. Лейкоциты выделяли из 1—2 мл крови крыс. Клетки промывали холодным физиологическим раствором и подсчитывали их количество. Для удаления кислоторастворимых нуклеотидов и нуклеозидов клетки гомогенизировали и дважды промывали холодной 0,2 н. HClO₄. Полноту удаления кислоторастворимых

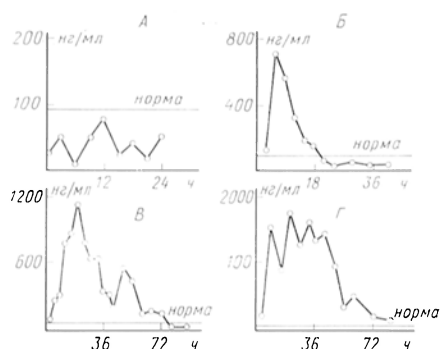


Рис. 3. Динамика изменения уровня глобулина в сыворотке крови здорового донора (А) и больных ОИМ (Б—Г).

Иммуноферментный метод был использован для определения содержания глобулина в сыворотке крови здоровых доноров и больных ОИМ. Средний уровень глобулина в сыворотке крови здоровых взрослых составил $30,3 \pm 10,2$ нг/мл, детей — $28,1 \pm 9,0$ нг/мл. Нижний и верхний пределы уровня глобулина в обоих случаях составляли около 4 и 95 нг/мл соответственно. На рис. 3, А представлена типичная кривая изменения уровня глобулина в сыворотке здорового донора в течение суток. У всех доноров наблюдали изменения содержания глобулина в 2—5 раз (в пределах нормы) в течение суток, что, вероятно, отражает периодические изменения в процессах высвобождения глобулина из клеток и его выведения почками.

На рис. 3, Б—Г изображены 3 различных типа кривых изменения уровня глобулина, полученные иммуноферментным методом при повторных исследованиях сывороток крови больных ОИМ. Наиболее часто наблюдали быстрое увеличение содержания глобулина (в первые 5—18 ч) и его нормализацию через 28—32 ч (см. рис. 3, Б), что отмечается при несложном течении ОИМ. Более медленное возрастание содержания глобулина, высокие максимальные значения и медленное снижение типичны для тяжелого течения инфаркта. Могут появляться дополнительные пики (см. рис. 3, В), отражающие повторные процессы некроза. В наиболее тяжелых случаях на фоне общего высокого уровня глобулина, сохраняющегося длительное время (24—36 ч), наблюдали резкие изменения его содержания (феномен Стакато) (см. рис. 3, Г).

Основными параметрами, определяющими ценность диагностического теста, являются специфичность, воспроизводимость, точность, а также, что особенно важно для его широкого практического применения, время анализа, простота исполнения и доступность. Предлагаемый иммуноферментный метод позволяет определять содержание глобулина в сыворотке или плазме крови за 1,5 ч в концентрации от 4 до 750 нг/мл, что охватывает почти весь диапазон уровней глобулина в норме и при ОИМ. При большем по сравнению со стандартной методикой разведении исследуемых образцов можно определять более высокие уровни глобулина без заметного снижения точности. Ряд важнейших клеточных белков и гемоглобин не оказывают влияния на качество анализа.

По чувствительности, специфичности, а также точности (см. таблицу) и воспроизводимости метод не уступает используемому в настоящее время радиоиммунологическому тесту [6, 9, 11, 15]. Вместе с тем он обладает рядом существенных преимуществ. Метод позволяет определять содержание глобулина в моче. Результаты определенных уровня глобулина в моче весьма информативны при диагностике ОИМ и оценке его размеров; во многих случаях анализ мочи доступнее и проще, чем анализ крови. Метод относительно прост (для инструментальной регистрации данных требуется автоматический спектрофотометр) и позволяет регистрировать результаты визуально с точностью, достаточной для идентификации ОИМ и приблизительной оценки его тяжести. Важно, что все компоненты, необходимые для анализа, могут храниться лиофилизированными без заметного снижения удельной активности не менее 1,5 лет.

Возможности иммуноферментного метода определения глобулина велики, что позволяет предположить, что в ближайшее время он займет важное место в диагностике и определении тяжести ОИМ, по крайней мере на госпитальном этапе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дзантиев Б. Б., Егоров А. М. — Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева, 1982, т. 27, с. 442—449.
2. Ермолин Г. А., Заолинскене В. П. — Sveikatos Apsauga, 1975, т. 12, с. 23—27.

2. Методы вирусологии и молекулярной биологии. М., 1972, с. 184—186.
3. Спирин А. С. — Биохимия, 1958, т. 23, № 4, с. 656—662.
4. Терещенко О. Я., Кондратенко Е. П. — Лаб. дело, 1982, № 12, с. 734—754.
5. Химия и биохимия нуклеиновых кислот / Под ред. Н. Б. Збарского, С. С. Дебова. Л., 1968, с. 74—75.
6. Шабарова З. А., Богданов А. А. Химия нуклеиновых кислот и их компонентов. М., 1978.
7. Bishop C. W., Davidson J. N. — Brit. J. Radiol., 1957, vol. 30, p. 367—371.
8. Hobb-Jorgensen F. — Biochem. J., 1952, vol. 50, p. 400—403.
9. LePeco J. B., Paoletti C. — Analyt. Biochem., 1966, vol. 17, p. 100—107.

Поступила 22.11.84

MICROBIOLOGICAL PROCEDURE FOR ESTIMATION OF DNA CONCENTRATION IN LEUKOCYTES

K. O. Blokh, I. F. Paskevich

Laboratory of Pathophysiology, Institute of Endocrinology and Hormone Chemistry, Chair of Biochemistry, Medical School, Kharkov

A procedure is developed for estimation of DNA microquantities in biological samples, which involved acid hydrolysis of DNA and the following microbiological estimation of its concentration. A sensitivity of the procedure was as little as 0.25 μg DNA per ml. At the DNA concentration 0.25-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ growth of the indicator strain of bacteria exhibited the linear shape. As shown by means of the procedure developed one rat leukocyte contained $6.3 \pm \pm 0.6 \cdot 10^{-12}$ g of DNA.

ДИСКУССИЯ

УДК 577:378.661:008

П. А. Верболович, С. М. Плешкова, С. А. Абитаева, Е. К. Аверьянова ВСЕМЕРНО СОВЕРШЕНСТВОВАТЬ ПРЕПОДАВАНИЕ БИОХИМИИ

Кафедра биоорганической химии и биохимии Алма-Атинского медицинского института

Дискуссия о методах и недостатках преподавания биологической химии в медицинских институтах, организованная журналом «Вопросы медицинской химии», представляется своевременной и полезной.

Акад. АМН СССР Т. Т. Березов в своей статье выносит на обсуждение заинтересованных специалистов ряд вопросов, касающихся методологии преподавания биохимии, подчеркивает важное место биохимии в системе подготовки кадров будущих специалистов и делится с читателями своим богатым опытом, накопленным за время 30-летней педагогической работы в ГММ им. И. М. Сеченова и Университете дружбы народов им. Патриса Лумумбы.

Со многими положениями статьи можно полностью согласиться. Мы целиком поддерживаем необходимость создания в вузах медицинского профиля самостоятельного курса по клинической биохимии на базе кафедр биохимии. Содержание такого курса желательно установить при участии ведущих ученых крупных биохимических лабораторий НИИ медицинского профиля. Это позволит будущим врачам глубже усвоить и разобраться в патогенезе заболеваний, правильно трактовать и использовать для диагностики результаты биохимических исследований, осознанно разрабатывать и применять методы терапии, направленные на коррекцию присущих данному заболеванию метаболических нарушений. Таким образом можно будет сократить разрыв, существующий между достижениями клинической и экспериментальной биохимии, рационально использовать эти достижения в практическом здравоохранении, что позволит улучшить фундаментальную теоретическую подготовку врачей и окажет по-

ложительное влияние на повышение уровня медицинской помощи населению.

Вопросы улучшения преподавания биохимии поднимались и широко обсуждались на совещании заведующих кафедрами биохимии медицинских институтов, созданного по инициативе Всесоюзного биохимического общества, еще в 1977 г. В решениях этого совещания была подчеркнута необходимость объединения курса биохимии здорового человека с курсом клинической биохимии силами биохимических кафедр медицинских институтов.

Совершенствование преподавания биохимии зависит от ряда условий внутреннего и внешнего порядка и может осуществляться различными путями. На кафедре биоорганической химии и биохимии исторически сложилось так, что здесь сосредоточено преподавание как органической (биоорганической) химии, так и биохимии студентам медицинских факультетов. Опыт позволяет считать такой вариант оптимальным, поскольку преподавание этих двух дисциплин в условиях одной кафедры дает возможность умело их коррелировать и координировать на младших курсах. Кроме того, при этом создаются условия для изучения биоорганической химии в таком аспекте, который обеспечивает лучшее усвоение студентами биохимии. Объединение биоорганической и биологической химии на одной кафедре значительно облегчает усвоение биохимии студентами и дает возможность объединять необходимые для студентов сведения в одном учебном пособии. Уже 20 лет на кафедре используются подобным образом как студенты, так и ассистенты, ведущие лабораторные занятия. Практикум был создан сотрудниками кафедры и при содействии