

ТОМ XXXII

ВЫПУСК 3

МАЙ — ИЮНЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

# ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1986



## 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. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАПЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ, Е. Л. РОЗЕН-  
ФЕЛЬД, Ю. А. РОМАКОВ (ответственный секретарь), А. В. СЛКС, С. Е. СЕВЕРИН,  
В. Б. СПИРИЧЕВ.

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

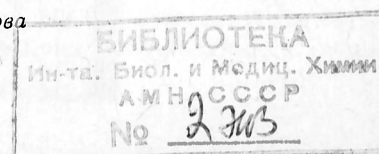
БАЕВ А. А. (Москва)  
БЕЛИЦЕР В. А. (Киев)  
БЫЧКОВ С. М. (Москва)  
КОНСТАНТИНОВ А. А. (Хабаровск)  
КУДРЯШОВ Б. А. (Москва)  
ЛЯХОВИЧ В. В. (Новосибирск)  
ПАСХИНА Т. С. (Москва)

ТРОИЦКИЙ Г. В. (Симферополь)  
ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)  
ТЯХЕПЫЛЬД Л. Я. (Тарту)  
УТЕВСКИЙ А. М. (Харьков)  
ШАПОТ В. С. (Москва)  
ЯКОВЛЕВ Н. П. (Ленинград)  
ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)

Адрес редакции журнала:

Москва 109801, Солянка, 14  
АМН СССР  
Тел. 297-16-44

Зав. редакцией Л. А. Фирсова



*Н. Н. Ивков, А. Б. Капитанов*

## **БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ХЛОРОРГАНИЧЕСКИХ АЛИФАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ (ОБЗОР)**

II ММИ им. Н. И. Пирогова

В настоящее время низкомолекулярные хлорорганические алифатические соединения широко применяют в промышленности и быту в качестве органических растворителей и препаратов для сухой чистки ряда промышленных изделий и материалов [5]. Кроме того, некоторые из них используют в практической медицине в качестве средств для ингаляционного наркоза и местной анестезии. Все большее распространение их в дальнейшем может привести к увеличению частоты несчастных случаев на производстве в результате длительного контакта людей с этими соединениями [11—13, 15, 35, 36]. Очевидно, необходимым условием успешного лечения больных как с острыми отравлениями хлорорганическими соединениями, так и страдающих хроническими отравлениями является ясное представление о клеточных и молекулярных механизмах действия этих соединений на организм человека и животных. В литературе накопился определенный материал по этому вопросу, который мы и обсуждаем в данном обзоре. Основное внимание будет сконцентрировано на данных о действии на организм человека и животных лишь двух представителей хлорированных углеводов алифатического ряда, широко применяемых в народном хозяйстве в нашей стране, — на 1,1,1-трихлорэтане (ТХН) и 1,1,2,2-тетрахлорэтилене (ТХЛ) [4—78].

Физиологическое действие большинства низкомолекулярных хлорорганических соединений алифатического ряда при достаточно высоких концентрациях проявляется прежде всего в угнетении функций центральной нервной системы. Например, ТХН вызывает наркоз и длительную анестезию при

вдыхании его паров в концентрации 1,0—2,6 об.% в течение 2—3 мин; трихлорэтилен — наркоз и длительную анестезию при вдыхании его паров в концентрации 0,6—1,2 об.%, что соответствует в среднем 15 000—20 000 ppm (1 об. часть на 1 млн.). Можно отметить, что в ряде европейских стран предельно допустимая концентрация для ТХН в рабочей зоне принята равной 200 ppm, т. е. примерно в 100 раз меньше концентрации, вызывающей наркоз.

Указывают [10, 23, 24, 27, 41, 60], что ТХН по сравнению с другими алифатическими галогеноуглеводородами имеет очень низкую скорость метаболизма и выводится из организма в основном в неизменном виде, хотя по технологическим характеристикам как растворитель он не уступает другим галогеноуглеводородам. Именно в связи с этим в последние годы все большее предпочтение при промышленном использовании отдают трихлорэтанам.

Из ряда хлорированных этиленов наименьшей скоростью метаболизма и соответственно наименьшей токсичностью обладает ТХЛ [11, 12, 15, 16, 20, 26, 52]. В связи с этим, а также благодаря хорошим технологическим характеристикам ТХЛ широко используют в промышленности, хотя в последние годы появились сведения о его канцерогенном эффекте у мышей в отличие от крыс [11, 12, 15, 55, 74].

Несмотря на то что хлорорганические растворители уже давно используют в быту, промышленности и медицине, сведений о молекулярных механизмах острых и хронических отравлений ими до настоящего времени практически нет. Это является основным препятствием для разработки научно



обоснованных мероприятий по профилактике случайных отравлений и методов их эффективного лечения, а также для рекомендаций по режиму работы с хлорорганическими растворителями и по отбору контингента лиц, наименее к ним чувствительных.

В научной литературе описано более 10 случаев острого отравления ТХН и ТХЛ за последние 20 лет [29, 31, 39, 43, 46, 49, 70]. Некоторые из них связаны с попыткой самоубийства. Так, описаны два случая смерти в результате отравления ТХН [39]. В первом случае смерть наступила в результате скопления паров этого растворителя в замкнутом помещении, что привело к угнетению дыхательного центра. Возраст погибшего был равен 20 годам. Посмертное определение содержания растворителя в крови показало, что оно было равным 4,2 мг в 100 мл крови, а содержание его в мозге — 123 мг на 100 г ткани. Во втором случае в салоне автомобиля был найден мертвым 17-летний служащий гаража, занимавшийся очисткой салона ТХН. Посмертное определение концентрации растворителя в крови показало, что она была равной 1,8 мг на 100 мл крови, в мозге — 8,0 мг на 100 г ткани и в печени — 8 мг на 100 г ткани. По заключению эксперта, смерть наступила в результате асфиксии, вызванной аспирацией рвотных масс.

Описан несчастный случай с 27-летним рабочим, который был обнаружен его товарищем в цистерне из-под ТХН [31]. Содержание растворителя в крови было равным 6 мг на 100 мл крови. Макроскопическая картина всех органов была практически нормальной, за исключением легких и мозга, в которых отмечалась небольшая отечность. При гистологическом обследовании также не выявлено существенных нарушений со стороны органов и тканей.

Все известные случаи отравления ТХН приходились, как правило, на молодых людей в возрасте не более 20 лет мужского пола. Установлено, что все несчастные случаи, происшедшие с молодыми людьми, если они не связаны с их неопытностью и неосторожностью, могут быть следствием большей чувствительности этих людей к данному органическому растворителю [39].

У анестезированных собак при ингаляции ТХН отмечали угнетение кар-

диоваскулярной системы, при этом оно носило двухфазный характер: сначала отмечалось расширение периферических сосудов, затем подавление сократимости миокарда [33, 45, 68].

Сообщают [78] об использовании ТХН для наркоза у 50 пациентов от 9 до 70 лет. С помощью этого препарата быстро достигается анестезия с сохранением глубокого дыхания, минимальной секрецией слюнных и бронхиальных желез и хорошим расслаблением мышц живота и конечностей. Наркоз вызывали при концентрации препарата 1,0—2,6 об. % и поддерживали при концентрации 0,6—2,25 об. %. У 32 пациентов исследовали ЭКГ: у 29 не было обнаружено каких-либо отклонений от нормы, у 3 лиц отмечены нарушения ритма сердечной деятельности. У 1 пациента произошла остановка сердца, хотя ЭКГ до этого была нормальной, за исключением подавления сегмента ST. Давление крови падало довольно быстро (в течение 3—4 мин), затем восстанавливалось. При использовании ТХН в качестве наркотического средства у обезьян и собак наблюдали существенные изменения ЭКГ, а у собак — значительное снижение артериального давления [45]. При анестезии ТХН существенно снижалось потребление кислорода животными. В опытах *in vitro* было показано, что добавление ТХН к срезам миокарда приводило к торможению их дыхания.

Показано [34], что ТХН в концентрации до 2 мкмоль на 1 мг митохондриального белка сильно подавляет дыхание изолированных митохондрий в состоянии 3 при окислении НАД-зависимых субстратов. В состоянии 4 по Чансу ТХН в низких концентрациях (до 0,8 мкмоль на 1 мг митохондриального белка) стимулирует дыхание, а при повышении его концентрации происходит угнетение дыхания. Дыхание, стимулированное 2,4-динитрофенолом, также угнетается ТХН. В присутствии олигомицина ТХН не влиял на скорость дыхания митохондрий. Пиридиннуклеотидзависимое дыхание прекращалось при концентрации ТХН более 3,5 мкмоль на 1 мг митохондриального белка. Интересно отметить, что ТХН практически не влиял на отношение АДФ/О вплоть до концентрации, равной 2 мкмоль на 1 мг митохондриального белка. Концентрация ТХН, вызывающая 50 % ингибиро-

Экскреция метаболитов с мочой у крыс и мышей при отравлении хлорорганическими растворителями (200 ppm; 8 ч) [41]

Растворитель	Животное	Число опытов	Метаболиты в моче, мг на 1 кг массы тела животного		
			суммарное количество метаболитов	ТХУ	ТХЭ
Контроль	Крыса	6	0,3±0,1	0	0,3±0,1
	Мышь	2	0,05; 0,17	0,05; 0,17	0
1,1,1-трихлорэтан	Крыса	8	3,6±1,0	0,5±0,2	3,1±1,0
1,1,2-трихлорэтан	»	8	0,6±0,3	0,3±0,1	0,3±0,1
1,1,1,2-тетрахлорэтан	»	8	199,0±24,0	39,4±5,0	159,6±24,4
1,1,2,2-тетрахлорэтан	»	8	8,2±3,0	1,7±0,9	6,5±2,7
Трихлорэтилен	»	8	113,4±32,0	21,2±7,6	92,2±28,1
Тетрахлорэтилен	»	8	8,5±3,3	5,3±1,6	3,2±1,2
	Мышь	2	23,0; 26,9	18,9; 22,4	4,1; 4,5

П р и м е ч а н и е. ТХУ — трихлоруксусная кислота, ТХЭ — трихлорэтанол.

ние дыхания в состоянии 3 по Чансу, составляла 0,65 мкмоль на 1 мг митохондриального белка. Идентичные результаты были получены на митохондриях, подвергнутых циклу охлаждения — нагревания в присутствии НАД<sup>+</sup> и цитохрома с, что свидетельствует о том, что ни кофакторы, ни субстрат не способствует вызванному ТХН торможению дыхания в состоянии 3 по Чансу. Преинкубация митохондрий с различными «защитными» агентами (обезжиренный БСА по 2 мг/мл; НАД<sup>+</sup> — 1,0 мМ; цитохром с — до 250 мкг/мл; АТФ — 2 мМ; Mg<sup>2+</sup> — 6 мМ; ЭДТА — 1,5 мМ; K<sup>+</sup> — 20 мМ) не предотвращала ингибирующий эффект ТХН. Только витамин К<sub>3</sub> эффективно предотвращал вызываемое ТХН ингибирование пиридинзависимого дыхания. Эти результаты согласуются с липофильным характером ротенончувствительного пункта электротранспортной цепи митохондрий и его чувствительностью к различным органическим растворителям, включая галогеноуглеводороды.

Эквивалентные концентрации ТХН не влияли на дыхание в состоянии 3 по Чансу при окислении сукцината и на динитрофенолстимулируемое дыхание, а также на величину АДФ/О и на скорость олигомициннечувствительного дыхания. Однако скорость дыхания в состоянии 4 по Чансу значительно увеличивалась в зависимости от концентрации ТХН. После добавления олигомицина (или атрактилозида) скорость дыхания в состоянии 4 по Чансу подавлялась до скорости дыха-

ния, независимой от ТХН, что согласуется с возрастанием скорости дыхания в состоянии 4 из-за возросшей АТФазной активности. При более высоких концентрациях ТХН (2,6 мкмоль на 1 мг митохондриального белка) дыхательный контроль утрачивается, что сопровождается быстрым угнетением дыхания, которое полностью тормозится при концентрации ТХН 4,5 мкмоль на 1 мг митохондриального белка.

Дозозависимое увеличение скорости дыхания в состоянии 4 в присутствии варьирующих количеств ТХН очень сходно со стимуляцией его добавлением АТФ к митохондриям. Этот стимулирующий эффект АТФ требует присутствия ионов магния.

Хотя и не показано сколько-нибудь заметного метаболизирования ТХН после ингаляции (табл. 1) [41], но, подобно другим галогеноуглеводородам, он имеет высокий коэффициент распределения ткань/кровь, что подтверждается [23] дозозависимой ретенцией препарата после экспозиции (табл. 2).

Установлено [23], что большая часть ТХН удаляется в неизменном виде через легкие (экспозиция 4 ч при 220 и 400 ppm; см. табл. 2).

В 1964 г. предельная доза для ТХН в США была уменьшена с 500 до 200 ppm [71, 72]. Эффект длительной ингаляции при концентрациях, превышающих предельно допустимые, исследовали на животных [18]. После разовой экспозиции все животные в течение 24 ч выделяли с мочой трихлорэтанол. Выделение трихлорэтанол-

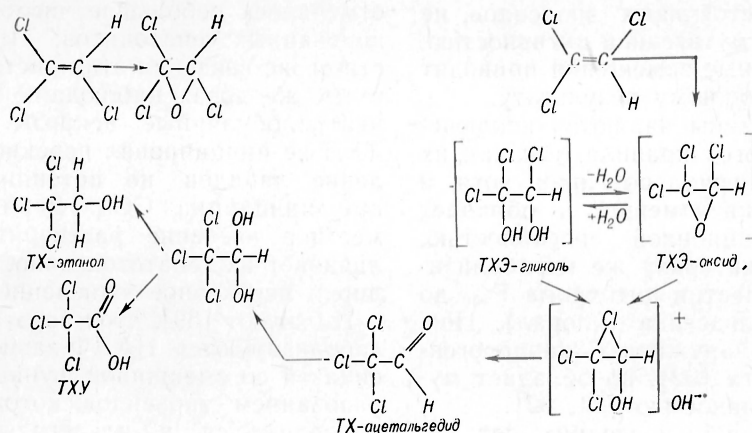
ла, а также трихлоруксусной кислоты было дозозависимым. При этом поведение животных, гематологические тесты, функциональные пробы на состояние почек, печени, массу органов и содержание глюкозы в крови были в пределах нормы. Гистопатологические исследования органов и тканей не выявляли каких-либо изменений. Экспозиции с ТХН при 500 ppm были подвергнуты 11 добровольцев по 6,5—7 ч в день в течение 5 дней [67]. Каких-либо существенных отклонений, за исключением модификации позы Ромберга у 2 добровольцев, обнаружено не было. Считают [44], что ТХН более безвреден для организма, чем другие хлорорганические растворители. Ограниченный метаболизм ТХН является причиной его меньшей гепатотоксичности. Способность человека метаболизировать ТХЛ также невелика, но он является относительно гепатотоксичным соединением [14, 15, 20, 26]. ТХН и ТХЛ подвергаются метаболизму при участии микросомальных оксидаз со смешанной функцией [15, 19, 28]. Вероятно, их токсические эффекты обусловлены образованием высокореактивных метаболитов (эпоксиды, оксираны). При экспозиции с ТХН при 900—1000 ppm нарушение координации движения минимально, но при 1700 ppm происходит значительное нарушение равновесия; анестезия наступает при 10 000—26 000 ppm [70, 71].

Содержание свободных аминокислот (глутамина, треонина и серина) в

тельно увеличивалось в зависимости от дозы ТХЛ. При воздействии трихлорэтилена отчетливое увеличение наблюдалось только при дозе 800 ppm. Содержание глутамина при ингаляции ТХЛ отчетливо снижалось, а при ингаляции трихлорэтилена такое снижение наблюдалось лишь при дозе 800 ppm. Трихлорэтилен при дозе 400 ppm значительно снижал содержание глицина. Интересно отметить, что ТХЛ приводил к некоторому снижению содержания  $\gamma$ -аминомасляной кислоты в мозге, а трихлорэтилен — к возрастанию ее содержания.

В этих же условиях опыта содержание дофамина в стриатуме увеличивалось незначительно, а содержание ацетилхолина в том же отделе мозга существенно снижалось в соответствии с дозой ТХЛ [35]. Содержание норадреналина увеличивалось незначительно, за исключением коры и гиппокампа, где отмечали его снижение при воздействии трихлорэтилена. Содержание серотонина в коре и гиппокампе увеличивалось незначительно и было статистически недостоверно. Полагают, что при хроническом контакте с ТХЛ и трихлорэтиленом могут нарушаться функции холинергических нейронов.

При изучении метаболизма хлорэтиленов и мутагенной активности трихлорэтилена показано [14], что хлорэтилены метаболизируются при участии цитохрома  $P_{450}$  с образованием эпоксидов и других продуктов окисления:



ткани мозга крыс, подвергнутых ингаляции различных доз трихлорэтилена и ТХЛ на протяжении месяца, значи-

тельно [19] изучены взаимодействия цитохрома  $P_{450}$  с ТХЛ и пути его метаболизма. Показано, что основным



Т а б л и ц а 2

Концентрация ТХН (в мг) в выдыхаемом воздухе после 4-часового воздействия при 220 и 443 ррт [23]

Часы после экспозиции	Концентрация ТХН во вдыхаемом воздухе	
	221 ± 16 ррт	443 ± 34 ррт
0—1	2,488	5,719
1—2	1,156	3,350
2—3	0,589	1,539
3—4	0,309	0,793
4—5	0,191	0,441
5—6	0,117	0,259
6—7	0,073	0,154
7—8	0,050	0,098

метаболизмом ТХЛ является эпоксид, который затем превращается в соответствующее кетопроизводное, подвергающееся в свою очередь гидролизу с образованием трихлоруксусной кислоты и HCl. Из всех форм цитохрома P<sub>450</sub> ТХЛ преимущественно связывался с цитохромом, индуцируемым фенобарбиталом. Эпоксиды или оксираны являются промежуточными продуктами метаболизма галоэтиленов [15, 26, 57, 59, 63], обладающими высокой реакционной способностью, которые затем детоксицируются в результате внутримолекулярных перегруппировок.

Показано [44], что при совместном введении в организм ТХН и ТХЛ их метаболизм взаимно подавляется.

Реакционная способность и, следовательно, токсичность индивидуальных хлороксиранов зависит от типа хлорзамещений. Так, симметричные замещения приводят к образованию относительно устойчивых эпоксидов, не обладающих мутагенной активностью, а асимметричные замещения приводят к противоположному результату.

Трихлорэтилены являются исключением из этого правила, так как их эпоксид 2,2,3-трихлороксиран хотя и асимметрически замещен и обладает высокой реакционной способностью, но практически сразу же метаболизируется при участии цитохрома P<sub>450</sub> до трихлорацетальдегида (хлорал). Последний не обнаруживает канцерогенной активности [32], но обладает мутагенной активностью [14, 32].

На протяжении последних лет накапливаются данные о ковалентном связывании галоэтиленовых метаболитов с белками и нуклеиновыми кислотами, но алкилирующая активность

оксирановых производных трихлорэтилена и тетрахлорэтилена по отношению к белкам и нуклеиновым кислотам не обнаружена. Метаболиты трихлорэтилена и ТХЛ не обладают канцерогенной активностью при воздействии на крыс в течение 8 ч в день, 5 дней в неделю при концентрации 2000 ррт через 10 нед после последней экспозиции, в то время как для других галоэтиленов была показана мутагенная и канцерогенная активность [15].

Токсичность хлороформа связана с его биоактивацией до фосгена, а гепатотоксичность CCl<sub>4</sub> — с инициацией перекисного окисления липидов [1, 3]. Потенцирование спиртами гепатотоксичности CCl<sub>4</sub> является результатом избирательной индукции его метаболизма.

При совместном введении хлороформа и CCl<sub>4</sub> (0,2 и 0,1 мл/кг) увеличивалась активность глутамат-пируват-трансаминазы в сыворотке крови и нарастала концентрация триглицеридов в печени, что не наблюдалось при их раздельном введении [30]. Увеличивались также содержание этапа в выдыхаемом воздухе, гистопатологические изменения в печени.

При изучении гепатотоксичности трихлорэтилена при совместном введении с CCl<sub>4</sub> было показано [56], что после воздействия трихлорэтилена (1 мл/кг) гистологическая картина печени через 24 ч после введения была нормальной. При введении CCl<sub>4</sub> (64 мкл/кг) гистологическая картина печени также была нормальной или отмечалось небольшое число некротизированных гепатоцитов. При совместном же введении этих растворителей в тех же дозах наблюдали обширные центролобулярные некрозы. In vitro ТХЛ не инициировал перекисное окисление липидов, но потенцировал его при инициации CCl<sub>4</sub>. Вероятно, совместное введение растворителей увеличивает их гепатотоксичность, стимулируя перекисное окисление липидов.

Полагают [59], что хлорэтилены метаболизируются НАДФ-зависимой оксидазой со смешанной функцией с образованием эпоксидов, которые могут превращаться в альдегиды, спирты или кислоты. У животных, предварительно обработанных фенобарбиталом, винилхлорид и трихлорэтилен вызывали уменьшение содержания цитохрома



$P_{450}$ , потерю окислительной и N-деметилазной активности, как при действии  $CCl_4$ . Ультраструктурные изменения, вызываемые этими хлорэтиленами, были сходны с таковыми при воздействии  $CCl_4$ . Возрастание гепатотоксичности хлорэтилена связано с образованием окисленных метаболитов. Химические изменения, вызываемые этими двумя хлорэтиленами, еще не охарактеризованы. Хотя и возможно, что сходные структурно-функциональные изменения могут быть вызваны различными молекулярными механизмами, однако еще не ясно, по какому механизму хлорэтилены вызывают повреждение эндоплазматического ретикулаума.

При изучении экскреции метаболитов три- и тетрахлорпроизводных этана и этилена с мочой у человека и лабораторных животных при экспозиции их в атмосфере паров этих галогеноуглеводородов при 200—400 ррт в течение 8 ч было установлено [41], что все хлоруглеводороды, за исключением 1,1,2-трихлорэтана, приводили к существенному увеличению количества экскретируемых трихлоруксусной кислоты и трихлорэтанола (см. табл. 1). Показано [24, 25], что некоторые галогеноуглеводороды и их метаболиты вызывают ацетонемии у крыс.

Определены концентрации хлоруглеводородов, при которых наблюдалась 50 % смертность крыс [16, 41]. Смерть крыс обычно отмечалась в первые 6 ч экспозиции или в течение 24 ч после ее окончания. Гибели животных предшествовала сонливость. При вскрытии животных, выживших до 14-го дня после окончания экспозиции, не обнаружено макроскопических повреждений легких, печени и почек.

Гепатотоксичность хлорпроизводных алифатических углеводородов объясняют их метаболической трансформацией в сильно электрофильные производные, образующие ковалентные связи с внутриклеточными нуклеофильными соединениями. Токсические количества метаболитов варьируют для каждого из хлорпроизводных. Это объясняет вариабельность в токсичности: острые гепатиты при простой ингаляции  $CCl_4$ ; очень четкая гепатотоксичность при острых интоксикациях трихлорэтиленом. Хроническая гепатотоксичность, вызываемая этими соединениями и особенно хлорвинилом, ставит

проблему возникновения злокачественных опухолей печени при длительной профессиональной экспозиции [54, 55]. Национальный институт профессиональной безопасности и здоровья США рекомендует соблюдать осторожность при работе с ТХЛ ввиду его возможной канцерогенности для человека. Рекомендация основывается на недавнем исследовании Национального института рака США, показавшем, что ТХЛ вызывает рак печени у лабораторных животных [53].

Актуальными являются вопросы изучения механизмов нарушения функционирования нервной системы при длительном, хроническом контакте с данными растворителями, а также проблема обратимости возникших нарушений после прекращения длительного контакта с ними. Очень мало сведений имеется в литературе о взаимосвязи нарушения энергопреобразующих систем клетки под влиянием хлорорганических растворителей с возникновением нарушений в функционировании других внутриклеточных систем. Изучение механизмов взаимодействия хлорорганических растворителей с микросомальной системой окисления в печени и механизмов повреждения гепатоцитов в процессе их метаболизирования проводится более интенсивно, но тем не менее многие вопросы остаются еще не решенными. К ним относятся, в частности, молекулярные механизмы взаимодействия ТХН и ТХЛ с компонентами микросомальной системы окисления и последовательности реакций, приводящие к нарушению функционирования клеточных мембран.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Арчаков А. И., Карузина И. И., Кузнецова Г. П. — В кн.: Биологические мембраны в норме и патологии. М., 1972, с. 25.
2. Арчаков А. И., Карузина И. И. — В кн.: Успехи гепатологии. Рига, 1973, т. 7, с. 39.
3. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. М., 1975.
4. Задорожный Б. В. — В кн.: Сборник науч. работ по проблеме «Научные основы гигиены труда и ликвидация инфекционных болезней. Гигиеническое значение факторов внешней среды малой интенсивности». Харьков, 1970, с. 54.
5. Измеров Н. Ф., Саноцкий И. В. Параметры токсикометрии промышленных ядов при однократном воздействии. (Справочник). М., 1977.
6. Калязин С. А. и др. Средства очистки

- электрооборудования от загрязнения на судах. [Морской транспорт. Серия «Техническая эксплуатация флота», № 4, (508)]. М., 1981.
7. Машковский М. Д. Лекарственные средства. М., 1984, с. 12—15.
8. Мизюкова И. Г., Кокаровцева М. Г., Бахшиев Г. Н., Лукьянчук В. Д. — В кн.: Всесоюзная учредительная конф. по токсикологии. Тезисы докладов. М., 1980, с. 25.
9. Федкина В. Н., Экштат Б. Я., Павленко М. А. — Сборник науч. трудов Моск. НИИ гигиены, 1974, вып. 21, с. 46—49.
10. Чулая В. Р., Бонашевская Г. И., Шайкан В. К. и др. — Сборник трудов НИИ общей и коммунальной гигиены, 1977, № 5, с. 42.
11. Adams E. M., Spencer H. C., Rowe V. K., Irish D. D. — Arch. Industr. Hyg., 1950, vol. 1, p. 225.
12. Adams E. M., Spencer H. C., Rowe V. K., Irish D. D. — Ibid., 1951, vol. 4, p. 469.
13. Antti-Poika M. — Int. Arch. Occup. Environ. Hlth, 1980, vol. 51, p. 127.
14. Bartsh H., Malaveille C. et al. — Arch. Toxikol., 1979, Bd 41, S. 249.
15. Bolt H. M., Laib R. J., Filser J. G. — Biochem. Pharmacol., 1982, vol. 31, p. 1—4.
16. Bonnet P., Francin J. M., Gradiski D. et al. — Arch. Mal. prof., 1980, vol. 41, p. 317.
17. Carpenter C. P., Smyth H. F., Pozzani U. C. — J. industr. Hyg. Toxicol., 1949, vol. 31, p. 343.
18. Conso F. — Med. Chir. Dig., 1979, vol. 8, p. 431.
19. Costa A. K., Ivanelich K. N. — Biochem. Pharmacol., 1980, vol. 29, p. 2863.
20. Cunningham M. L., Gandolfi A. J., Brendel K., Sipes T. G. — Toxicol. appl. Pharmacol., 1979, vol. 48, p. 1.
21. De Ceaurriz J., Desiles J. P., Bonnet P. et al. — Toxicol. appl. Pharmacol., 1983, vol. 67, p. 383.
22. Dornette W. H. L., Jones J. P. — Anesth. Analg., 1960, vol. 39, p. 249.
23. Eben A., Kimmerle Q. — Arch. Toxikol., 1974, Bd 31, S. 233.
24. Filser J. G., Bolt H. M. — Ibid., 1979, Bd 42, S. 123.
25. Filser J. G., Bolt H. M. — Ibid., 1981, Bd 47, S. 279.
26. Frejaville J. P., Beaune P., Cresteil T. — Arch. Mal. prof., 1974, vol. 40, p. 359.
27. Guilemin M., Gubaran E. — Brit. J. industr. Med., 1982, vol. 39, p. 161.
28. Hake C. L., Wagonner T. B., Robertson D. N., Rowe V. K. — Arch. environ. Hlth, 1960, vol. 1, p. 101.
29. Hall F. B., Hine C. N. — J. Forens. Sci., 1966, vol. 11, p. 404.
30. Harris R. N., Ratnagave J. F., Garry V. F., Anders M. W. — Toxicol. appl. Pharmacol., 1982, vol. 63, p. 281.
31. Halfield Th. R., Maykoski R. T. — Arch. environ. Hlth, 1970, vol. 20, p. 279.
32. Henschler D., Romen W., Elsesser et al. — Arch. Toxikol., 1980, Bd 43, S. 237.
33. Herd P. A., Lipsky M., Marlin H. F. — Arch. Environ. Hlth, 1974, vol. 28, p. 227.
34. Herd P. A., Marlin F. — Biochem. Pharmacol., 1975, vol. 24, p. 1179.
35. Honma T., Sudo A., Miyasava M. et al. — Industr. Hlth, 1980, vol. 18, p. 171.
36. Honma T., Hagesava H., Sato M., Sudo A. — Ibid., p. 1.
37. Jakobson I., Holmberg B., Wahlberg J. E. — Acta pharmacol. (Kbh.), 1977, vol. 41, p. 497.
38. Guilemin M., Gubaran E. — Brit. J. industr. Med., 1982, vol. 39, p. 161.
39. Jones R. D., Winter D. P. — Arch. Environ. Hlth, 1983, vol. 38, p. 99.
40. Juntenen J., Antti-Poika M., Tola S., Partanen T. — Acta neurol. scand., 1982, vol. 65, p. 488.
41. Ikeda M., Ohtsui H. — Brit. J. industr. Med., 1972, vol. 29, p. 99.
42. Irish D. D. — In: Industrial Hygiene and Toxicology/Ed. F. A. Patty. New York, 1963, p. 1291.
43. Kleinfeld M., Feiner B. — J. occup. Med., 1966, vol. 8, p. 358.
44. Koizumi A., Kumai M., Ikeda M. — Bull. Environ. Contam. Toxicol., 1982, vol. 29, p. 196.
45. Krantz J. L. et al. — Anesthesiology, 1959, vol. 20, p. 635.
46. Lukaszewski T. — Clin. Toxicol., 1979, vol. 15, p. 411.
47. De Null N. S., Amster R. L., Mellonell F. — Lab. Invest., 1975, vol. 32, p. 642.
48. Monster Q. C. — Int. Arch. occup. environ. Hlth, 1979, vol. 42, p. 311.
49. Northjild R. R. — J. Soc. occup. Med., 1981, vol. 31, p. 164.
50. Ogata M., Hasegawa T. — Industr. Hlth, 1981, vol. 19, p. 71.
51. Ogata M., Tomokuni K., Watanabe Sh. — Ibid., 1968, vol. 6, p. 116.
52. Ohtsuki T., Sato K., Koizumi A., Ikeda M. — Int. Arch. occup. Environ. Hlth, 1983, vol. 51, p. 381.
53. Parker J. C., Bahlman L. J. — Amer. industr. Hyg. Ass. J., 1978, vol. 39, p. 3.
54. Perocco P., Prodi G. — Cancer Lett., 1981, vol. 13, p. 213.
55. Perocco P., Bolognesi S., Alberghyini W. — Toxicol. Lett., 1983, vol. 16, p. 69.
56. Pessayre D., Cobert B., Descatoire V. et al. — Gastroenterology, 1982, vol. 83, p. 761.
57. Poplawski-Tabarelli S., Uehlke H. — Xenobiotica, 1982, vol. 12, p. 55.
58. Powell J. — Brit. J. industr. Med., 1945, vol. 2, p. 142.
59. Reynolds F. S. — Advanc. exp. Med. Biol., 1977, vol. 84, p. 117.
60. Rowe V. K., Wujkowski T., Wolf M. A. et al. — Industr. Hyg., 1963, vol. 24, p. 541.
61. Rowe V. K., McCollister D. D., Spencer H. C. et al. — Arch. industr. Hyg., 1952, vol. 5, p. 556.
62. Sabljic A. — Bull. Environ. Contam. Toxicol., 1983, vol. 30, p. 80.
63. Salmon A. G., Jones R. B., Mackrodt W. C. — Xenobiotica, 1981, vol. 11, p. 723.
64. Sigel J., Jones R. A., Coon R. A., Lyon J.-P. — Toxicol. appl. Pharmacol., 1974, p. 18, p. 168.
65. Sovolainun K., Riihimaki V. et al. — Int. Arch. occup. environ. Hlth, 1981, vol. 49, p. 89.
66. Spencer H. C., Rowe V. K., Adams E. M. et al. — Arch. industr. Hyg., 1951, vol. 4, p. 482.
67. Stewart R. D., Gay H. H., Erley D. S. et al. — Amer. industr. Hyg. Ass. J., 1961, vol. 22, p. 252.

68. Stewart R. D. — J. occup. Med., 1963, vol. 5, p. 259.
69. Stewart R. D., Dodd H. C. — Amer. industr. Hyg. Ass. J., 1964, vol. 25, p. 439.
70. Stewart R. D., Andreus J. T. — J. A. M. A., 1966, vol. 195, p. 904.
71. Stewart R. D. — Ann. occup. Hyg., 1968, vol. 11, p. 71.
72. Stewart R. D., Gay H. H., Schaffer A. W., Rowe V. K. — Arch. environ. Hlth, 1969, p. 19, p. 467.
73. Stewart R. D., Barella E. D., Dodd H. C., Torkelson T. R. — Ibid., 1970, vol. 20, p. 224.
74. Schumann A. M., Watanabe P. G. — Toxicol. appl. Pharmacol., 1979, vol. 48, p. 178.
75. Takeuchi J. — Jap. J. industr. Hlth, 1966, vol. 8, p. 371.
76. Thiele D. L., Eigenbrodt E. N., Ware A. J. — Gastroenterology, 1982, vol. 83, p. 926.
77. Torkelson T. R., Oyen F., McCollister D. D., Rowe V. K. — Amer. industr. Hyg. Ass. J., 1958, vol. 19, p. 353.
78. William H. L., Dornett M. D., Jones J. P. — Anesth. Analg., 1960, vol. 39, p. 249.

Поступила 11.01.85

# EFFECTS OF LOW MOLECULAR CHLOROR- GANIC ALIPHATIC COMPOUNDS ON HUMAN AND ANIMAL ORGANISMS (A REVIEW)

N. N. Ivcov, A. B. Kapitanov

N. I. Pirogov II Medical School, Moscow

Data on the effects of 1,1,1-trichlorethane and tetrachlorethylene on human and animal organisms are reviewed. These compounds are used in industry and in homeservice. The review deals with some aspects of the action of these organic solvents at the subcellular level.

УДК 612.018:577.175.859].014.46-008

Н. Я. Головенко, Б. Н. Галкин

## БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПРОСТАГЛАНДИНСИНТЕАЗНОГО СООКИСЛЕНИЯ КСЕНОБИОТИКОВ (ОБЗОР)

Физико-химический институт АН УССР, Одесса

Среди многочисленных реакций метаболизма ксенобиотиков наибольшее внимание исследователей привлекают окислительные процессы, которые катализируют монооксигеназы. Как правило, роль терминальной оксидазы в этих ферментных системах выполняют различные изоформы цитохрома Р-450. Он обнаружен в организмах многих животных и растений [2]. Наряду с процессами детоксикации монооксигеназы катализируют реакции, в которых образуются продукты, обладающие высокой реакционной способностью. Эти свойства определяют их возможность взаимодействовать с белками и нуклеиновыми кислотами клеток, индуцировать мутагенез и канцерогенез.

Учитывая то обстоятельство, что интактные клетки содержат множество других ферментов, катализирующих реакции окисления эндогенных субстратов, возник вопрос о возможности их участия в метаболизме ксенобиотиков. Первые исследования показали [21], что к таким ферментным системам можно отнести простагландинсинтеазу, окисляющую арахидоновую кислоту до простагландинов (ПГЕ<sub>2</sub> и ПГФ<sub>2α</sub>) и тромбоксанов. В этом не было ни-

чего удивительного, так как известно, что на определенном этапе в биосинтезе простагландинов (ПГ) участвует цитохром Р-450 [8, 10, 26]. Позже с помощью микросом семенных барана, которые использовали в качестве источника простагландинсинтеазы, удалось показать [18], что окисление полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) может осуществляться без участия цитохрома Р-450. Об этом свидетельствовал ряд факторов: 1) в микросомах семенных пузырьков барана цитохром Р-450 отсутствует; 2) набор метаболитов ПАУ в семенных пузырьках отличается от продуктов реакций, протекающих в микросомах печени животных; 3) НАДФН не ускоряет реакции окисления ПАУ; 4) метгемоглобин в значительной степени ускоряет окисление ПАУ, а протопорфирин IX, входящий в состав цитохрома Р-450, неэффективен.

Более того, окисление ПАУ в микросомах семенных пузырьков барана может осуществляться только в том случае, если в инкубационную среду вносят арахидоновую кислоту и простагландины. Указанное выше и объясняет возникновение термина «соокисление», используемого в литературе



для обозначения метаболизма ксенобиотиков в простагландинсинтетазном катализе.

В настоящем обзоре суммированы данные по соокислению ксенобиотиков различной химической структуры в некоторых органах и тканях экспериментальных животных. Обсуждаются возможные биохимические механизмы этого процесса.

### Сooksление ПАУ

Значительная часть исследований по окислению ПАУ в гепатоцитах относится к бенз(а)пирену (БП). Основные его метаболиты представлены следующими группами: 1) фенольные производные БП (3-окси; 6-окси; 9-окси); 2) эпоксиды (7,8-эпокси; 9,10-эпокси; 4,5-эпокси); 3) хиноны (1,6-; 3,6-; 6,12-); 4) дигидродиолы; 5) эпоксиды дигидродиолов; 6) тетролы. Принято считать, что группы метаболитов 1—3 и 5 образуются в монооксигеназном, а 4 и 6 — в эпоксидгидратазном катализе.

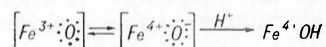
Физико-химическими методами анализа установлено [18], что в семенных пузырьках барана БП превращается в основном в 1,6-, 3,6- и 6,12-хиноны. Исходя из общих принципов механизмов окислительных реакций ксенобиотиков [1], можно заключить, что между БА и эпоксидами существуют промежуточные соединения эпоксидной природы.

Если в качестве субстрата простагландинсинтетазы используют ( $\pm$ )-транс-7,8-диокси - 7,8-дигидробенз(а)пирен (I), то он в основном превращается в метаболит III (анти-транс-бенз(а)пирен-7,10/8,9-тетрол) и в меньшей степени — в II, IV и V. Выход метаболитов увеличивается при внесении в инкубационную среду арахидоновой

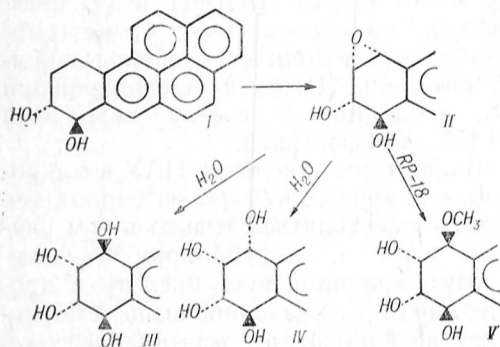
кислоты, ПГГ<sub>2</sub> и  $\Delta$ -оксиперокси-5,8-11,13-эйкозатетраеновой кислоты [5, 11, 16, 29]. Метирапон и СО не ингибируют по аналогии с цитохром Р-450-зависимыми ферментами эти процессы, а НАДФН не ускоряет их. В то же время индометацин замедляет реакцию на 50 % [16].

Сooksление БП и соединения I осуществляется также в легких морских свинок и толстой кишке [9, 20].

В связи с обсуждаемой проблемой наибольший интерес представляет метаболит II. Каковы возможные механизмы его образования? Можно считать установленным фактом, что он образуется в пероксидазных реакциях. Цитохром Р-450, гемоглобин и цитохром с взаимодействуют с гидроперекисями и образуют комплексы. Однако цитохром Р-450 отличается от других гемопротеидов в каталитическом действии тем, что для него отсутствуют радикальные стадии [4]. Спектральные характеристики взаимодействия цитохрома Р-450 с гидроперекисями трет-бутила и тетралина аналогичны комплексу I, известному в реакциях пероксидаз



Простагландинсинтетаза относится к мультиэнзимным комплексам. В ее состав входят циклооксигеназа, пероксидаза и другие ферменты. Циклооксигеназа содержит слабосвязанный гем и негеминное железо. Оба атома железа принимают участие в комплексе реакций, в результате которых образуется ПГГ<sub>2</sub>. Первым промежуточным продуктом в реакции арахидоновая кислота  $\rightarrow$  ПГГ<sub>2</sub> является 15-оксиперокси-9,11-эндопероксид ПГГ<sub>2</sub>. Происходит это в результате отщепления атома водорода у С-13 и образования свободного радикала. Затем пероксидный радикал присоединяется в С-9 и С-11 и образуются 8,12-С—С-связи. Этому процессу предшествуют изомеризация 11,12-С—С-связи в 12,13-двойную связь и присоединение другого пероксидного радикала в положение 15. Все это приводит к изомеризации 12,13- в 13,14-двойную связь. Такие превращения относят к процессам одноэлектронного переноса. Атомы кислорода при С-9, С-11 и С-15 происходят из атмосферного кислорода. Циклооксиге-

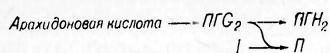




назную реакцию ингибируют аспирин и другие нестероидные противовоспалительные средства. В этом случае ацетальный остаток аспирина присоединяется к активному центру фермента, ингибируя его. Восстанавливается ПГ<sub>2</sub> до ПГН<sub>2</sub> в реакциях пероксидазного типа. ПГН<sub>2</sub> служит предшественником ПГЕ<sub>2</sub> и ПГФ<sub>2α</sub> в семенных пузырьках и других тканях, а также тромбоксана А<sub>2</sub> в тромбоцитах и легких.

Следовательно, неспецифическим источником кислорода, внедряемого в молекулу БП в простагландинсинтетазном катализе, могут быть эндоперекиси ПГ. Действительно, инкубирование соединения I с микросомами семенных пузырьков барана в присутствии [<sup>18</sup>O]-15-перокси-эйкоза-5,8,11,13-тетраеновой кислоты показало [17], что радиоактивный материал включается в метаболиты II—V.

Анализ приведенных данных позволяет заключить, что биохимические механизмы соокисления БП в простагландинсинтетазном катализе необходимо рассматривать в сочетании с другими процессами, прежде всего с монооксигеназными и эпексидгидратазными. В целом это «конвейерный» процесс, включающий в себя 3 этапа: 1) монооксигеназное окисление БП до соответствующих эпексидов в реакции  $RH + \text{НАДФН} + \text{H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow \text{РОН} + \text{НАДФ}^+ + \text{H}_2\text{O}$ . В ней один атом молекулярного кислорода присоединяется к субстрату, другой восстанавливается до воды; 2) превращение эпексида в транс-дигидродиол (метаболит I). Механизм эпексидгидратазной реакции отличается от классических гидролитических процессов, катализируемых соответствующими гидролазами. У эпексидгидратазы оксигруппа серина образует ацил-О-ферментативный промежуточный комплекс, дающий впоследствии устойчивый эфир [2]. В результате реакции происходит протонирование кислорода эпексида и его превращение в диол; 3) образование бенз(а)пирен-7,8-диокси-9,10-эпексида (метаболит II) осуществляется следующим образом:

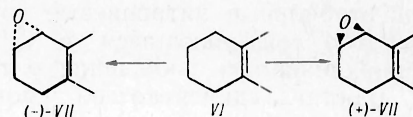


В этом случае эпексидирование идет по свободнорадикальному механизму.

Установлено, что диолэпексид II связывается с макромолекулами клетки и обладает высокими мутагенными свойствами [19]. Однако, будучи неустойчивым продуктом, он легко трансформируется в метаболиты III—V в реакции метанолиза при его выделении из биологического материала (химический путь) или в реакции гидролиза в клетке (биохимический путь).

Следует отметить, что во многих органах и тканях экспериментальных животных метаболит II образуется в реакции монооксигеназного типа. Однако он отличается от соединения, образующегося в простагландинсинтетазном катализе. Это относится не только к кислороду, который внедряется в молекулу БП из различных источников, но и к стереохимии метаболитов. Известно, что конформационная изомерия имеет большое значение для циклических соединений и конденсированных полициклических систем. Заместители в этих молекулах могут находиться в двух основных состояниях: экваториальном (в плоскости кольца) и аксиальном (перпендикулярно плоскости).

Для изучения основных закономерностей стереоизбирательного эпексидирования ПАУ простагландинсинтетазой и монооксигеназой [5] был использован 7,8-дигидробенз(а)пирен (VI), который окисляется до (+)- и (—)-9,10-эпекси-7,8,9,10-тетрагидробенз(а)пирена (VII).



Простагландинсинтетаза микросом семенных пузырьков барана окисляет VI с выходом продуктов (—)-VII и (+)-VII в соотношении 54:46. Для монооксигеназной реакции оно составляет 89:11 (интактные микросомы крыс), 62:38 (индуцированные фенобарбиталом) и 69:31 (индуцированные 3-метилхолантеном). Представленные результаты свидетельствуют о том, что для реакции эпексидирования характерно избирательное (частичное) образование из субстрата продукта, содержащего центр асимметрии. Это один из четырех возможных случаев стереохимической специфичности действия ферментов при метаболизме ксенобиотиков [1]. В дан-

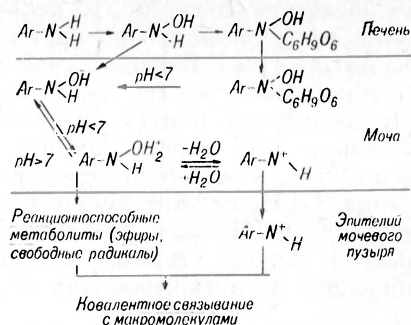
ном случае для простагландинсинтетазы отсутствует, а для монооксигеназы существует стереохимическая специфичность действия.

Рассматриваемые данные представляют особый интерес для онкологии в связи с интенсивно развивающейся теорией, согласно которой определенные области в молекуле ПАУ (в частности, bay region) обладают высокой реакционной способностью [3]. Несомненно, что для взаимодействия ПАУ с «рецепторным участком» клетки безразлично расположение определенных групп или атомов в пространстве. В частности, определено, что (—)-II и (—)-VII на порядок превышают соответствующие энантиомеры по способности индуцировать определенные формы канцерогенеза [31].

Простагландинсинтетаза микросом семенников барана в присутствии арахидоновой кислоты окисляет бенз(а)-антрацен, хризен и их дигидродиолы. Индометацин ингибирует эти реакции [15].

#### Соокисление ароматических аминов

Ариламины — важный класс органических веществ, большинство из которых приобретает канцерогенные свойства после N-гидроксилирования монооксигеназной системой. Продукты реакций (N-гидроксилизированные) или их эфиры могут образовывать резонанс-стабильные нитропиевые ионы, ковалентно связывающиеся с ДНК. Недавно появились сообщения о том, что простагландинсинтетаза может соокислять ариламины и ариламиды [24, 32], алкилариламиды [24], алкиламины [25], аминоказобензолы [33], аминифенолы и ацетоамидофенолы [7]. Большинство из перечисленных работ в той или иной степени констатирует факт соокисления ароматических аминов в простагландинсинтетазном катализе. Биохимические механизмы этих процессов рассматривают, как правило, на примере бензидина и его производных [12, 32], аминифенолов [27] или парацетамола [23, 24]. Образование нуклеофильных метаболитов ароматических аминов в печени, их транспорт в мочевой пузырь человека и собаки и индуцирование опухоли происходит следующим образом [22]:



Инкубирование бензидина с микросомами семенников барана и арахидоновой кислотой приводит к связыванию его (около 15 %) с экзогенной РНК [25]. При нагревании простагландинсинтетазы процесс связывания прекращается. Аналогичная картина наблюдается при внесении в инкубационную среду индометацина. Если РНК внести в среду после субстратов окисления, то связывания метаболитов бензидина с нуклеиновой кислотой не происходит. Эти данные свидетельствуют о том, что реакционноспособные продукты соокисления бензидина существуют короткое время и, будучи неустойчивыми, превращаются в соединения, которые не взаимодействуют с РНК. Отмечено также, что близкие по структуре бензидину вещества, такие, как N-ацетилбензидин, N,N-диацетилбензидин, 4-аминобифенил и 4,4'-метил-бис-(2-хлоранилин), после предварительной активации в значительно меньшей степени связываются с нуклеиновой кислотой.

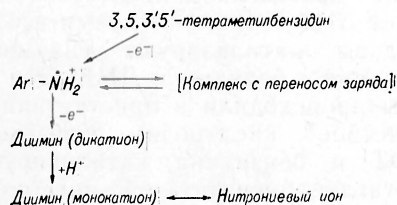
Следовательно, наличие 4,4'-аминозаместителей в молекуле бензидина определяет его специфическое соокисление простагландинсинтетазой.

Выяснению природы электрофильных продуктов соокисления ароматических аминов посвящен ряд работ [7, 25]. При использовании N-оксиацетиламинобифенила образуются нитропиевые ионы 4-аминобифенила, которые дают аддукт 8(N-4-аминобифенил)гуанина [25]. В то же время при инкубации 4-аминобифенила с гуанозин-5-монофосфатом в присутствии арахидоновой кислоты и простагландинсинтетазы такой аддукт не обнаружен. Эти и другие данные [7, 25] позволили заключить, что в процессе соокисления 4-аминобифенила арил-натрониевые ионы не образуются. Можно было бы предположить, что

реакционноспособными промежуточными продуктами являются нитрозосоединения, образующиеся после окисления аминов до гидроксиламинов. Однако нитрозосоединения образуют комплексы с белками [7], но не взаимодействуют с нуклеиновыми кислотами [13].

Несмотря на то что бензидин образует комплексы с полигуанидиловой кислотой, данных о наличии гидроксиламинов и нитрониевых ионов в составе его метаболитов нет.

Обычное ферментативное или электрофильное окисление бензидина при  $pH < 7,0$  включает две стадии: 1) одноэлектронный процесс, приводящий к образованию голубого продукта реакции; 2) двухэлектронный процесс с образованием желтого продукта реакции [12]. В нейтральной среде эти продукты нестойкие и могут димеризоваться до азосоединений. Следовательно, при соокислении бензидина простагландинсинтетазой реакционноспособные интермедиаты образуются между исходным соединением, с одной стороны, и нитрониевым ионом — с другой. Действительно, на примере 3,5,3',5'-тетрамethylбензидина было показано [12], что таким промежуточным соединением может быть радикал  $(Ar - \dot{N}H_2^+)$ . В целом авторы представляют схему окисления 3,5,3',5'-тетрамethylбензидина следующим образом:



В связи с канцерогенным действием бензидина следует отметить, что микросомы внутренней и паружной частей мозгового слоя почек в присутствии арахидоновой кислоты окисляют этот субстрат [32]. Микросомная фракция коркового слоя почек и печени в подобных условиях не осуществляла биохимическую трансформацию этого соединения. При инкубации бензидина с микросомами внутренней части мозгового слоя почек установлено, что он окисляется на 30 %. Активность паружной части составляет 60 % от

внутренней. Внесение в инкубационную среду глутатиона замедляло обмен бензидина на 30 %. Ингибиторы простагландинсинтетазы блокировали зависимость от арахидоновой кислоты соокисление бензидина.

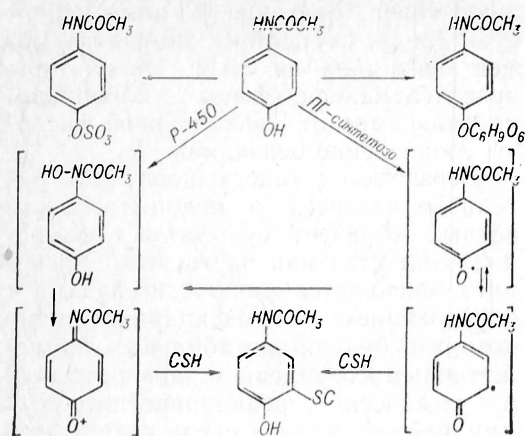
Парацетамол (ацетаминнофен) в организме человека и подопытных животных образует сульфат и глюкуропид. Значительная часть этого препарата окисляется монооксигеназами с образованием N-оксипарацетамола, который, будучи нестабильным промежуточным соединением, превращается в химически реакционноспособный имидохинон. Если в среде содержится эквимольное количество глутатиона, имидохинон превращается в нетоксичный метаболит. В опытах на животных он обнаруживается в моче в виде производных меркаптуровой кислоты.

Микросомы семенных пузырьков барана и мозгового слоя почек кролика в присутствии арахидоновой кислоты катализируют соокисление парацетамола до электрофильного метаболита, который также образует конъюгат с восстановленным глутатионом [6, 24]. В атмосфере азота скорость образования такого конъюгата снижалась на 80 %. Индометацин и антиоксиданты блокируют эту реакцию, а метирапон не оказывает на нее существенного влияния. Образование конъюгата — ферментативный процесс, поскольку он зависит от концентрации микросомного белка в пробе.

Гидроперекись линолевой кислоты также способна инициировать метаболизм парацетамола. Однако скорость соокисления субстрата значительно ниже, чем в случае использования арахидоновой кислоты. Ингибирующий эффект в этом случае оказывают только антиоксиданты.

В отличие от цитохром Р-450-зависимых ферментов простагландинсинтетазы в качестве интермедиата не образует N-гидроксильного производного парацетамола. По-видимому, при этом каталитическом процессе образуются соответствующие радикалы [24], которые при взаимодействии с глутатионом превращаются в меркаптуровые кислоты. Следовательно, электрофильные метаболиты парацетамола, образующиеся в монооксигеназном и простагландинсинтетазном катализе, различны и их можно представить следующим образом:





В биохимии чужеродных веществ для установления механизмов окислительных реакций, молекулярной организации и свойств ферментных систем, катализирующих эти процессы, в качестве субстратов используют N-, O- и S-монометил- и диметилпроизводные. Моноксигеназы осуществляют N-деметилирование этих субстратов с образованием в качестве промежуточного соединения карбиноламина. Конечными метаболитами этой реакции являются формальдегид и соответствующие N-деалкильные производные. Стехиометрия процессов позволяет регистрировать по образованию формальдегида активность ряда моноксигеназ.

Микросомы семенников барана в присутствии арахидоновой кислоты также окисляют производные монометил- и диметиламина. Индометацин ингибирует эти процессы. Установлено [28], что деметилирование названных субстратов простагландинсинтетазой происходит в аэробных условиях и в отличие от моноксигеназ не характеризуется строгой субстратной специфичностью. Формальдегид образуется в инкубационной среде через 10—20 с после внесения субстрата, и процесс, как правило, продолжается 4—5 мин. Оптимальная концентрация белка микросом в пробе составляет 1 мг.

Инициировать деметилирование веществ могут также 15-пероксиарахидоновая кислота, трет-гидроперекись бутила и перекись водорода, но не  $\text{PGH}_2$  и НАДФН. В этом случае присутствие в инкубационной среде кислорода не требовалось. Аналогичные процессы обнаружены [28] в легких

морских свинок и мышей, а также в мозговом слое почек кролика.

Механизм N-деметилирования субстратов простагландинсинтетазой, как полагают [14], отличается от моноксигеназного. Однако он окончательно не выяснен. Предполагается, что промежуточным продуктом при таком процессе может быть катион-радикал, который после гидролиза превращается в формальдегид.

Приведенные результаты свидетельствуют о том, что во всех перечисленных реакциях соокисления простагландинсинтетаза выступает в роли простагландинпероксидазы. Следовательно, этот фермент по своим каталитическим свойствам должен напоминать другие пероксидазы. В биохимии хорошо известны механизмы действия пероксидаз на некоторые амины и фенолы.

В работе [30] сопоставлены свойства простагландинсинтетазы и ряда пероксидаз по их способности катализировать метаболизм ксенобиотиков. В частности, исследована способность пероксидазы хрена, хлорпероксидазы, лактатпероксидазы и простагландинсинтетазы окислять бензидин и 2-амино-4-(5-нитро-2-фурил)-тиазол (АНФТ). Количества электрофильных продуктов, образующихся в этих реакциях, определяли по содержанию радиоактивного материала, связанного с белками и ДНК. Отмечено, что только простагландинсинтетаза активирует АНФТ. В то же время все пероксидазы катализируют связывание бензидина с белками и ДНК. Эти процессы происходили в присутствии и в отсутствие кислорода. Связывание АНФТ и бензидина, катализируемое простагландинсинтетазой, ингибировалось аспирином и при анаэробных условиях. Зависимое от хлорпероксидазы окисление бензидина также снижалось при введении в среду аспирина. Витамин Е ингибировал активность всех ферментов, метаболизирующих бензидин и АНФТ. Аналогичные результаты получены при изучении соокисления 2-аминофлуорена [7].

Представленные результаты свидетельствуют о том, что простагландинсинтетаза катализирует широкий круг реакций соокисления различных по структуре ксенобиотиков. Образующиеся при этом электрофильные промежуточные продукты взаимодействуют



ют с макромолекулами клеток. В настоящее время трудно представить себе все возможные последствия, которые имеют место в организме при попадании в него чужеродных соединений и их превращении простагландин-синтетазой. Но, пожалуй, уже сейчас необходимо учитывать это явление при одновременном назначении пациентам простагландинов и других лекарственных средств.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Головенко Н. Я. Механизмы реакций метаболизма ксенобиотиков в биологических мембранах. Киев, 1981.
2. Головенко Н. Я., Карасева Т. Л. Сравнительная биохимия чужеродных соединений. Киев, 1983.
3. Ляхович В. В., Цырлов И. Б. Индукция ферментов метаболизма ксенобиотиков. Новосибирск, 1981.
4. Метелица Д. И. Активация кислорода ферментными системами. М., 1982.
5. Boyd J. A., Barnett J. C., Eling T. E. — *Cancer Res.*, 1982, vol. 42, p. 2628—2632.
6. Boyd J. A., Eling T. E. — *J. Pharmacol. exp. Ther.* 1981, vol. 219, p. 659—664.
7. Boyd J. A., Hadvan D. L., Eling T. E. — *J. biol. Chem.*, 1983, vol. 258, p. 8246—8254.
8. Cinli D. L., Feinstein M. B. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1976, vol. 73, p. 171—179.
9. Craven P. A., De Rubertis F. R. — *Ibid.*, 1980, vol. 94, p. 1044—1051.
10. Graf H., Ullrich V. — *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, 1982, Bd 363, S. 972.
11. Gurthzie J., Robertson I. G. C., Zeigen E. et al. — *Cancer Res.*, 1982, vol. 42, p. 1620—1623.
12. Josephy P. D., Mason R. P., Eling T. E. — *Ibid.*, p. 2567—2570.
13. Koldubar F. F., Frederick C. B., Weins C. C., Zenser T. V. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1982, vol. 108, p. 253—258.
14. Lasker J. M., Sivarajah R. P., Mason B. et al. — *J. biol. Chem.*, 1981, vol. 256, p. 7764—7767.
15. Marnett L. S., Bienkowski M. J., Luthauer M. — In: *Prostaglandins and Cancer*. Washington, 1981.
16. Marnett L. S., Johnson J. T., Bienkowski M. J. — *FEBS Lett.*, 1979, vol. 106, p. 13—16.
17. Marnett L. S., Panthananickal A., Reed G. A. — *Drug Metab. Rev.*, 1982, vol. 13, p. 235—247.
18. Marnett L. S., Reed G. A. — *Biochemistry (Wash.)*, 1979, vol. 18, p. 2932—2929.
19. Marnett L. S., Reed G. A., Dennison D. J. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1978, vol. 82, p. 210—216.
20. Marnett L. S., Reed G. A., Johnson J. T. — *Ibid.*, 1977, vol. 79, p. 569—576.
21. Marnett L. S., Wlodawer P., Samuelsson B. — *J. biol. Chem.*, 1975, vol. 250, p. 8510—8517.
22. Miller J. A., Miller E. C. — *Advanc. Pharmacol. Ther.*, 1978, vol. 9, p. 3—12.
23. Mohands G., Duggin G., Hawath G. S., Tiller D. J. — *Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol.*, 1981, vol. 34, p. 69—80.
24. Moldeus P., Anderson B., Rahimtula A., Berggren M. — *Biochem. Pharmacol.*, 1982, vol. 31, p. 1363—1368.
25. Morton K. C., King C. M., Vaught S. B. et al. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1983, vol. 111, p. 96—103.
26. O'Brien P. J., Rachimtula A. D. — *Ibid.*, 1976, vol. 70, p. 832—838.
27. Robertson I. G. C., Sivarajah K., Eling T. E., Zeiger E. — *Cancer Res.*, 1983, vol. 43, p. 476—480.
28. Sivarajah K., Lasker J. M., Eling T. E., Abou-Donia M. B. — *Molec. Pharmacol.*, 1982, vol. 21, p. 133—141.
29. Sivarajah K., Mukhtar H., Eling T. E. — *FEBS Lett.*, 1979, vol. 106, p. 17—20.
30. Wise R. W., Zenser T. V., Davis B. B. — *Cancer Res.*, 1983, vol. 43, p. 1518—1522.
31. Wood A. W., Wislocki P. G., Chang R. L., Levin W. et al. — *Ibid.*, 1976, vol. 36, p. 3355—3366.
32. Zenser T. V., Mattamnal M. B., Davis B. B. — *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 1979, vol. 211, p. 460—464.
33. Zenser T. V., Mattamnal M. B., Davis B. B. — *J. Lab. clin. Med.*, 1980, vol. 96, p. 425—432.

Поступила 17.01.85

УДК 612.822.1.018:[547.95:547.943].015.1

О. О. Григорьянц, О. А. Гомазков

### ЭНКЕФАЛИНОБРАЗУЮЩИЕ ФЕРМЕНТЫ (ОБЗОР)

Институт медицинской энзимологии АМН СССР, Москва

В ряду физиологически активных пептидов, таких как брадикинин, ангиотензин, вещество Р, гормонстимулирующие или гормонотормозящие факторы, особое место занимают энкефалины и эндорфины, относящиеся к группе опиоидных пептидов.

Эти вещества — эндогенные лиганды опиатных рецепторов нервной тка-

ни — были впервые описаны в 1975 г. [18] как важные пептиды-анальгетики, имитирующие в организме эффект морфина.

В многочисленных исследованиях патофизиологического и фармакологического планов постепенно было выявлено весомое участие этих нейропептидов в регуляции центральных и ве-

гетативных функций организма. Действие энкефалинов связывают с изменением артериального давления, регуляцией эмоционального состояния, участием в развитии стрессорных реакций и патогенеза психических заболеваний, таких как шизофрения и эпилепсия.

Целостное представление о семействе энкефалиновых пептидов позволяет оценивать их как новый тип эндогенных регуляторов, в первую очередь связанных с функцией нервных клеток. Однако исходное понимание энкефалинов и эндорфинов только как нейропептидов требует определенного пересмотра [1], поскольку их образование, локализации рецептирование доказаны и для периферических тканей.

Для выяснения механизмов регулирующего действия опиоидных пептидов существенное значение имеет изучение путей их синтеза и распада. Ферменты, участвующие в деградации энкефалинов (энкефалиназы А и В, диаминопептидаза, дипептидилкарбокспептидаза и др.), исследованы достаточно хорошо [43]. В то же время сведения относительно ферментов синтеза опиоидных пептидов, а также данные о биохимии предшественников энкефалинов и эндорфинов представляются недостаточными. В настоящей работе впервые обобщены материалы об энкефалинообразующих ферментах (ЭОФ).

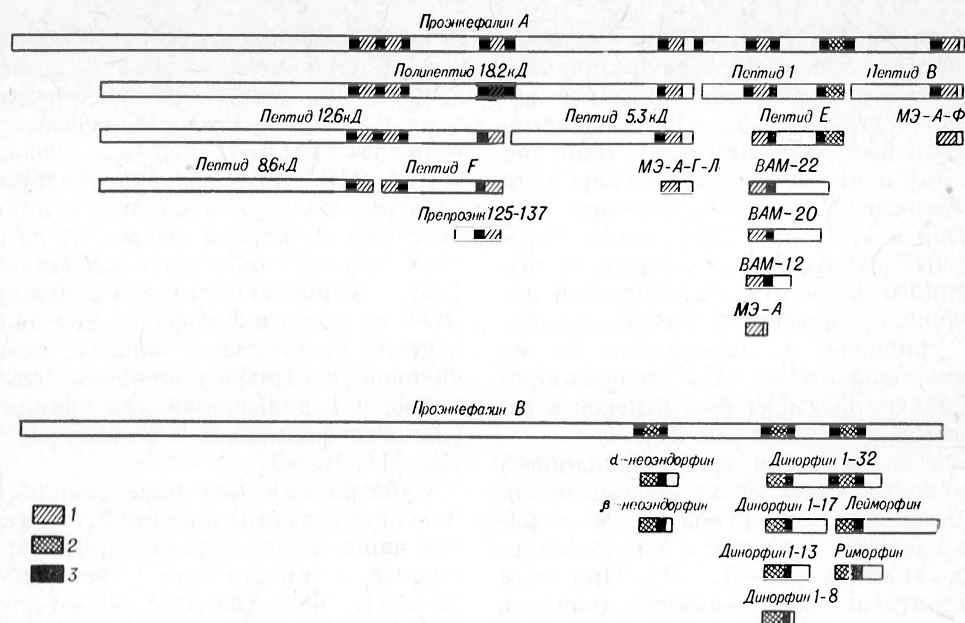
*Предшественники энкефалинов.* Аминокислотные последовательности мет-энкефалина (Тир-Гли-Гли-Фен-Мет) и лей-энкефалина (Тир-Гли-Гли-Фен-Лей) входят в состав многих крупных пептидов, являющихся их возможными предшественниками. Различают три наиболее вероятных предшественника энкефалинов: проопиомеланокортин, проэнкефалин А и проэнкефалин В, или продинорфин [15]. До настоящего времени эти белки охарактеризованы недостаточно, отсутствуют конкретные сведения об их выделении и свойствах. Первичная структура этих пропептидов с молекулярной массой порядка 30 кД была определена по нуклеотидной последовательности кДНК [5, 20, 28, 37, 39].

Молекула проопиомеланокортина содержит одну копию мет-энкефалина. В аминокислотную последовательность проэнкефалина А входят 6 ко-

пий мет-энкефалина и 1 — лей-энкефалина. Наконец, структура продинорфина включает в себя 3 последовательности лей-энкефалина. Ряд пептидов, выделенных из различных органов млекопитающих, вписывается в структурную последовательность этих предшественников. Так, в молекулу проопиомеланокортина входят АКТГ и  $\beta$ -эндорфин, содержащий в свою очередь последовательность мет-энкефалина в N-концевой части [2, 6]. Аминокислотные последовательности пептида Е [23], пептида I [19], пептида F [25], пептида В [47], ВАМ-пептидов [36], полипептида 18,2 кД [22] и более мелких пептидов [17, 35, 41, 42, 48] укладываются в структуру проэнкефалина А. Продинарфин включает в себя последовательности  $\alpha$ - и  $\beta$ -нео-эндорфинов [21], динарфинов с различной длиной цепи [7, 12, 44], риморфина [24] и лейморфина [38] (см. рисунок).

В образовании энкефалинов из указанных предшественников принимают участие в основном 3 группы ферментов. Первая — SH-зависимая эндонептидаза представляет собой фермент, расщепляющий  $\beta$ -эндорфин по связи Мет-Тре с образованием мет-энкефалина [27]. Две других — трипсиноподобный и карбоксипептидаза-В-подобный ферменты, вероятно, действуют в организме совместно, так как последовательно участвуют в процессинге одной и той же молекулы предшественника. Наличие в молекулах проэнкефалина А и продинорфина пар основных аминокислотных остатков, окружающих все энкефалиновые последовательности, представляет удобную мишень для действия трипсиноподобных ферментов [29]. В ходе триптического гидролиза, кроме собственно энкефалинов, освобождаются различные мелкие пептиды: мет-энкефалин-арг<sub>6</sub>, мет-энкефалин-арг<sub>6</sub>-фен<sub>7</sub>, лей-энкефалин-арг<sub>6</sub> и другие, являющиеся субстратами для карбоксипептидаза-В-подобных ферментов [9, 16]. Кроме этих протеаз, описаны несколько других ферментов, которые принимают участие в процессинге энкефалинов и эндорфинов [13, 14, 32, 34].

Характеризуя отдельно каждую из групп ЭОФ, следует указать, что ранее других появились работы по SH-зависимой пептидазе, гидролизующей  $\beta$ -эндорфин [3, 26, 27]. Фермент



Эндогенные пептиды, входящие в структуру проэнкефалинов А и В.

1 — мет-энкефалин; 2 — лей-энкефалин; 3 — пары аминокислотных остатков лизина и аргинина; МЭ-А-Ф — мет-энкефалин-арг-фен; МЭ-А-Г-Л — мет-энкефалин-арг-гли-лей; МЭ-А — мет-энкефалин-арг. Препроэнк<sub>125-137</sub> — фрагмент проэнкефалина А.

был выделен и очищен из мозга крыс фракционированием сульфатом аммония, гель-фильтрацией через сефадекс G-25, ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-сефадексе и аффинной хроматографией, использующей в качестве лиганда фрагмент  $\beta$ -липотропина<sub>64-67</sub> [27]. Различают растворимую и мембраносвязанную формы фермента, из которых каждая высвобождает мет-энкефалин из  $\beta$ -эндорфина и  $\beta$ -липотропина [26].

Активность фермента определяли радиоиммунным методом по образованию мет-энкефалина из  $\beta$ -эндорфина. Кроме того, использовали флюориметрический анализ с дансильрованным фрагментом  $\beta$ -эндорфина [4—7].

SH-зависимая эндопептидаза, расщепляющая  $\beta$ -эндорфин, была первым исследованным ЭОФ. Японская и американская группы исследователей, занимавшиеся его изучением [26, 27], придавали ферменту большое значение в образовании опиоидных пептидов из крупных предшественников. Однако ряд фактов не позволяет говорить об этом пути биосинтеза энкефалинов как об основном и прежде всего потому, что  $\beta$ -эндорфин, субстрат для SH-зависимой эндопептидазы, может служить предшественником только одного из двух энкефалинов.

Начиная с 1981 г. были опубликованы серии работ относительно трипсиноподобных ЭОФ [4, 30, 40, 50]. Ферменты выделяли из хромоафинных гранул надпочечников быка, используя различные схемы очистки. Одна из них состояла во фракционировании лизата хромоафинных гранул сульфатом аммония и гель-фильтрации через сефадекс G-200 [51]. В выделенном ферментном препарате была обнаружена как трипсиноподобная, так и карбоксипептидаза-B-подобная активности. Кроме того, в ходе гель-фильтрации удалось частично разделить собственно трипсиноподобную активность, которую определяли по действию на традиционные трипсиновые субстраты, и энкефалинконвертирующую активность, выщепляющую мет- и лей-энкефалины из йодированного пептида Е. Оптимальный pH для энкефалинконвертазы был равен 5, 7. Активность фермента ингибировал п-хлормеркуробензоат — ингибитор тиоловых протеаз. Это ингибирование блокировал дитиотреитол. Ингибитор сериновых протеаз — п-тозиллизинхлорометилкетон активности не снижал. На этом основании авторы отнесли выделенный ими ЭОФ к тиоловым протеазам.

Другая группа исследователей провела более тщательную очистку трип-



синоподобного ЭОФ. Лизат хромафинных гранул после фракционирования сульфатом аммония подвергли аффинной хроматографии на сефарозе 4В с соевым ингибитором трипсина [29, 30] и затем хроматографировали на биогеле Р-60 [31]. Фермент был очищен в 1000 раз [31], имел оптимальный рН 8,0 [29]. Активность выделенного фермента ингибировали диизопропилфторфосфат, соевый ингибитор трипсина и апротинин, но не п-аминобензамидин. По ингибиторному спектру фермент был отнесен к сериновым протеазам [30, 31].

Для определения трипсиноподобной активности этого ЭОФ использовали комбинацию жидкостной хроматографии высокого давления и радиоиммунного анализа [29—31, 51]. При этом субстратами для фермента являлись частично очищенный эндогенный пептид, получаемый при выделении фермента [29, 30, 51], пептид Е [31, 51] и пептид F [29, 31]. Кроме того, для определения активности использовали радиорецепторный анализ с клетками NG-108-15 [51].

Одновременно с работами по трипсиноподобным протеазам были начаты исследования третьей группы ЭОФ — карбоксипептидаза-В-подобных [9, 11, 52]. Ферменты выделяли из гипофиза [8, 11, 49], различных отделов мозга [10, 11] и надпочечников быка [9, 10, 49, 52], из мозга [10, 11, 49] и гипофиза крысы [11, 16].

Для очистки фермента из надпочечников быка использовали центрифугирование гомогената, аффинную хроматографию на лейциларгинин-агарозе и гель-фильтрацию через сефадекс G-200 [9]. Впоследствии этот же фермент очищали хроматографией на конканавалин-А-сефарозе [49]. При электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия препарат давал одну полосу, соответствующую молекулярной массе около 50 кД [11]. Фермент имел оптимальный рН 5,5—6,0 [9], активировался ионами кобальта, никеля и цинка [9, 11], ингибировался ионами кадмия, меди, ртути, рядом гуаниновых производных янтарной кислоты [8, 11].

Эта же группа авторов параллельно выделяла и очищала карбоксипептидаза-В-подобные ЭОФ из мозга, гипофиза и надпочечников быка, исполь-

зуя ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе, аффинную хроматографию на конканавалин-А-сефарозе и на п-аминобензиларгининсефарозе и гель-фильтрацию через сефадекс G-200 [10, 49]. По ингибиторному спектру, молекулярной массе и кинетическим свойствам ферменты из всех трех тканей оказались идентичными [10]. Карбоксипептидаза-В-подобные ЭОФ из мозга и гипофиза крыс не подвергали специальной очистке, ограничиваясь центрифугированием гомогенатов, и использовали для оценки активности ферментов в различных тканях [11, 16, 49].

Субстратами для определения карбоксипептидаза-В-подобной активности чаще всего служили дансилпроизводные трипептидов Фен-Лей-Арг [8—11], Фен-Ала-Арг, Фен-Гли-Арг, Фен-Иле-Арг, Про-Ала-Арг [10], продукты гидролиза которых определяли флюориметрически. При использовании мет-энкефалина-Арг<sub>6</sub> и лей-энкефалина-Арг<sub>6</sub> применяли жидкостную хроматографию высокого давления [9]. Иодирование мет-энкефалина-арг<sub>6</sub> позволяло эффективно использовать тонкослойную хроматографию [16]. Расщепление <sup>125</sup>I-динорфина<sub>1-13</sub> регистрировали на жидкостном хроматографе с проточным γ-счетчиком [52]. Разработан новый чувствительный радиометрический анализ карбоксипептидаза-В-подобной активности, основанный на различной растворимости <sup>3</sup>H-меченого субстрата и продукта в хлороформе. Метод оказался в 100 раз чувствительнее флюориметрического [45]. Таблица суммирует основные характеристики исследованных групп ЭОФ.

Имеются единичные публикации, описывающие регионарную активность ЭОФ в тканях мозга и гипофиза. Наибольшая активность энкефалинообразующей карбоксипептидазы обнаружена в гипофизе, особенно в его передней доле. Среди зон мозга обращает внимание высокая активность в гиппокампе и таламусе/гипоталамусе; наименьшая — в мозжечке. Различие между самой высокой (гипофиз) и самой низкой (мозжечок) удельными активностями энкефалинконвертазы достигает двух десятичных порядков [49].

Таким образом, ЭОФ представляют собой целостную биохимическую си-



Свойства ЭОФ

Тип фермента	Источник фермента	Стадии и степень очистки	Субстрат	Активаторы	Ингибитор	Оптимальный pH	Литературный источник
SH-зависимая пептидаза	Мозг крысы	Фракционирование сульфатом аммония, гель-фильтрация, ионообменная и аффинная хроматография	$\beta$ -Эндорфин, дансил-л-пептидин (64—67)	—	—	—	[27]
Карбоксипептидаза-B-подобный	Хромаффинные гранулы надпочечников быка	Аффинная хроматография, гель-фильтрация	Дансил-фен-лей-арг, мет-энкефалин-арг <sub>6</sub> , лей-энкефалин-арг <sub>6</sub> , мет-энкефалин-арг <sub>6</sub> -арг <sub>7</sub> , Дансил-трипептиды	Co <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , ЭДТА, о-Фенантролин, п-ХМФС, МГТК, АМПС, ГПС	5,5—6,0	[9, 11]
	Надпочечники, мозг и гипофиз быка	Ионообменная и аффинная хроматография, гель-фильтрация, очистка фермента из гипофиза — в 2800 раз, мозга — в 110 000 раз, надпочечников — в 135 000 раз	Дансил-фен-лей-арг	Co <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup>	ГПС, ГЭМС, мет-энкефалин-арг <sub>6</sub> , лей-энкефалин-арг <sub>6</sub> , ГПС, ГЭМС, АМПС, МГТК, Бромацетил-аргинин	5,4—5,8	[8, 49]
	Гипофиз быка	Дифференциальное центрифугирование и аффинная хроматография. Очистка фермента: растворимого — в 1400 раз, мембраносвязанного — в 2 000 раз	—	—	—	6,1	[52]
	Надпочечники быка	Центрифугирование в градиенте плотности сахарозы	<sup>125</sup> I-динорфин (1—13), Гипурил-арг, лей-энкефалин-арг <sub>6</sub>	Co <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , ЭДТА, п-ХМФС, МГТК, АМПС, ГПС, Бензилсукцинат, о-Фенантролин, Лейопептин, Картофельный ингибитор карбоксипептидазы, п-Хлормеркуробензоат	5,5	[16]
	Гипофиз крысы	Центрифугирование в градиенте плотности сахарозы	<sup>125</sup> I-мет-энкефалин-арг <sub>6</sub>	—	—	—	—
Тиоловая протеаза	Хромаффинные гранулы надпочечников	Центрифугирование в градиенте плотности сахарозы, фракционирование сульфатом аммония, гель-фильтрация	<sup>125</sup> I-пептид E	—	—	5,7	[51]
Трипсиноподобный фермент	Хромаффинные гранулы надпочечников быка	Фракционирование сульфатом аммония, аффинная хроматография, гель-фильтрация. Очистка в 1000 раз (мол. масса 20 кД)	Пептид E, Пептид F	—	Соевый ингибитор трипсина, бобовый ингибитор трипсина, динизопропилфторфосфат, апротинин	8,0	[29, 30, 31]

Примечание. п-ХМФС — п-хлормеркурибензилсульфонат; МГТК — 2-меркаптометил-3-гуанидиноэтилтрипропионовая кислота; АМПС — аминопропилмеркаптосукцинат; ГПС — гуанидинопропилсукцинат; ГЭМС — гуанидиноэтилмеркаптосукцинат.

стему, локализованную как в мозге, так и в периферических тканях организма. Функциональное значение этой системы определяется образованием физиологически активных пептидов различной величины и спектра действия. Следует подчеркнуть, что рассмотренные здесь ЭОФ, вероятно, обладают более широкой субстратной специфичностью, участвуя также в процессинге других белков и пептидов [33, 46]. Однако специфическая функция этих нейропептидаз как ЭОФ определяется наличием условий, при которых в определенных тканях и кле-

точных структурах одновременно присутствуют не только ферменты, но и соответствующие субстраты, а также другие факторы реализации энзиматического процесса.

В настоящий момент совершенно отсутствуют сведения относительно изменений активности энкефалинообразующей системы при патологии. Эти данные представляли бы несомненный интерес, поскольку активность ЭОФ определяет динамику образования энкефалинов, эндорфинов и других опиоидных пептидов в норме и при патологии.

# ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин И. П. — Журн. эволюц. биохим., 1982, № 1, с. 3—10.
2. Ерошкин М. Ю. — Успехи совр. биол., 1983, т. 95, № 1, с. 65—83.
3. Aono J., Takahashi M., Koida M. — Jap. J. Pharmacol., 1978, vol. 28, p. 930—932.
4. Chang T.-L., Gainer H., Russell J. T. et al. — Endocrinology, 1982, vol. 111, p. 1607—1614.
5. Comb M., Seeburg P. H., Adelman J. et al. — Nature, 1982, vol. 295, p. 663—666.
6. Cox B. M., Goldstein A., Li C. H. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1976, vol. 73, p. 1821—1823.
7. Fischli W., Goldstein A., Hunkapiller M. W. et al. — Ibid., 1982, vol. 79, p. 5435—5437.
8. Fricker L. D., Plummer T. H., Snyder S. H. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1983, vol. 111, p. 994—1000.
9. Fricker L. D., Snyder S. H. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1982, vol. 79, p. 3886—3890.
10. Fricker L. D., Snyder S. H. — J. biol. Chem., 1983, vol. 258, p. 10950—10955.
11. Fricker L. D., Supattapone S., Snyder S. H. — Life Sci., 1982, vol. 31, p. 1841—1844.
12. Goldstein A., Tachibana S., Lowney L. J. et al. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1979, vol. 76, p. 6666—6670.
13. Graf L., Kenessey A., Rersélei I. et al. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1977, vol. 78, p. 1114—1123.
14. Hirao T., Hara K., Takahashi K. — J. Biochem. (Tokyo), 1983, vol. 94, p. 2071—2074.
15. Höllt V. — Trends Neurosci., 1983, vol. 6, p. 24—26.
16. Mizuno K., Minamino N., Kangawa K. et al. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1980, vol. 97, p. 1283—1290.
17. Huang W.-Y., Chang R. C. C., Kastin A. J. et al. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1979, vol. 76, p. 6177—6180.
18. Hughes J., Smith T. W., Kosterlitz H. W. et al. — Nature, 1975, vol. 258, p. 577—579.
19. Jones B. N., Stern A. S., Lewis R. V. et al. — Arch. Biochem., 1980, vol. 204, p. 392—395.
20. Kakidani H., Furutani Y., Takahashi H. et al. — Nature, 1982, vol. 298, p. 245—249.
21. Kangawa K., Matsuo H., Igarashi M. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1979, vol. 86, p. 153—160.
22. Kilpatrick D. L., Jones B. N., Lewis R. V. et al. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1982, vol. 79, p. 3057—3061.
23. Kilpatrick D. L., Taniguchi T., Jones B. N. et al. — Ibid., 1981, vol. 78, p. 3265—3268.
24. Kilpatrick D. L., Wahlstrom A., Lahm H. W. et al. — Ibid., 1982, vol. 79, p. 6480—6483.
25. Kimura S., Lewis R. V., Stern A. S. et al. — Ibid., 1980, vol. 77, p. 1681—1685.
26. Knight M., Klee W. A. — J. biol. Chem., 1979, vol. 254, p. 10426—10430.
27. Koida M., Aono J., Takenaga K. et al. — J. Neurochem., 1979, vol. 33, p. 1233—1237.
28. Legon S., Glover D. M., Hughes J. et al. — Nucl. Acid Res., 1982, vol. 10, p. 7905—7918.
29. Lindberg I., Yang H.-Y. T., Costa E. — Life Sci., 1982, vol. 31, p. 1713—1716.
30. Lindberg I., Yang H.-Y. T., Costa E. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1982, vol. 106, p. 186—193.
31. Lindberg I., Yang H.-Y. T., Costa E. — J. Neurochem., 1984, vol. 42, p. 1411—1419.
32. Loh Y. P., Gainer H. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1982, vol. 79, p. 108—112.
33. Loh Y. P. et al. — Ann. Rev. Neurosci., 1984, vol. 7, p. 189—222.
34. Marks N., Benuck M., Berg M. J. — Life Sci., 1982, vol. 31, p. 1845—1848.
35. Micanovic R., Ray P., Krugger W. et al. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1984, vol. 118, p. 299—303.
36. Mizuno K., Minamino N., Kangawa K. et al. — Ibid., 1980, vol. 97, p. 1283—1290.
37. Nakanishi S., Inoue A., Kita T. et al. — Nature, 1979, vol. 278, p. 424—427.
38. Nakao K., Suda M., Sakamoto M. et al. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1983, vol. 117, p. 695—701.
39. Noda M., Teranishi Y., Takahashi H. et al. — Nature, 1982, vol. 297, p. 431—434.
40. Orlowski M., Wilk S. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1981, vol. 101, p. 814—822.
41. Pittius C. W., Seizinger B. R., Mehraein P. et al. — Life Sci., 1983, vol. 33, p. 41—44.
42. Rossier J., Audigier Y., Ling N. et al. — Nature, 1980, vol. 288, p. 88—90.
43. Schwartz J. Ch. — Trends Neurosci., 1983, vol. 6, p. 45—48.
44. Seizinger B. R., Grimm C., Höllt V. et al. — J. Neurochem., 1984, vol. 42, p. 447—457.
45. Slack G., Fricker L. D., Snyder S. H. — Life Sci., 1984, vol. 34, p. 113—122.
46. Steiner D. F., Docherty K., Carroll R. — J. Cell Biochem., 1984, vol. 24, p. 121—130.
47. Stern A. S., Jones B. N., Shively J. E. et al. — Proc. nat. Acad. Sci., 1981, vol. 78, p. 1962—1966.
48. Stern A. S., Lewis R. V., Kimura S. et al. — Ibid., 1979, vol. 76, p. 6680—6683.
49. Supattapone S., Fricker L. D., Snyder S. H. — J. Neurochem., 1984, vol. 42, p. 1017—1023.
50. Troy C. M., Musacchio J. M. — Soc. Neurosci., 1981, vol. 7, p. 91.
51. Troy C. M., Musacchio J. M. — Life Sci., 1982, vol. 31, p. 1817—1820.
52. Wallace E. F., Evans C. J., Jurik S. H. et al. — Ibid., p. 1793—1796.

Поступила 03.04.85

Р. Е. Лохов, Ю. Б. Цахилов, А. Г. Таранов

## ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ГИПОФИЗАРНО-ОВАРИАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ЖИВОТНЫХ К НЕГОРМОНАЛЬНОМУ ПРЕПАРАТУ RL-S

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

Для профилактики и лечения нарушений воспроизводительных функций человека и животных важное значение имеют разработка негормональных средств избирательного влияния на биосинтез и метаболизм половых гормонов, возможность регулирования воздействий гипофизарно-овариальной эндокринной системы на процессы восстановления воспроизводительных функций и состояние иммунной системы в период глубоких нейроэндокринных перестроек организма [2—5].

Хотя опасность гормональной терапии очевидна, в практике (особенно ветеринарной) гормоны применяют довольно часто, что чревато серьезными последствиями и для здоровья человека. Гормоны и оральные контрацептивы вызывают хромосомные аберрации [6] и аккумулируются в организме животных. При попадании в организм человека через продукты питания гормоны приводят к угнетению активности собственных желез внутренней секреции. В частности, снижение чувствительности гипофиза к ЛГ-РГ (рилизинг-фактор лютеинизирующего гормона) является причиной тяжелого функционального нарушения системы гипоталамус—гипофиз, что приводит к нарушению формирования нормального полового цикла [7, 8].

Настоящая работа посвящена исследованию влияния негормонального химического препарата RL-S на активацию функции лютеинизирующего гормона и, следовательно, гипоталамо-гипофизарной системы бесплодных коров.

### Методика

Исследования проводили на 10 коровах красной степной породы с дисфункциями яичников (гипер- и гиподисфункция, персистенция фолликулов, фолликулярные разновидности кисты, лютеинизация фолликулов без овуляции, кисты желтых тел и т. д.), отмечавшихся в течение 4—5 мес. Одновременно исследовали 10 животных контрольной группы, аналогичных по возрасту, массе и жирнотелотности продуктивности. С целью адаптации

за 2 мес до начала эксперимента животных поместили в одинаковые условия содержания и кормления.

Перед началом опыта у коров контрольной и опытной групп была взята кровь в количестве 10 мл из яремной вены для исследования содержания гормонов. Затем животным опытной группы в течение 4 дней внутривенно вводили исследуемый препарат RL-S в дозе 60 мг в 5 мл 0,9 % раствора NaCl на особь. В дальнейшем взятие крови у животных проводили через 7, 14 и 21 день после последнего введения препарата. Взятие крови для исследования проводили утром. Кровь центрифугировали при 3000 об/мин, отделяли плазму, которую хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ . При получении плазмы крови использовали гепарин.

Прогестерон и эстрадиол определяли радиоиммунологическим методом с выделением стероидов на колонках с целитом [1]. Определение содержания в плазме крови лютеинизирующего гормона проводили биологическим методом, основанным на определении содержания тестостерона, вырабатываемого клетками Лейдига семенников мышей в присутствии добавленного гонадотропина [9]. Определение содержания гормонов проводили в лаборатории экспериментальной эндокринологии Института экспериментальной патологии и терапии АМН СССР (Сухуми). Статистическую обработку результатов с использованием критерия Стьюдента осуществляли на ЭВМ Д-3-28 по специально разработанной программе. Препарат RL-S имеет простое химическое строение, относится к классу гетероароматических систем, синтезирован в лаборатории Северо-Осетинского университета. Он малотоксичен ( $\text{DL}_{50}$  для белых крыс 1000 мг на 100 г), хорошо растворим в воде и органических растворителях. Другие сведения о препарате приведены в работе [10].

### Результаты и обсуждение

Из данных по содержанию прогестерона и эстрадиола в плазме крови коров (рис. 1 и 2) косвенно следует, что животные до начала опыта находились на разных стадиях морфологической перестройки желтого тела. В частности, у 5 коров среднее содержание прогестерона составляло  $2,92 \pm 3,49$  нг/мл, что выше максимального ( $2,43 \pm 0,19$  нг/мл), достигаемого у здоровых животных в стадии «уравновешивания», т. е. на 10—12-й день после овуляции.

Содержание прогестерона у других 5 коров составляло в среднем  $0,34 \pm$

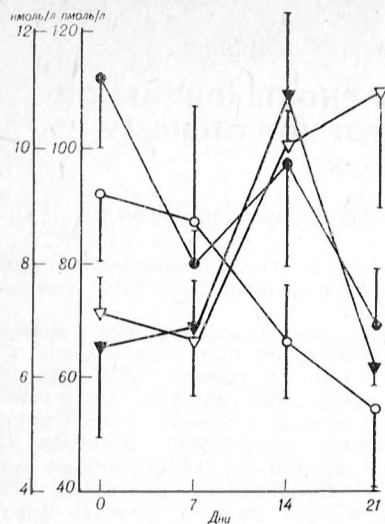


Рис. 1. Изменение содержания половых гормонов под влиянием RL-S в крови коров с гипофункцией желтого тела яичников.

Здесь и на рис. 2: по оси абсцисс — дни; по оси ординат: слева — прогестерон (в нмоль/л), справа — эстрадиол (в пмоль/л). Крестик — прогестерон, треугольник — эстрадиол. Темные фигуры — контрольная группа, светлые — опытная группа.

0,43 нг/мл; у здоровых коров 0,25—0,52 нг/мл. Поскольку животные в течение 90—150 дней после отела не проявляли признаков овариальной активности, можно заключить, что у исследуемых коров имели место гипо- и гиперфункции желтого тела яичников.

Максимальные значения содержания прогестерона у контрольных (3,76 и 0,28 нг/мл) и минимальные у подопытных животных (2,13 и 0,14 нг/мл) через 14 дней после эксперимента (см. рис. 1 и 2) свидетельствуют о том, что коровы находились в противоположных стадиях полового цикла.

Обнаружена интересная зависимость содержания эстрадиола в плазме крови от состояния животных. Уровень эстрадиола у подопытных ( $0,0296 \pm 0,0002$  нг/мл) и контрольных ( $0,0288 \pm 0,0003$  нг/мл) животных с гиперфункцией яичников через 14 дней после начала опыта был приблизительно одинаковым, а через 21 день эта величина более чем в 1,8 раза превышала ( $P < 0,0001$ ) контрольные величины.

Что касается животных с гипофункцией яичников, то концентрация эстрадиола у подопытных коров ( $0,0286 \pm 0,0006$  нг/мл) была в 1,3 раза выше

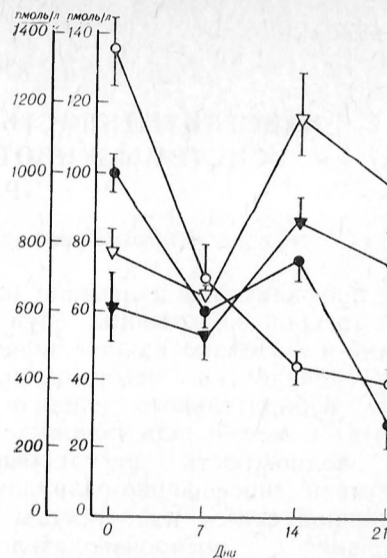


Рис. 2. Изменение содержания половых гормонов под влиянием RL-S в крови коров с гиперфункцией желтого тела яичников ( $M \pm m$ ) ( $n=5$ ).

( $P < 0,001$ ), чем у контрольных животных ( $0,0228 \pm 0,0016$  нг/мл).

Полагают [2], что увеличение содержания в крови прогестерона и одновременное уменьшение эстрадиола является закономерным процессом восстановления эндокринной функции гипопизарно-овариальной системы у коров после отела. По нашим данным, у подопытных коров с гипофункцией желтого тела яичников наиболее отчетливы различия в содержании прогестерона и эстрадиола на 21-й день эксперимента. У контрольных животных подобного явления не было обнаружено.

Важным подтверждением нормализации полового цикла под влиянием препарата RL-S является возрастание на 12,3 % ( $P < 0,001$ ) содержания ЛГ в крови у подопытных животных ( $42,0 \pm 0,7$  мЕД/мл) по сравнению с контролем ( $37,4 \pm 0,5$  мЕД/мл).

Таким образом, можно отметить определенную чувствительность гипопизарно-овариальной эндокринной системы бесплодных коров к гонадотропному воздействию негормонального препарата RL-S. Важно указать, что соединение RL-S нормализует функции собственных желез внутренней секреции и представляется перспективным для профилактики и лечения бесплодия и импотенции человека и животных.



1. Гончаров Н. П., Антоничев А. В., Кацця Г. В., Бутнев В. Ю. — *Вопр. мед. химии*, 1979, № 1, с. 92—97.
2. Горев Э. Л. — *Сельск.-хоз. биол.*, 1983, № 6, с. 114—119.
3. Лободин А. С. Влияние гонадотропина СЖК на функцию яичников и его применение для стимуляции воспроизводительной способности коров. Автореф. дис. канд. Воронеж, 1982.
4. Нежданов А. С. — *Сельск.-хоз. биол.*, 1983, № 7, с. 95—98.
5. Старкова Н. Т. Клиническая эндокринология. М., 1983, с. 230—261.
6. Сушков И. И., Сазонова Л. А. — В кн.: *Успехи современной генетики*. М., 1983, № 11, с. 93—132.
7. Arije G. R., Nillbank J. H., Hopwood M. L. — *J. Anim. Sci.*, 1974, vol. 39, p. 338—347.
8. Henricks D. M., Dickey J. F., Hill J. R. et al. — *Endocrinology*, 1972, vol. 90, p. 1336.
9. VanDamme M. P., Robertson P. M., Dicz-jalusy E. — *Acta endocr. (Kbh.)*, 1974, vol. 77, p. 655.

10. Lokhov R. E. — *Rejuvenation*, 1985, vol. 13, p. 14—36.

Поступила 02.04.85

# EFFECT OF THE PREPARATION RL-S ON THE HYPOPHYSIS-OVARIAN SYSTEM OF BARREN COWS

R. E. Lokhov, U. B. Tsakhilov, A. G. Taranov

North-Osetian State University, Ordzhonikidze

A hypophysis-ovarian system of barren cows was shown to be highly sensitive to the effect of the preparation RL-S. The preparation possessing a simple chemical structure, proved to regulate the functional activity of endocrine glands. After treatment with the preparation RL-S concentration of estradiol was increased 1.81-fold in blood plasma of cows studied as compared with controls, while content of luteinizing hormone was elevated by 12.3 %. In the groups of experimental animals the sexual cycle was normalized as content of progesterone was increased in blood with simultaneous decrease in estradiol concentration.

УДК 616.391:577.164.111]-008.64-092.9-07:616.36-008.931:577.152.1]-074

В. А. Денисенко, З. В. Горбач, Ю. М. Островский

## О РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ В<sub>1</sub>-НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Отдел регуляции обмена веществ АН БССР, Гродно

Основная функция пентозофосфатного пути (ПФП) в гепатоцитах заключается в обеспечении необходимого фонда пентозофосфатов для синтеза нуклеотидов, а также восстановленных эквивалентов в форме НАДФ·Н, используемых в анаболических реакциях (главным образом в синтезе жирных кислот). Важную роль в регуляции функционирования ПФП отводят глюкозо-6-фосфатдегидрогеназе (КФ 1.1.1.49, Г6ФД) — начальному ферменту в последовательности реакций цикла. Необратимость глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной реакции, вариабельность активности фермента при различных физиологических [4, 14] и патологических [5, 12] состояниях организма позволяют считать Г6ФД «ключевым» ферментом ПФП.

К числу факторов, определяющих интенсивность протекания глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной реакции в организме животного, относится обеспечение его витаминами. Так, при В<sub>1</sub>-недостаточности было обнаружено ингибирование не только тиаминадифос-

фатзависимых ферментов [3], но и дегидрогеназ окислительной ветви ПФП — Г6ФД и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (6ФГЛД) [2, 12]. Поскольку изменение активности «ключевого» фермента ПФП не может не отразиться на функционировании цикла в целом, исследование механизмов влияния В<sub>1</sub>-недостаточности на активность Г6ФД представляет интерес.

### Методика

В эксперименте использовали беспородных белых крыс-самцов массой 170—190 г, которых содержали на стандартном рационе вивария. Различной степени выраженности тиаминовую недостаточность у животных вызывали дозированным введением антивитамина В<sub>1</sub> окситиамина в течение 10 дней. Крыс разделили на 4 группы по 8 животных в каждой. Особям 2, 3 и 4-й групп вводили с 24-часовым интервалом окситиамин в разовой дозе 4, 40 и 100 мг на 1 кг массы соответственно. Особи 1-й группы (контроль) получали эквивалентные по объему инъекции физиологического раствора.

Крыс декапитировали, печень перфузировали 0,15 М KCl. Гомогенаты готовили на 10 мМ триэтаноламиновом буфере, pH 7,4 и центрифугировали в течение 1 ч при 30 000 g.

Частичная очистка Г6ФД включала фракционирование сульфатом аммония, хроматографию на КМ-целлюлозе и гидроксипатите. Осаждаемую сульфатом (30—55 % насыщения) фракцию растворяли в дистиллированной воде. Сульфат удаляли с помощью ацетата бария. Раствор после доведения pH до 5,5 0,1 М уксусной кислотой наносили на колонку (3×10 см) с КМ-целлюлозой СМ-52 ("Whatman", Англия). Промывание и элюцию проводили соответственно 0,2 и 0,3 М ацетатом аммония. Фракции, содержащие активность Г6ФД, объединяли и наносили на колонку с гидроксипатитом (3×1 см). Для получения препаратов Г6ФД использовали ступенчатую элюцию (0,2 и 0,3 М) калийфосфатным буфером, pH 6,0. Фракции с максимальной активностью фермента объединяли и концентрировали с помощью ультрафильтрации. Данная процедура позволяла достичь 50-кратной степени очистки. Препараты Г6ФД хранили в 20 % глицерине при —2 °С. В описанных условиях каталитическая активность фермента оставалась неизменной в течение многих месяцев. В полученных препаратах не обнаруживали активности 6ФГЛД и глюкозодегидрогеназы, присутствие которых могло бы осложнить проведение кинетических исследований с Г6ФД. Белок определяли методом Лоури [11] и спектрофотометрически по поглощению при 280 нм, принимая  $A_{280}^{0,1\%} = 1$ .

Активность Г6ФД и 6ФГЛД определяли спектрофотометрически по поглощению при 340 нм на спектрофотометре "Spescord UV-VIS" (ГДР) в системе, содержащей 0,15 М триэтаноламиновый буфер, pH 7,6, 20 мМ  $MgCl_2$ , 1 мМ НАДФ, а также 2,3 мМ глюкозо-6-фосфат (Г6Ф) и 2 мМ 6-фосфоглюконат или только 6-фосфоглюконат [7].

Кинетические характеристики Г6ФД определяли при 30 °С. Концентрацию Г6Ф варьировали в пределах 4—60 мкМ, НАДФ<sup>+</sup> — от 2 до 45 мкМ. Опыты по изучению термостабильности фермента проводили с помощью ультратермостата УТ-15. Полученные данные были подвергнуты статистической обработке [6]. В работе использовали препараты НАДФ<sup>+</sup>, НАДФ·Н, Г6Ф и 6-фосфоглюконата фирмы "Reanal" (Венгрия).

## Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены данные, характеризующие изменение активности

Таблица 1

Активность ферментов окислительной ветви ПФП (в нмоль НАДФ·Н на 1 мг белка в 1 мин) в гомогенатах печени контрольных и тиаминдефицитных крыс ( $M \pm m$ )

Группа животных	Активность	
	Г6ФД	6ФГЛД
1-я	$31,8 \pm 2,9$	$23,8 \pm 1,9$
2-я	$28,0 \pm 1,3$	$24,6 \pm 1,7$
3-я	$19,4 \pm 1,5$	$22,1 \pm 1,6$
4-я	$16,6 \pm 0,7$	$18,8 \pm 1,3$
	$p > 0,1$	$p > 0,1$
	$p < 0,01$	$p < 0,05$

ферментов окислительной ветви ПФП в печени крыс при дозированном введении животным окситиамина. Малые дозы антивитамина не вызывали достоверных изменений в активности дегидрогеназ. С увеличением разовой дозы до 40 мг/кг наблюдали угнетение активности Г6ФД на 39,0 %, тогда как скорость 6-фосфоглюконатдегидрогеназной реакции практически не изменялась. Последующее повышение количества вводимого препарата приводило к достоверному снижению активности Г6ФД и 6ФГЛД на 47,8 и 21,0 % соответственно. Такая динамика изменения скоростей реакций уже отмечалась [2], хотя ингибирование дегидрогеназ было менее выраженным.

Сведения об активности Г6ФД при развитии патологии нельзя, очевидно, непосредственно использовать при рассмотрении условий протекания данной реакции *in vivo*, поскольку активность фермента измеряли в условиях, близких к оптимальным. При этом устранялось влияние внутриклеточных метаболитов, осуществляющих «тонкий» контроль активности Г6ФД [7]. Тем

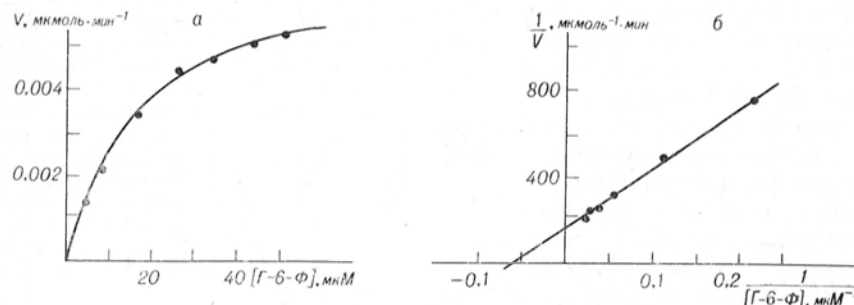


Рис. 1. Зависимость скорости глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной реакции от концентрации Г6Ф в прямых (а) и обратных (б) координатах для Г6ФД из печени крыс контрольной группы.

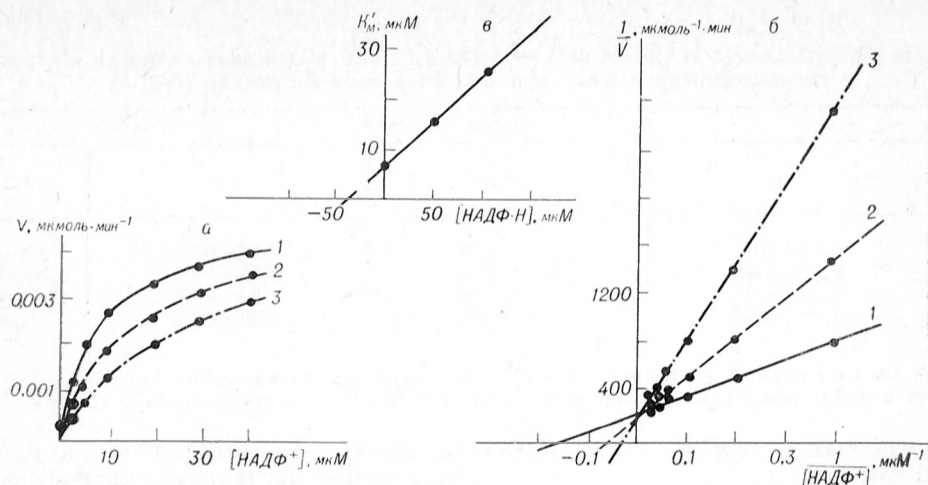


Рис. 2. Зависимость скорости глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной реакции от концентрации НАДФ в отсутствие (1) и в присутствии 54 мкМ (2) и 108 мкМ (3) НАДФ·Н для Г6ФД печени контрольных животных.  
а — прямые координаты; б — обратные координаты; в — расчет  $K_i$  для НАДФ·Н графическим способом.

не менее различия в определяемых показателях для контрольных и подопытных животных свидетельствуют о возможности снижения концентрации Г6ФД в цитозоле клеток печени, снижения молекулярной активности фермента в результате модификации белковых молекул или комбинации этих факторов.

Одним из подходов к установлению того, какая из указанных возможностей реализуется в действительности, является изучение кинетических параметров и физико-химических свойств Г6ФД.

Кривые зависимости начальной скорости реакции, катализируемой Г6ФД, выделенной из печени контрольных животных, от концентрации субстрата и кофактора имели гиперболическую форму (рис. 1, а и рис. 2, а). Величины  $K_m$ , полученные из графиков, построенных методом двойных обратных величин (см. рис. 1, б и рис. 2, б), составили  $18,5 \cdot 10^{-6}$  и  $5,6 \cdot 10^{-6}$  М соот-

ветственно. Найденные значения  $K_m$  близки к аналогичным характеристикам Г6ФД, полученным другими авторами [1, 9, 13, 19].

В живой клетке скорость глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной реакции в значительной мере зависит от соотношения восстановленной и окислительной форм НАДФ [7, 13, 19], поэтому взаимодействие фермента и НАДФ·Н представляется важным моментом при исследовании свойств Г6ФД.

В координатах Лайнуивера—Берка прямые, описывающие кинетику реакции в присутствии различных концентраций НАДФ·Н, пересекаются на оси ординат (см. рис. 2, б), что свидетельствует о конкурентном характере взаимодействия НАДФ·Н с активным центром фермента по отношению к НАДФ<sup>+</sup>. Константа ингибирования для фермента, изолированного из пече-

Таблица 2  
Кинетические характеристики Г6ФД из печени контрольных крыс и крыс с экспериментальной окситиаминовой  $V_1$ -недостаточностью

Кинетический параметр, мкМ	Группа животных			
	1-я	2-я	3-я	4-я
$K_m$ для НАДФ	5,6	5,8	5,8	5,7
$K_m$ для Г6Ф	18,5	18,5	18,9	19,2
$K_i$ для НАДФ·Н	32,0	30,0	32,0	32,0

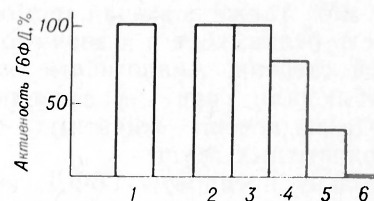


Рис. 3. Изменение (в %) активности Г6ФД из печени крыс контрольной группы при контролируемом нагревании.

1 — контроль (без нагревания, 100 %); 2, 3, 4, 5, 6 — нагревание в течение 5 мин при 30, 40, 50, 55 и 60 °С соответственно.



Активность Г6ФД (в мкмоль НАДФ·Н на 1 мг белка в 1 мин), выделенной из печени контрольных и тиаминдефицитных крыс, при контролируемом нагревании ( $M \pm m$ )

Условия опытов	Группа животных			
	1-я	2-я	3-я	4-я
I	2,69 $\pm$ 0,07	1,02 $\pm$ 0,06	0,67 $\pm$ 0,03	1,28 $\pm$ 0,04
II	0,80 $\pm$ 0,08	0,28 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,02	0,45 $\pm$ 0,06
III	2,42 $\pm$ 0,03	0,91 $\pm$ 0,09	0,59 $\pm$ 0,04	1,15 $\pm$ 0,08
IV	1,41 $\pm$ 0,07	0,51 $\pm$ 0,00	0,36 $\pm$ 0,03	0,71 $\pm$ 0,02

Примечание. I — контроль, II—IV — нагревание в течение 5 мин при 55 °С, II — без субстрата и кофактора, III — в присутствии 1 мМ НАДФ, IV — в присутствии 2 мМ Г6Ф.

ни интактных особей, составила  $32,0 \cdot 10^{-6}$  М.

Для Г6ФД из печени подопытных животных определяли аналогичные характеристики, что позволило их сопоставить. Характер кинетических кривых, а также величины кинетических параметров (табл. 2) практически не отличаются для Г6ФД из печени контрольных и тиаминдефицитных крыс.

Известно, что термостабильность ферментов зависит от конформации их белкового компонента. Предварительные исследования, проведенные на препаратах Г6ФД из печени интактных крыс, показали (рис. 3), что прогревание в течение 5 мин в интервале температур 50—60 °С вызывало инактивацию фермента. В табл. 3 показано изменение активности ферментных препаратов из печени контрольных и подопытных животных при прогревании в течение 5 мин при 55 °С, а также зависимость термостабильности Г6ФД от наличия субстрата или кофактора. Содержание белка во всех исследуемых образцах составляло 0,4 мг/мл. Прогревание препаратов Г6ФД из печени контрольных животных приводило к снижению активности на 70,3 %. НАДФ<sup>+</sup> (1 мМ) оказывал сильное стабилизирующее воздействие на Г6ФД. Г6Ф (1 мМ) также повышал термостабильность белка, хотя и в значительно меньшей степени. Аналогичные явления наблюдали при исследованиях фермента из печени животных всех трех подопытных групп.

Поскольку препараты Г6ФД, выделенные как из печени контрольных, так и подопытных животных, не отличались по сродству к субстрату, кофактору, по чувствительности к ингибитору и тепловому воздействию, можно с большой степенью уверенности ут-

верждать, что метаболические сдвиги, вызванные введением антивитамина, не приводят к модификации молекул фермента.

В литературе имеются данные о важной регуляторной роли механизмов, контролирующих увеличение [1, 5, 10, 14, 16—18, 20] или уменьшение [1, 15] содержания Г6ФД в клетках печени.

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что наблюдаемое при В<sub>1</sub>-недостаточности снижение активности Г6ФД также связано с уменьшением концентрации активного белка в цитозоле, что обусловлено нарушением процессов синтеза и(или) деградации фермента.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградов В. В., Струмило С. А. — *Вопр. мед. химии*, 1980, № 2, с. 169—174.
2. Горбач З. В., Островский Ю. М., Маглыш С. С., Бородинский А. Н. — Там же, 1980, № 5, с. 608—611.
3. Островский Ю. М. — В кн.: *Экспериментальная витаминология*. Минск, 1979, с. 176—223.
4. Панин Л. Е., Третьякова Т. А., Русских Г. С., Войцековская Е. Э. — *Вопр. мед. химии*, 1982, № 2, с. 26—30.
5. Парфенова Н. С., Шаныгина И. Г. — Там же, 1976, № 6, с. 808—812.
6. Рокицкий П. Ф. *Основы вариационной статистики для биологов*. Минск, 1961.
7. Eggleston L. V., Krebs H. A. — *Biochem. J.*, 1974, vol. 138, p. 425—435.
8. Glock G. E., Mclean P. — *Ibid.*, 1953, vol. 55, p. 400—408.
9. Hori S. H., Sado J. — *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ.*, 1974, vol. 19, p. 515—529.
10. Liao T. H., Szepesi B. — *J. Nutr.*, 1980, vol. 110, p. 2390—2395.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. — *J. biol. Chem.*, 1951, vol. 193, p. 265—275.
12. McCandless D. W., Cassidy C. E., Curley A. D. — *Biochem. Med.* 1975, vol. 14, p. 834—839.
13. Oka K.-J., Takahashi T., Hori S. H. — *Bio-*

- chim. biophys. Acta, 1981, vol. 662, p. 318—325.
14. Peavy D. E., Hansen R. J. — Ibid., 1979, vol. 586, p. 22—30.
  15. Rudack G. D., Hollen D. — J. biol. Chem., 1975, vol. 250, p. 3960—3965.
  16. Selmecki L. E., Weber G. — FEBS Lett., 1976, vol. 61, p. 63—67.
  17. Simenez M. S., Johnson B. C. — J. Nutr., 1981, vol. 111, p. 260—265.
  18. Sun J. D., Hollen D. — J. biol. Chem., 1978, vol. 253, p. 6832—6836.
  19. Thompson R. E., Spivey H. O., Katz A. J. — Biochemistry (Wash.), 1976, vol. 15, p. 862—867.
  20. Weber G., Convery H., Hird J. — Life Sci., 1966, vol. 5, p. 1139—1146.

Поступила 26.01.85

# REGULATION OF GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE ACTIVITY IN RAT LIVER TISSUE IN VITAMIN B<sub>1</sub> DEFICIENCY

V. A. Denisenko, Z. V. Gorbach,  
Yu. M. Oslovsky

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

Kinetic patterns and thermostability of glucose-6-phosphate dehydrogenase, isolated from liver tissue of intact and thiamine-deficient rats, were analyzed. Distinct alterations were not found in the patterns studied. The data obtained suggest that a decrease in the enzymatic activity, observed after administration of oxythiamine into rats, occurred due to lowering in content of the protein active form.

УДК 616.36-002-092.9-07:[616.36-008.939.53+616.36-008.922.1:616-008.939.633.2

К. Т. Алматов, Д. Т. Мурталипов, Г. М. Касимова, А. Абидов

## ИЗМЕРЕНИЕ ФОСФОЛИПИДНОГО СОСТАВА И ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ ПРИ ГЕПАТИТЕ

НИИ красной медицины Минздрава Узбекской ССР, Ташкент

Известно, что основная функция биологических мембран состоит в обеспечении структурной организации клеток и внутриклеточных органелл и поддержании постоянства физико-химических характеристик цитозоля. Фосфолипиды мембран образуют гидрофобную «жидкую» матрицу (с которой могут связываться функциональные белки) и играют важную роль в регуляции свойств мембран [1, 23].

При гепатите нарушается структура и функция клеток печени, причем наиболее глубокие изменения отмечаются в митохондриях [1—3, 10, 11, 15, 17, 18]. В связи с этим представляет интерес изучение при этой патологии фосфолипидного состава мембран митохондрий, а также состояния связанных с ними процессов дыхания и окислительного фосфорилирования [12, 16]. Для этой цели были использованы две модели гепатита: гелиотринный, при котором отмечается преимущественно явление белковой дистрофии, и вызванный отравлением  $\text{CCl}_4$ , приводящий к жировой дистрофии [1].

### Методика

Эксперименты проведены на белых крысах-самцах массой тела 160—180 г, содержащихся на стандартном рационе вивария. Экспериментальную модель хронического ге-

патита воспроизводили на животных, затравленных гелиотрином или  $\text{CCl}_4$  [1].

Выделение митохондрий из ткани печени и определение их функциональных параметров проводили по ранее описанной методике [13]. Белок определяли по Лоури [22].

Фосфолипиды митохондрий экстрагировали по методу Кейтса [7]. Индивидуальные фосфолипиды фракционировали методом проточной горизонтальной хроматографии в модификации А. В. Карганолова [6]. Количественное содержание отдельных фракций определяли с помощью денситометра [6], липидный фосфор — по методике, описанной ранее [24].

### Результаты и обсуждение

В табл. 1 приведены результаты измерения дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий печени при гепатите. Как видно, при гепатите, вызванном  $\text{CCl}_4$ , заметно повышается дыхание митохондрий в состоянии 4 без существенных изменений дыхания в фосфорилирующем состоянии, в результате чего снижаются параметры окислительного фосфорилирования. При гелиотринном гепатите наблюдается снижение скорости фосфорилирующего окисления и усиление дыхания в метаболическом состоянии 4. Это приводит к снижению величины дыхательного контроля (ДК) и коэффициента АДФ/О. В опытах с сукупинатом дыхание митохондрий в состоянии 4 практически не изменяется,

Дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий печени при гепатите ( $M \pm m$ )

Субстрат окисления (10 мМ)	Показатель	Скорость дыхания, ппотом кислорода на 1 мг белка в 1 мин		
		контроль	гепатит	
			CCl <sub>4</sub>	гелиотрин
Глутамат	Состояние 3	45±2	44±4	38±24*
	» 4	12±1	22±1*	17±14*
	ДК	3,7±0,07	2,0±0,12*	2,2±0,10*
Сукцинат	АДФ/О	2,8±0,06	2,0±0,10*	2,3±0,09*
	Состояние 3	108±4	100±7	95±3***
	» 4	35±3	50±4**	35±3
	ДК	3,0±0,09	2,0±0,08*	2,7±0,08***
	АДФ/О	1,8±0,09	1,3±0,07*	1,6±0,03**

П р и м е ч а н и е. Состав среды инкубации: 0,25 М сахараза, 10 мМ КСl, 5 мМ КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, 5 мМ трис-буфер рН 7,4. АДФ по 150 мкМ. Одна звездочка  $P < 0,001$  по сравнению с контролем, две —  $P < 0,01$ , три —  $P < 0,02$ , четыре —  $P < 0,05$ .

а скорость дыхания в состоянии 3 имеет тенденцию к снижению. Вследствие этого параметры окислительного фосфорилирования уменьшаются, но не в такой степени, как при использовании в качестве субстрата окисления глутамата. Сравнение полученных результатов показывает, что нарушение сопряженности дыхания с фосфорилированием в митохондриях печени наиболее заметно при гепатите, вызванном CCl<sub>4</sub>. Так, если коэффициент АДФ/О при гелиотринном гепатите с глутаматом и сукцинатом в качестве субстратов окисления снижен на 18 и 12 %, то при гепатите, вызванном CCl<sub>4</sub>, на 29 и 28 % соответственно.

Фосфолипидный состав мембран митохондрий печени при CCl<sub>4</sub>-гепатите также изменяется в большей степени, чем при гелиотринном гепатите (табл. 2). При CCl<sub>4</sub>-гепатите нарушение энергообразующей функции митохондрий печени сопровождается снижением содержания в мембранах кардиолипина, который является обязательным компонентом сопрягающих мембран митохондрий [21], тогда как при гелиотринном гепатите его содержание в митохондриях печени достоверно не изменяется. При гелиотринном гепатите в митохондриях печени содержание фосфатидилхолина повышается. При CCl<sub>4</sub>-гепатите отмечено повышение содержания фосфатидилэтаноламина в митохондриях печени. Наблюдаемые изменения, по-видимому, являются прямым следствием энзиматических реакций метилирования и декарбоксилирования, протекающих

в ткани печени [19]. Можно допустить, что при гелиотринном гепатите в клетках печени ускоряется превращение фосфатидилэтаноламина в фосфатидилхолин (реакция метилирования), а при CCl<sub>4</sub>-гепатите — декарбоксилирования, т. е. превращение фосфатидилсерина в фосфатидилэтаноламин. При гелиотринном гепатите в митохондриях печени содержание сфингомиелина повышается, а при CCl<sub>4</sub>-гепатите — уменьшается. Содержание лизофосфатидилхолина существенно возрастает (в 3,7 раза) при CCl<sub>4</sub>-гепатите и мало изменяется при гелиотринном поражении печени.

Выявленные различия в характере изменений содержания фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, сфингомиелина, кардиолипина и лизофосфатидилхолина, вероятно, связаны со спецификой поражения клеток печени при воздействии CCl<sub>4</sub> и гелиотрина. В то же время изменение содержания других фосфолипидов и соответствующих лизосоединений в мембранах митохондрий печени не зависит от природы гепатотропного агента. Так, при гепатите обоих типов содержание фосфатидилинозита уменьшается, особенно при CCl<sub>4</sub>-гепатите. Этот факт коррелирует со снижением АТФ-синтезирующей функции митохондрий печени в этих условиях.

Одним из интересных аспектов физиологической роли обмена фосфатидилинозитов представляется их участие в трансформации энергии в клетке [8, 9]. Среди фосфатидилинозитов трифосфоинозитид может выполнять



Фосфолипидный состав митохондрий печени при гепатите (в % от общего количества фосфолипидов) ( $M \pm m$ )

Фосфолипиды	Контроль	CCl <sub>4</sub>	P	Гелиотрин	P
Фосфатидилхолин	32,67 ± 1,42	29,54 ± 1,38	> 0,1	36,69 ± 1,16	< 0,05
Фосфатидилэтаноламин	25,44 ± 0,68	29,21 ± 1,34	< 0,05	23,03 ± 1,21	> 0,2
Кардиолипин	16,80 ± 0,74	11,81 ± 0,48	< 0,001	14,90 ± 0,89	> 0,1
Фосфатидилинозит	1,82 ± 0,12	1,30 ± 0,11	< 0,01	1,41 ± 0,12	< 0,05
Сфингомиелин	4,30 ± 0,28	3,41 ± 0,22	< 0,02	5,34 ± 0,16	< 0,01
Фосфатидилсерин	2,31 ± 0,27	1,89 ± 0,18	> 0,2	2,63 ± 0,13	> 0,2
Фосфатидная кислота	1,29 ± 0,18	3,22 ± 0,20	< 0,001	2,31 ± 0,12	< 0,001
Лизофосфатидилхолин	2,00 ± 0,30	7,29 ± 0,44	< 0,001	1,50 ± 0,18	< 0,2
Лизофосфатидилэтаноламин	10,82 ± 0,47	7,30 ± 0,10	< 0,001	8,38 ± 0,18	< 0,001
Лизокардиолипин	1,10 ± 0,10	1,42 ± 0,09	< 0,05	1,81 ± 0,22	< 0,01
Лизофосфатидная кислота	1,89 ± 0,19	3,33 ± 0,11	< 0,001	2,63 ± 0,21	< 0,02

функции как посредника в использовании энергии АТФ, так и предшественника синтеза АТФ. По нашему мнению, гипотетический фактор хемиоосмотического сопряжения, фосфолипидную природу которого предположил В. П. Скулачев [16], следует искать среди фосфатидилинозитов. Ранее было показано [25], что частично восстановить АТФ-зависимую сократительную способность митохондрий после нарушения их липидного состава удалось только добавлением монофосфоинозитида (фосфатидилинозитида).

При гепатите в митохондриях печени заметно повышается содержание фосфатидной кислоты, особенно при CCl<sub>4</sub>-гепатите, что, по-видимому, связано с повышением активности фосфолипазы D [14]. При гепатите обоих типов содержание лизофосфолипидов изменяется по-разному. На фоне снижения содержания лизофосфатидилэтаноламинов уровень лизокардиолипинов и лизофосфатидной кислоты заметно возрастает. Установлено, что лизокардиолипин наряду с другими лизоформами фосфолипидов играет существенную роль в транспорте ионов калия через митохондриальную мембрану [5]. Накопление избытка лизоформ фосфолипидов в мембране митохондрий при гепатите свидетельствует о глубоком нарушении структуры биологических мембран [20].

Соотношение фосфатидилхолин/фосфатидилэтаноламин, играющее важную роль в сохранении целостности мембранных структур, при CCl<sub>4</sub>-гепатите увеличивается, а при гелиотринном гепатите уменьшается на 30 %. Обнаружены также изменения в соот-

ношении диацильных форм фосфолипидов и их лизопроизводных. При гепатите коэффициент кардиолипин/лизокардиолипин возрастает в 1,8 раза и не зависит от вида гепатита. В то же время соотношение фосфатидилэтаноламин/лизофосфатидилэтаноламин уменьшается примерно на 20—40 %. Величина соотношения фосфатидилхолин/лизофосфатидилхолин в значительной мере зависит от вида гепатита. Так если при CCl<sub>4</sub>-гепатите этот показатель уменьшается на 40 %, то при гелиотринном — повышается в 4,2 раза. Следовательно, разные модели гепатита характеризуются специфическими для каждой формы фосфолипидов изменениями соотношения лизо- и диацильных форм.

Анализируя полученные результаты, можно заключить, что при гепатите подавление эффективности окислительного фосфорилирования митохондрий печени сопровождается нарушением соотношений фосфолипидов и гидролизом фосфатидилинозида. При этом образуются лизосоединения, которые способствуют нарушению структурной целостности митохондриальной мембраны. Наблюдаемые при гепатите изменения фосфолипидного состава мембран митохондрий могут быть обусловлены нарушением восполнения фосфолипидного компонента мембран, разрушением фосфолипидов и их лизосоединений под влиянием фосфолипаз, лизофосфолипаз и автолиза. Причем наиболее глубокие изменения фосфолипидного спектра в митохондриях печени отмечаются при CCl<sub>4</sub>-гепатите, что сочетается и с более выраженными нарушениями окислительного фосфо-

рилирования. В связи с этим можно полагать, что изменение содержания индивидуальных фосфолипидов и их лизосоединений в митохондриях печени при гепатите может являться существенным фактором, отражающим нарушения параметров дыхания и окислительного фосфорилирования.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Абдуллаев Н. Х., Каримов Х. Н. — В кн.: Механизмы патологических процессов. Ташкент, 1976, вып. 1, с. 18—23.
2. Агзамов Х., Ахмеров Р. Н., Алматов К. Т., Гулямов Т. Д. — Мед. журн. Узбекистана, 1978, № 9, с. 43—46.
3. Алматов К. Т., Рахимов М. М. — Вопр. мед. химии, 1978, № 6, с. 740—747.
4. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М., 1980.
5. Евтодченко Ю. В., Медведов Б. И., Кудзина Л. Ю. и др. — Докл. АН СССР, 1977, т. 233, № 4, с. 708—711.
6. Каргаполов А. В. — Биохимия, 1981, № 4, с. 691—697.
7. Кейтс М. Техника липидологии. Пер. с англ. М., 1975, с. 74—77.
8. Киселев Г. В., Павлинова Л. И., Четвериков Р. А. — Докл. АН СССР, 1976, т. 226, с. 1455—1458.
9. Киселев Г. В. — Там же, 1977, т. 234, с. 475—478.
10. Ляхович В. В., Долгов А. Ю., Мишин В. М., Цырлов И. Б. — Фармакол. и токсикол., 1972, № 2, с. 243—247.
11. Манкус Т. Г. Экспериментальный гепатит и цирроз печени. Вопросы патогенеза и коррекции печеночного кровообращения. Дис. докт. мед. наук. Ташкент, 1974.
12. Микельсаар Х., Северин И. И., Скулачев В. П. — Успехи совр. биол., 1974, т. 78, № 3 (6), с. 348—370.
13. Рахимов М. М., Алматов К. Т. — Биохимия, 1977, т. 42, с. 1852—1863.
14. Рахимов М. М. — В кн.: Биологические мембраны. Структура и функция. Ташкент, 1983, с. 106.
15. Ротенберг Ю. С., Сербиновская Н. А. — В кн.: Митохондрии. Регуляция процессов окисления и сопряжения. М., 1974, с. 164—167.
16. Скулачев В. П. Трансформация энергии в биомембранах. М., 1972.
17. Туракулов Я. Х., Назырова В. Е., Баши-

рова Н. С. — Докл. АН УзССР, 1972, № 10, с. 38—39.

18. Юлдашева Л. Н., Султанов Р. Г. — Вопр. мед. химии, 1983, № 1, с. 81—85.
19. Beresial G. — Ann. Nutr. Alim., 1980, vol. 34, p. 241—254.
20. Hunter D. R., Komai N., Haworth R. A. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1974, vol. 56, p. 647—653.
21. Krebs J. J. R., Hayser H., Carafoli E. — J. biol. Chem., 1979, vol. 254, p. 5308—5317.
22. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. — J. biol. Chem., 1951, vol. 193, p. 265—275.
23. Prongle M. J., Chapman D. — Biochem. Soc. Trans., 1980, vol. 8, p. 686—688.
24. Vaskovsky V. E., Kocetelsky E. Y., Vasendin I. M. — J. Chromatogr., 1975, vol. 114, p. 129—141.
25. Vignais P. M., Vignais P. V., Lehninger A. L. — J. biol. Chem., 1964, vol. 239, p. 2011—2021.

Поступила 03.03.85

#### PHOSPHOLIPID COMPOSITION AND OXIDATIVE PHOSPHORYLATION IN LIVER MITOCHONDRIA IN HEPATITIS

K. T. Almatov, D. T. Mirtalipov, G. M. Kasy-mova, A. A. Abidov

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

Phospholipid composition and oxidative phosphorylation were studied in liver mitochondria of rats with experimental chronic hepatitis. The hepatitis was simulated by means of two hepatotropic drugs — heliotrin and  $\text{CCl}_4$ . Content of phosphatidyl inositol was decreased and that of phosphatidic acid — increased in the hepatitis independently of the nature of the agent inducing the disease. At the same time, content of lysophosphatidyl ethanolamine was decreased but content of lysocardioline and lysophosphatidic acid was increased. In  $\text{CCl}_4$ -induced hepatitis content of cardiolipine and sphingomyelin was decreased, whereas after the treatment with heliotrin content of cardiolipine in liver tissue was unaltered and that of sphingomyelin was increased. Content of lysophosphatidyl choline was considerably increased in  $\text{CCl}_4$ -hepatitis but it was only slightly altered after the treatment with heliotrin. The most pronounced alterations in the phospholipid spectrum and oxidative phosphorylation were found in liver mitochondria in the  $\text{CCl}_4$ -induced hepatitis.

Е. Ю. Глинка, Н. Ф. Беляева, К. Н. Быковская, З. С. Каган

# НЕКОТОРЫЕ РЕГУЛЯТОРНЫЕ СВОЙСТВА ФРУКТОЗО-1,6-БИСФОСФАТАЗЫ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ В НОРМЕ И ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ АУТОИММУННОЙ КАРДИОМИОПАТИИ

НИИ по биологическим испытаниям химических соединений, Кулава, Московская область

Фруктозо-1,6-бисфосфатаза (КФ 3.1.3.11) катализирует одну из необратимых стадий гликолизогенеза. Активность этого аллостерического фермента регулируется рядом внутриклеточных метаболитов, в том числе ионами металла, субстратом и АМФ. Чувствительность фермента к аллостерическому ингибитору — АМФ зависит в свою очередь от природы активирующего двухвалентного катиона ( $Mg^{2+}$  или  $Mn^{2+}$ ) [10, 19], а также от присутствия в ферменте прочно связанного (структурного)  $Zn^{2+}$ . Принято считать, что структурный  $Zn^{2+}$  вызывает снижение активности фруктозо-1,6-бисфосфатазы и существенно повышает чувствительность фермента к ингибированию АМФ [17]. Добавление в среду для определения активности фруктозо-1,6-бисфосфатазы комплексообразующих агентов и вызванная этим активация фермента обычно рассматриваются как освобождение его от  $Zn^{2+}$  [17, 18]. Активация фруктозо-1,6-бисфосфатазы гистидином, концентрация которого возрастает в печени голодных животных, играет существенную роль в регуляции гликолизогенеза [14, 17, 18].

В литературе имеются данные [1, 2, 7] о нарушении обмена гликогена в миокарде человека и животных при кардиомиопатиях. Обнаружено также, что содержание гликогена в печени голодных крыс с экспериментальной аутоиммунной кардиомиопатией существенно выше, чем у здоровых животных. В связи с этим представляло интерес сравнить некоторые свойства фруктозо-1,6-бисфосфатазы в норме и при экспериментальной кардиомиопатии. В задачу настоящей работы входило сравнение активностей этого фермента в печени крысы в норме и при экспериментальной аутоиммунной кардиомиопатии, а также исследование регуляции активности фермента аллостерическим ингибитором — АМФ.

## Методика

В работе были использованы крысы-самцы гибридной линии ВистарХАвгуст, голодавшие в течение 17—18 ч, и те же крысы с экспериментальной аутоиммунной кардиомиопатией, которую вызывали путем иммунизации животных смесью убитого  $\beta$ -гемолитического стрептококка и растворимой фракции сердечной мышцы крысы [8]. У крыс-гибридов кардиомиопатия развивалась в 98 % случаев.

Ферментный препарат фруктозо-1,6-бисфосфатазы получали из печени индивидуального животного следующим образом. Печень, замороженную при  $-79^{\circ}C$ , измельчали и гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера с тefлоновым пестиком в 0,25 М сахарозе, содержащей 0,03 М трис-НСl pH 7,8, и центрифугировали при 85 000 g в течение 90 мин. Белки растворимой фракции осаждали  $(NH_4)_2SO_4$  в интервалс от 35 до 50 % насыщения и полученный осадок, растворенный в 0,05 М трис-НСl-буфере pH 7,3, использовали в качестве ферментного препарата. На этой стадии очистки фермент мог длительное время храниться при  $-18^{\circ}C$  без изменения кинетических и регуляторных свойств. Кроме того, в ряде экспериментов использовали растворимую фракцию печени крыс, полученную, как указано выше.

Активность фруктозо-1,6-бисфосфатазы определяли по восстановлению НАДФ<sup>+</sup> в системе, сопряженной с глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой и фосфогексоизомеразой. Стандартная инкубационная смесь объемом 3 мл включала в себя 50 мМ трис-НСl pH 7,3, различные концентрации  $MgCl_2$  и ЭДТА, 0,1 мМ НАДФ<sup>+</sup>, избыток сопрягающих ферментов и 0,01 мл ферментного препарата, содержащего около 0,1 ед. фермента. Смесью инкубировали 6 мин при  $30^{\circ}C$  (кроме экспериментов, представленных на рис. 1) и реакцию начинали добавлением фруктозо-1,6-дифосфата в конечной концентрации 70 мкМ. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующего образование 1 мкмоль фруктозо-6-фосфата в 1 мин.

Концентрацию АМФ, используемого в качестве аллостерического ингибитора, определяли по поглощению при 259 нм, пользуясь молярным коэффициентом экстинкции  $\epsilon = 15\,300\ M^{-1}\ cm^{-1}$ .

Фосфогексоизомеразу получали из мышц кролика, модифицируя метод Филлиса и соавт. [15]. Белок устанавливали спектрофотометрически по методу Гровес и соавт. [9].

В работе использовали глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу фирмы «Fluca» (Швейцария), НАДФ<sup>+</sup> и АМФ фирмы «Reanal» (ВНР), сефадекс G-50 «Pharmacia» (Швеция). Фруктозо-1,6-дифосфат, монокальциевую соль



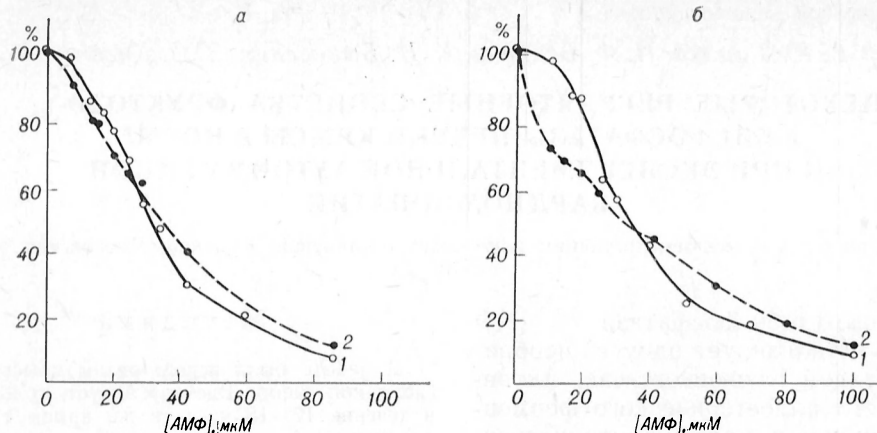


Рис. 1. Ингибирование АМФ фруктозо-1,6-бисфосфатазы из печени контрольных животных (а) и крыс с экспериментальной аутоиммунной кардиомиопатией (б). Реакционная смесь содержала 3 мМ  $MgCl_2$  и 0,1 мМ ЭДТА. 1 — растворимая фракция печени; 2 — та же фракция после хроматографии на сефадексе G-50. Величины коэффициентов Хилла ( $n_H$ ) на рис. а: 1 —  $n_H=2,5$ , 2 —  $n_H=1,8$ ; на рис. б: — 1 —  $n_H=2,6$ . По оси ординат указана относительная активность фруктозо-1,6-бисфосфатазы (в %).

(«Reanal», ВНР) переводили в калиевую соль, используя Дауэкс-50 (100—200 меш) фирмы «Serva» (ФРГ).

### Результаты и обсуждение

Как видно из таблицы, активность фруктозо-1,6-бисфосфатазы в печени крыс с экспериментальной кардиомиопатией в расчете на 1 г ткани и удельная активность фермента повышались по сравнению с таковой у контрольных животных. Следует отметить, что после гель-фильтрации растворимой фракции печени крысы на колонке с сефадексом G-50 удельная активность фермента из печени больных животных снижалась в 1,5—2 раза и приближалась к активности фермента в норме, которая после хроматографии несколько повышалась.

Сравнение зависимости относительной активности  $V_i/V_0$  от концентрации аллостерического ингибитора — АМФ  $[I]_0$  для фруктозо-1,6-бисфосфатазы в растворимой фракции печени контрольных животных (см. рис. 1, а) и крыс с кардиомиопатией (см. рис. 1, б) показало, что обе зависимости имеют S-образный вид с одинаковыми величинами  $[I]_{0,5}=32$  мкМ и высокой кооперативностью (значения коэффициентов кооперативности Хилла,  $n_H$  составляли 2,5 и 2,6 соответственно). Следует отметить, что во всех исследованных условиях можно было полностью подавить активность фермента при достаточном увеличении концентрации АМФ, что дает возможность

пользоваться обычной формой уравнения Хилла и рассчитывать величины  $[I]_{0,5}$ , не прибегая к вычитанию остаточной активности. В то же время зависимость  $V_i/V_0$  от  $[I]_0$ , полученная с использованием растворимой фракции из печени здоровых животных, пропущенной через сефадекс G-50, имела вид S-образной кривой с меньшей кооперативностью ( $n_H=1,8$ ), а при патологии на этой кинетической кривой выявлялось промежуточное плато (см. рис. 1, б; кривая 2).

Для выяснения причин, приводящих к изменению формы кривой зависимости  $V_i/V_0$  от  $[I]_0$ , исследовали влияние различных концентраций  $Mg^{2+}$  и

Активность фруктозо-1,6-бисфосфатазы в печени крысы в норме и при экспериментальной аутоиммунной кардиомиопатии

Материал	№ животного	Активность, ед. на 1 г ткани	Белок, мг на 1 г ткани	Удельная активность, ед./мг белка	
				растворимая фракция	элюат с сефадекса
Норма	1	6,2	205	0,030	0,038
	2	8,3	215	0,038	0,043
	3	7,1	210	0,034	0,039
Экспериментальная кардиомиопатия	1	10,4	158	0,066	0,034
	2	9,9	160	0,062	0,042
	3	10,4	160	0,065	0,040

Примечание. Активность фермента определяли в присутствии 3 мМ  $MgCl_2$  и 0,1 мМ ЭДТА.

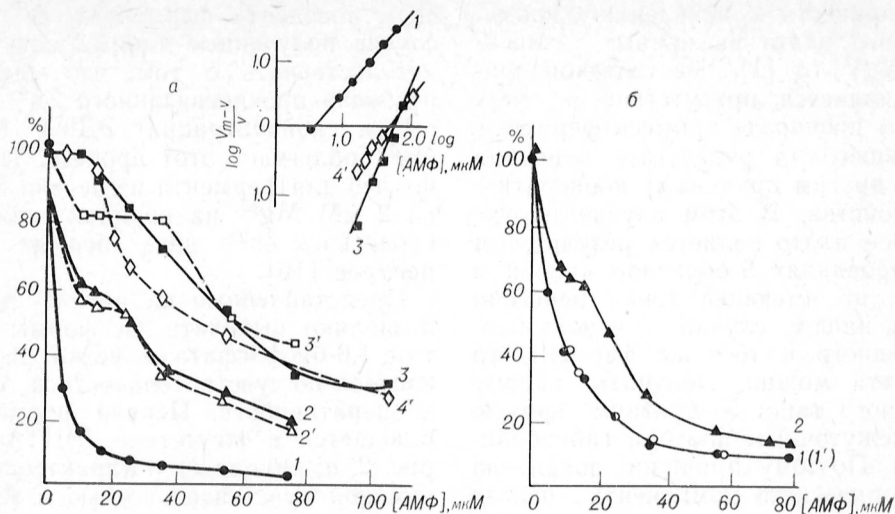


Рис. 2. Влияние различных концентраций ЭДТА (а) и  $Mg^{2+}$  (б) на ингибирование АМФ фруктозо-1,6-бисфосфатазы из печени контрольных животных и крыс с кардиомиопатией.

Цифры без штриха и сплошные линии относятся к ферменту в норме, а цифры со штрихом и пунктирные линии — к ферменту при патологии. а: — концентрации  $Mg^{2+}$  3 мМ; концентрации ЭДТА: (в мМ): 1 — 0,000; 2 (2') — 0,03; 3 (3') — 0,3; 4' — 0,6. В отсутствие АМФ активность фермента без ЭДТА составляла 60 % от активности, измеренной в присутствии ЭДТА. На врезке — данные в координатах Хилла, Величины  $n_H$ : 1 — 1,1; 3 — 2,3; 4 — 1,4. б: концентрация ЭДТА — 0,03 мМ; концентрации  $Mg^{2+}$  (мМ): 1 (1') — 0,3; 2 — 1,0. В отсутствие АМФ активность на кривой 1 составляла 50 % от активности на кривой 2. По оси ординат — относительная активность фруктозо-1,6-бисфосфатазы.

ЭДТА на ингибирование фруктозо-1,6-бисфосфатазы АМФ. Предварительные эксперименты позволили установить, что преинкубация фермента в среде, содержащей АМФ и все необходимые для реакции компоненты (за исключением субстрата) в течение 5 и 15 мин не влияла на степень ингибирования фермента АМФ. В связи с этим дальнейшие исследования проводили с преинкубацией в течение 6 мин и с использованием сульфат-аммонийной фракции, полученной как указано в разделе «Методика». Необходимо подчеркнуть, что существенных различий в кинетических характеристиках фермента, полученного из печени индивидуальных животных как в норме, так и при патологии, не наблюдалось.

Из рис. 2 следует, что форма кинетической кривой зависимости  $V_i/V_0$  от  $[I]_0$  существенно зависит от концентраций ЭДТА и  $Mg^{2+}$ . Наибольшая чувствительность фермента к АМФ наблюдается в отсутствие ЭДТА (см. рис. 2, а, кривая 1). Добавление ЭДТА приводит к снижению чувствительности фермента к АМФ и появлению промежуточного плато на кинетической кривой (см. рис. 2, а и кри-

вые 2, 2' и 3'), которые при увеличении концентрации ЭДТА смещаются вверх по оси ординат. При этом кривая с промежуточным плато трансформируется в S-образную кривую (кривые 3 и 4') с  $n_H = 1,4$  и 2,3 соответственно. Повышение концентрации  $Mg^{2+}$  при постоянной концентрации ЭДТА приводит к снижению чувствительности фермента к ингибитору (см. рис. 2, б, кривые 1 и 2). Из этого же рисунка видно, что снижение концентрации  $Mg^{2+}$  ниже 1 мМ при низкой концентрации ЭДТА приводит к тому, что плато на кинетической кривой не выявляется (см. рис. 2, б; кривые 1 и 1').

Сравнение свойств фруктозо-1,6-бисфосфатазы из печени здоровых и больных животных показывает, что различия между ними наблюдаются лишь при высоких концентрациях ЭДТА (кривые 3 и 3'). Так, для трансформации кривой с промежуточными плато в S-образную кривую для фермента из печени крысы с кардиомиопатией необходима более высокая концентрация ЭДТА, чем для фермента из печени здорового животного (см. рис. 2, а; кривые 3 и 4').

Остановимся на причинах, которые

могут привести к появлению промежуточного плато на кривых зависимости  $V_i/V_0$  от  $[I]_0$ . Часто такой причиной является присутствие в ферментном препарате примеси фермента, утратившего (в результате хранения или по другим причинам) кооперативные свойства. В этом случае промежуточное плато является результатом «суммирования» S-образной кривой и кривой, не имеющей точки перегиба [3]. В нашем случае с использованием одного и того же ферментного препарата можно получить кривые различного типа: S-образную, кривую с промежуточным плато и гиперболическую. Поэтому причиной появления гиперболического компонента нельзя считать частичную необратимую утрату фруктозо-1,6-бисфосфатазой кинетической кооперативности между аллостерическими центрами, связывающими АМФ. Поскольку изменение в характере кинетических кривых можно было вызвать варьированием концентрации ЭДТА, можно предположить, что оно обусловлено удалением из белка прочносвязанного эндогенного металла.

Известно, что молекула фруктозо-1,6-бисфосфатазы печени крысы может связывать 12 атомов  $Zn$  в центрах с высоким, промежуточным и низким сродством к металлу [14], т. е. на каждой из 4 субъединиц фермента имеется по одному центру каждого типа. Принято считать, что активирующее действие ЭДТА и других хелаторов связано с удалением  $Zn^{2+}$  из ингибиторных центров, которыми, судя по кинетическим исследованиям, могут быть центры с промежуточным сродством к  $Zn^{2+}$  [14]. Установлено также, что обработка фермента и всех компонентов реакционной смеси комплексобразующей смолой Chelex-100 приводит к полной активации фермента [12]. Однако, как показали проведенные ранее исследования [11], после такой обработки с фруктозо-1,6-бисфосфатазой из печени крысы остаются связанными 4 иона  $Zn^{2+}$  и 4 иона  $Mg^{2+}$  в расчете на тетрамер.

Основываясь на данных Хорекера и соавт. [17] о том, что прочносвязанный с фруктозо-1,6-бисфосфатазой  $Zn^{2+}$  усиливает чувствительность фермента к ингибированию АМФ, можно предположить, что удаление именно этого катиона отражается на кинетиче-

ском поведении фермента. В таком случае полученные данные могут свидетельствовать о том, что удаление из белка прочносвязанного  $Zn^{2+}$  зависит от концентрации ЭДТА и что  $Mg^{2+}$  облегчает этот процесс. Известно, что для фермента из печени кролика 2 мМ  $Mg^{2+}$  на порядок снижают сродство к  $Zn^{2+}$  двух первых типов центров [16].

Представленные на рис. 2 данные позволяют выделить две формы фруктозо-1,6-бисфосфатазы, резко различающиеся по чувствительности к АМФ и кооперативности. Первая форма наблюдается в отсутствие ЭДТА (см. рис. 2, а; кривая 1) и характеризуется высокой чувствительностью к АМФ и отсутствием кооперативности ( $[I]_{0,5} = 2$  мкМ, а  $n_H = 1,1$ ). Это хорошо согласуется с данными Понтремоли и соавт. [17], показавшими, что  $K_i$  для АМФ, определяемая в отсутствие ЭДТА для фермента, очищенного из печени кролика, равна 1,9 мкМ. Этой форме может соответствовать фермент, в структурных центрах которого есть  $Zn^{2+}$ . Вторая форма наблюдается при высоких концентрациях ЭДТА (см. рис. 2, а; кривая 3) и характеризуется низкой чувствительностью к АМФ ( $[I]_{0,5} = 58$  мкМ) и высокой кооперативностью по отношению к аллостерическому ингибитору ( $n_H = 2,3$ ). Эта форма может представлять собой фермент, структурные центры которого свободны от  $Zn^{2+}$  и могут быть заполнены  $Mg^{2+}$ .

Таким образом, обнаруженные нами сложные кинетические кривые могут быть результатом одновременного существования по крайней мере двух форм фермента, различающихся по заполнению структурных центров  $Zn^{2+}$  и  $Mg^{2+}$ , что обуславливает различия в их кинетическом поведении.

Указанные выше различия в поведении фруктозо-1,6-бисфосфатазы из печени здоровых и больных крыс (см. рис. 2, а, кривые 3 и 3', а также и рис. 1, кривые 2) можно объяснить более прочным связыванием  $Zn^{2+}$  со структурными центрами фермента у больных животных. Однако, поскольку эти результаты получены с использованием частично очищенных препаратов фруктозо-1,6-бисфосфатазы, нельзя исключить, что сопутствующие белки, находящиеся в ферментных препаратах, выделенных из печени больных и



здоровых животных, по-разному связывают добавленный  $Mg^{2+}$ , снижая тем самым концентрацию свободного катиона, конкурирующего с  $Zn^{2+}$  за связывание на ферменте.

Изменения в кинетическом поведении фруктозо-1,6-бисфосфатазы после хроматографии на сефадексе G-50 можно объяснить удалением природных комплексообразователей (таких, как гистидин и цитрат), связывающих  $Zn^{2+}$  в отсутствие ЭДТА. Поэтому их удаление может привести к усилению связывания  $Zn^{2+}$  в структурных центрах фермента и, следовательно, к снижению кооперативности или появлению плато на кинетической кривой (см. рис. 1). Следует отметить, что гель-фильтрацию проводили в отсутствие ЭДТА и что содержание  $Zn^{2+}$  в бидистиллированной деионизованной воде составило 0,044 мкМ [8], в то время как величина  $K_D$  для центров с высоким сродством к  $Zn^{2+}$  для фруктозо-1,6-бисфосфатазы из печени крысы была меньше 0,01 мкМ [14]. Вполне вероятно, что изменение чувствительности фермента к аллостерическому ингибитору и в физиологических условиях будет зависеть от концентраций свободного  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  и природных комплексообразователей.

Обнаруженное нами повышение активности фруктозо-1,6-бисфосфатазы в печени крыс с кардиомиопатией нельзя объяснить усилением биосинтеза этого фермента, поскольку после гель-фильтрации активность снижалась до нормы. В литературе имеются указания [17] на наличие в микросомах печени крысы активатора фруктозо-1,6-бисфосфатазы, который, вероятно, является белком. Обнаружено также, что некоторые асцитные гепатомы содержат цитоплазматический активатор фруктозо-1,6-бисфосфатазы [13]. Можно предположить, что при кардиомиопатии активатор фермента переходит из микросом в растворимую фракцию и что действие его отличается от активации фермента в присутствии ЭДТА.

По данным Розе и соавт. [14], повышение содержания гликогена в печени голодных животных с кардиомиопатией является следствием нарушения регуляции активности гликогенфосфорилазы катехоламинами, в связи с чем фосфоролиз гликогена у больных крыс практически отсутствовал.

Можно предположить, что активация фруктозо-1,6-бисфосфатазы у животных с экспериментальной аутоиммунной кардиомиопатией служит компенсаторным фактором, обеспечивающим биосинтез недостающей глюкозы. Интересно отметить, что у детей, больных гликогенозом, вызванным отсутствием глюкозо-6-фосфатазы (в связи с чем гликоген печени не мог превращаться в свободную глюкозу), также наблюдали повышение активности фруктозо-1,6-бисфосфатазы в печени в 2—2,5 раза [6].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов О. С., Часовских Г. Г., Никитин Ю. П., Леона М. А. — Кардиология, 1978, № 5, с. 24—27.
2. Вихерт А. М., Быковская К. Н., Рыффа Н. Н. — Там же, 1977, № 4, с. 126—132.
3. Курганов Б. И. — В кн.: Аллостерические ферменты. М., 1978, с. 45.
4. Розе Л. В., Попова И. А. — Вопр. мед. химии, 1979, № 1, с. 50—55.
5. Розе Л. В., Розенфельд Е. Л., Попова И. А. — Там же, № 4, с. 484—491.
6. Розенфельд Е. Л., Попова И. А. — В кн.: Гликогеновая болезнь. М., 1979, с. 81, 192.
7. Alexander C. S., Forsyth G. W., Nagasawa H. T., Kohlhaff T. G. — J. molec. cell. Cardiol., 1977, vol. 9, p. 235—245.
8. Bencovic P. A., Caperelli S. A., Demaine M., Bencovic S. J. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1978, vol. 75, p. 2185—2189.
9. Groves U. E., Davis F. C., Sell B. H. — Analyt. Biochem., 1968, vol. 22, p. 195—210.
10. Kido H., Vila A., Gen-jun Xu et al. — Biochemistry Int., vol. 1, p. 91—97.
11. McGrane M. M., El-Maghrabi M. R., Pilakis S. J. — J. biol. Chem., 1983, vol. 258, p. 10445—10454.
12. Nimmo H. G., Tipton K. F. — Biochem. J., 1975, vol. 145, p. 323—334.
13. Orenge A., Palenia D. M. — Int. J. Biochem., 1981, vol. 13, p. 337—341.
14. Pedrosa F. O., Pontremoli S., Horecker B. L. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1977, vol. 74, p. 2742—2745.
15. Phillips T. L., Talent J. M., Gracy R. W. — Biochem. biophys. Acta, 1976, vol. 429, p. 624—628.
16. Pontremoli S., Melloni E., Salamino F. et al. — Arch. Biochem., 1979, vol. 197, p. 356—363.
17. Pontremoli S., Melloni E., Salamino F. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1979, vol. 88, p. 656—660.
18. Tejwani C. A., Pedrosa F. O., Pontremoli S., Horecker B. L. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1976, vol. 73, p. 2692—2695.
19. Vila A., Kido H., Pontremoli S., Horecker B. L. — Arch. Biochem., 1981, vol. 209, p. 598—605.

Поступила 05.05.85

SOME REGULATORY PROPERTIES OF  
LIVER FRUCTOSE-1,6-BIPHOSPHATASE IN  
NORMAL RATS AND IN ANIMALS WITH  
EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE CARDIO-  
MYOPATHY

*E. Yu. Glinka, N. F. Belyaeva, K. N. Bykovskaya, Z. S. Kagan*

Institute for Biological Testing of Chemical  
Compounds Cupavna, Moscow Region, All-  
Union Cardiological Research Centre, Academy  
of Medical Sciences of the USSR, Moscow

An increase in fructose-1,6-biphosphatase activity in liver tissue of rats with experimental autoimmune cardiomyopathy was observed. At certain concentrations of EDTA and  $Mg^{2+}$  the AMP-inhibition curves exhibited an intermediate plateau, which appear under different experimental, normal and pathological conditions. The occurrence of complex kinetic curves could be attributed to simultaneous existence of several enzymatic forms differing in the "structural" sites with tightly bound metals, which defines the differences in the kinetic cooperativity and sensitivity to AMP inhibition.

УДК 612.173.1.015.1:577.152.311]-019

*Ю. А. Григорович, С. А. Булгадиева*

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ  
ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ  
ИЗ СЕРДЦА КРОЛИКА И СЕРДЦА БЫКА

НИИ медицинской энзимологии АМН СССР, Москва; Институт физиологически активных веществ АН СССР, Черноголовка

Фосфодиэстераза (ФДЭ) циклических нуклеотидов (КФ 3.1.4.17) — фермент, гидролизующий цАМФ и цГМФ. ФДЭ в тканях млекопитающих характеризуется многообразием форм, различающихся по молекулярной массе, кинетическим характеристикам, субстратной специфичности, чувствительности к действию ингибиторов и активации ионами  $Ca$  и низкомолекулярным, термостабильным  $Ca^{2+}$ -зависимым белком — калмодулином. Проблема множественности форм ФДЭ продолжает оставаться до конца нерешенной. ФДЭ достаточно лабильна; набор форм зависит от источника получения фермента и методов его выделения.

Регуляция активности ФДЭ достаточно сложна и осуществляется на уровне субстрата в зависимости от его концентрации, на уровне взаимодействия двух субстратов (цАМФ и цГМФ) и при участии  $Ca^{2+}$  и калмодулина [8].

Калмодулин входит в эволюционное семейство  $Ca^{2+}$ -связывающих белков, включающее тропонин С, парвальбумины и другие  $Ca^{2+}$ -связывающие белки [9, 12]. Калмодулин широко распространен в природе [14], не обладает видовой специфичностью и в одинаковой степени активирует ферменты, полученные из той же ткани или из других источников [2, 22]. Связываясь с 4 ионами  $Ca$ , калмодулин переходит в активное состояние и активирует ряд процессов и ферментов, включая ФДЭ

циклических нуклеотидов [8]. При присоединении ионов  $Ca$  на поверхности молекулы калмодулина экспонируются гидрофобные участки [11, 15, 20], которые, связываясь с молекулой фермента, изменяют конформационное состояние ферментного белка так, что активность ФДЭ циклических нуклеотидов возрастает в 5—10 раз в зависимости от источника фермента.

Активность ФДЭ циклических нуклеотидов тормозится многими биологически и фармакологически активными веществами. К ним относится ряд белков и пептидов, препараты ксантинового ряда, изохинолиновые и фенотиазиновые производные [18]. Известно, что фенотиазиновые производные являются ингибиторами активирующего действия калмодулина [13, 16], среди них наиболее выраженный эффект дает трифторперазин, который блокирует гидрофобные участки молекулы калмодулина в присутствии  $Ca^{2+}$ , препятствуя проявлению активирующего действия калмодулина [11, 15]. Фенотиазиновые производные обладают различной фармакологической активностью. Трифторперазин и аминазин относятся к группе нейролептиков, этмозин — к антиаритмическим средствам, а нонахлазин обладает как антиаритмической, так и спазмолитической активностью [5].

Задачей данной работы было проведение сравнительного анализа свойств ФДЭ циклических нуклеотидов из серд-

ца кролика и сердца быка, изучение влияния лекарственных препаратов фенотиазинового ряда, оказывающих нейролентическое, антиаритмическое и коронарорасширяющее действие на активность частично очищенных препаратов ФДЭ из этих источников.

### Методика

Частично очищенные препараты ФДЭ из сердца быка и сердца кролика были получены модифицированным методом Храпача и Расмуссена [1, 3, 10], разработанным для выделения фермента из сердца быка. Сердце быка получали с мяскокомбината и, как правило, сразу же использовали для выделения фермента. Для получения сердца кролика животных декапитировали. От 10 кроликов массой 2—2,3 кг было получено 37 г сердечной мышцы. После гомогенизирования ткани сердца и получения экстракта центрифугированием при  $15\,000\times g$  белки осаждали сульфатом аммония при 55 % насыщении. Полученный осадок растворяли в среде, включающей в себя имидазольный буфер (20 мМ рН 7,5) и  $MgSO_4$  (5 мМ). Нерастворившуюся часть удаляли центрифугированием при  $15\,000\times g$ . Полученную надосадочную жидкость, представлявшую собой так называемую сульфат-аммонийную фракцию (САФ), рассматривали как суммарный препарат цитоплазматических форм фермента и использовали для дальнейших исследований его свойств и дальнейшей очистки фермента, которую проводили методом гель-фильтрации на колонках с сефарозой 6В ( $90\times 1,8$  см).

Препараты, полученные в процессе этой очистки, сохраняли связь с калмодулином. «Базальную активность» фермента оценивали в присутствии специфического комплексона  $Ca^{2+}$  — ЭГТА [этиленгликоль-бис (β-аминоэтиловый эфир) N, N, N', N'-тетраацетат].

Активность ФДЭ, как описано в работе [7], определяли в пробах объемом 0,5 мл, содержащих имидазольный буфер (20 мМ рН 7,4),  $MgSO_4$  (5 мМ), субстраты фосфодиэстеразной реакции — цАМФ и цГМФ в концентрации  $5\cdot 10^{-4}$  М и различное количество ферментного белка. Пробы инкубировали в течение 15 мин при 37 °С. Реакцию останавливали кипячением на водяной бане. О ферментативной активности судили по накоплению неорганического фосфата из продуктов фосфодиэстеразной реакции 5'-АМФ и 5'-ГМФ в ходе сопряженной реакции в присутствии яда азиатской эфы в качестве источника 5'-нуклеотидазной активности. После остановки реакции кипячением и удаления выпавшего осадка белка центрифугированием в пробах определяли содержание неорганического фосфата [17], используя в качестве восстановителя  $SnCl_2$ . Активность фермента выражали в наномолях  $P_n$  на 1 мг белка в 1 мин.

Белок определяли микробиуретовым методом [4] и спектрофотометрически при 280 и 260 нм, рассчитывая содержание белка по формуле Калькара ( $1,45 D_{280} - 0,74 D_{260}$ ).

Фенотиазиновые производные добавляли в реакционные пробы в концентрациях  $5\cdot 10^{-5}$  и  $1\cdot 10^{-4}$  М.

### Результаты

Ранее было показано [1, 3], что активность ФДЭ из сердца быка с цАМФ в качестве субстрата в экстракте составляла 7—10 нмоль  $P_n$  на 1 мг белка в 1 мин. Высаливание сульфатом аммония увеличивало активность фермента в 5—7 раз, а после гель-фильтрации на сефарозе 6В во фракциях пика максимальная удельная активность достигала 500—600 нмоль  $P_n$  на 1 мг белка в 1 мин. Следует отметить, что активность фермента зависела от индивидуальных особенностей животного.

Удельная активность САФ из сердца быка и сердца кролика соответственно составляли 45 и 12 нмоль  $P_n$  на 1 мг белка в 1 мин.

При гель-фильтрации на сефарозе 6В ферментного препарата из сердца быка был получен один пик в объеме элюции примерно 175 мл с максимальной активностью 200—220 нмоль  $P_n$  на 1 мг белка в 1 мин (рис. 1).

При нанесении на ту же колонку САФ из сердца кролика (общая активность 950 нмоль  $P_n$  в 1 мин) профиль элюции был представлен большим (в объеме 170—180 мл) и малым (в объеме 235—250 мл) пиками. Общая элюируемая с колонки активность составляла 840 нмоль  $P_n$  в 1 мин; на первый пик приходилось 603, на второй — около 30 нмоль  $P_n$  в 1 мин. Таким образом, основная активность

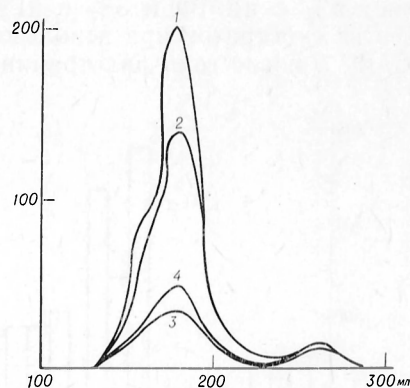


Рис. 1. Гель-фильтрация сульфатаммонийной фракции из сердца быка на колонке с сефарозой 6В: с цАМФ (1), цГМФ (2), цАМФ в присутствии ЭГТА ( $5\cdot 10^{-4}$  М) (3) и с цГМФ (4) в присутствии ЭГТА.

Здесь и на рис. 2: объем пробы — 3 мл. По оси абсцисс — объем элюции (в мл); по оси ординат — удельная активность ФДЭ (в нмоль  $P_n$  на 1 мг белка в 1 мин).



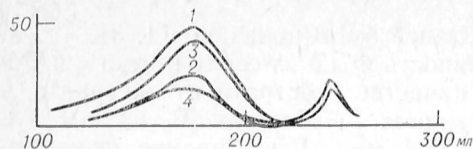


Рис. 2. Гель-фильтрация сульфатаммонийной фракции из сердца кролика на колонке с сефарозой 6В.

ФДЭ была сосредоточена в первом пике (рис. 2).

По сравнению с препаратом из сердца быка активность ФДЭ из сердца кролика в основном пике была значительно ниже (не превышала 50 нмоль  $P_H$  на 1 мг белка в 1 мин).

Как и для препаратов из сердца быка активность в присутствии цАМФ по сравнению с активностью фермента в присутствии цГМФ была выше и в САФ и в пике активности после гель-фильтрации.

При добавлении в пробы специфического комплексона  $Ca^{2+}$  ЭГТА выявляется так называемая базальная активность, когда отсутствует активация  $Ca^{2+}$  и калмодулином. В присутствии ЭГТА в концентрации  $5 \cdot 10^{-4}$  М активность ФДЭ из сердца быка ингибировалась в среднем на 80% с цАМФ и на 60% с цГМФ, используемых в качестве субстратов фосфодиэстеразной реакции. Что касается препаратов ФДЭ из сердца кролика, то ингибирующее действие ЭГТА выражено слабо и составляет 9% с цАМФ и 3% с цГМФ в качестве субстратов при использовании САФ, а после гель-фильтрации во

Удельная активность (в нмоль  $P_H$  на 1 мг белка в 1 мин) препаратов ФДЭ из сердца кролика без ЭГТА и в его присутствии

Ферментный препарат	Субстрат	
	цАМФ	цГМФ
Сульфатаммонийная фракция:		
без ЭГТА	12,3	8,4
с ЭГТА	11,2	7,3
Пик активности после гель-фильтрации:		
без ЭГТА	36,2	19,6
с ЭГТА	29,9	18,6

фракциях с максимальной активностью торможение достигало 17 и 5% соответственно с цАМФ и цГМФ. В таблице приведены результаты типичного опыта по определению активности ФДЭ с цАМФ и цГМФ без добавления ЭГТА и в его присутствии.

Таким образом, по сравнению с препаратами ФДЭ из сердца быка ФДЭ из сердца кролика ингибируется ЭГТА незначительно, т. е. активность фермента в этих условиях не зависит от ионов Са. При добавлении калмодулина, выделенного из сердца быка, повысить активность ФДЭ из сердца кролика не удалось.

Исследование влияния производных фенотиазина показало, что трифторперазин и его менее гидрофобный аналог аминазин в концентрации  $5 \cdot 10^{-5}$  М тормозят активность ФДЭ из сердца быка на 78 и 48% с цАМФ и на 46 и 25% с цГМФ в качестве субстратов при использовании САФ, а во фракциях с максимальной активностью после гель-фильтрации трифторперазин и

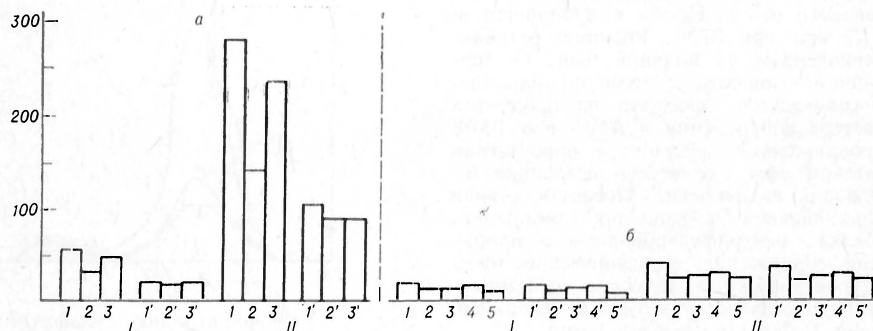


Рис. 3. Влияние лекарственных препаратов на активность ФДЭ цАМФ из сердца быка (а) и сердца кролика (б) в сульфатаммонийной фракции (I) и во фракции с максимальной активностью после гель-фильтрации на сефарозе 6В (II).

Здесь и на рис. 3: в опытах с ФДЭ из сердца быка использованы препараты в концентрации  $5 \cdot 10^{-5}$  М, а в опытах с ФДЭ — из сердца кролика —  $1 \cdot 10^{-4}$  М; по оси ординат — активность ФДЭ (в нмоль  $P_H$  на мг белка в 1 мин). 1 — без добавления препарата, 2 — с трифторперазинном, 3 — с аминазином, 4 — с напхазлином, 5 — с этмозином, 1', 2', 3', 4', 5' — то же в присутствии ЭГТА.

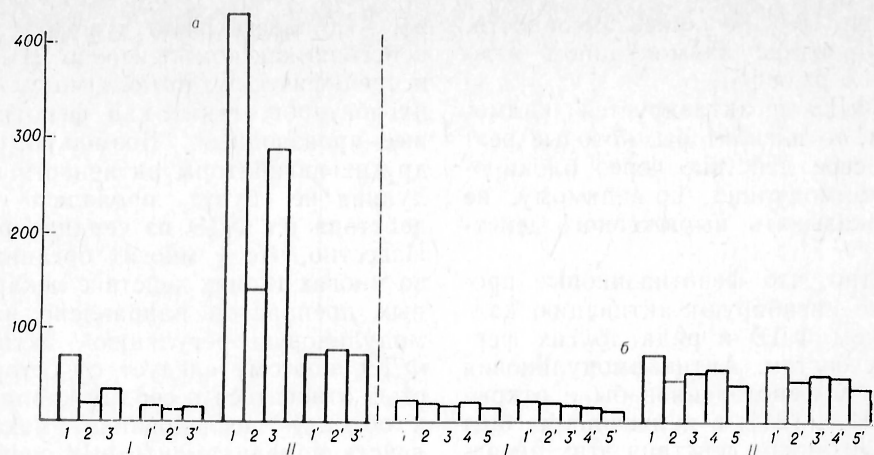


Рис. 4. Влияние лекарственных препаратов на активность ФДЭ цГМФ из сердца быка и сердца кролика.

аминазин в тех же концентрациях тормозили активность фермента на 67 и 33 % с цАМФ и на 50 и 16 % с цГМФ (рис. 3, А, и 4, А).

В присутствии ЭГТА добавление трифторперазина и аминазина снижало активность фермента незначительно.

Активность ФДЭ из сердца кролика в концентрации лекарственных препаратов  $5 \cdot 10^{-5}$  М практически не тормозится. Поэтому в этих опытах использовали более высокую концентрацию производных фенотиазинов —  $1 \cdot 10^{-4}$  М. Ингибирующий эффект достигал при этом в среднем 15%, за исключением этмозина, который ингибировал активность ФДЭ в САФ на 34% с цАМФ. В присутствии цГМФ торможение всеми исследованными производными было выше и составляло в среднем 30% (рис. 3, Б и 4, Б).

При использовании фракций фермента из сердца кролика после гель-фильтрации с максимальной активностью фенотиазиновые производные ингибировали активность ФДЭ больше: в среднем на 30% с цАМФ (с этмозином на 46%) и до 35% с цГМФ (с трифторперазином на 45%).

В присутствии ЭГТА фенотиазиновые производные либо не влияли, либо влияли незначительно на базальную активность в опытах как с САФ, так и с фракциями после гель-фильтрации.

Таким образом, выявлены существенные различия в активности препаратов ФДЭ из сердца кролика и сердца быка, а также во влиянии ЭГТА и фенотиазиновых производных.

### Обсуждение результатов

Полученные данные показали, что активность ФДЭ из сердца быка в процессе очистки резко возрастает. После гель-фильтрации на сефарозе 6В фермент сохраняет связь с калмодулином; в присутствии комплексона  $\text{Ca}^{2+}$  ЭГТА-активность фермента ингибировалась более чем на 80% (см. рис. 3, А).

В тех же условиях выделения фермента активность ФДЭ из сердца кролика возрастает в результате гель-фильтрации в меньшей степени и незначительно ингибируется ЭГТА как в САФ, так и в пробах после гель-фильтрации во фракциях с максимальной активностью (см. рис. 3, Б и 4, Б). По-видимому, полученный таким образом препарат ФДЭ из сердца кролика либо теряет связь с калмодулином в процессе очистки, либо активность фермента не зависит от  $\text{Ca}^{2+}$  и калмодулина. Действительно, при добавлении калмодулина ФДЭ из сердца кролика дополнительно не активировалась. Можно предположить, что ФДЭ в сердце кролика представлена в основном  $\text{Ca}^{2+}$ -калмодулиннезависимой формой.

Это согласуется с литературными данными, согласно которым методом хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе было показано, что ФДЭ из сердца кролика, хотя и представлена двумя формами, однако  $\text{Ca}^{2+}$ -калмодулиннезависимая форма составляет 90% всей фосфодиэстеразной активности, а  $\text{Ca}^{2+}$ -калмодулинактивируемая фор-

ма — лишь 10 % от общей активности, а активирование калмодулином было всего в 1,5 раза [6].

Если ФДЭ не активируется калмодулином, то ингибиторы, которые реализуют свое действие через блокирование калмодулина, по-видимому, не будут оказывать выраженного действия.

Известно, что фенотиазиновые производные ингибируют активацию калмодулином ФДЭ и ряда других ферментных систем. Антикалмодулиновая активность фенотиазинов была открыта в 1974 г. [21]; в дальнейшем был изучен механизм действия этих препаратов, особенно трифторперазина, который обладает наиболее гидрофобными свойствами и присоединяется к молекуле калмодулина в двух участках, отличающихся от участков связывания  $\text{Ca}^{2+}$ . Именно эти участки играют важную роль во взаимодействии с ферментным белком ФДЭ и других  $\text{Ca}^{2+}$ -калмодулинзависимых ферментов [11, 13, 14, 16].

Действительно, как показывают полученные данные, трифторперазин резко тормозит активность ФДЭ из сердца быка в концентрации  $5 \cdot 10^{-5}$  М на 78 % с цАМФ и на 46 % с цГМФ. Это торможение носит  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый характер, так как в присутствии ЭГТА оно практически отсутствовало. Аминазин как менее гидрофобный аналог оказывал меньшее влияние (см. рис. 3, А).

Что касается ФДЭ из сердца кролика, то торможения фенотиазинами в этой концентрации не отмечалось, а при увеличении концентрации до  $1 \cdot 10^{-4}$  М ингибирование было незначительным с САФ и несколько большим с фракциями белка после гель-фильтрации (см. рис. 3, Б и 4, Б). Но так как без ЭГТА и в его присутствии торможение фенотиазинами было почти одинаковым, то оно носит скорее неспецифический характер — не зависит от  $\text{Ca}^{2+}$  и не связано с ингибированием действия калмодулина. Это относится и к фенотиазинам-нейролептикам (трифторперазин и аминазин) и к фенотиазинам с антиаритмическими и коронарорасширяющими свойствами (этмозин и нонахлазин).

Таким образом, в сердце кролика ФДЭ, по-видимому, представлена  $\text{Ca}^{2+}$ -калмодулиннезависимой формой (независимо от методов выделения) [3,

6]. Активность мало чувствительна к действию как комплексонов ЭГТА, так и специфических антикалмодулиновых ингибиторов, таких как фенотиазиновые производные. Возможно, что и другие ингибиторы активности калмодулина не будут проявлять своего действия на ФДЭ из сердца кролика. Известно, что у многих организмов и во многих тканях действие лекарственных препаратов направлено на калмодулиновую регуляцию активности ФДЭ, поэтому следует с осторожностью относиться к сердцу кролика как к объекту исследования механизма действия медикаментозных средств на циклазную систему, регулирующую  $\text{Ca}^{2+}$  и калмодулином.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Булгадаева С. А. Автореф. дисс. Исследование состава и свойств препарата фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов из сердца быка. 1985.
2. Григорович Ю. А. — Успехи биол. химии, 1982, т. 22, с. 76—99.
3. Королева Е. И., Булгадаева С. А., Григорович Ю. А. — Биохимия, 1979, т. 44, с. 555—563.
4. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. М., 1971, с. 309—310.
5. Машковский М. Д. Лекарственные средства. М., 1978.
6. Ткачук В. А., Лазаревич В. Г., Меньшиков М. Ю., Северин С. Е. — Биохимия, 1978, т. 43, с. 1622—1629.
7. Butcher R. W., Sultheland E. W. — J. biol. Chem., 1962, vol. 237, p. 1244—1250.
8. Cheung W.-Y. — Fed. Proc., 1982, vol. 41, p. 2253—2257.
9. Demaille J. C. — Nouv. Rev. franc. Hemat., 1982, vol. 24, p. 141—144.
10. Hrapchak R. J., Rasmussen H. — Biochemistry (Wash.), 1972, vol. 11, p. 4458—4464.
11. Klevit R. E., Levine B. A., Williams R. J. P. — FEBS Lett., 1981, vol. 123, p. 25—29.
12. Kretsinger R. H. — Advanc. Cyclic Nucl. Res., 1979, vol. 11, p. 1—26.
13. Levin R. M., Weiss B. — Molec. Pharmacol., 1976, vol. 12, p. 581—589.
14. Means A. R., Tash J. S., Charouleas J. G. — Physiol. Rev., 1982, vol. 62, p. 1—39.
15. La Porte D. C., Wierman B. M., Storm D. R. — Biochemistry (Wash.), 1980, vol. 19, p. 3814—3819.
16. Prozialeck W. C., Weiss B. — J. Pharmacol. exp. Ther., 1982, vol. 222, p. 509—516.
17. Rathbun W. B., Bellach M. V. — Analyt. Biochem., 1969, vol. 28, p. 436—445.
18. Roufogalis B. D., Minocherhomjee A.-E.-V., Al-Johore A. — Canad. J. Biochem., 1983, vol. 61, p. 927—933.
19. Strada S. J., Thompson W. J. — Advanc. Cyclic Nucl. Res., 1978, vol. 9, p. 265—283.
20. Watterson D. M., Sharief F., Vaman T. C. — J. biol. Chem., 1980, vol. 255, p. 962—975.
21. Weiss B., Fertel R., Figlin R., Uzunov P. —



Molec. Pharmacol., 1974, vol. 10, p. 616—625.

22. Wolff D. J., Brostrom C. O. — Advanc. Cyclic Nucl. Res., 1979, vol. 11, p. 27—81.

Поступила 25.12.84

## PROPERTIES OF CYCLIC NUCLEOTIDE PHOSPHODIESTERASES FROM BOVINE AND RABBIT HEART TISSUES

*Yu. A. Grigorovich, S. A. Bulgadaeva*  
Institute of Medical Enzymology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow, Institute of Physiologically Active Substances, Academy of Sciences of the USSR, Chernogolovka

Activities of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDE) were studied in partially purified preparations from bovine and rabbit heart tissues. The PDE activity from rabbit heart was not increased in the course of purification and remained distinctly lower as compared with the

enzymatic activity from bovine heart. Specific chelating agent  $\text{Ca}^{2+}$ -EGTA ( $5 \cdot 10^{-4}$  M) inhibited effectively the PDE activity from bovine heart both in the ammonium sulfate fraction and in the fractions obtained by means of gel filtration on Sepharose 6B, but affected only slightly the enzyme activity from rabbit heart. The enzyme from bovine heart appears to involve mainly the  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin-dependent form, while the enzyme from rabbit heart, isolated under similar conditions, was  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin-independent. Phenothiazine derivatives inhibited distinctly the PDE activity from bovine heart at  $5 \cdot 10^{-5}$  M concentration, whereas they did not affect or affected only slightly the enzyme preparations from rabbit heart even at  $1 \cdot 10^{-4}$  M concentration; the inhibition was of the calmodulin-unspecific type. Phenothiazine derivatives (inhibitors of the calmodulin activity) exhibited only slight effect on the  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin-independent PDE from rabbit heart. This enzyme could not be used in studies of drugs, the effect of which is realized *via* regulation of the enzymatic activity by means of  $\text{Ca}^{2+}$  and calmodulin.

УДК 612.015.6:577.161.3]-06:613.268:665.335.9

*Н. К. Надиров, Е. Г. Ленская, С. Е. Сагиндыкова, Ж. У. Токмурзин,  
Б. Б. Айдарханов*

## АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ И НАКОПЛЕНИЕ ТКАНЯМИ ТОКОФЕРОЛОВ ИЗ НОВОГО ПРИРОДНОГО ИСТОЧНИКА

Казахский филиал Института питания АМН СССР, Алма-Ата

В настоящее время большое внимание уделяется созданию витаминных препаратов для животноводства, обладающих выраженной специфической активностью при невысокой стоимости их производства. В целях решения этой проблемы предложена схема получения концентрата токоферолов из побочных продуктов переработки хлопкового масла [7, 8]. Наряду с  $\alpha$ -токоферолом, содержание которого в концентрате составляет около 4,5 %, в нем представлены другие изомеры витамина Е, а также каротиноиды, в частности  $\beta$ -каротин, что придает препарату более выраженные антиоксидантные свойства. В связи с этим представляло интерес оценить *in vitro* антиоксидантную активность указанного концентрата и исследовать накопление токоферолов в тканях крыс, получающих этот концентрат.

### Методика

Для опытов *in vivo* использовали концентрат токоферолов в исходной форме и в виде водной эмульсии, полученной путем ультразвуковой дезинтеграции.

Антиокислительную активность концентрата

токоферолов оценивали по реакции со стабильным свободным радикалом 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразином (ДФПГ) по сравнению с активностью синтетических препаратов DL- $\alpha$ -токоферола, бутилгидроксианола (БГТ) и бутилгидроксанизола (БГЛ) фирмы «Serva» (ФРГ) по методике [17] в модификации, при этом использовали для анализа 0,2 % растворы антиоксидантов в диметилсульфоксиде. Перед опытом исходный раствор ДФПГ (10 мг в 25 мл этанола) разводили этиловым спиртом в соотношении 1:1. Реакционная смесь содержала 8,5 мл смеси бензол—метанол (1:1), 0,5 мл раствора антиоксиданта и 1 мл раствора ДФПГ. Снижение оптической плотности регистрировали при 522 нм через 15 мин по сравнению с контролем, не содержащим антиоксиданта. Результаты выражали в относительных единицах оптической плотности на 1 моль исследуемого вещества.

Биологическую эффективность концентрата токоферолов определяли в системе *in vitro* по ингибированию накопления липидных перекисей в ходе НАДФ-Н-зависимого перекисного окисления липидов (ПОЛ) в микросомах печени крыс линии Август с массой тела 200—250 г. Животных декапитировали под эфирным наркозом. Печень перфузировали холодным 1,15 % раствором KCl. Микросомы печени получали низкоскоростным центрифугированием [20]. Скорость ПОЛ в микросомальной фракции определяли по накоплению малонового диальдегида (МДА) [18]. Инкубационная смесь содержала 100 мМ NaCl, 50 мМ трис-HCl-буфер pH 7,4 при 37 °C, 1 мг микросомального белка на 1 мл, 0,5 мМ

НАДФ·Н и 50 мкМ  $\text{Fe}^{2+}$ , а также 1 мкМ антиоксидантов в диметилсульфоксиде — DL- $\alpha$ -токоферола (контроль) и концентрата токоферолов, БоТ или БоА. В одной серии проб применяли диметилсульфоксид без антиоксиданта. Инкубацию проводили в аэробных условиях при 37 °С после 30-минутного периода для встраивания токоферола в мембраны.

Концентрацию белка находили биуретовым методом [14], оптическую плотность — с помощью спектрофотометра «Hitachi-557».

Накопление токоферола тканями и встраивание его в биологические мембраны исследовали в опытах *in vivo*. Самки-отъемыши крыс линии Август были разделены на 6 опытных групп. Животные 1-й группы получали сбалансированный по основным пищевым ингредиентам рацион, включавший 100 МЕ синтетического DL- $\alpha$ -токоферола на 1 кг диеты (контроль), особой 2-й группы содержали на дефицитной по витамину Е диете. Животные 3-й и 4-й групп в качестве витамина Е получали 100 МЕ токоферола на 1 кг диеты в виде исходного концентрата или эмульсии. Животным 5-й и 6-й групп доза витамина Е из указанных источников была увеличена до 250 МЕ на 1 кг диеты. Через 60 дней после перевода на указанные рационы животных декапитировали, печень перфузировали, как описано выше. Микросомы печени выделяли ультрацентрифугированием [3].

Содержание  $\alpha$ -токоферола в печени, почках, мозге, сердечной мышце, легких и жировой ткани, а также в исходном концентрате и эмульсии определяли ранее описанным методом [9] в модификации. Для анализа использовали 1 г измельченной ткани (или 1 г концентрата). Омыление проводили в присутствии пирогаллола в атмосфере инертного газа при 80 °С в течение 30 мин. Липидную фазу экстрагировали гексаном с использованием БоТ в качестве антиоксиданта для защиты токоферолов от окисления. После отмывки от щелочи экстракт выпаривали под струей аргона и в гексане наносили на силиконовые пластинки. Для развития хроматограмм использовали систему растворителей гексан — диэтиловый эфир — ледяная уксусная кислота (84:15:1). Содержание  $\alpha$ -токоферола в элюате определяли колориметрически с использованием 0,2 % растворов батофенантролина и  $\text{FeCl}_3$ . Для построения калибровочного графика и идентификации пятен токоферола на хроматограммах использовали препарат DL- $\alpha$ -токоферола («Serva», ФРГ).

Микровязкость липидной фазы мембран эндоплазматического ретикула гепатоцитов оценивали по степени эксимеризации флуоресцентного зонда пирена при добавлении его в концентрации 2,5 мкМ к суспензии мембран, содержащей 100 мМ NaCl, 50 мМ трис-HCl-буфер и 0,2 мг микросомального белка в 1 мл. Флуоресценцию пирена возбуждали при 334 нм, регистрировали при 392 нм (мономеры) и 475 нм (эксимеры) с шириной щели возбуждения и эмиссии 2 и 5 нм соответственно. Для вычисления значений микровязкости измеряли интенсивность флуоресценции пирена в стандартном растворе известной вязкости. Измерения проводили на флуоресцентном спектрофотометре «Hitachi-850».

## Результаты и обсуждение

Содержание  $\alpha$ -токоферола в исходном концентрате токоферолов и в эмульсии равнялось соответственно 4460 и 4170 мг на 100 мл.

Антиокислительная активность по реакции с ДФПГ для DL- $\alpha$ -токоферола (контроль) составляла  $9,717 \pm 3,261$ , концентрата токоферолов —  $24,130 \pm 5,217$ , БоТ —  $56,182 \pm 5,353$ , БоА —  $44,473 \pm 9,273$  ( $n=7$ ;  $P<0,001$ ).  $\alpha$ -Токоферол, как и другие донаторы протонов, способен взаимодействовать с ДФПГ [21]. При этом факторы, определяющие скорость его реакции с этим радикалом, ответственны за эффективность токоферола в качестве биоантиоксиданта [19]. Антиокислительная активность концентрата токоферолов почти в 2,5 раза превышает таковую синтетического препарата DL- $\alpha$ -токоферола. Такой результат может быть следствием наличия в концентрате, помимо  $\alpha$ -токоферола, его  $\gamma$ -изомера. Активность синтетических антиоксидантов, БоТ и БоА, в реакции с ДФПГ оказалась выше активности витамина Е, что согласуется с данными других исследований в модельных системах, особенно при низком уровне исходной окисленности системы [11, 15].

Результаты оценки биологической эффективности концентрата токоферолов *in vitro* по накоплению МДА в ходе НАДФ·Н-зависимого ПОЛ в микросомах печени представлены на рис. 1. Введение в среду инкубации витамина Е в оптимальной концентрации [5] в виде синтетического препарата или концентрата токоферолов, а также других антиоксидантов (БоТ,

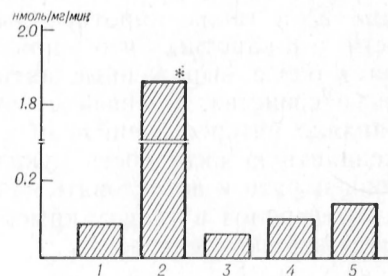


Рис. 1. Скорость накопления МДА (в нмолях на 1 мг белка в 1 мин) в микросомах печени в ходе НАДФ·Н-зависимого перекисного окисления.

1 — DL- $\alpha$ -токоферол; 2 — диметилсульфоксид; 3 — концентрат токоферолов; 4 — бутилгидроксианизол; 5 — бутилгидрокситолуол. Звездочка —  $P<0,001$ .

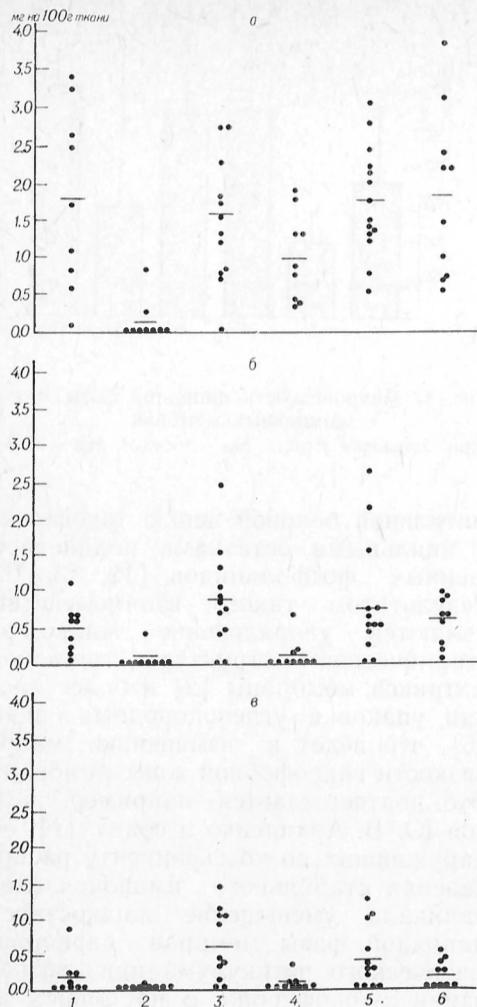


Рис. 2. Содержание  $\alpha$ -токоферола в печени (а), почках (б) и мозге (в) крыс, получавших различные препараты токоферолов или синтетические антиоксиданты.

Здесь и на рис. 3 и 4: 1 — 100 МЕ *DL*- $\alpha$ -токоферола на 1 кг рациона; 2 — дефицит витамина Е; 3 — 100 МЕ исходного концентрата токоферолов; 4 — 100 МЕ концентрата в форме эмульсии; 5 — 250 МЕ исходного концентрата; 6 — 250 МЕ в форме эмульсии на 1 кг рациона.

БоА) приводило к почти полному ингибированию ПОЛ. Скорость образования липидных перекисей в этих условиях снижалась в среднем в 20 раз. При этом не отмечалось достоверных различий в эффективности различных антиоксидантов.

При существенно более низкой антирадикальной активности в реакции с ДФПГ витамин Е в форме синтетического препарата или концентрата токоферолов ингибировал свободнорадикальное окисление липидов в микросомах так же мощно, как БоТ и

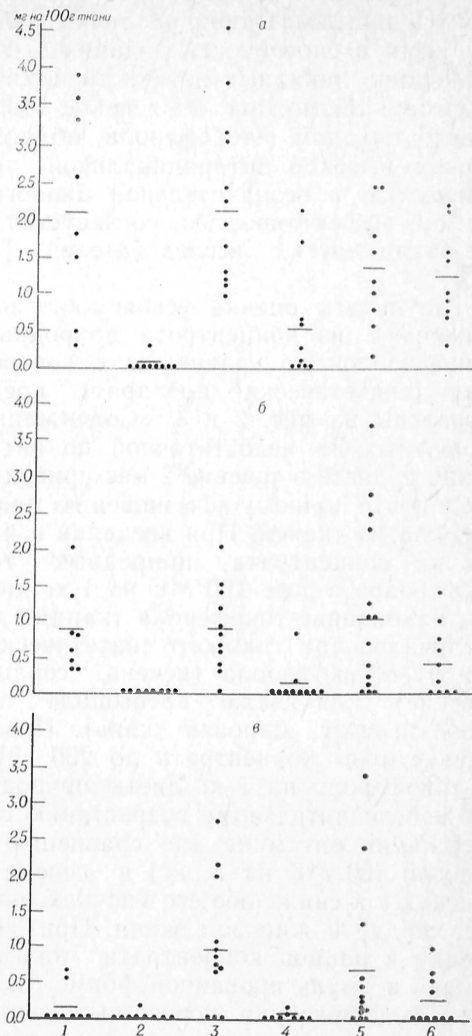


Рис. 3. Содержание  $\alpha$ -токоферола в сердечной мышце (а), легких (б) и жировой ткани (в) крыс, получавших различные препараты токоферолов или синтетических антиоксидантов.

БоА. Это, по-видимому, свидетельствует о том, какой важный вклад в эффективность токоферола как антиоксиданта вносит наряду с его антирадикальными свойствами стабилизирующее влияние на липидную фазу мембран [16], приводящее к стерическому ограничению поступления индукторов перекисного окисления в гидрофобную зону.

Сравнение результатов исследования антиокислительной активности и ингибирующего ПОЛ действия синтетического препарата и концентрата токоферолов обнаруживает существенно более выраженные антирадикальные свойства последнего в реакции с



ДФПГ при отсутствии различий между ними в способности подавлять образование липидных перекисей в микросомах. Возможное объяснение этого факта вкладом  $\gamma$ -токоферола, обладающего высокой антирадикальной активностью и незначительной биологической эффективностью, согласуется с данными других исследователей [4, 10].

Результаты оценки усвояемости витамина Е из концентрата природных токоферолов по сравнению с контролем (синтетический препарат) представлены на рис. 2 и 3. Содержание животных на недостаточной по витамину Е диете в течение 2 мес приводило к почти полному исчезновению токоферола из тканей. При введении в рацион концентрата природных токоферолов в дозе 100 МЕ на 1 кг диеты накопление токоферола тканями не отличалось от такового синтетического DL- $\alpha$ -токоферола (печень, сердце, легкие) или даже превышало его (почки, мозг, жировая ткань). Повышение дозы концентрата до 250 МЕ  $\alpha$ -токоферола на 1 кг диеты приводило к незначительному возрастанию содержания витамина (по сравнению с дозой 100 МЕ на 1 кг) в печени и легких и к снижению его в почках, мозге, сердце и жировой ткани. При введении в рацион концентрата токоферолов в эмульгированной форме отмечалась сниженная усвояемость витамина во всех тканях, причем особенно этот эффект был выражен в группе животных, получавших дозу 100 МЕ/кг. Этот факт свидетельствует о предпочтительности использования для кормления животных концентрата токоферолов в исходной, а не эмульгированной форме.

Сравнение полученных значений содержания витамина Е в различных тканях с данными других авторов [10] обнаруживает совпадение результатов в отношении печени и сердца и некоторые различия при анализе остальных тканей, связанные, возможно, с отличиями использовавшихся рационов.

Результаты исследования микровязкости липидной фазы микросомальных мембран представлены на рис. 4. Известно, что  $\alpha$ -токоферол способен стабилизировать структуру липидного бислоя путем специфического физико-химического взаимодействия между

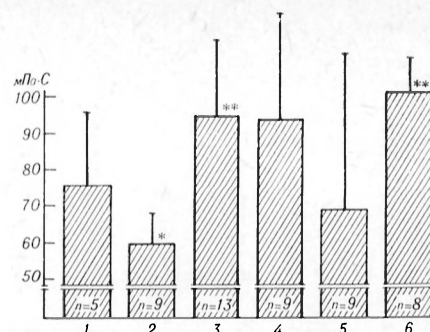


Рис. 4. Микровязкость липидной фазы микросомальных мембран.

Одна звездочка  $P < 0,1$ , две —  $P < 0,05$ , три —  $P < 0,01$ .

фитильной боковой цепью токоферола и ацильными остатками полиненасыщенных фосфолипидов [12, 13, 16]. Результатом такого взаимодействия являются упорядочение жидко-кристаллической структуры липидного матрикса мембраны [2] и более плотная упаковка углеводородных цепей [6], что ведет к изменению микровязкости гидрофобной зоны мембраны. Это подтверждается, например, работой Ю. В. Архипенко и соавт. [1], обнаруживших по коэффициенту распределения стабильного иминоксильного радикала уменьшение жидкостности липидной фазы мембран саркоплазматического ретикулула при встраивании  $\alpha$ -токоферола. В настоящем исследовании оценка микровязкости гидрофобной зоны микросомальных мембран по степени эксимеризации пирена также выявила влияние обеспеченности организма витамином Е на вязкость липидной фазы. В условиях дефицита витамина Е микровязкость мембран была достоверно ниже контроля. В то же время содержание животных на трех из четырех рационов, включавших добавки концентрата токоферолов, привело к повышению микровязкости по сравнению с таковой животных группы, получавшей DL- $\alpha$ -токоферол. Такой эффект концентрата, по-видимому, может быть связан с наличием в нем  $\gamma$ -токоферола, способного накапливаться в тканях в условиях непрерывного поступления его с пищей [10]. В целом полученные количественные данные полностью укладываются в диапазон значений микровязкости липидного слоя клеточных и субклеточных мембран,

приводимый Ю. А. Владимировым и соавт. [5].

Таким образом, проведенное *in vitro* исследование антиокислительной активности и биологической эффективности концентрата токоферолов из нового природного источника наряду с анализом его усвояемости *in vivo* выявило не уступающие чистому препарату DL- $\alpha$ -токоферола и даже более высокие качества, оправдывающие дальнейшие усилия по совершенствованию производства концентрата, изучению его изомерного состава и физико-химических свойств, медико-биологической оценке на лабораторных и сельскохозяйственных животных.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Архипенко Ю. В., Добринина С. К., Каган В. Е. и др. — Биохимия, 1977, т. 42, № 8, с. 1525—1531.
2. Архипенко Ю. В., Каган В. Е., Козлов Ю. П., Ритов В. Б. — В кн.: Патология мембранной проницаемости. М., 1975, с. 13—15.
3. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. М., 1975, с. 14.
4. Бурлакова Е. Б., Алесенко А. В., Молочкина Е. М. Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте. М., 1975, с. 35.
5. Владимиров Ю. А., Рошупкин Д. И., Потапенко А. Я., Деев А. И. Биофизика, М., 1983, с. 45; 117.
6. Иванов И. И., Каган В. Е., Добринина С. К., Козлов Ю. П. — В кн.: Актуальные проблемы витаминологии. М., 1978, т. 1, с. 64—66.
7. Надиров Н. К. Токоферолы (витамины группы Е) — биологически активные вещества. М., 1981, с. 56.
8. Надиров Н. К., Морозов В. С., Сафронова Н. П., Хафизов Р. Х. — В кн.: Витамины. Киев, 1975, вып. 8, с. 150—154.
9. Bieri J. G. — In: Lipid Chromatographic Analysis / Ed. G. V. Marinetti. New York, 1969, p. 459—478.
10. Bieri J. G., Poukka Evarts R. — Amer. J. clin. Nutr., 1974, vol. 27, p. 980—986.
11. Burton G. W., Le Page Y., Gabe E. J., Ingold K. U. — J. Amer. chem. Soc., 1980, vol. 102, p. 7791—7792.

12. Giasuddin A. S., Diplock A. T. — Arch. Biochem., 1979, vol. 196, p. 270—280.
13. Giasuddin A. S., Diplock A. T. — Ibid., 1981, vol. 210, p. 348—362.
14. Gornall A. G., Bardawill C. J., David M. M. — J. biol. Chem., 1949, vol. 177, p. 751—761.
15. Hicks M., Gebicki J. M. — Arch. Biochem., 1981, vol. 210, p. 56—63.
16. Lucy J. A. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1972, vol. 203, p. 4—11.
17. Parodi P. W. — Aust. J. Dairy Technol., 1965, vol. 20, p. 6—9.
18. Placer Z. A., Cushman L. L., Johnson B. C. — Analyt. Biochem., 1966, vol. 16, p. 359—364.
19. Rao A. M., Singh U. C., Rao C. N. R. — Biochim. biophys. Acta, 1982, vol. 711, p. 134—137.
20. Roders M. K., Glende E. A., Recknagel R. O. — Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol., 1976, vol. 15, p. 393—396.
21. Singh S., Bhaskar K. R., Rao C. N. R. — Canad. J. Chem., 1966, vol. 44, p. 2657—2662.

Поступила 26.12.84

#### THE ANTIOXIDANT ACTIVITY AND ACCUMULATION IN TISSUES OF TOCOPHEROLS OBTAINED FROM A NEW NATURAL SOURCE

N. K. Nadirov, E. G. Lenskaya, S. E. Sagindykova, Zh. U. Tokmurzin, B. B. Aidarkhanov

Kazakh Branch of the Institute of Nutrition, Academy of Medical Sciences of the USSR, Alma-Ata

Properties of a tocopherol concentrate, obtained from side products of cotton oil treatment containing  $\alpha$ -tocopherol and other isomers of vitamin E and carotinoids at high concentrations, were studied *in vivo* and *in vitro*. The concentrate exhibited higher antioxidative activity in reaction with 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazine and inhibited lipid peroxidation in liver microsomes similarly to synthetic  $\alpha$ -tocopherol. After addition of the concentrate to rat ration at a dose of 100 IU of vitamin E per 100 g of food the animals accumulated tocopherol from this source in the same way as it was observed for the synthetic preparation (liver, heart, lung) or at the higher level (kidney, brain, fatty tissue). Consumption of the concentrate was decreased after its emulsification. Contribution of  $\gamma$ -tocopherol to anti-radical effect of the tocopherol concentrate and to stabilization of the membrane lipid moiety is discussed.

УДК 616.98:579.14]-07:616.008.939.15-02:615.324:638.124.48

Л. Б. Оконенко

#### ПРОПОЛИС КАК ИНГИБИТОР СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПРИ САЛЬМОНЕЛЛЕЗЕ

ЦИНИЛ Алма-Атинского медицинского института

Доказано разрушающее действие на мембраны клеток вторичных и печеночных продуктов свободнорадикаль-

ного окисления (СРО) липидов [2]. Резистентность клеточных мембран зависит от активности антиоксидантной

системы, соотношения фракций фосфолипидов, активности фосфолипаз, содержания лизофосфолипидов и других факторов, препятствующих или способствующих токсическому действию промежуточных продуктов СРО.

Сальмонеллезный эндотоксин снижает оксигенацию тканей, взаимодействует с фосфолипидным бислоем плазматических мембран кишечного эпителия, способствует накоплению лизофосфолипидов [9, 14]. Повышение концентрации перекисей найдено в первые 2 дня после введения мышам эндотоксина сальмонелл [6]. Развитие инфекции обусловлено влиянием не только эндо-, но и энтеротоксина, токсическим действием некоторых ферментов [1]. Перечисленный комплекс действующих начал может вызывать значительные изменения скорости СРО липидов, чрезмерное накопление промежуточных продуктов. Исследование СРО в динамике — важное условие дифференциальной терапии [3].

В настоящей работе изучено содержание промежуточных продуктов перекисного окисления липидов у мышей, зараженных сальмонеллезом, активность антиокислительных ферментов до и после введения прополиса. Прополис содержит природные флавоноиды, обладающие антиокислительными свойствами [11].

#### Методика

Инфекционный процесс вызывали у мышей массой тела 10—15 г путем введения 0,1 мл взвеси  $5 \cdot 10^6$  живых микробных тел сальмонеллы тифимуриум. Животных декапитировали через 6, 24 ч и 7 дней после введения микробной культуры. Контролем являлись мыши, содержащиеся в обычных виварных условиях. Животные получали прополис через 1 ч после заражения по 2 мг. О степени СРО судили по содержанию гидроперекисей липидов и малонового диальдегида (МДА) [2, 5, 7]. Со-

держание МДА выражали в нмоль на 1 мг белка, гидроперекисей — в условных единицах, соответствующих  $\Delta E$  на 100 мг белка.

Из антиоксидантных ферментов определяли активность супероксиддисмутазы (СОД) и ее изоферментов [6, 10], каталазы [12], глутатионпероксидазы [15] и глутатионредуктазы [13]. Активность каталазы выражали в виде разности десятичных логарифмов концентрации перекиси водорода в пробе до и после 1 мин инкубации в расчете на 1 г ткани. Активность глутатионпероксидазы выражали в мкмоль на 1 г ткани, глутатионредуктазы — в мкмоль НАД на 1 г ткани, СОД — в условных единицах на 1 г ткани.

#### Результаты и обсуждение

Содержание гидроперекисей липидов увеличивалось в печени животных через 6 ч после заражения (табл. 1). Их количество возрастало и в более поздние сроки, достигая максимальных значений через неделю. Концентрация МДА превосходит таковую у интактных мышей только через 7 дней после инфицирования. Повышение уровня гидроперекисей в 1-е сутки после попадания возбудителя в организм и отсутствие изменений со стороны МДА может зависеть от скорости синтеза или распада диальдегида [8].

Активность СОД (Zn, Cu-зависимой) проявляла тенденцию к снижению в первый период исследования, статистически достоверное уменьшение найдено через сутки. При исследовании глутатионпероксидазы отмечались аналогичные изменения: ее активность была ниже контрольных значений через 6 и 24 ч. Активность каталазы существенно не менялась, то же было характерно для глутатионредуктазы в первый и последний сроки наблюдения. Через 24 ч выявлялась активация фермента в 1,5 раза (табл. 2).

Таким образом, в течение 1-х суток в печени зараженных животных на-

Таблица 1

Влияние сальмонеллеза и прополиса на содержание гидроперекисей липидов и малонового диальдегида в печени мышей

Показатель	Условия опыта	Интактные животные	Время после введения сальмонелл		
			6 ч	24 ч	7 дней
Гидроперекиси, усл. ед. на 1 мг белка	Без прополиса	13,7±1,44	29,7±2,30*	34,0±2,47*	50,5±5,77*
	С прополисом	—	22,2±3,20*	27,1±2,16*	14,7±0,51
МДА, нмоль на 1 мг белка	Без прополиса	7,83±0,76	7,75±0,98	6,20±0,86	11,6±0,46*
	С прополисом	—	—6,03±0,60	3,44±0,31	6,06±0,31

Примечание. Здесь и в табл. 2 звездочкой отмечены значения, статистически достоверно отличающиеся от интактного контроля.



## Влияние сальмонеллеза и прополиса на активность антиокислительных ферментов в печени

Время после заражения	Группа животных	СОД, усл. ед. на 1 г ткани	Каталаза, усл. ед. на 1 г ткани	Глутатионредуктаза, мкмоль на 1 г ткани в 1 мин	Глутатионпероксидаза, мкмоль на 1 г ткани в 1 мин
—	Интактные	3452±349	886±38,5	52,7±5,60	46,8±4,40
6 ч	Зараженные	2368±480 (69)	979±117 (111)	50,7±8,10 (96)	30,7±4,50* (66)
	Леченные прополисом	4744±607 (137)	1508±122* (170)	75,8±9,18* (144)	49,4±6,10 (106)
24 ч	Зараженные	2166±179 (63)	867,7±39,6 (98)	79,0±8,50* (150)	26,4±3,90 (56)
	Леченные прополисом	4829±622 (140)	1324±280 (150)	42,0±5,50 (80)	28,5±3,16* (61)
10 дней	Зараженные	2630±375 (76)	859±26,6 (97)	59,6±11,30 (113)	59,6±7,52 (127)
	Леченные прополисом	2826±349 (82)	1164±99,9* (131)	64,5±10,70 (122)	45,5±7,80 (97)

П р и м е ч а н и е. В скобках приведены значения, выраженные в процентах по отношению к интактному контролю.

капливались только гидроперекиси липидов, количество МДА оставалось в пределах нормы. Снижение активности СОД и глутатионпероксидазы способствует повышению уровня гидроперекисей; работа систем, поддерживающих нормальное содержание МДА, в этот период еще не нарушена. В последующем активность ферментов стабилизируется, а уровень продуктов СРО остается повышенным. При ферментативном разрушении перекисей расходуются компоненты антирадикальной цепи — восстановленные никотинамидные коферменты, глутатион, аскорбиновая кислота, полифенолы [4], т. е. антиокислители неферментной природы. Недостаточность их в организме способствует интенсификации СРО липидов.

В качестве антиоксиданта, как уже было сказано, применен прополис. У мышей, получавших этот препарат, концентрация гидроперекисей в течение суток поддерживалась на уровне, характерном для нелеченых животных. Через 7 дней после микробного воздействия их содержание не отличалось от такового у здоровых животных. Количество МДА, сниженное через сутки, проявляло тенденцию к нормализации через неделю (см. табл. 1).

Антиоксидантные ферменты вели себя неоднозначно: в 1-е сутки активировалась СОД на 40 %, на столько же понизилась активность глутатионпе-

роксидазы. В дальнейшем уровень ферментов стабилизировался. Высокая активность каталазы сохранялась весь период наблюдения (увеличение в 1,7, 1,5 и 1,3 раза соответственно).

Активность глутатионредуктазы, возрастающая в первый срок после заражения животных, возвращается к исходному состоянию через 24 ч и остается на этом уровне через неделю (см. табл. 2).

Разовое введение прополиса не нормализует содержания гидроперекисей. Более длительное его применение поддерживает накопление этих промежуточных продуктов СРО. Активность антиокислительных ферментов в это время либо не отличается от таковой у здоровых мышей, либо превосходит ее.

Активация СОД при введении прополиса может рассматриваться как реакция, направленная на защиту клеточных мембран от окислительной деструкции супероксидным анионом, синглетным кислородом и образующимися гидроперекисями.

Все вышесказанное подтверждает возможность использования прополиса в качестве антиоксиданта при сальмонеллезе. Целесообразность его применения при данной инфекции вытекает также из того, что прополис, подавляя рост патогенной микробной флоры, не действует на развитие нормальной кишечной палочки.

1. Блюгер А. Ф., Новицкий И. П., Теребкова З. Ф. Сальмонеллез. Рига, 1975, с. 327.
2. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972.
3. Волкова Л. П., Бондаренко М. И., Северин Н. Ф. — Врач. дело, 1981, № 12, с. 35—38.
4. Воскресенский О. П., Жутаев И. А., Бобырев В. И., Безуглый Ю. В. — Вопр. мед. химии, 1982, № 1, с. 14—28.
5. Гаврилова В. Б., Мишкорудная М. И. — Лаб. дело, 1983, № 3, с. 33—36.
6. Дубинина Е. Е., Сальникова Л. А., Ефимова Л. Ф. — Там же, № 10, с. 30—33.
7. Дудник Л. Б., Биленко М. В., Алиенко А. В. и др. — Бюл. exper. биол., 1980, № 5, с. 556—558.
8. Панченко Л. Ф., Герасимов А. М., Ноздрачева Л. И., Корякина Г. А. — Вопр. мед. химии, 1974, № 3, с. 321—325.
9. Покровский В. И., Килессо В. А., Ющук П. Д. — Сов. мед., 1981, № 5, с. 3—8.
10. Чумаков В. П., Осинская Л. Ф. — Вопр. мед. химии, 1977, № 5, с. 712—716.
11. Ушколова В. Н., Мурыхнич Т. П. — В кн.: Ценный продукт пчеловодства: прополис. Бухарест, 1975, с. 60—62.
12. Beers R. F., Sizer J. W. — J. biol. Chem., 1952, vol. 195, p. 195—199.
13. Carlberg J., Mannervi K. — Ibid., 1975, vol. 250, p. 5475—5480.
14. Frank K. L., Roberts R. J. — Toxicol. appl. Pharmacol., 1979, vol. 50, p. 371—380.
15. Mills G. S. — J. biol. Chem., 1959, vol. 234, p. 502—506.
16. Sakaguchi S., Kanda N., Hsu C. C., Sakaguchi O. — Microbiol. a. Immunol., 1981, vol. 25, p. 229—244.

Поступила 22.01.85

# PROPOLIS AS AN INHIBITOR OF LIPID FREE-RADICAL OXIDATION IN SALMONELLOSIS

L. B. Okonenko

Central Research Laboratory, Medical School, Alma-Ata

Lipid peroxidation was activated in salmonellosis. Content of hydroperoxides and malonic dialdehyde was increased in mice liver tissue. At the same time, the activity of antioxidative enzymes was altered. Continuous administration of propolis stabilized lipid peroxidation, thus suggesting that the substance could be used as a drug in medicine.

УДК 612.351.11+612.351.1:577.112.384.4].015:6:577.161.3

Д. Н. Яхнина, И. И. Агабекова

## ВЛИЯНИЕ $\alpha$ -ТОКОФЕРОЛА НА ОБМЕН ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ И СОДЕРЖАНИЕ НИКОТИНАМИДНЫХ КОФЕРМЕНТОВ В ГЕПАТОЦИТАХ

Кафедра биоорганической и биологической химии Таджикского медицинского института, Душанбе

Ранее было показано, что предварительное введение  $\alpha$ -токоферола оказывает протекторное влияние при кислородной недостаточности. При этом было обнаружено, что активность глутаматдегидрогеназы (ГДГ; КФ 1.4.1.2) в печени крыс, получивших  $\alpha$ -токоферол до воздействия гипоксии, возрастает в большей степени, чем у животных, подвергнутых гипоксии без предварительного введения  $\alpha$ -токоферилацетата [7, 8].

В связи с этим при выяснении механизма протекторного эффекта  $\alpha$ -токоферола представляло интерес исследование некоторых показателей обмена глутаминовой кислоты и изменений в содержании никотинамидных коферментов при введении  $\alpha$ -токоферола в оптимальной дозе, оказывающей протекторное действие, и при введении его избытка (в дозе, в 10 раз превышающей оптимальную).

## Методика

Опыты проведены на белых беспородных крысах-самках массой 160—200 г, содержащихся на стандартном рационе вивария.  $\alpha$ -Токоферилацетат («Эрввит», Чехословакия) вводили внутримышечно в растворе вазелинового масла по 30 мг на 1 кг массы тела в одной серии опытов и по 300 мг на 1 кг массы тела в другой серии. Животных умерщвляли декапитацией через 24 ч после введения  $\alpha$ -токоферола. Гомогенаты печени готовили на 0,25 М растворе сахарозы с добавлением 0,001 М ЭДТА и фракционировали методом дифференциального центрифугирования [2]. В выделенных фракциях исследовали активность ГДГ и трансаминафераз. Активность ГДГ определяли спектрофотометрически, измеряя скорость восстановительного аминирования  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты и окислительного дезаминирования глутаминовой кислоты. Состав инкубационной среды для первой реакции: 0,1 М фосфатный буфер pH 7,8,  $\alpha$ -кетоглутарат  $16 \cdot 10^{-4}$  М; НАДН  $5 \cdot 10^{-2}$  М;  $\text{NH}_4\text{Cl}$   $5 \cdot 10^{-2}$  М, ЭДТА  $5 \cdot 10^{-5}$  М; объем 3 мл. Состав инкубационной среды для второй реакции: 0,1 М фосфатный буфер pH 7,8, глутаминовая кислота  $5 \cdot 10^{-2}$  М;

Т а б л и ц а 1

Влияние введения  $\alpha$ -токоферилацетата на активность ГДГ (в мкмоль/мин на 1 г ткани) в реакциях окислительного дезаминирования и восстановительного аминирования

Объект исследования	Контроль (10)	$\alpha$ -Токоферилацетат, 30 мг/кг (9)	$\alpha$ -Токоферилацетат, 300 мг/кг (9)
Окислительное дезаминирование:			
гомогенат	$3,15 \pm 0,27$	$3,02 \pm 0,21$	$2,30 \pm 0,48$
митохондрии	$2,86 \pm 0,31$	$2,74 \pm 0,29$	$1,97 \pm 0,28$
надмитохондриальная фракция	$0,60 \pm 0,11$	$0,58 \pm 0,07$	$0,84 \pm 0,09$
Восстановительное аминирование:			
гомогенат	$6,07 \pm 0,40$	$5,93 \pm 0,62$	$8,95 \pm 0,63$ $p < 0,01$
митохондрии	$7,52 \pm 0,62$	$7,08 \pm 0,81$	$15,74 \pm 1,32$ $p < 0,01$
надмитохондриальная фракция	$0,40 \pm 0,05$	$0,31 \pm 0,03$	$0,32 \pm 0,03$

П р и м е ч а н и е. В табл. 1—3 в скобках — количество определений.

НАД<sup>+</sup>  $1 \cdot 10^{-4}$  М, ЭДТА  $5 \cdot 10^{-5}$  М; объем 3 мл. Активность аспартат- и аланинаминотрансферазы (АСТ и АЛТ; КФ 2.6.1.1, КФ 2.6.1.2) определяли описанным методом [12]. В ткани печени исследовали содержание никотинамидных коферментов [13], молочной и пировиноградной кислот [10]. Вычисляли отношение НАД<sup>+</sup>/НАДН в лактатдегидрогеназной реакции [14]. Данные обрабатывали статистически [1].

### Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены результаты исследования активности ГДГ в реакциях окислительного дезаминирования и восстановительного аминирования через 24 ч после введения  $\alpha$ -токоферилацетата в дозе 30 и 300 мг на 1 кг массы животного. Из этих данных видно, что введение  $\alpha$ -токоферола в дозе 30 мг/кг не влияло на активность ГДГ ни в одной из этих реакций. Введение  $\alpha$ -токоферилацетата в дозе 300 мг/кг привело к значительному увеличению активности ГДГ во фракции митохондрий и за счет этого в гомогенате,

в реакции восстановительного аминирования  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты, а также к отчетливой тенденции к снижению скорости окислительного дезаминирования. Обнаруженные изменения активности ГДГ могут быть обусловлены, по-видимому, сдвигами в концентрации эндогенных субстратов и окислительно-восстановительного потенциала.

Из данных, суммированных в табл. 2, видно, что если после введения  $\alpha$ -токоферилацетата в дозе 30 мг/кг появлялась лишь тенденция к снижению содержания НАД<sup>+</sup>, то после его введения в дозе 300 мг/кг уровень НАД<sup>+</sup> уменьшался вдвое. Особенно отчетливо зависимость действия  $\alpha$ -токоферола от дозы сказывалась на содержании НАДФН. При дозе 30 мг/кг количество НАДФН снижалось в 2 раза, вследствие этого падала суммарная концентрация восстановленных нуклеотидов и возрастало отношение

Т а б л и ц а 2

Влияние введения  $\alpha$ -токоферилацетата на содержание никотинамидных коферментов (в мкг на 1 г ткани) пировиноградной и молочной кислот (в нмоль на 1 г ткани) в печени крыс

Показатель	Контроль (12)	$\alpha$ -Токоферилацетат, 30 мг/кг (6)	$\alpha$ -Токоферилацетат, 300 мг/кг (6)
НАД <sup>+</sup>	$338 \pm 14$	$268 \pm 31$	$164 \pm 28$ $p < 0,05$
НАДН	$165 \pm 16$	$148 \pm 20$	$144 \pm 13$
НАДФН	$253 \pm 22$	$123 \pm 24$ $p < 0,05$	$397 \pm 44$ $p < 0,05$
Молочная кислота	$919 \pm 64$	$861 \pm 75$	$1623 \pm 112$ $p < 0,05$
Пировиноградная кислота	$152 \pm 14$	$130 \pm 26$	$174 \pm 28$
НАД <sup>+</sup> /НАДН (ЛДГ)	$1490 \pm 98$	$1360 \pm 112$	$966 \pm 97$ $p < 0,05$



Активность АСТ и АЛТ (в мкмоль пирувата в 1 мин на 1 г ткани) в печени крыс при введении  $\alpha$ -токоферилацетата

Объект исследования	Контроль (10)	$\alpha$ -Токоферилацетат, 30 мг/кг (10)	$\alpha$ -Токоферилацетат, 300 мг/кг (10)
АСТ:			
гомогенат	10,8 $\pm$ 0,3	11,2 $\pm$ 0,8	8,1 $\pm$ 0,4 $p < 0,01$
митохондрии	5,4 $\pm$ 0,4	6,1 $\pm$ 0,7	2,9 $\pm$ 0,3 $p < 0,01$
надмитохондриальная фракция	4,1 $\pm$ 0,4	5,4 $\pm$ 0,5	3,8 $\pm$ 0,4
АЛТ:			
гомогенат	13,0 $\pm$ 0,6	11,5 $\pm$ 1,0	7,4 $\pm$ 0,8 $p < 0,01$
митохондрии	2,0 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,3	2,2 $\pm$ 0,3
надмитохондриальная фракция	10,1 $\pm$ 1,0	9,2 $\pm$ 1,1	5,6 $\pm$ 0,6 $p < 0,01$

НАДН/НАДФН. Введение  $\alpha$ -токоферилацетата в дозе 300 мг/кг приводило, напротив, к повышению содержания НАДФН и уменьшению отношений НАДН/НАДФН и НАД<sup>+</sup>/НАДН.

Под влиянием избытка  $\alpha$ -токоферола возрастало содержание молочной кислоты и вследствие этого уменьшалось в 1,5 раза отношение свободных НАД<sup>+</sup>/НАДН в цитозоле.

В гепатоцитах в физиологических условиях равновесие обратимой реакции, катализируемой ГДГ, значительно сдвинуто в сторону образования глутаминовой кислоты. Под влиянием избытка  $\alpha$ -токоферола скорость потребления  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты в реакции восстановительного аминирования возрастала, что не могло не отразиться на скорости реакций трансаминирования.

Исследование активности АСТ и АЛТ в гомогенате печени и его фракциях показало, что если при введении  $\alpha$ -токоферилацетата в дозе 30 мг/кг активность ферментов трансаминирования существенно не изменялась, то введение избытка  $\alpha$ -токоферола приводило к снижению активности АСТ в митохондриальной фракции в 1,9 раза и к уменьшению активности АЛТ в надмитохондриальной фракции в 1,8 раза (табл. 3). Эти изменения отчетливо коррелировали с повышением активности ГДГ в реакции восстановительного аминирования  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты.

Учитывая сопряженность активности ГДГ с трансаминаферазами и их роль в регуляции отношения НАД<sup>+</sup>/НАДН в митохондриях, можно предположить, что изменения активности

исследованных ферментов при введении избытка  $\alpha$ -токоферола могут быть связаны с выявленными изменениями в содержании и соотношении никотинамидных коферментов.

В физиологических условиях функционирование малат-аспартатного челночного механизма обеспечивает поступление восстановительных эквивалентов из цитозоля в митохондрии, в которых в результате их окисления образуется НАДН. Полученные результаты свидетельствуют, что после введения  $\alpha$ -токоферола в дозе 30 мг/кг, оказывающей протекторное влияние при гипоксии, направленность потока восстановительных эквивалентов сохраняется. Вместе с тем ранее нами было обнаружено, что под влиянием этой дозы  $\alpha$ -токоферола в гомогенатах печени крыс снижается потребление кислорода и повышается активность фосфолипазы А [8]. По всей вероятности, эти изменения в большей степени могут быть выражены после введения значительного избытка  $\alpha$ -токоферола.

Повышение скорости восстановительного аминирования  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты является одним из механизмов, приводящих к снижению потребления кислорода, поскольку при этом уменьшается доля  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты, окисляемой в цикле трикарбоновых кислот. Увеличение активности ГДГ в реакции восстановительного аминирования свидетельствует также и о том, что при этом в митохондриях не накапливается НАДН, который является ингибитором ГДГ.

Повышение содержания НАДФН на

фоне уменьшения содержания окисленного НАД, наблюдающееся при введении избытка  $\alpha$ -токоферола, может быть связано с усилением биосинтеза НАДФ под действием НАД-киназы. Это предположение основано на работах, в которых было показано, что нагрузка организма токоферолом сопровождается накоплением в печени крыс АТФ, лимитирующим скорость синтеза НАДФ [4, 6]. Однако нельзя исключить и возможную активацию трансгидрогеназной реакции, смещающей систему никотинамидных кофакторов в сторону более высокого содержания НАДФН, а также активацию ферментов, катализирующих распад окисленного НАД [3, 5]. Существует определенная связь между обеспеченностью токоферолом и отношением НАД<sup>+</sup>/НАДН в митохондриях [9]. В наших опытах отчетливо выявилась зависимость содержания НАД<sup>+</sup> и НАДФН в ткани печени от дозы введенного токоферола.

Увеличение содержания НАДФН четко коррелирует с изменениями активности ГДГ, трансаминафераз, величиной отношения свободных НАД<sup>+</sup>/НАДН в цитозоле и является, по-видимому, отражением сдвигов, развивающихся под влиянием  $\alpha$ -токоферола в мембранных структурах.

Сведения о влиянии  $\alpha$ -токоферола на состояние мембран [11] и анализ собственных данных позволяют предположить, что при введении  $\alpha$ -токоферола происходит изменение проницаемости мембран для определенных субстратов, следствием которого являются изменения окислительно-восстановительного потенциала клетки. Зависимость выраженности и направленности сдвигов от дозы вводимого  $\alpha$ -токоферола свидетельствует о необходимости подбора его оптимальных доз для практического применения.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Монцевичуте-Эрингене Е. Н. — Пат. физиол., 1964, № 4, с. 71—78.

2. Покровский А. А., Арчаков А. И. — В кн.: Современные методы в биохимии. М., 1968, ч. 2, с. 5—58.
3. Северин С. Е., Телепнева В. И., Цейтлин Л. А. — В кн.: Витамины. Кисв, 1974, вып. 7, с. 11—23.
4. Узбеков Г. А., Баландина Л. Л. — Вopr. мед. химии, 1967, № 1, с. 47—50.
5. Халмурадов А. Г., Пакирбаева Л. В., Чаговец Р. В. — В кн.: Витамины. Кисв, 1974, вып. 7, с. 56—74.
6. Штутман Ц. М., Кузнецова Л. М., Пархоменко Ю. Н. — В кн.: Витамины. Киев, 1975, вып. 8, с. 96—104.
7. Яхнина Д. Н., Устимова М. И., Сабурова А. М. — Пат. физиол., 1973, № 1, с. 71—74.
8. Яхнина Д. Н., Устимова М. И., Агабекова И. И., Сабурова А. М. — В кн.: Митохондрии. Аккумуляция энергии и регуляция ферментативных процессов. М., 1977, с. 52—55.
9. Carabello F. B. — Canad. J. Biochem., 1974, vol. 52, p. 679—688.
10. Hohorst H.-J. — Meth. Enzymol., 1963, p. 266—272.
11. Lucy J. A. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1972, vol. 203, p. 6—11.
12. Reitman S., Frankel S. — Amer. J. clin. Path., 1957, vol. 28, p. 56—62.
13. Slater T. F., Sawyer B., Strauli U. — Arch. int. Physiol. Biochem., 1964, vol. 72, p. 427—447.
14. Williamson D. H., Lund P., Krebs H. A. — Biochem. J., 1967, vol. 103, p. 514—527.

Поступила 30.01.85

#### EFFECT OF $\alpha$ -TOCOPHEROL ON METABOLISM OF GLUTAMIC ACID AND CONTENT OF NICOTINAMIDE COENZYMES IN HEPATOCYTES

D. N. Yakhnina, I. I. Agabekova

Chair of Bioorganic and Biological Chemistry, Medical School, Dushanbe

Activity of enzymes participating in metabolism of glutamate and content of nicotinamide nucleotides was studied in rat liver tissue within 24 hrs after intramuscular administration of  $\alpha$ -tocopheryl acetate at doses of 30 mg and 300 mg per kg of body mass. Excess of the vitamin was responsible for a decrease in the ratio NAD<sup>+</sup>/NADH in cytosol, for stimulation of glutamate dehydrogenase reaction, for a decrease of aspartate aminotransferase activity in mitochondria and of alanine aminotransferase activity in cytosol as well as for an increase of NADPH content.

## ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СИСТЕМ ДОФАМИНА И ГАМК В МОЗГЕ ЖИВОТНЫХ С РАЗЛИЧНОЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬЮ ЭТАНОЛОВОГО СНА

Отдел регуляции обмена веществ АН БССР, Гродно

Однократное введение этанола в достаточной большой дозе вызывает у животных и человека сон, продолжительность которого определяется первичной чувствительностью данного индивида к алкоголю [1]. Ввиду отсутствия выраженных различий в метаболизме этанола у недолго- и долгоспящих мышей можно предположить, что неодинаковая длительность этанолового наркоза обеспечивается за счет различного функционирования нейромедиаторных систем мозга [5]. Исследование метаболизма и активности катехоламинов у мышей, различающихся по длительности «этанолового сна», выявило некоторые особенности. Так, концентрация  $\beta$ -адренорецепторов была ниже в коре больших полушарий долгоспящих мышей, чем у недолгоспящих и животных промежуточной группы. Базальное и стимулированное через  $\beta$ -адреноблокаторы накопление цАМФ, а также плотность М-холинорецепторов у мышей этих групп не различались. Однако стимулируемая дофамином аденилатциклаза была менее активной у недолгоспящих мышей, чем у животных промежуточной группы, хотя плотность дофаминовых рецепторов у них была одинаковой. Введение этанола в большой степени угнетало оборот дофамина у долгоспящих мышей, чем у недолгоспящих животных.

Исходный уровень дофамина у них был также меньше, оборот и уровень норадреналина у этих животных не различался и не изменялся после инъекции этанола.

Влияние различных модификаторов систем катехоламинов или серотонина на длительность «этанолового сна» оказалось весьма противоречивым. Это позволило предположить, что снотворное действие алкоголя может быть опосредовано через систему ГАМК [7, 11]. В пользу этого свидетельствуют, например, опубликованные ранее данные [12] о том, что антагонисты ГАМК-рецепторов укорачи-

вают алкогольный сон. Гамма-бутиролактон удлинит «этаноловый сон» более заметно у долгоспящих мышей, чем у недолгоспящих, и более выраженно увеличивает уровень дофамина у них [6].

Нами были изучены некоторые показатели функциональной активности дофаминовых и ГАМК-нейронов у крыс с различной продолжительностью сна после введения этанола. Поскольку животные не были чистой линии, они должны быть гетерогенны по тем характеристикам, которые не оказывают влияния на первичную чувствительность к этанолу. Учитывая особую роль метаболита ГАМК — гамма-оксимасляной кислоты (ГОМК) — в регуляции парадоксальной фазы сна, которая нарушается при введении алкоголя [4], представлялось интересным изучить активность ферментов метаболизма ГАМК, приводящих к образованию ГОМК — ГАМК-амино-трансферазы (ГАМК-Т), дегидрогеназы и редуктазы янтарного полуальдегида (ЯПА-ДГ и ЯПА-редуктаза).

### Методика

Эксперименты выполняли на белых беспородных крысах самцах и самках массой 160—220 г. Продолжительность сна недолгоспящих животных после введения этанола в дозе 3,5 г/кг внутрибрюшинно в разных отборах составила 60—90 мин, у долгоспящих — 180—230 мин. Опыты проводили через 2—3 нед после отбора животных, при этом половине животных из каждой группы вводили этанол (2,5 г/кг, внутрибрюшинно), половине — воду (контрольная группа). Через 1 ч животных декапитировали, извлекали мозг и выделяли базальные ганглии, большие полушария и ствол мозга [8], из которых выделяли синапсомы [10]. В синапсоме определяли захват  $^3\text{H}$ -дофамина (фирма NEN, США; удельная активность 906 ГБк/ммоль, конечная концентрация  $1 \cdot 10^{-8}$  М) или  $^{14}\text{C}$ -ГАМК (Институт изотопов АН ВНР, удельная активность 436 МБк/ммоль, конечная концентрация  $1 \cdot 10^{-5}$  М). После 5 мин (для дофамина) или 4 мин (для ГАМК) инкубации при 27 °C синапсомы отделяли от среды инкубации путем быстрой фильтрации содержимого пробирок через стекловолокнистые фильтры GF/F с вакуумным насосом. Филт-



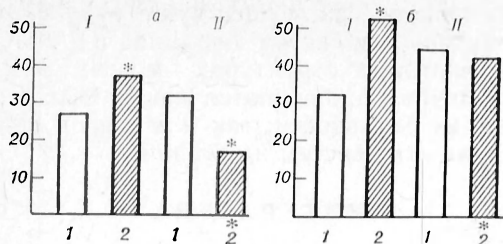


Рис. 1. Захват <sup>3</sup>H-дофамина (а) (в пмоль на 1 мг белка в 1 мин) и <sup>14</sup>C-ГАМК (б) (в пмоль на 1 мг белка в 1 мин) в базальных ганглиях мозга долго- (I) и недолгоспящих (II) крыс.

Здесь и на рис. 2 и 3 1 — контроль; 2 — этанол (2,5 г/кг, внутривенно 1 ч); 3 — звездочка сверху —  $P < 0,05$  между контролем и этанолом, звездочка снизу —  $P < 0,05$  между показателями долго- и недолгоспящих животных.

ры с осажденными на них синапсами трижды промывали охлажденной средой инкубации (для дофамина) или средой инкубации при комнатной температуре (для ГАМК), затем их высушивали, помещали во флаконы, добавляли по 7 мл сцинтиллятора и измеряли радиоактивность на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Mark-11». Специфический захват определяли по разности радиоактивности пробы, содержащей только метку, и пробы, содержащей соответствующую метку и 0,1 мМ немеченого дофамина или 1 мМ немеченой ГАМК.

Активность ГАМК-Т (КФ 2.6.1.19) находили в гомогенатах тканей флуориметрическим методом [16] с 3,5-диаминобензойной кислотой, любезно предоставленной нам фирмой «Koch—Light Lab. Ltd.» (Англия). Калибровочную кривую для определения количества образовавшегося продукта строили по стандартным растворам янтарного полуальдегида, флуориметрию осуществляли на флуориметре «Aminco—Bowman». Активность ЯПА-ДГ (КФ 1.2.1.16) определяли в гомогенатах тканей [15], ЯПА-редуктазы — в цитозоле [17]. Субстратом для обоих ферментов и стандартом для калибровки при выявлении ГАМК-Т служил ЯПА, получаемый из его предшественника диформилсукцината («Calbiochem Behring Ltd»). Белок находили по Лоури и соавт. [14]. Оценку достоверности

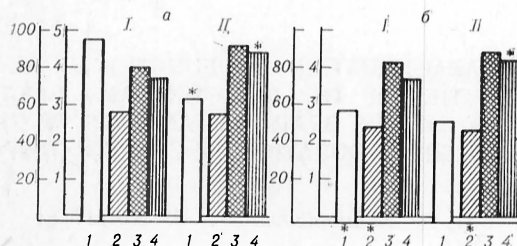


Рис. 2. Показатели захвата и метаболизма ГАМК в больших полушариях мозга долго- (а) и недолгоспящих (б) крыс.

Здесь и на рис. 3 1 — контроль, II — этанол, 1 — захват <sup>14</sup>C-ГАМК (в пмоль на 1 мг белка в 1 мин); 2 — ГАМК-Т (в пмоль на 1 мг белка в 1 ч); 3 — ЯПА-редуктаза (в пмоль на 1 мг белка в 1 мин); 4 — ЯПА-ДГ (в пмоль на 1 мг белка в 1 мин).

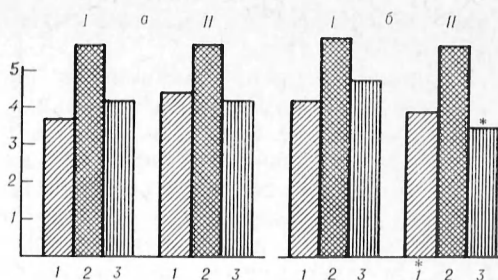


Рис. 3. Показатели метаболизма ГАМК в стволе мозга долго- (а) и недолгоспящих (б) крыс.

1 — ГАМК-Т; 2 — ЯПА-редуктаза; 3 — ЯПА-ДГ.

различий производили по критерию Вилкоксона — Манна — Уитни [2].

## Результаты и обсуждение

У интактных животных показатели захвата меченого дофамина в базальных ганглиях достоверно не различались. После введения этанола у долго-спящих животных происходит увеличение захвата медиатора, а у недолгоспящих — резкое его снижение, в результате чего разница между показателями становится достоверной (рис. 1).

Захват <sup>14</sup>C-ГАМК в базальных ганглиях у этих групп без нагрузки этанолом достоверно не различается, а после нагрузки увеличивается только у долго-спящих животных, поэтому различие становится достоверным.

В больших полушариях мозга картина несколько иная. Без нагрузки захват ГАМК у недолгоспящих крыс меньше, чем у долго-спящих, а введение этанола нивелирует это различие за счет снижения показателя долго-спящих животных. Активность ГАМК-Т меньше у недолгоспящих животных как без нагрузки, так и после введения этанола (рис. 2). Существенных различий в активности ферментов метаболизма ЯПА у животных этих групп не обнаружено. Введение этанола приводит через 1 ч к некоторой активации окисления ЯПА у животных обеих групп, тогда как активность ЯПА-редуктазы не различается у этих групп и не меняется после введения этанола.

В стволе мозга различий изучаемых ферментов до нагрузки этанолом у животных этих двух групп не наблюдается, а после нагрузки активность ГАМК-Т ниже у недолгоспящих крыс.

У них же отмечается снижение активности ЯПА-ДГ (рис. 3).

Усиление различий активности систем дофамина и ГАМК в базальных ганглиях на фоне введения этанола у животных с различной чувствительностью к алкоголю согласуется с полученными ранее данными о подобном эффекте этанола на синтез и захват ГАМК, наблюдавшемся на крысах с различным отношением к потреблению алкоголя [3]. В больших полушариях различия активности ГАМК-системы проявляются у интактных животных и сохраняются отчасти после введения этанола (более низкая активность ГАМК-Т у недолгоспящих крыс), что свидетельствует о дифференцированном действии этанола в зависимости от структуры мозга. Отсутствие выраженных различий активности ферментов, метаболизирующих ЯПА, а также довольно слабое влияние этанола на эти показатели, возможно, объясняется тем, что их активность в мозге в норме значительно превышает количество доступного субстрата. Лимитирующим этапом в этом шунте является ГАМК-Т. Кроме того, эти данные свидетельствуют в пользу опосредованного системного влияния этанола на процессы развития сна, а не прямого его воздействия на ферменты метаболизма ГАМК, несмотря на важную роль ГАМК и ГОМК в регуляции фаз сна.

Можно предположить, что разная активность медиаторных систем у долгоспящих и недолгоспящих животных, а также различие эффектов этанола у них связаны с различиями строения нейрональных мембран. Необходимо отметить, что только во фракции синаптических мембран, но не миелина или митохондрий, обнаружены значительные изменения состава фосфолипидов у мышей после алкогольной интоксикации [13]. Применение спинных зондов для сравнения структурной упорядоченности мембран показало [9], что синаптические мембраны мозга мышей долгоспящей линии более чувствительны к дезорганизующему прямому действию этанола как *in vivo*, так и *in vitro*, хотя исходная упорядоченность этих мембран у долгоспящих и недолгоспящих мышей была одинаковой.

Следовательно, у животных, различающихся по продолжительности ал-

когольного сна, существуют различия в активности систем дофамина и ГАМК в некоторых структурах мозга. Эти различия проявляются как в исходной их активности, так и в разной реакции этих систем на этанол.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Буров Ю. В., Жуков В. Н. — Хим.-фарм. журн., 1979, № 5, с. 42—50.
2. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. Л., 1973.
3. Канунникова Н. П., Ковальчук В. Г. — Вестн АН БССР. Серия биол. наук, 1984, № 1, с. 72—74.
4. Сытинский И. А. — Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева, 1976, т. 21, № 2, с. 137—144.
5. Dibner M. D., Zahniser N. R., Wolfe B. B. et al. — Pharmacol. Biochem. Behav., 1980, vol. 12, p. 509—512.
6. Dudek B. C., Fanelli R. J. — Psychopharmacology, 1980, vol. 68, p. 89—97.
7. Eriksson K., Malchett J. A. — Advanc. exp. Med. Biol., 1975, vol. 59, p. 419—430.
8. Glowinsky J., Iversen L. — J. Neurochem., 1966, vol. 13, p. 655—669.
9. Goldstein D., Chin J. H., Lyon R. C. — In: International Society for Biomedical Research on Alcoholism. 1-st. Congress. Abstracts. München, 1982, p. 56.
10. Hajos F. — Brain Res., 1975, vol. 93, p. 485—489.
11. Kiianmaa K. — In: Animal Models in Alcohol Research. London, 1980, p. 317—322.
12. Liljequist S., Engel J. — Ibid., 1980, p. 309—315.
13. Littleton J. M., Grieve S. J., Griffiths P. J., John G. R. — Advanc. exp. Med. Biol., 1980, vol. 126, p. 7—19.
14. Lowry O. H., Rosebrough N. I., Farr A. L., Randall R. J. — J. biol. Chem., 1951, vol. 193, p. 265—275.
15. Pitts F. N., Quick C. — J. Neurochem., 1965, vol. 12, p. 893—900.
16. Salvador R. A., Albers R. W. — J. biol. Chem., 1959, vol. 234, p. 922—925.
17. Whittle S. R., Turner A. J. — Biochim. biophys. Acta, 1981, vol. 657, p. 94—105.

Поступила 24.05.85

## CHARACTERISTICS OF FUNCTIONAL ACTIVITIES OF THE DOPAMINE AND GABA SYSTEMS IN BRAIN OF ANIMALS WITH DIFFERENT DURATION OF ETHANOL NARCOSIS

N. P. Kanunnikova, V. G. Koval'chuk

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Grodno

Uptake of labelled dopamine and GABA and activities of GABA transaminase, dehydrogenase and reductase of succinic semialdehyde were studied in brain of rats with different duration of ethanol narcosis. The data obtained showed the differences in activities of the do-

pamine and GABA systems, which were not similar in different brain regions. These differences were manifested by both initial ac-

tivities (hemispheres, brain stem) and different changes of these systems after the ethanol injection (basal ganglia, hemispheres).

УДК 616.153.922-085.38.015.2:615.246.2

И. П. Андрианова, В. В. Зуевский, А. Б. Рабовский,  
М. В. Цыбульская, Ю. С. Никитин, Т. Д. Хохлова

## УДАЛЕНИЕ ЛИПОПРОТЕИДНЫХ КОМПЛЕКСОВ ХОЛЕСТЕРИНА ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИЛОХРОМОВ

II ММИ, Химический факультет МГУ

Гемо- и плазмасорбция находит все большее применение для лечения различных заболеваний. Опыт клинического применения гемосорбции с использованием неспецифических и малосмких угольных сорбентов для удаления холестерина и его атерогенных комплексов дал положительные результаты [4]. Использование высоко-специфических иммунных плазмасорбентов на атерогенные липопротеиды (ЛП) низкой и очень низкой плотности привело к быстрому обратному развитию атеросклеротических изменений у больных семейной гиперхолестеринемией [10]. Однако следует отметить, что технологические сложности приготовления иммунных сорбентов приводят к их высокой стоимости и, следовательно, к ограниченному применению в клинике. В связи с этим создание доступных сорбентов для специфического удаления холестерина и его атерогенных комплексов из крови или плазмы остается весьма актуальным.

Поскольку ЛП низкой и очень низкой плотности имеют молекулярную массу и размеры, значительно превышающие таковые других белков плазмы, представилось целесообразным выяснить возможность адсорбции ЛП на макропористых сорбентах и определить оптимальные размеры пор для эффективного и избирательного удаления этих комплексов. Попытки использовать для этой цели макропористые иониты были сделаны ранее [5]. В качестве модели макропористого материала использовали промышленные макропористые кремнеземы — силохромы [1].

### Методика

В качестве адсорбентов были использованы промышленно выпускаемые в СССР образцы

силохромов с различной структурой поверхности. Их структурные характеристики — удельная поверхность  $S$ , определенная по методу низкотемпературной адсорбции криптона или тепловой десорбции азота [6], удельный объем пор  $V$ , определенный из насыпной массы силохрома, и средний диаметр пор  $d = 4V/S$  — приведены в табл. 1.

Кроме исходных силохромов с поверхностью, покрытой силополюсными группами, в работе использовали силохром-2, модифицированный глюкозой, посредством реакции с  $\gamma$ -аминопропилтриэтоксисилоном.

Применяли плазму донорской крови, которую хранили не более 4 сут. Навеску силохрома (300 мг), высушенного при 200 °С, предварительно замачивали в 100 мМ натрий-фосфатном буфере pH 7,4, переносили в колонку (диаметр 9 мм, высота 100 мм) и промывали тем же буфером. Количество буферного раствора в адсорбенте для учета разведения плазмы определяли путем взвешивания. Плазму крови (3 мл) пропускали через колонку с помощью перистальтического насоса со скоростью 0,35 мл/мин в замкнутой системе при комнатной температуре. Адсорбцию ЛП оценивали по убыли холестерина в плазме после контакта с силохромом. Содержание холестерина определяли, как описано ранее [11] или по ферментативной реакции с холестеринэстеразой на анализаторе «Centrifichem-400». Содержание белка находили с помощью биуретового реактива [3].

Экспериментальную гиперхолестеринемию у кролика вызывали путем ежедневного скормливания 5 мл 20 % суспензии холестерина в растительном масле в течение 3—4 нед. За 3—4 нед до опыта кормление прекращали. Для проведения плазмасорбции кролику вводили нембутал (30 мг на 1 кг массы тела) и гепарин (500 ЕД на 1 кг массы тела); пор-

Т а б л и ц а 1

### Структурные характеристики силохромов

Образец силохрома	Удельная поверхность, м <sup>2</sup> /г	Удельный объем пор, см <sup>3</sup> /г	Средний диаметр пор, нм
C-120	140	1,5	43
CX-3	110	1,9	70
CX-2	74	1,8	100
CX-1,5	41	1,8	180
CX-1	28	1,9	270



Таблица 2

Снижение содержания холестерина в плазме крови кролика при плазмосорбции на силихроме CX-1,5 ( $d=190$  нм)

№ сорбции	Содержание холестерина, мг %	
	до колонки	после колонки
1	360	330
3	278	204
5	230	150
Через 15 мин после окончания операции	215	—

циями отбирали кровь (50 мл). Форменные элементы отделяли центрифугированием, плазму пропускали через колонку объемом 75 мл, заполненную силихромом CX-1,5 ( $d=180$  нм) со скоростью 1,5 мл/мин. После колонки плазму смешивали с форменными элементами и реинфузировали. Процедуру повторяли 5 раз. Всего через колонку было пропущено около 150 мл плазмы.

### Результаты и обсуждение

Кинетика адсорбции общего холестерина плазмы крови на четырех образцах силихромов и на угле ИГИ-3, применяемом в клинической практике, представлена на рис. 1. На силихроме С-120 со средним диаметром пор 43 нм адсорбции холестерина практически не происходит (кривая 1). Увеличение диаметра пор до 70 и 100 нм (кривые 3 и 4) приводит к значительной сорбции холестерина, которая существенно превышает таковую на угле ИГИ-3 (кривая 2). Дальнейшее увеличение пор до 200 нм приводит к еще большей адсорбции холестерина (кривая 5), которая уже через 30 мин составляет 66 %, в то время как уголь ИГИ-3 через 90 мин адсорбировал только 10 % холестерина.

На рис. 2 представлены данные о зависимости адсорбции общего холестерина и общего белка плазмы от размера пор силихромов. Максимальная емкость по белку была отмечена в опытах с силихромами, имевшими размер пор 70 нм, а по холестерину — с силихромом, имевшим средний размер пор 180—200 нм. Таким образом, наибольшей доступностью для белков плазмы обладает силихром CX-3 с диаметром пор 70 нм и удельной поверхностью 110 м<sup>2</sup>/г. Молекулярная

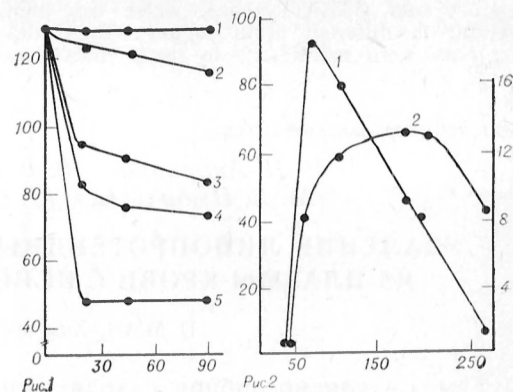


Рис. 1. Кинетика адсорбции холестерина из плазмы крови различными образцами силихромов.

По оси абсцисс — время (в мин); по оси ординат — содержание холестерина в плазме крови (в мг %). 1 — силихром С-120 ( $d=43$  нм); 2 — уголь ИГИ-3; 3, 4 и 5 — силихромы CX-3 ( $d=70$  нм), CX-2 ( $d=100$  нм) и CX-1,5 ( $d=200$  нм) соответственно.

Рис. 2. Адсорбция белка и холестерина различными образцами силихромов.

По оси абсцисс — средний диаметр пор  $d$  (в нм); по оси ординат: справа — количество адсорбированного холестерина (кривая 2, в мг на 1 г сорбента); слева — количество адсорбированного белка (кривая 1, в мг на 1 г сорбента).

масса наибольшей части белков плазмы (альбумины и глобулины) составляет  $6 \cdot 10^4$ — $1,5 \cdot 10^5$  Д, а их размеры — соответственно 7—10 нм [7]. Силихром С-120 с диаметром пор 43 нм хотя и имеет большую, чем силихром CX-3, поверхность (140 м<sup>2</sup>/г), однако ее доступность для таких белковых частиц, по-видимому, меньше, чем у образцов CX-3. При увеличении среднего диаметра пор до 100 и 200 нм емкость силихромов по белку снижается из-за заметного уменьшения их поверхности до 74 и 41 м<sup>2</sup>/г соответственно.

Величина диаметра пор 70 нм, соответствующая максимальной адсорбции белков плазмы, близка к полученной ранее величине диаметра пор 55 нм, соответствующей максимальной адсорбции сывороточного альбумина на макропористом силикагеле [2].

Практически весь холестерин плазмы включен в состав липопротеидных комплексов, молекулярная масса которых составляет  $10^6$ — $10^7$  Д, а размер — 20—70 нм [8]. Размеры ЛП в среднем в несколько раз превышают таковые других белков плазмы. Поэтому максимум на кривой зависимости адсорбции холестерина от диаметра пор для ЛП по сравнению с другими белками смещен в сторону больших значений и

соответствует 180—200 нм. На силохроме СХ-1,5 ( $d=180$  нм), обладающем максимальной емкостью по ЛП, количество адсорбированного холестерина составляло 50 % и более, тогда как для общего белка плазмы эта величина не превышала 10—12 %. Эти данные свидетельствуют об определенной избирательности силохрома СХ-1,5 к ЛП плазмы. Очевидно, такая селективность обусловлена большим размером пор силохрома СХ-1,5, одной стороны, и его малой поверхностью, с другой, — что значительно снижает нежелательную сорбцию белков плазмы. Однако даже для этого образца силохрома абсолютная величина адсорбированного белка плазмы остается большой (40 мг/г) и значительно превышает количество адсорбированного холестерина (14 мг/г).

Результаты использования силохрома СХ-1,5 для плазмосорбции у кролика с экспериментальной моделью гиперхолестеринемии, представленные в табл. 2, показывают, что за сеанс плазмосорбции уровень холестерина в плазме удалось снизить с 360 до 215 мг%, т.е. на 40 %. В ходе плазмосорбции и в послеоперационный период осложнений не наблюдалось.

Ранее было показано, что на кремнеземе, модифицированном глюкозой через  $\gamma$ -аминопропилтриэтоксисилан, снижалась адсорбция белков [9]. На силохроме СХ-2 ( $d=100$  нм), модифицированном таким образом, наблюдалось снижение адсорбции белков плазмы с 10 до 5,7 мг/г по сравнению с немодифицированным силохромом, однако адсорбция холестерина при этом уменьшилась в 1,7 раза.

Полученные результаты дают основание полагать, что направленная химическая модификация поверхности силохромов и правильный выбор селективного модификатора позволяют снизить нежелательную адсорбцию белков плазмы, сохранив или улучшив при этом свойство гемосорбентов сорбировать ЛП. Можно считать пористые материалы, в частности промышленные макропористые материа-

лы (кремнеземы — силохромы) перспективными носителями гемо- и плазмосорбентов для удаления атерогенных комплексов холестерина.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бебрис И. К., Киселев А. В., Никитин Ю. С. — Коллоид. журн., 1967, т. 29, с. 326—332.
2. Борисова М. А., Некрасов Л. И., Кобозов И. И. и др. — Журн. физ. химии, 1969, т. 43, с. 529.
3. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. М., 1971.
4. Лопухин Ю. М., Арчаков А. И., Владимиров Ю. А., Коган Э. М. Холестериноз. М., 1983, с. 300—329.
5. Мрачковская Т. А., Лейкин Ю. А. — В кн.: Современные проблемы гемосорбции и трансплантации. М., 1980, с. 39.
6. Экспериментальные методы в адсорбции и молекулярной хроматографии / Под ред. А. В. Киселева, В. П. Древинга, М., 1973.
7. Ackers G. K. — Biochemistry (Wash.), 1964, vol. 3, p. 727—735.
8. Gibbson G. F., Mitropoulos K. A., Myant N. B. Biochemistry of Cholesterol. Amsterdam, 1982.
9. Kiselev A. V., Khokhlova T. D., Nikitin Yu. S. — Chromatographia, 1984, vol. 18, p. 69—72.
10. Stoffel W., Demant T. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1981, vol. 78, p. 611—615.
11. Webster D. — Clin. chim. Acta, 1962, vol. 7, p. 272—284.

Поступила 11.01.85

#### ELIMINATION OF CHOLESTEROL LIPO-PROTEIN COMPLEXES FROM BLOOD PLASMA USING SYLOCHROMES

I. P. Andrianova, V. V. Zuevsky, A. B. Rabovsky, M. V. Tsybulskaya, Yu. S. Nikitin, T. D. Khokhlova

N. I. Pirogov II Medical School, Faculty of Chemistry, M. V. Lomonosov State University, Moscow

Industrial silicates, sylochromes, proved to be effective sorbents of cholesterol lipoprotein complexes in blood *in vitro*. Sylochrome SH-1.5 with a diameter of pores of 180-200 nm and a capacity of 12-14 mg of cholesterol per 1 g of the sorbent exhibited the best efficiency in isolation of the complexes. At the same time, maximal unspecific binding of blood plasma proteins was observed in the systems with sylochrome SH-3 with a diameter of pores of 60 nm. By use of sylochrome SH-1.5 for plasmosorption the content of cholesterol was decreased from 3,600 mg/l down to 2,150 mg/l, i. e. by 40 %, in blood plasma of a rabbit with experimental hypercholesterolemia.

О. П. Соцкий, Г. М. Саркисова, Г. А. Чухаджян, Ш. Ш. Шахбатян,  
В. Г. Паглавян, В. М. Арутюнян, Г. А. Еганян

## ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ β-N-АЦЕТИЛГЛЮКОЗАМИНИДАЗЫ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

Кафедра бионеорганической химии и факультетской терапии Ереванского медицинско-  
го института, Ереван

Гипертонию рассматривают как заболевание, развитие которого определяется нарушениями в различных системах организма [3, 15]. За последнее время при изучении патогенеза гипертонии особое внимание уделяют нарушению транспорта электролитов через клеточные мембраны. Полагают, что гипертоническая болезнь (ГБ) — мембранная патология, при которой причиной повышенной проницаемости плазматических мембран для одновалентных катионов и измененной чувствительности клеток к действию гормонов, являются сдвиги в распределении внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  [7]. Известно, что такие углеводсодержащие компоненты мембран как ганглиозиды, принимают активное участие в захвате кальция мембранами и активном транспорте ионов, в гормональной рецепции, т.е. в осуществлении тех клеточных функций, которые нарушены при данной патологии [2, 10, 14].

В этой связи большой интерес представляют исследования, в которых установлено увеличение количества оказывающих сосудосуживающее действие гликосфинголипидов (ГСЛ) [5] в тканях сосудов и крови при атеросклерозе, ишемической болезни сердца (ИБС), ГБ [8, 9, 12].

Эти данные послужили основанием для дальнейшего изучения обмена ГСЛ у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями. В настоящей работе была поставлена задача исследовать в лейкоцитах крови больных с сердечно-сосудистой патологией активность β-N-ацетилглюкозаминидазы — фермента, принимающего участие в распаде тканевых ГСЛ.

### Методика

Исследовали лейкоциты крови 58 здоровых лиц (21 мужчины и 37 женщин, из которых 18 были в возрасте от 20 до 40 лет, 40 — от 40 до 65 лет) с 57 больных (20 мужчин и 37 женщин в возрасте от 40 до 65 лет). Все

больные были подразделены на 3 группы: 1-ю составили 16 больных ГБ стадии ИБ с кризовым течением, у которых, по клиническим данным, не было почечной формы гипертонии; 2-ю — 23 больных ГБ стадии ИБ в сочетании с ИБС (коронарный атеросклероз, нарушение коронарного кровообращения, приступы стенокардии напряжения и покоя); 3-ю — 18 больных ИБС (коронарный атеросклероз, хроническое нарушение коронарного кровообращения, приступы стенокардии напряжения и покоя).

Лейкоциты были получены из венозной крови, к которой добавляли 6 % раствор ЭДТА pH 7,0. Метод выделения лейкоцитов включал в себя осаждение клеток в течение ночи при температуре  $+4^\circ\text{C}$ , отделение плазмы и лейкоцитов от эритроцитов центрифугированием при 300—600 г в течение 15—20 мин, обработку лейкоцитов 1 мл дистиллированной воды с последующим добавлением раствора тритона X-100 в конечной концентрации 0,2 %. Полученный экстракт лейкоцитов после центрифугирования использовали в качестве источника фермента.

Общую и термостабильную (В-форму) активности β-N-ацетилглюкозаминидазы определяли, как описано ранее [11]. В качестве субстрата использовали п-нитрофенил-2-ацетамидо-2-дезокс-β-D-глюкопиранозид фирмы «Sigma» (США).

Оптическую плотность окрашенных проб измеряли при 400 нм на спектрофотометре «Specord UV—VIS». Количество отщепившегося п-нитрофенола рассчитывали по калибровочному графику. Общую активность фермента и его форм (А и В) выражали в наномолях п-нитрофенола на 1 мг белка за 1 ч инкубации при  $37^\circ\text{C}$ . Относительную активность А-формы вычисляли по разности между активностью β-N-ацетилглюкозаминидазы до и после прогревания проб при  $50^\circ\text{C}$  в течение 3 ч. Белок в пробах определяли по методу [16]. Полученные данные статистически обрабатывали общепринятым методом с использованием критерия Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

Фермент β-N-глюкозаминидаза — одна из лизосомальных гидролаз, расщепляющая глюкозаминиды, имеющие нередуцирующие концевые остатки N-ацетилглюкоз- и -галактозаминов. Этот фермент представлен в большинстве тканей и тканевых жидкостях животных в виде двух основных форм — А и В, различающихся по це-



Активность  $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазы лейкоцитов крови больных сердечно-сосудистыми заболеваниями (в имолях п-нитрофенола на 1 мг белка за 1 час инкубации при 37 °C,  $M \pm m$ )

Исследуемая группа	Активность				
	общая форма	В-форма	% от общей формы	А-форма	% от общей формы
Здоровые лица в возрасте 20—40 лет	224,08 $\pm$ 6,29	59,23 $\pm$ 3,71	26,43	164,84 $\pm$ 6,29	73,56
Здоровые лица в возрасте 40—65 лет	206,38 $\pm$ 5,32	80,91 $\pm$ 2,98*	39,20	119,64 $\pm$ 4,45*	61,80
1-я	154,87 $\pm$ 8,17**	57,54 $\pm$ 3,18**	37,15	90,68 $\pm$ 3,41**	58,55
2-я	165,47 $\pm$ 4,78**	61,96 $\pm$ 2,53**	37,44	100,24 $\pm$ 4,42**	60,50
3-я	160,17 $\pm$ 6,26**	61,89 $\pm$ 4,19**	38,64	98,28 $\pm$ 5,56**	61,35

Примечание. Одна звездочка —  $P < 0,001$  по сравнению с группой здоровых лиц в возрасте от 20 до 40 лет, две — то же от 40 до 65 лет.

лому ряду физико-химических свойств и, в частности, по электрофоретической подвижности [1]. Известно, что фермент активен также по отношению к некоторым ГСЛ — глобозиду, асиалоганглиозиду Г<sub>м2</sub>, ганглиозиду Г<sub>м2</sub> [4]. Отмечены изменения активности этого фермента при ряде патологий, не связанных с болезнями накопления — гликофинголипидозами (болезнями Тей — Сакса, Сандгоффа). Это побудило к дальнейшим исследованиям изменений активности фермента в целях выяснения возможности разработки энзиматического теста для диагностики и прогноза ряда заболеваний [17].

Как видно из данных, представленных в таблице, величины общей активности  $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазы в лейкоцитах обеих групп клинически здоровых лиц были практически одинаковы. По данным ряда авторов, имеет место увеличение активности фермента в сыворотке крови с возрастом [19, 20]. Установлено, однако, что не всегда активность  $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазы и других  $\beta$ -гликозидаз однонаправленно изменяется в сыворотке крови и тканях различных органов [13]. Нами выявлены изменения в активности А- и В-форм фермента: с возрастом увеличивалась доля активности термостабильной В-формы по отношению к общей активности  $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазы. Так, в группе практически здоровых лиц в возрасте от 20 до 40 лет величина отношения А-формы к В-форме была равна 2,78, в то время как в группе лиц в возрасте более 40 лет — 1,48, т. е. почти в 2 раза ниже.

Следует также отметить, что выявленные нами величины активности А-

и В-форм в лейкоцитах (61,8 и 39,2 %) от общей при использовании искусственного субстрата п-нитрофенил-2-ацетамидо-2-дезоксид- $\beta$ -D-глюкопиранозид соответствуют литературным данным [11].

При сравнении величин активностей общей, А- и В-форм  $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазы у людей в возрасте от 40 до 65 лет с соответствующими показателями группы больных ГБ, обнаружено их снижение. Так, общая активность снизилась на 24,96 %, активность А- и В-форм на 29,43 и 28,89 % соответственно.

Сравнение общей активности данного фермента у группы больных ГБ в сочетании с ИБС также выявило ее снижение, хотя и в несколько меньшей степени (на 19,83 %). Сниженная активность общей  $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазы и ее форм была отмечена и в группе больных, у которых ведущими клиническими признаками заболевания были нарушения со стороны сердца в результате поражения сосудов атеросклеротическим процессом.

Полученные данные свидетельствуют о том, что у лиц всех обследуемых групп наблюдалось снижение активности как общей  $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазы, так и ее отдельных форм, величины отношений А-формы к В-форме у больных (соответственно 1,58, 1,62 и 1,59) были весьма близки.

Следует отметить, что ранее были отмечены аналогичные изменения другого лизосомального фермента — кислой формы  $\beta$ -галактозидазы у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями [6].

Оценка причин снижения активности фермента в лейкоцитах крови

больных затруднительна в связи с малочисленностью подобного рода исследований в литературе, противоречивостью их характера, различием объекта исследований. Литературные данные относятся в основном к лизосомальным препаратам, выделенным из культивируемых клеток нервной, артериальной тканей крыс с генетически обусловленной гипертонией, и к сыворотке крови больных, в то время как наши исследования выполнены на лейкоцитах крови.

Можно предполагать, что снижение активности  $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазы связано с влиянием на фермент неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК), количество и степень ненасыщенности которых в крови при сердечно-сосудистых заболеваниях, и особенно при атеросклерозе, увеличиваются. Об этом свидетельствуют исследования, в которых при характеристике факторов, регулирующих активность лизосомальных ферментов сердца, было обнаружено подавление активности  $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазы при повышении содержания НЭЖК [22]. Выявлена взаимосвязь между активностью фермента и степенью ненасыщенности жирных кислот: увеличение ненасыщенности приводило к возрастанию активности  $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазы [18]. Полагают, что действие жирных кислот обусловлено изменением жидко-кристаллического или аморфного состояний мембран клетки, отражающимся на активности  $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазы [18].

Другой причиной подавления активности указанного фермента могут стать гипоксические явления, развивающиеся в тканях. Описано снижение активности некоторых лизосомальных ферментов, и в том числе  $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазы, в зоне ишемии миокарда собак через 2 ч после перевязки нисходящей коронарной артерии [21]. На правомерность учета влияния вышеприведенных факторов на активность  $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазы указывает отсутствие различий в изменении активности изученного фермента при ГБ и ее сочетании с коронарным атеросклерозом.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Барретт А. Дж., Хит М. Ф. — В кн.: Лизосомы. М., 1980, с. 90—93.
2. Крэнс Е. М. Липиды клеточных мембран. Л., 1981, с. 56—58.

3. Кушаковский М. С. Гипертоническая болезнь и вторичные артериальные гипертензии. М., 1982, с. 36—66.
4. Ли Ю.-Т., Ли С.-У. — В кн.: Лизосомы и лизосомные болезни накопления. М., 1984, с. 194—216.
5. Мирзоян С. А., Мхоян Э. Е., Секоян Э. С., Соцкий О. П. — Докл. АН СССР, 1974, т. 214, № 1, с. 228—231.
6. Мирзоян С. А., Секоян Э. С., Соцкий О. П. и др. — Докл. АН Арм. ССР, 1984, т. 78, № 2, с. 91—96.
7. Ностнов Ю. В., Орлов С. Н. — Бюл. Всесоюз. кардиол. науч. центра, 1978, № 2, с. 20—29.
8. Саркисова Г. М., Соцкий О. П., Епископьян Н. Г., Секоян Э. С. — Вопр. мед. химии, 1984, № 2, с. 41—44.
9. Соцкий О. П., Секоян Э. С., Саркисова Г. М. — В кн.: Физиология, патофизиология и фармакология мозгового кровообращения. Ереван, 1984, с. 156—157.
10. Туманова С. Ю., Прохорова М. И. — Нейрохимия, 1982, т. 1, № 2, с. 184—199.
11. Цветкова И. В., Козина А. Б. — В кн.: Современные методы в биохимии. М., 1977, с. 132—135.
12. Breckenridge W., Halloran Y., Kovacs L., Silver M. — Lipids, 1975, vol. 10, p. 256—259.
13. Dushimi H., Tarui S. — Clin. chim. Acta, 1976, vol. 71, p. 1—8.
14. Gritchley D., Ansell S., Dilks S. — Biochem. Soc. Trans., 1979, vol. 7, p. 314—319.
15. Knosla M., Page I., Bumpus F. — Biochem. Pharmacol., 1979, vol. 28, p. 2867—2882.
16. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. — J. biol. Chem., 1951, vol. 193, p. 265—275.
17. Oberkotter L., Tenore A., Palmieri M. — Clin. chim. Acta, 1979, vol. 94, p. 281—286.
18. Orlacchio A., Maffei C., Binaglia L., Porcellati G. — Biochem. J., 1981, vol. 195, p. 383—388.
19. Reglero A., Carretero J., Cabelas J. — Clin. chim. Acta, 1980, vol. 103, p. 155—158.
20. Tenore A., Oberkotter L., Koldovsky O. — Early Hum. Develop., 1980, vol. 4, p. 41—49.
21. Vennell F., Weglicki W. — Circulat. Res., 1978, vol. 43, p. 750—758.
22. Wildental K. — Ibid., 1976, vol. 39, p. 441—446.

Поступила 05.03.85

#### ALTERATIONS IN ACTIVITY OF N-ACETYL- $\beta$ -D-GLUCOSEAMINIDASE IN LEUKOCYTES OF PATIENTS WITH HYPERTENSION

O. P. Sotsky, G. M. Sarkisova, G. A. Chukhadzhyan, Sh. Sh. Shakhbatyan, V. G. Paglavanyan, V. M. Arutyunyan, G. A. Eganjan

Medical School, Yerevan

Activities of N-acetyl- $\beta$ -D-glucoseaminidase and of its A and B forms were studied in leukocytes of healthy persons and in patients with hypertension, hypertension combined with ischemic heart disease and in patients with ischemic heart disease. In healthy persons activity of the enzyme B form was increased with ageing. In the patients activities of both

total N-acetyl- $\beta$ -D-glucoseaminidase and of its two forms were decreased. This decrease was

especially distinct in the group of patients with hypertension.

Л. Е. Панин, Г. С. Русских, Т. Г. Филатова

## ВЛИЯНИЕ АДРЕНАЛИНА, ГИДРОКОРТИЗОНА И ЛПВП СЫВОРОТКИ КРОВИ НА АКТИВНОСТЬ МНОЖЕСТВЕННЫХ ФОРМ ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ПЕЧЕНИ КРЫС

Институт клинической и экспериментальной медицины СО АМН СССР, Новосибирск

Изменение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) в печени экспериментальных животных под влиянием чрезвычайных раздражителей носит фазовый характер: снижение активности фермента во время стресса сменяется его активацией в период после стресса [5, 9, 13]. Эффект ингибирования фермента хорошо воспроизводится при введении в организм избытка гидрокортизона [1, 2, 11]. Сведений о механизме этих эффектов в литературе нет.

Изменения множественных форм Г-6-ФДГ в печени под влиянием субэкстремальных и экстремальных факторов изучены недостаточно. Литературные данные по этому вопросу противоречивы. Одни авторы указывают на перестройку изоферментного спектра в печени при стрессе и восстановление его в период после стресса [9], другие — не находят существенных изменений [13].

В настоящей работе изучали влияние адаптивных гормонов (адреналина и гидрокортизона), второго мессенджера в передаче гормонального сигнала в клетку (цАМФ) и липопротеидов сыворотки крови высокой плотности (ЛПВП) на распределение активности множественных форм Г-6-ФДГ в печени крыс. Проводили также специальные исследования кооперативного эффекта действия адаптивных гормонов и ЛПВП на активность фермента, установившие возможность существования новых, ранее неизвестных механизмов его регуляции.

### Методика

В опытах использовали крыс-самок Вистар массой 180—220 г. В экспериментах *in vivo* часть животных декапитировали сразу после окончания плавательных процедур с грузом (4 % от массы тела), продолжавшихся 3,5 ч, часть — через 6 ч. Контролем служила группа интактных животных. После декапитации у животных извлекали печень, промывали ее

холодным физиологическим раствором и готовили гомогенат в 0,15 М KCl. В надосадочной фракции (20 000 g) определяли общую активность Г-6-ФДГ [16] и ее молекулярных форм [12]. Срезы толщиной 0,3 мм готовили из промытой холодным физиологическим раствором печени интактных животных, инкубировали в Krebs—Рингер-бикарбонатном буфере pH 7,4, содержащем 2 % альбумина, при 37 °C и постоянном покачивании в течение 15 и 120 мин. К опытным пробам в среду инкубации добавляли: дибутирил-цАМФ ( $10^{-5}$  М), адреналин  $10^{-6}$  М; гидрокортизон  $3 \cdot 10^{-6}$  М или ЛПВП в количестве 0,2 мг белка на 1 мл инкубационной среды. В ряде опытов исследовали кооперативный эффект. С этой целью срезы инкубировали с добавлением адреналина, гидрокортизона и ЛПВП одновременно. Для блокирования синтеза белка *de novo* использовали актиномицин D,  $10^{-7}$  М; для подавления активности микротрубочкового аппарата клетки применяли винбластин — 1 мг на 1 мл инкубационной среды.

Липопротеиды получали методом флотации в растворе KBr на ультрацентрифуге Beckman L75B, ротор 75 Ti [14]. В надосадочной фракции срезов печени (20 000 g) определяли активность Г-6-ФДГ и ее множественных форм.

Дискэлектрофорез проводили в течение 1,5 ч в 7 % полиакриламидном геле (ПААГ) pH 8,2 в трис-глициновом буфере pH 8,3 при 0—2 °C. Сила тока составляла 4—5 мА на трубку (d—0,5 см). Для выявления специфической активности множественных форм Г-6-ФДГ гель инкубировали в течение 30 мин при 37 °C в инкубационной среде следующего состава: 75 мМ глицил-глициновый буфер pH 8,2, 10 мМ  $MgCl_2$ , 1 мМ НАДФ, 2 мМ глюкозо-6-фосфат (Г-6-Ф), феназimetасульфат 0,04 мг/мл, нитротетразолиевый синий 0,4 мг/мл. Гели сканировали на денситометре «Хромоскан» фирмы «Joice Lobel» (Англия). Относительную активность множественных форм фермента рассчитывали по формуле  $S = A \cdot \frac{1}{h} \times \frac{1}{\sum A_i} \times 100$ , где  $A_{1/2}$  — ширина кривой, измеренной на половине высоты,  $h$  — высота концентрации кривой [4]. Достоверность полученных результатов оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

С помощью электрофореза в ПААГ надосадочной фракции печени крыс выделено 6 множественных форм фермента, пронумерованных в порядке убывания анодной подвижности (I—VI). Согласно литературным данным,



Таблица 1

Распределение активности множественных форм Г-6-ФДГ в печени контрольных животных

Форма Г-6-ФДГ	Активность	
	нмоль НАДФ·Н на 1 мг белка в 1 мин	в % от общей активности
I	1,62±0,24	6,04
II	2,84±0,36	10,6
III	11,52±1,04	43,0
IV	3,15±0,21	11,7
V	2,25±0,32	8,4
VI	5,41±0,38	20,2
Общая активность	26,8±0,88	100

в печени выделяют от 4 до 8 множественных форм фермента [8, 9, 15].

Как видно из табл. 1, максимальной активностью обладала изоформа III — 43 % общей активности фермента, в 2 раза менее активной была изоформа VI, остальные формы характеризовались приблизительно равными активностями.

Из результатов, представленных на рис. 1, следует, что сразу после окончания плавательных процедур активность практически всех изоформ Г-6-ФДГ снижалась, но достоверно ингибировались лишь изоформы II и IV Г-6-ФДГ. Через 6 ч происходило восстановление активности всех множественных форм, кроме III и VI, активность которых достоверно возрастала, по сравнению с контролем. Таким об-

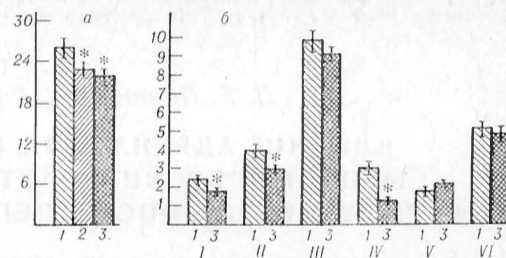


Рис. 2. Изменение общей активности (а) и активности множественных форм Г-6-ФДГ (б) в переживающих срезах печени крыс за 15 мин инкубации с дибутирил-цАМФ.

1 — контроль; 2 — адреналин, гидрокортизон, 3 — дибутирил-цАМФ.

разом, динамика описанных ранее изменений общей активности фермента в печени при физической нагрузке и в восстановительный период [5] находит свое отражение в изменении активности определенных множественных форм фермента: ингибировании Г-6-ФДГ изоформ II и IV сразу после плавания и активации изоформ III и VI через 6 ч.

Для того чтобы понять механизм отмеченных *in vivo* изменений, целесообразно обратиться к более простой модельной системе — переживающим срезам печени.

Из рис. 2, а видно, что за 15 мин инкубации срезов печени с адреналином и гидрокортизоном происходило достоверное снижение активности Г-6-ФДГ. Отсюда следует, что повышение продукции катехоламинов и глюкокор-

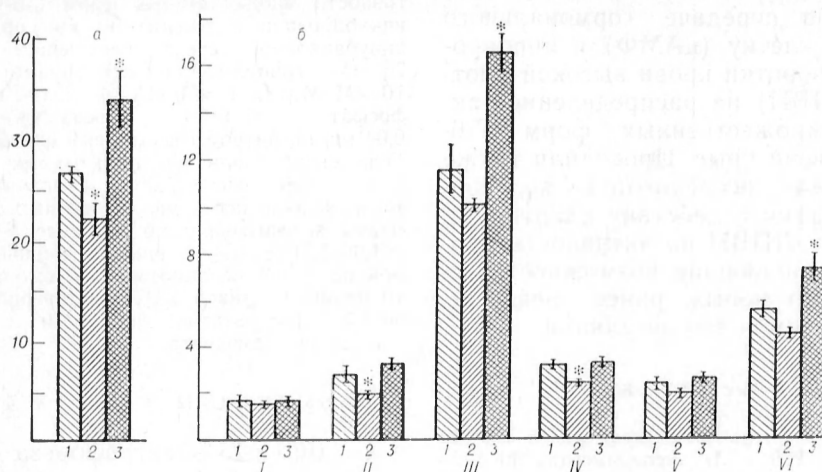


Рис. 1. Изменение общей активности (а) и активности множественных форм Г-6-ФДГ (б) в печени крыс сразу после физической нагрузки (плавание) и через 6 ч.

1 — контроль; 2 и 3 — соответственно сразу и через 6 ч после физической нагрузки. Звездочкой отмечены значения, достоверно отличающиеся от контроля ( $P < 0,05$ ).

Таблица 2

Изменение общей активности и множественных форм Г-6-ФДГ при инкубации срезов печени с адреналином, гидрокортизоном, ЛПВП, актиномицином D и винбластином (в нмоль НАДФ·Н на 1 мг белка в 1 мин)

Условия опыта	Активность						
	общая	изоформа Г-6-ФДГ					
		I	II	III	IV	V	VI
Контроль (40)	26,0 ± 1,39	2,01 ± 0,55	2,64 ± 0,42	10,7 ± 0,34	2,6 ± 0,24	2,13 ± 0,23	5,89 ± 0,86
Адреналин, гидрокортизон, ЛПВП, актиномицин D (6)	23,8 ± 1,87	1,97 ± 0,49	2,24 ± 0,59	9,86 ± 0,73	2,46 ± 0,28	1,96 ± 0,33	5,2 ± 0,52
Адреналин, гидрокортизон, ЛПВП, винбластин (9)	26,5 ± 1,64	2,95 ± 0,51	2,5 ± 0,44	10,47 ± 0,54	2,34 ± 0,26	2,03 ± 0,35	6,03 ± 0,52

тикоидов при интенсивной физической нагрузке (или любом другом стрессе) является причиной ингибирования фермента. Дибутрил-цАМФ вызывал аналогичные изменения. Это означает, что в основе ингибирования фермента лежит цАМФ-зависимый механизм. В предварительных исследованиях было показано, что содержание цАМФ в переживающих срезах печени под влиянием адреналина и гидрокортизона значительно возрастает [13]. Для того чтобы установить проявление эффекта относительно множественных форм Г-6-ФДГ в данной модели, с помощью электрофореза в ПААГ разгоняли растворимую фракцию срезов печени после 15 мин инкубации их с дибутирил-цАМФ. Выявлено достоверное

ингибирование I, II и IV изоформ Г-6-ФДГ (рис. 2, б). Эти изменения полностью соответствовали тем, которые наблюдались *in vivo* сразу после физической нагрузки с той лишь разницей, что ингибирование изоформы I Г-6-ФДГ оказалось более выраженным. Таким образом, снижение активности Г-6-ФДГ в печени крыс при интенсивной физической нагрузке обусловлено механизмом, в котором катехоламины и глюкокортикоиды играют роль первого, а цАМФ — второго мессенджеров, при этом преимущественно ингибируется Г-6-ФДГ изоформ II и IV.

Инкубация срезов печени с адреналином и гидрокортизоном в течение 2 ч снижала активность фермента

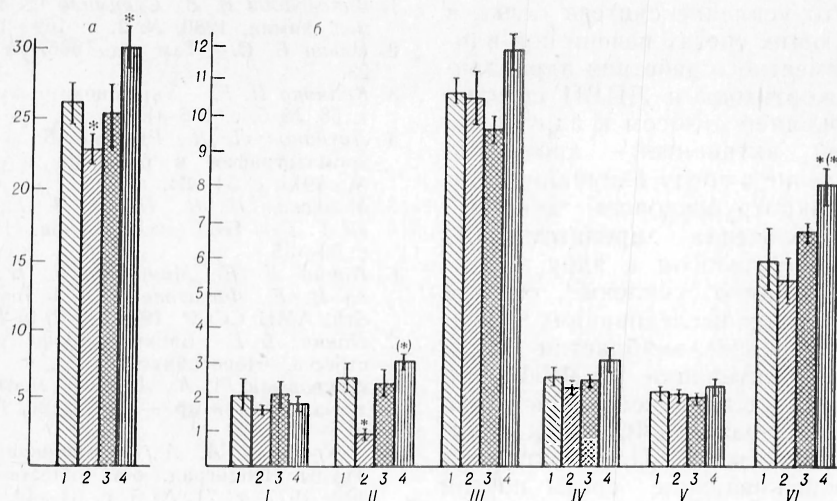


Рис. 3. Изменение общей активности (а) и активности множественных форм Г-6-ФДГ (б) в переживающих срезах печени крыс за 2 ч инкубации с адреналином, гидрокортизоном и ЛПВП.

1 — контроль; 2 — адреналин, гидрокортизон; 3 — ЛПВП; 4 — адреналин, гидрокортизон, ЛПВП. Звездочкой в скобках отмечены значения, достоверно отличающиеся от опыта с адреналином и гидрокортизоном (2;  $P < 0,05$ ).

преимущественно за счет ингибирования Г-6-ФДГ изоформы II (рис. 3). ЛПВП не изменяли активности Г-6-ФДГ и ее множественных форм. Совместное действие ЛПВП и гормонов, напротив, приводило к достоверному увеличению активности фермента: на 15 % по сравнению с контролем. Под влиянием кооперативного эффекта отмечалась тенденция к повышению активности Г-6-ФДГ изоформ II, III, IV и V, однако достоверное увеличение было лишь у Г-6-ФДГ изоформы VI. По отношению к действию одних гормонов, кроме Г-6-ФДГ изоформы VI, значительно возрастала активность Г-6-ФДГ изоформы II (почти в 3 раза). Наблюдаемое увеличение общей активности Г-6-ФДГ за счет молекулярных форм II и VI не превышало 31 %.

Таким образом нами показано, что ЛПВП модулируют действие адаптивных гормонов на Г-6-ФДГ печени крыс, приводя не к ингибированию, а, напротив, к активации фермента. Вскрыта природа этого явления.

Добавление в среду инкубации актиномицина D препятствовало повышению как общей активности фермента, так и его множественных форм (табл. 2). Это свидетельствует о том, что механизм кооперативного эффекта связан с усилением синтеза ферментного белка *de novo*. Ранее с использованием меченых аминокислот было показано, что усиление синтеза белка в переживающих срезах печени под влиянием совместного действия адреналина, гидрокортизона и ЛПВП связано с транслокацией лизосом к ядру и последующей активацией хроматина [14]. Введение в среду инкубации блокатора микротрубочкового аппарата клетки винбластин препятствовало транслокации лизосом к ядру и полностью подавляло усиление синтеза белка. В наших исследованиях в аналогичных условиях винбластин устранял эффект активации Г-6-ФДГ. Это свидетельствует об участии лизосом в индукции синтеза Г-6-ФДГ под влиянием гормонов и ЛПВП. Несмотря на то что переживающие срезы печени представляют собой достаточно простую систему, в ней по-прежнему сохраняются все особенности внутри- и межклеточных взаимоотношений, характерных для целого органа. Это необходимо для реализации кооператив-

ного эффекта. В надосадочной фракции (20 000 g) используемые гормоны и ингибиторы не оказывали какого-либо действия на фермент.

По-видимому, описанный выше механизм лежит в основе увеличения активности Г-6-ФДГ в восстановительный период, отмеченный ранее для печени [3] и мышечной ткани [15].

Ранее было показано, что интенсивная физическая нагрузка у крыс (плавание 3,5 ч с грузом, составляющим 4 % от массы тела) приводит к сдвигу липопротеидного спектра сыворотки крови в сторону увеличения ЛПВП [16], что создает предпосылки для усиления индукции синтеза Г-6-ФДГ под влиянием ЛПВП и адаптивных гормонов.

Таким образом, ингибирующее действие глюкокортикоидов и катехоламинов на Г-6-ФДГ изоформ I, II и IV в печени реализуется через цАМФ-зависимый механизм. ЛПВП сыворотки крови модулируют действие адаптивных гормонов. В комплексе с ними они дают кооперативный эффект, который реализуется через лизосомальный аппарат клеток печени и приводит к повышению активности фермента в результате индукции синтеза преимущественно Г-6-ФДГ изоформ III и VI.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградов В. В., Струмило С. А. — *Вопр. мед. химии*, 1980, № 2, с. 169—174.
2. Ильин В. С. — Там же, 1966, № 1, с. 3—23.
3. Колядко Н. Г. — *Укр. биохим. журн.*, 1981, т. 53, № 5, с. 106—110.
4. Литвинов Л. Д., Руденко Б. А. Газовая хроматография в биологии и медицине. М., 1971, с. 54—64.
5. Маянская Н. Н., Панин Л. Е., Филатова Т. Г. — *Бюл. exper. биол.*, 1982, № 7, с. 33—35.
6. Панин Л. Е., Маянская Н. Н., Колосова И. Е., Филатова Т. Г. — *Бюл. Сибир. отд. АМН СССР*, 1982, № 2, с. 85—94.
7. Панин Л. Е. Биохимические механизмы стресса. Новосибирск, 1983, с. 170—185.
8. Покровский А. А., Абрамук И. Ф., Бондаренко М. В. и др. — *Лаб. дело*, 1971, № 1, с. 8—12.
9. Покровский А. А., Коровников К. А. — *Труды Ленинград. о-ва естествоиспытателей*, 1977, т. 71, № 5, с. 31—44.
10. Поляков Л. М., Панин Л. Е. — В кн.: *Адаптация и проблемы общей патологии*. Новосибирск, 1974, т. 2, с. 174—175.
11. Федченко С. Н. — В кн.: *Всесоюзный симпозиум по пентозофосфатному пути превращения углеводов*. 5-й. Материалы. Гродно, 1978, с. 33.



12. Шурда Г. Г., Панин Л. Е. — Вopr. мед. химии, 1978, т. 24, с. 282—285.
13. Chang H. L., Hollen D., Karin R. — Canad. J. Biochem., 1979, vol. 57, p. 396—401.
14. Hatch F. T., Lees R. S. — Advanc. Lipid. Res., 1968, vol. 6, p. 2—68.
15. Hori S. H., Kamada T., Matsui S. — J. Histochem. Cytochem., 1967, vol. 15, p. 419—420.
16. Lohn G. W., Waller H. D. — In: Methoden der enzymatischen Analyse. Weinheim, 1970, S. 599—606.

Поступила 07.01.85

# EFFECT OF ADRENALINE, HYDROCORTISONE AND HIGH DENSITY LIPOPROTEINS FROM BLOOD SERUM ON ACTIVITY OF MULTIPLE GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE FORMS IN RAT LIVER TISSUE

L. E. Panin, G. S. Russkikh, T. G. Filatova

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

A decrease in activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) in Wistar rat liver tissue, caused by stress, was realized *via* a mechanism, involving adrenaline and hydrocortisone as first messengers and cAMP as a second messenger. In these systems G6PD II and IV isoenzymes were mainly inhibited. These are the urgent mechanisms for regulation of the enzymatic activity. Activation of G6PD within the reparative period after the stress was due to induction of the enzyme synthesis. Cooperative action of adrenaline, hydrocortisone and high density lipoproteins from blood serum, modulating the effect of adaptive hormones, was responsible for the enzyme induction. Actinomycin D and vinblastine (inhibitor of the cell microtubular apparatus) prevented the stimulation of G6PD isoenzymes caused by the cooperative hormonal effect. The data obtained suggest that the cooperative effect occurred as a result of lysosomes translocation to nucleus and the subsequent activation of chromatin.

УДК 616.36-002-099-092.9-02:615.356.317.164.184

Н. Б. Болданова, В. Л. Мигушина, С. З. Шатинина, О. В. Добрынина

## ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ФОСФАТИДИЛХОЛИНОВЫХ ЛИПОСОМ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ

II ММИ им. Н. И. Пирогова, Москва

Актуальная проблема лечения отравлений гепатотропными ядами связана с возможностью защиты и восстановления поврежденных клеточных мембран в условиях целого организма. Известно, что при действии гепатотропного яда — тетрахлорметана (CCl<sub>4</sub>) повреждаются многие клеточные мембраны и в первую очередь их липидный бислой, обеспечивающий барьерную функцию [1]. Следствием повреждения плазматической мембраны гепатоцитов являются высвобождение клеточных ферментов, выход их в кровяное русло и в результате — выраженная гиперферментемия в первые же часы после введения CCl<sub>4</sub> [3, 4, 5]. Количественная оценка выхода фермента в кровь может служить критерием состояния плазматической мембраны в условиях *in vivo* [4].

В настоящей работе предпринята попытка восстановить целостность поврежденных плазматических мембран гепатоцитов введением фосфолипидов как основных компонентов липидного матрикса биологических мембран. Ге-

патозащитное действие фосфолипидов оценивали по активности гепатоспецифического фермента — альдолазы фруктозо-1-фосфата (НФ 4.1.2.13) в сыворотке крови.

### Методика

Опыты проводили на 600 беспородных крысах-самцах массой 100—120 г, которых за сутки до эксперимента лишали пищи без ограничения воды. Тетрахлорметан вводили в виде 50 % раствора на вазелиновом масле внутривентрально в дозе 0,25 мл на 100 г массы животного или в виде 10 % раствора на жидком парафине внутривентрально в дозе 40 мкл на 100 г массы животного. Животных декапитировали через 20 ч, собирали кровь и в полученной сыворотке определяли активность альдолазы фруктозо-1-монофосфата по методу Шапиро в модификации Брагинского [5]. Активность фермента выражали в наномолях фосфотриоз в 1 мин на 1 мл сыворотки крови. Яичный фосфатидилхолин выделяли по модифицированному методу [2]. Фосфатидилхолин из сои и подсолнечника выделяли методом Фолча [8]. Многослойные липосомы формировали в 0,1 М трис-НСl-буфере pH 7,4 [6]. Бислойные липосомы получали методом ультразвуковой обработки многослойных липосом [7]. Состав липосом модифицировали при формировании введением 10 моль % липидных добавок. В работе использовали фосфатидную

**Активность альдолазы фруктозо-1-фосфата (нмоль/мин на 1 мл сыворотки) в сыворотке крови крыс при внутрибрюшинном и внутривенном введении фосфолипидных препаратов**

Условия опыта	Фосфолипидный препарат	Способ введения	
		внутрибрюшинный	внутривенный
Контроль	Яичный фосфатидилхолин с 10 моль% ДОХ	2,5±0,7 (4)	2,2±0,6 (16)
CCl <sub>4</sub>	Яичный фосфатидилхолин с 10 моль% ДОХ	50,3±5,5 (16)	50,3±5,5 (16)
	Липостабил	27,4±4,4 (16)*	40,0±12,6 (6)
	Многослойные липосомы из яичного фосфатидилхолина	48,7±8,2 (16)	85,3±4,9 (12)*
	Бислойные липосомы из яичного фосфатидилхолина	30,1±4,9 (16)*	—
		49,2±21,9 (6)	—

Примечание. В скобках указано количество опытов, в каждом из которых использовали сыворотку от 3 животных. Звездочкой отмечено достоверное различие по сравнению с опытом без введения фосфолипидов.

кислоту, холестерин, сфингомиелин, дезоксихолат натрия (ДОХ), дилиолеилфосфатидилхолин (ДЛФХ), дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ), цетилтриметиламмонийбромид (ЦТАБ) фирмы «Sigma» (США). Липидные препараты вводили через 2 ч после CCl<sub>4</sub> в дозе 10 мг на 100 г массы животного. Параллельно использовали применяемые в клинике препараты липостабил и эссенциале ("Natterman", ФРГ), приготовленные на основе ненасыщенного соснового фосфатидилхолина.

#### Результаты и обсуждение

Действие фосфолипидов исследовали при двух вариантах токсического гепатита, полученных путем внутрижелудочного или внутрибрюшинного введения CCl<sub>4</sub>, что позволило использовать 3 способа (внутрибрюшинный, внутрижелудочный и внутривенный) введения фосфолипидных препаратов.

Как видно из таблицы, активность альдолазы, отсутствующая в крови в норме, резко повышалась после введения CCl<sub>4</sub>. Однократное внутрибрюшинное введение на фоне CCl<sub>4</sub> препаратов из яичного фосфатидилхолина снижало гиперферментемию на 45 %. Внутривенное применение этого препарата не влияло на уровень альдолазы. Нормализации активности альдолазы при внутрибрюшинном использовании липостабила не наблюдали, а внутривенное его применение усугубляло гиперферментемию. Действие эссенциале было полностью идентичным таковому липостабила, в связи с чем соответствующие цифровые значения не приводятся. Возможно, что фосфолипиды, введенные в кровоток одномоментно, могут усваиваться клеточными эл-

ментами крови или подвергаться расщеплению липазой в кровяном русле, что снижает степень их воздействия на гепатоциты. В дальнейшем мы использовали внутрибрюшинное введение липидных препаратов.

Для усиления действия фосфатидилхолина были применены модификации размера, состава и заряда липосом.

При вариации размера липосом от монобислойных (диаметром 25 нм) до многослойных (диаметром 100—1000 нм) выявлено преимущество многослойных липосом, которые при внутрибрюшинном введении снижали уровень гиперферментемии на 40 %. Монобислойные липосомы того же состава не влияли на уровень альдолазы при повреждении печени CCl<sub>4</sub>. Известно, что липосомы могут взаимодействовать с клеточной мембраной тремя основными способами: посредством эндоцитоза, встраивания и обмена липидным материалом [9]. По-видимому, размер многослойных липосом и большая площадь их внешнего бислоя способствуют второму типу взаимодействия, т.е. встраиванию липидного материала в плазматическую мембрану гепатоцита. В результате этого происходит частичное восстановление поврежденной плазматической мембраны и снижение выхода цитозольного фермента в кровоток. Отсутствие эффекта при использовании монобислойных липосом можно также отнести за счет увеличения окисленности липидного материала в процессе обработки ультразвуком.

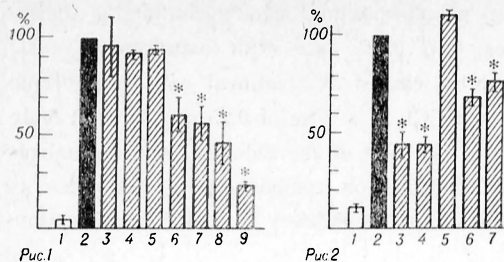


Рис. 1. Влияние внутрибрюшинного введения липосом различного состава на активность аспартатаминотрансферазы сыворотки крови при внутрибрюшинном введении  $\text{CCl}_4$  (в % от данных, полученных в опыте без введения липосом).

1 — контроль; 2—9 —  $\text{CCl}_4$ ; 3 — липостабил; 4 — липосомы из соевого фосфатидилхолина; 5 — то же из подсолнечного; 6 — то же из яичного; 7 — яичный фосфатидилхолин с 10 моль% ДОХ; 8 — то же с ЦТАБ; 9 — то же с фосфатидной кислотой. Здесь и на рис. 2 звездочкой отмечены величины, достоверно отличающиеся от данных, полученных в опыте без липосом.

Рис. 2. Влияние внутрижелудочного введения липосом различного состава на активность аспартатаминотрансферазы сыворотки крови при внутрибрюшинном введении  $\text{CCl}_4$ .

1 — контроль; 2—7 —  $\text{CCl}_4$ ; 3 — липосомы из яичного фосфатидилхолина; 4 — липосомы из ДЛФХ; 5 — из ДПФХ; 6 — липосомы с добавкой холестерина; 7 — с добавкой холестерина и сфингомиелина.

Модификация состава многослойных липосом выявила отсутствие защитного действия фосфатидилхолина с высокой степенью ненасыщенности (фосфатидилхолин из подсолнечника и сои; рис. 1). Следует отметить, что широко применяемый в клинике липостабил, липидную основу которого составляет ненасыщенный соевый фосфатидилхолин, также не влиял на гиперферментемию в условиях нашего эксперимента. Наиболее активно снижали уровень аспартатаминотрансферазы отрицательно заряженные липосомы с 10 моль% фосфатидной кислоты (на 78 %) и с 10 % моль% ЦТАБ (на 54 %). По-видимому, такие формы липидного материала наиболее активно взаимодействуют с цитоплазматической мембраной за счет специфичности состава или благодаря слабому детергентному вмешательству ЦТАБ, облегчающему контакты мембранных и экзогенных фосфолипидов.

В условиях наших экспериментов гепатозащитное действие фосфолипидных препаратов на основе яичного фосфатидилхолина проявлялось более выражено, чем липостабила и эссенциале, в составе которых методом тонко-

слойной хроматографии обнаружены лизокомпоненты (4—12 % от суммарного содержания фосфолипидов), оказывающие агрессивное действие на биомембраны.

Внутрижелудочное введение многослойных липосом из яичного фосфатидилхолина (на модели внутрибрюшинного введения  $\text{CCl}_4$ ) также снижало в 2 раза активность аспартатаминотрансферазы (рис. 2). Изменения заряда и жесткости липосом за счет включения в их состав ЦТАБ, фосфатидной кислоты, холестерина и сфингомиелина не улучшало их действия. Липосомы из жидкого полиенового фосфатидилхолина (ДЛФХ) обладали такой же активностью, как и яичный фосфатидилхолин, а предельно насыщенный ДПФХ даже усиливал гиперферментемию.

Таким образом, результаты настоящей работы свидетельствуют о возможности прижизненного восстановления поврежденных цитоплазматических мембран гепатоцитов с помощью яичного фосфатидилхолина, введенного в форме липосом или мицелл. Можно предполагать, что в основе защитного действия фосфатидилхолина лежит его способность формировать и поддерживать устойчивый биологический барьер в водном окружении, что необходимо для восстановления нарушенной целостности липидного матрикса мембраны.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Арчаков А. И., Карузина И. И. — В кн.: Успехи гепатологии. Рига, 1973, вып. 4, с. 35—59.
2. Бергельсон Л. Д., Дятловицкая Э. В., Молотковский Ю. Г. и др. В кн.: Препаративная биохимия липидов. М., 1981, с. 107—108.
3. Громашевская Л. Л. — В кн.: Проблемы медицинской энзимологии. М., 1970, с. 195—209.
4. Губский Ю. И. — В кн.: Новое в лабораторной диагностике хронических болезней внутренних органов. Ужгород, 1983, с. 106—107.
5. Колб В. Г., Камышников В. С. Клиническая биохимия. Минск, 1976, с. 37.
6. Bangham A., Degior J., Crellille G. D. — Chem. Phys. Lipids, 1967, vol. 1, p. 225—228.
7. Barenholts J., Gibbes D., Litman B. — Biochemistry (Wash.), 1977, vol. 16, p. 2806—2810.
8. Folch J., Zees M., Sloane-Stanley G. H. — J. biol. Chem., 1957, vol. 226, p. 447—509.
9. Kimelberd H. K. — Biochim. biophys. Acta, 1976, vol. 448, p. 531—550.

Поступила 22.01.85



PROTECTIVE EFFECT OF PHOSPHATIDYL  
CHOLINE-CONTAINING LIPOSOMES IN  
EXPERIMENTAL TOXIC HEPATITIS

*N. B. Boldanova, S. Z. Shatinina, V. L. Migushina, O. V. Dobrynina*

N. I. Pirogov II Medical School, Moscow

Level of fructose-1-monophosphate aldolase was decreased in blood serum after administra-

tion of phosphatidyl choline-containing liposomes into male rats with experimental toxic hepatitis caused by treatment with hepatotropic poison  $\text{CCl}_4$  at a dose of 0.25 ml/100 g of body mass. The rate of the aldolase level normalization depends on composition of liposomes as well as on the pathway of their administration.

*В. С. Михайлин, А. А. Кондрашин, Т. Т. Березов*

ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ  
И КАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ОТЕЧЕСТВЕННОГО  
КОММЕРЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА L-АСПАРАГИНАЗЫ  
В ЛИПОСОМАХ, СФОРМИРОВАННЫХ ИЗ ФОСФОЛИПИДОВ  
СОЕВЫХ БОБОВ

Кафедра биохимии Университета дружбы народов им. Патриса Лумумбы, Москва

Из числа ферментов с выраженной антиопухолевой активностью особый интерес представляет L-аспарагиназа, обладающая сильным противолейкозным действием [1]. Основными причинами, препятствующими широкому применению этого и других ферментов, вводимых парентерально, являются высокая скорость распада и иммунологическая несовместимость с организмом, приводящая к развитию аллергических реакций. Для преодоления иммунологической несовместимости и пролонгирования действия фермента в организме ведутся работы по его иммобилизации на различных носителях [3, 4]. Одним из перспективных методических подходов к иммобилизации L-аспарагиназы является ее включение в замкнутые фосфолипидные везикулы — липосомы [9], что сопровождается увеличением времени действия фермента в крови, повышением устойчивости к действию некоторых протеолитических ферментов, а также уменьшением иммунологических реакций [9, 13].

Несмотря на очевидные успехи, многие аспекты применения липосом в качестве носителей ферментных препаратов все еще ждут своего решения. Эти аспекты, в частности касающиеся повышения стабильности нагруженных белком липосом в организме, а также снижения скорости их выведения из кровотока, едва могут быть успешно решены без глубокого и тщательного исследования механизма иммобилизации с использованием достаточно дешевых и доступных материалов.

В связи с этим целью настоящей работы было исследование некоторых каталитических и кинетических характеристик отечественного коммерческого препарата L-аспарагиназы, иммобилизованной в липосомах, фосфолипидный компонент которых представлен фосфолипидами соевых бобов (азолектином), широко используемых в настоящее время в мембранной энзимологии.

Методика

Исследования проводили с препаратами L-аспарагиназы Рижского завода лекарственных средств с исходной активностью 100 МЕ на 1 мг белка. Активность фермента определяли методом прямой несселеризации [2]. Инкубационная проба объемом 1,1 мл (0,05 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4) содержала 34 мкмоль L-аспарагина, предварительно растворенного в 50 мМ растворе  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,4), и 0,01—0,5 мг препарата L-аспарагиназы. Пробу инкубировали 12 мин при 37 °C. Реакцию останавливали добавлением 0,1 мл 50 % ТХУ. После центрифугирования при 5000 об/мин в течение 15 мин из надосадочной жидкости отбирали 0,1 мл, доводили водой до 5,0 мл и добавляли 0,5 мл реактива Несслера. Оптическую плотность определяли через 1—3 мин на спектрофотокolorиметре "Specol ЕК-5 Aut" при 420 нм. Удельную активность выражали в международных единицах на 1 мг. Липосомы готовили методом диализа детергента [10]. Для этого 50 мг фосфолипидов соевых бобов (Sigma) суспендировали в 1 мл среды, содержащей 50 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,5) и 2 % холата Na, озвучивали до просветления, добавляли 2 мг белка аспарагиназы, вторично озвучивали в течение 20 с и диализовали 18 ч против 500 объемов раствора 50 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,5 при 4 °C. После диализа суспензию центрифугировали 1,5 ч при 50 000 об/мин на центрифуге ВАК-601, осадок липосом дважды промывали тем же буфером и ресуспендировали

в небольшом объеме. Для приготовления липосом методом озвучивания 50 мг азолектина суспендировали в 1 мл 50 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7,5, озвучивали до просветления и смешивали с раствором фермента. После 20 с озвучивания липосомы центрифугировали и ресуспендировали, как описано выше. В опытах по исследованию стабильности липосом в сыворотке крови липосомы готовили с использованием буфера, содержащего 0,01 М трис-HCl pH 7,5 и 0,14 М NaCl.

Эффективность включения в липосомы флюоресцентного красителя кальцеина оценивали по методу Наото и соавт. [12]. Для этого липосомы готовили в  $10^{-4}$  М растворе кальцеина ("Serva"). На спектрофлуориметре "Hitachi MRF-4" в плоской кювете снимали спектр флюоресценции в диапазоне 490—600 нм при длине возбуждающего света 480 нм. Затем к суспензии липосом добавляли ацетат кобальта ("Sigma") и по изменению спектра флюоресценции определяли концентрацию насыщения. После этого к смеси вливали 20 % раствора тритона X-100 до конечной концентрации 1 % и снова снимали спектр флюоресценции. Эффективность включения кальцеина (а вместе с тем и общего объема водной фазы) во внутреннее пространство липосом оценивали путем измерения интенсивности флюоресценции при 520 нм с учетом светорассеивания [12].

Объектом исследования была сыворотка крови белых крыс. Для определения белка использовали метод Лоури, модифицированный для проб с повышенным содержанием липидов [7]. Конечная концентрация дезоксихолата натрия в пробах составляла 0,1 %.

## Результаты и обсуждение

Как отмечалось ранее [5], оптимальными характеристиками, исходя из целей терапии лейкозов, обладают однослойные микровезикулы диаметром 25—50 нм, полученные методом озвучивания фосфолипидов и способные циркулировать в крови в течение нескольких часов. Крупные же, гигантские липосомы (размером более 100 нм) исчезают из кровотока уже через 5—15 мин. В последние годы получил широкое распространение метод приготовления липосом путем диализа детергента. Этот методический прием, особенно хорошо зарекомендовавший себя при реконструкции мембранных преобразователей энергии [6, 11], позволяет получать мембранные везикулы размером от 50 до 100 нм. Представляется вероятным, что увеличение размера частиц по сравнению с озвученными липосомами будет способствовать повышению степени захвата липосомами белковых молекул. С другой стороны, можно ожидать, что размеры таких липосом обеспечат им достаточно длительное время циркуля-

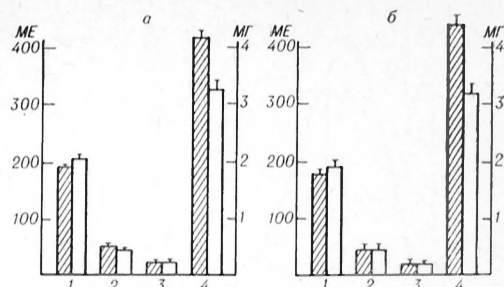


Рис. 1. Эффективность включения L-аспарагиназы в азолектиновые липосомы, приготовленные методом диализа детергента (а) и озвучиванием (б).

1, 2, 3 — надосадочная жидкость после 1, 2 и 3-го центрифугирования соответственно. 4 — суспензия липосом с L-аспарагиназой. Объяснения см. в тексте. Заштрихованные столбики — общее количество белка в объеме (в мг; ось ординат справа), светлые — общая активность (в ME; ось ординат слева).

ции, а соответственно и действия в крови по сравнению с гигантскими везикулами. В связи с этим было интересно сравнить связывание L-аспарагиназы микровезикулами, полученными из азолектина методом озвучивания, и липосомами «средней величины», полученными из тех же фосфолипидов методом диализа детергента.

Как видно из рис. 1, после трехкратного промывания буфером липосом, полученных методом диализа детергента, с везикулами остается связанным примерно 60 % введенного в суспензию фосфолипидов белка. Чуть больше белка (примерно 61 %) иммобилизовалось на липосомах, полученных методом озвучивания. Примерное равенство (54 % для первого случая и 55 % для второго) наблюдалось и в отношении общей активности иммобилизации на липосомах фермента. Исходя из этих данных, было сделано заключение, что включение стадии диализа в процедуру приготовления липосом в наших условиях не приводит к увеличению количества включенного белка, что дает возможность в процедуре приготовления липосом ограничиться более простым и достаточно эффективным методом озвучивания смеси азолектина и L-аспарагиназы. Именно последний прием был использован в последующих экспериментах.

Если допустить, что фермент включается только во внутреннюю водную фазу липосом, то степень такого включения, вероятно, будет зависеть от объема этой фазы. Указанный объем можно оценить с помощью флюоресцент-

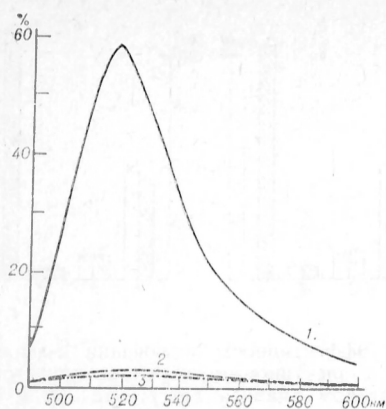


Рис. 2. Спектры флюоресценции кальцеина в суспензии аспарагиназных липосом.

1, 2 и 3 — суспензии липосом, приготовленных в присутствии кальцеина, ацетата кобальта и 1 % тритона X-100 соответственно.

ного красителя кальцеина. На рис. 2 (кривая 1) представлен спектр флюоресценции суспензии липосом, приготовленных в присутствии кальцеина. Добавление к суспензии ацетата кобальта, не способного проникать через мембрану (см. рис. 2, кривая 2), приводит к тушению флюоресценции в межлипосомном пространстве. Теперь флюоресценция суспензии определяется лишь тем кальцеином, который локализован во внутренней фазе липосом. Разрушение везикул тритоном X-100 позволяет оценить вклад флюоресценции красителя, заключенного во внутренний объем частиц (см. рис. 2, кривая 3). Расчет показал, что доля красителя, захваченного при озвучивании фосфолипидов, не превышает 1 %. Такой же цифрой, вероятно, следует определить и объем водной фазы, попавшей во внутреннюю часть липосом. Исходя из представления о том, что лишь сотая доля водной фазы локализована внутри липосом, весьма трудно объяснить столь высокую (до 60 %) степень включения Л-аспарагиназы в липосомы. Однако если предположить, что включение фермента происходит за счет определенного средства между молекулами белка и мембранами липосом, то такое объяснение вполне возможно. В этом случае значительная доля иммобилизованного белка должна быть сорбирована на поверхности везикул, в том числе на внешней. Отсутствие прироста активности после осмотического шока липосом, вероятно, также подтверждает это предположение.

Еще одним подтверждением указанного предположения могут служить результаты опыта, в котором липосомы дважды промывали в среде с высокой ионной силой (содержащей 250 мМ NaCl). Оказалось, что после двукратной промывки таким раствором с липосомами остается связанным 30 % белка, открытого до промывки. Таким образом, значительная доля белковых молекул сорбирована на внешней поверхности липосом; в механизме подобной сорбции в наших условиях важную роль играют, вероятно, электростатические и гидрофобные взаимодействия.

Представляло интерес оценить, в какой мере изменяются основные кинетические свойства используемой в наших экспериментах Л-аспарагиназы, включенной в липосомы, по сравнению со свободным от липидов ферментом. Исследование зависимости скорости дезамидазной реакции от концентрации аспарагина в координатах Лайнуивера — Берка дало возможность рассчитать  $K_M$  свободной Л-аспарагиназы, которая в наших условиях составляла  $1,8 \cdot 10^{-5}$  М, что согласуется с данными, известными из литературы [8].  $K_M$  для Л-аспарагиназы, связанной с липосомами и равная  $2,7 \cdot 10^{-5}$  М, увеличилась по сравнению со свободным ферментом незначительно. Такое

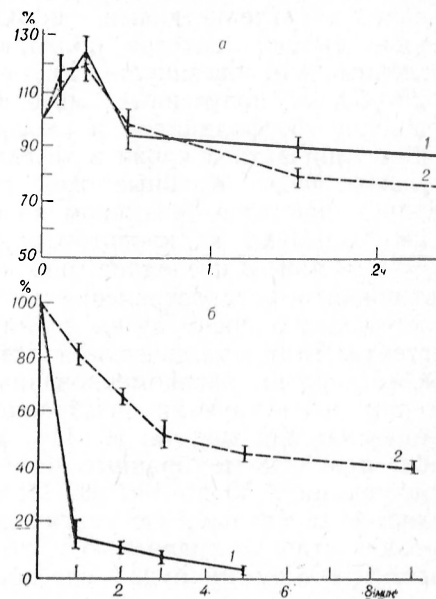


Рис. 3. Зависимость активности Л-аспарагиназы от времени инкубации при 55°C (а) и 70°C (б).

Здесь и на рис. 4 и 5: 1 — свободный фермент; 2 — фермент на липосомах.



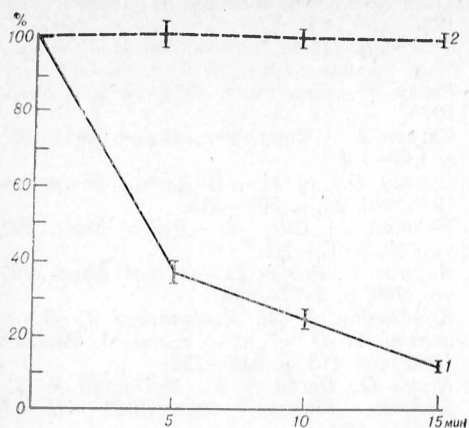


Рис. 4. Изменение активности L-аспарагиназы под действием трипсина.

увеличение, возможно, объясняется уменьшением скорости диффузии субстрата вблизи поверхности липосом.

Исследование влияния температуры в интервале от 25 до 65 °C на активность свободной и связанной с азолектиновыми липосомами L-аспарагиназы показало (данные не представлены), что оптимальная температура для свободного фермента, равная 55°, примерно на 10 °C превышает соответствующее значение для иммобилизованного фермента.

Более значительные различия между этими двумя формами фермента обнаружили при сравнении зависимости активности фермента от времени инкубации при 55 и 70 °C. Из рис. 3, а видно, что при инкубации свободной L-аспарагиназы и L-аспарагиназы, связанной с азолектиновыми липосомами в течение 2,5 ч при 55 °C, не выявляется существенных различий между этими двумя формами фермента. Однако инкубация свободного фермента при 70 °C уже через 4 мин приводит к практически полной инактивации L-аспарагиназы (рис. 3, б). За то же время фермент, включенный в липосомы, сохраняет почти 50 % своей активности. Увеличение термостабильности L-аспарагиназы при высоких температурах наблюдали ранее [9] после выключения фермента в липосомы, сформированные из яичного лецитина. Представленные данные свидетельствуют о том, что и фосфолипиды соевых бобов могут оказывать защитное влияние на L-аспарагиназы в отношении повышенной температуры.

Эти данные, на наш взгляд еще раз подтверждают предположение о том, что основное количество фермента сорбируется на поверхности мембран, и это в свою очередь приводит к стабилизации белковых молекул за счет соответствующей модификации. Повышение термостойкости фермента едва ли можно объяснить нахождением фермента во внутренней фазе липосом как бы в свободном состоянии. В этом случае условия его существования, по-видимому, мало будут отличаться от тех, которые присущи ферменту, растворенному в буферном растворе.

Иммобилизация L-аспарагиназы на азолектиновых липосомах, так же как и в случае использования яичного лецитина [9], приводит к повышению устойчивости фермента в отношении протеолитического действия трипсина (рис. 4). Как видно, через 15 мин инкубации свободного фермента в присутствии протеиназы происходит практически полная его инактивация. За то же время обработки L-аспарагиназы, связанной с липосомами, активность фермента снижается незначительно.

Таким образом, не только включение L-аспарагиназы во внутреннее пространство липосом, но и ее сорбция на поверхности мембран (что, по-видимому, характерно для данного случая) оказывает защитное действие по отношению к протеолизу.

Ранее было показано [13], что время функционирования L-аспарагиназы, включенной в липосомы, состоящей из смеси яичного лецитина, холестерина и фосфатидиой кислоты, в опытах на мышах существенно больше возрастает, чем в случае со свободным ферментом. Полученные данные позволяют считать, что стабиль-

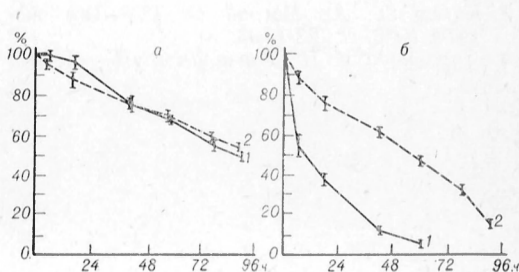


Рис. 5. Стабильность L-аспарагиназы в физиологическом растворе (а) и сыворотке крови (б).

ность L-аспарагиназы, включенной в азолектиновые липосомы, в условиях, максимально приближенных к условиям *in vivo*, также возрастет.

В заключительной серии экспериментов сравнивали стабильность L-аспарагиназы в свободном и иммобилизованном на липосомах состояниях, в процессе длительной инкубации в физиологическом растворе и свежеприготовленной сыворотке крови крыс. Как можно видеть из данных рис. 5, а, существенных различий в скорости снижения активности двух форм фермента при его инкубации в физиологическом растворе в течение 4 сут не наблюдается. При инкубации фермента в сыворотке крови (рис. 5, б) его активность снижается более интенсивно. Однако период полужизни свободной L-аспарагиназы в сыворотке составляет около 8 ч, в то время как связанной с липосомами — почти 50 ч. Такое (более чем в 6 раз) увеличение стабильности фермента в сыворотке крови и другие характеристики, полученные в данной работе, свидетельствуют о том, что азолектиновые липосомы могут служить перспективной основой как для иммобилизации отечественного коммерческого препарата L-аспарагиназы с целью возможного применения в терапии, так и подходящей моделью для исследования различных аспектов получения липосомных препаратов других ферментов и эффективности их использования в опытах *in vitro* (включая культуру клеток) и *in vivo*.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Березов Т. Т. — Вестн. АМН СССР, 1971, № 11, с. 35—46.
2. Коваленко Н. А., Цветкова Т. А., Николаев А. Я. — Вopr. мед. химии, 1977, № 5, с. 618—622.
3. Козлов Е. А., Петрий О. П. — Там же, 1978, № 6, с. 723—733.
4. Ларионова Н. И., Торчилин В. П. — В кн.:

Химическая энзимология. М., 1983, с. 115—153.

5. Розенберг О. А., Алиакбаров М. Т. и др. — Мед. радиол., 1981, № 5, с. 65—69.
6. Рэкер Э. — Биохимия, 1973, № 5, с. 1070—1075.
7. Сяткин С. — Вopr. мед. химии, 1981, № 1, с. 136—138.
8. Cooney D. et al. — Biochem. Pharmacol., 1975, vol. 24, p. 503—515.
9. Fishman J., Citri N. — FEBS Lett., 1975, vol. 60, p. 17—20.
10. Kagawa J., Racker E. — J. biol. Chem., 1971, vol. 246, p. 5477—5487.
11. Kondrashin A. A., Remennikov V. G., Samuilov V. D. et al. — Europ. J. Biochem., 1980, vol. 113, p. 219—222.
12. Naoto O., Derba A. K., McDonald R. S. — Biochim. biophys. Acta, 1982, vol. 691, p. 618—622.
13. Neerunjun E. D., Gregoriadis G. — Biochem. Soc. Trans., 1976, vol. 4, p. 133—134.

Поступила 22.01.85

#### PECULIARITIES OF IMMOBILIZATION AND CATALYTIC PROPERTIES OF NATIVE COMMERCIAL L-ASPARAGINASE IN LIPOSOMES FORMED FROM SOYBEAN PHOSPHOLIPIDS

V. S. Michailin, A. A. Kondrashin, T. T. Berезov

Chair of Biochemistry, P. Lumumba Peoples' Friendship University, Moscow

The commercial preparation of L-asparaginase was incorporated into liposomes formed from soybean phospholipids (asolectin). The inside phase volume of liposomes did not exceed 1 % as calculated using fluorescence dye calcein but the efficiency of the enzyme incorporation into liposomes reached approximately 60 %. The enzyme was adsorbed on outside surface due to electrostatic and hydrophobic interactions. The  $K_m$  value of immobilized L-asparaginase ( $2.7 \cdot 10^{-5}$  M) did not exceed considerably the  $K_m$  values of free enzyme ( $1.8 \cdot 10^{-5}$  M) when L-asparagin was used as a substrate. The incorporation of L-asparaginase into asolectin liposomes led to considerable increase in the enzyme thermostability at 70 ° and also to an increase in its sensitivity to proteases and, particularly, to trypsin. The half-life periods of free and immobilized enzymes were practically similar in buffer solutions. However, the half-life period of immobilized L-asparaginase in blood serum was more than 6-fold higher as compared with that of the free enzyme.

Д. В. Косягин

## КОНЦЕНТРАЦИЯ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ В НЕИЗМЕНЕННОМ И ДЕГЕНЕРАТИВНО ИЗМЕНЕННОМ СУСТАВНОМ ХРЯЩЕ ЛЮДЕЙ РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Саратовский НИИ травматологии и ортопедии

Протеогликаны представляют собой макромолекулы, состоящие из центрально расположенной нити белка, к которой ковалентно присоединены цепи гликозаминогликанов (ГАГ). В протеогликанах преобладает углеводный компонент, определяющий основные физико-химические особенности молекулы, например ее сильно отрицательный заряд [2]. Отдельные цепи ГАГ, имея одинаковый заряд, отталкиваются; благодаря этому протеогликаны представляют собой «жесткую» молекулу.

В хряще ГАГ представлены в основном хондроитинсульфатами и кератансульфатом. В хряще обнаружено также небольшое количество гиалуроновой кислоты. По данным одних авторов, содержание ее в хрящевой ткани составляет 1—3 % от содержания уроновой кислоты хондроитинсульфатов [6, 8, 9], по данным других — несколько больше [3]. Последними авторами, кроме того, в хряще выявлены гепарансульфат, дерматансульфат и гепарин. Однако другие исследователи их наличие не отмечают [12].

Все ГАГ хрящевой ткани имеют в своем составе гексозамины, представленные в кератансульфате, гиалуроновой кислоте и гепарансульфате глюкозаминном, а в хондроитинсульфатах и дерматансульфате — галактозаминном. Небольшое количество последнего обнаружено и в кератансульфате.

Хондроитинсульфаты и кератансульфат в своем составе имеют галактозу: первые — в месте присоединения углеводной цепи к белковой основе протеогликана, второй — в самой цепи. Все ГАГ, за исключением кератансульфата, содержат в своей дисахаридной цепи в качестве одного из углеводов уроновую кислоту.

Общее содержание ГАГ в хрящевой ткани принято определять по концентрации гексозаминов, уроновых кислот и гексоз. Эти компоненты обнаруживаются в хряще в большом количестве [2].

Исследование состава межклеточного вещества хряща важно для понимания его своеобразных свойств, и литература о содержании ГАГ в этой ткани обширна. Однако из-за большого разнообразия материала, подвергнувшегося исследованию, а также отсутствия единых методов выделения, очистки и определения ГАГ существуют различные точки зрения на изменения в содержании и составе ГАГ хряща, зависящие от возраста и развития патологических процессов. Кроме того, ряд исследований проводился на ограниченном числе объектов и результаты не подвергались статистической обработке.

В связи с этим мы поставили цель изучить общее содержание ГАГ по входящим в их состав основным углеводам (гексозамину, уроновой кислоте, гексозам) в неизмененном и дегенеративно измененном суставном хряще людей различного возраста.

### Методика

У людей, умерших от случайных причин, брали на исследование хрящевую ткань надколенников. Состояние суставного хряща оценивали визуально. Хрящ считали неизмененным, если он был блестящим, гладким, плотным и неистонченным. Дегенеративные изменения проявлялись в шероховатости и тусклости поверхности, размягчении и истончении хряща. Дегенеративно измененный хрящ по степени дегенерации был условно разделен на две группы. Хрящ с тусклой и шероховатой поверхностью без изменений консистенции мы относили в группу I степени дегенерации. В группу II степени дегенерации нами отнесена размягченная и истонченная хрящевая ткань.

Всего было исследовано 102 образца хряща, из них 71 неизмененного, 13 с I степенью дегенерации, 18 со II степенью.

Материал распределен согласно схеме возрастной периодизации 1972 г. следующим образом: новорожденные (0—10 сут), дети второго детства (7—11 лет), юноши (17—20 лет), люди зрелого возраста первого (21—35) и второго (36—55 лет женщины и 36—60 лет мужчины) периодов, пожилого (до 74 лет) и старческого (75—90 лет) возраста.

ГАГ хряща выделяли и очищали в соответствии с указаниями [14]. Хрящ обезжиривали эфиром. К кусочкам хряща для ферментатив-



ного расщепления добавляли папаин, растворенный в 0,1 М ацетатном буфере pH 5,7—5,8 с 0,01 М ЭДТА и L-цистеином из расчета 10 мг фермента в 5 мл буфера на 1 г сырой массы хряща. Гидролиз проводили при 65°C при периодическом встряхивании в течение 5—7 ч до полного исчезновения кусочков хрящевой ткани. Депротенинизацию гидролизата осуществляли 10 % ТХУ в течение суток при 4°C. После центрифугирования при 3000 об/мин в течение 30 мин на каждый миллилитр надосадочной жидкости для осаждения ГАГ добавляли 0,3 мл 50 % раствора уксуснокислого натрия и 96° этанол до его конечной концентрации 67°. Смесь встряхивали и помещали на сутки в термостат при 4°C. Осадок отделяли центрифугированием, как описано выше. Полноту осаждения ГАГ выборочно проверяли дополнительным добавлением равного объема этанола к надосадочной жидкости. Отсутствие помутнения свидетельствовало о полноте осаждения ГАГ.

Для очистки ГАГ их растворяли в 2,0 мл воды и повторно осаждали смесью этанола с уксуснокислым натрием, как описано выше, и вновь растворяли в воде.

В растворе ГАГ определяли содержание их углеводных компонентов. Уроновую кислоту определяли карбазоловым методом [7], используя в качестве стандарта D-глюкуроновую кислоту, гексозы—орциновым методом [13], используя в качестве стандарта галактозу. Гексозамины определяли после гидролиза образцов в течение 4 ч при 100°C в 4 н. соляной кислоте описанным методом [5] с п-диметилбензилальдегидом, используя в качестве стандарта солянокислый глюкозамин. Содержание всех компонентов выражали в микромолях вещества на 1 г влажной массы хряща.

## Результаты и обсуждение

Исследования показали, что содержание различных углеводов в ГАГ неизмененного суставного хряща человека изменяется с возрастом неодинаковым образом.

Концентрация уроновых кислот в ГАГ на протяжении жизни снижается, и у новорожденных их содержание более чем в 2 раза выше, чем у людей старческого возраста. Однако эта убыль посит неравномерный характер. Наиболее резко уменьшается количество уроновых кислот в детском возрасте. У новорожденных их содержание составляет в среднем  $62,0 \pm 2,0$  мкмоль/г. У детей 7—11 лет —  $53,9 \pm 1,1$  мкмоль/г ( $P < 0,001$ ).

У юношей содержание уроновых кислот в ГАГ хряща еще более низко —  $46,0 \pm 1,1$  мкмоль/г и статистически достоверно отличается от такового у детей 7—11 лет ( $P < 0,001$ ).

У взрослых людей зрелого возраста первого периода концентрация уроновых кислот составляет в среднем  $40,7 \pm 1,8$  мкмоль/г, т. е. еще более

снижена по сравнению с таковой у юношей ( $P < 0,05$ ). В зрелом возрасте содержание уроновых кислот продолжает убывать. У людей зрелого возраста второго периода и крайние, и средние значения концентрации уроновых кислот несколько ниже таковых людей зрелого возраста первого периода. Однако эти различия не достигают статистической значимости ( $P > 0,5$ ).

У людей более старшего возраста отмечена самая низкая концентрация уроновых кислот — в среднем  $30,3 \pm 1,0$  мкмоль/г. Это снижение является статистически достоверным по сравнению с лицами зрелого возраста ( $P < 0,001$ ).

Иным образом изменяется с возрастом содержание в ГАГ гексоз. У новорожденных этот показатель имеет самое низкое значение —  $20,6 \pm 1,6$  мкмоль/г. В ГАГ хряща детей 7—11 лет и юношей концентрация их в 2,5 раза выше и составляет соответственно  $55,4 \pm 1,1$  и  $55,0 \pm 1,8$  мкмоль/г.

У людей зрелого возраста первого периода отмечается самое высокое содержание гексоз —  $65,7 \pm 2,9$  мкмоль/г. Такое увеличение содержания гексоз у людей зрелого возраста первого периода по сравнению с этим показателем у юношей является статистически достоверным ( $P < 0,01$ ).

В процессе дальнейшего онтогенетического развития концентрация гексоз в ГАГ хряща уменьшается. У людей зрелого возраста второго периода она составляет  $60,8 \pm 1,8$  мкмоль/г. У людей пожилого и старческого возраста концентрация гексоз в ГАГ хряща снижается статистически достоверно по сравнению с таковой у людей зрелого возраста второго периода и составляет в среднем  $53,7 \pm 1,7$  мкмоль/г ( $P < 0,02$ ).

Содержание гексозаминов в ГАГ хряща не подвержено возрастным колебаниям. Статистически достоверной разницы между их концентрацией у людей различных возрастных групп не отмечается. Средние значения данного показателя находятся в пределах 60—78 мкмоль/г.

В дегенеративно измененном хряще по сравнению с неизмененным во всех возрастных группах содержание компонентов ГАГ снижено.

На нашем материале особенно заметна эта убыль в хряще людей зре-

лого возраста, где прослеживается зависимость между степенью дегенеративного процесса и содержанием компонентов ГАГ. В этой возрастной группе в ГАГ хряща с I степенью дегенерации уменьшается содержание уоновых кислот до  $27,3 \pm 1,4$  мкмоль/г и гексоз до  $44,4 \pm 2,4$  мкмоль/г. Эта убыль статистически достоверна ( $P < 0,001$ ).

Концентрация гексозаминов у людей зрелого возраста при I степени дегенерации хряща снижена по сравнению с таковой в неизмененном хряще почти на 25 % и составляет  $52,7 \pm 7,5$  мкмоль/г.

Как показали наши исследования, при усилении дегенеративного процесса концентрация всех углеводов в ГАГ хряща людей зрелого возраста снижена на 40 %. Содержание уоновых кислот снижено в среднем до  $23,1 \pm 2,5$  мкмоль/г, гексоз — до  $37,1 \pm 1,6$  мкмоль/г, гексозаминов — до  $42,8 \pm 8,0$  мкмоль/г. Это снижение статистически достоверно. Различия содержания компонентов ГАГ в хряще с I и II степенью дегенерации у людей зрелого возраста также статистически достоверны ( $P < 0,05$ ).

У людей пожилого и старческого возраста в ГАГ дегенеративно измененного хряща снижение содержания уоновых кислот, гексоз и гексозаминов по сравнению с таковым в ГАГ неизмененного хряща не столь ярко выражено, как у людей зрелого возраста. У людей пожилого и старческого возраста в хряще с различной степенью дегенерации не выявлены статистически достоверные различия между содержанием этих компонентов ГАГ.

У людей пожилого возраста в ГАГ дегенеративно измененного хряща по сравнению с ГАГ хряща без макроскопических изменений содержание гексозаминов снижено почти на 25 %, а концентрация уоновых кислот и гексоз — на 14 % ( $P < 0,05$ ).

У людей старческого возраста концентрация гексоз в ГАГ дегенеративно измененного хряща статистически достоверно снижена по сравнению с соответствующим показателем неизмененного хряща ( $P < 0,02$ ). В этом возрасте в ГАГ хряща с дегенеративными изменениями отмечается также уменьшение содержания уоновых кислот на 14 % и гексозаминов на 28 %.

Результаты наших исследований показывают, что с возрастом в суставном хряще уменьшается концентрация ГАГ, содержащих уоновые кислоты. Такие же данные были получены и другими авторами [4]. О возрастных изменениях содержания гексозаминов в ГАГ хряща существуют различные мнения. Одни исследователи выявляют их снижение [10, 11], другие считают, что концентрация гексозаминов не претерпевает существенных изменений в течение жизни человека [1]. Последнее подтверждается и нашими данными. Исследования гексоз в хрящевой ткани людей в возрастном аспекте, как следует из доступной нам литературы, не проводились. По полученным нами данным, в ГАГ хряща наименьшее содержание гексоз у новорожденных, оно достигает максимума у людей зрелого возраста первого периода и в процессе дальнейшего онтогенетического развития снижается. Результаты наших исследований, как и данные других авторов, показали, что в дегенеративно измененном хряще концентрация всех компонентов ГАГ снижена. Нами также отмечено, что чем более выражены дегенеративные изменения в хряще, тем меньше в нем содержание ГАГ. В этом случае на снижение ГАГ не оказывает существенного влияния возраст человека.

Различные изменения в концентрации отдельных компонентов ГАГ свидетельствуют о том, что о содержании ГАГ в тканях нельзя судить по концентрации одного углевода.

Между процессами старения и дегенерации хряща имеются различия: при дегенеративном процессе в хряще снижена концентрация всех компонентов ГАГ, а при старении уменьшается содержание уоновых кислот и гексоз, тогда как концентрация гексозаминов остается постоянной.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Касавина Б. С., Зенкевич Г. Д. — Биохимия, 1960, т. 25, № 4, с. 669—674.
2. Слуцкий Л. И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани. Л., 1969.
3. Юсипова Н. А., Костюк В. П., Балесная Л. И., Мамонтова В. А. — Вопр. мед. химии, 1976, № 4, с. 507—513.
4. Bjelle A. O., Antonopoulos C. A., Engfeldt B., Hjertquist S. O. — Calcif. Tissue Res., 1972, vol. 8, p. 237—246.

5. Cessi C., Piliago F. — Biochem. J., 1960, vol. 77, p. 508—510.
6. Elliott R. J., Gardner D. L. — Ann. rheum. Dis., 1979, vol. 38, p. 371—377.
7. Galambos J. T. — Analyt. Biochem., 1967, vol. 19, p. 119—132.
8. Hardingham T. E., Muir H. — Biochem. Soc. Trans., 1973, vol. 1, p. 282—289.
9. Hascall V. C., Heinegard D. — J. biol. Chem., 1974, vol. 249, p. 4242—4249.
10. Kuhn R., Leppelmann H. J. — Justus Liebig's Ann. Chem., 1957, Bd 607, S. 3 202—206.
11. Loewi G. — J. Path. Bact., 1953, vol. 65, p. 381—388.
12. Mankin H. J., Lippiello L. — J. clin. Invest., 1971, vol. 50, p. 1712—1719.
13. Svennerholm L. — J. Neurochem., 1956, vol. 1, p. 42—53.
14. Taniguchi N. — Separ. Purif. Meth., 1976, vol. 5, p. 247—299.

Поступила 25.01.85

## CONCENTRATION OF GLYCOSAMINOGLYCANS IN NORMAL AND DEGENERATIVE JOINT CARTILAGE FROM PERSONS OF VARIOUS AGE

D. V. Kosyagin

Institute of Traumatology and Orthopedics,  
Saratov

Content of glycosaminoglycans in normal and degenerative joint cartilage of various old persons from birth up to senile age was studied by means of estimation of uronic acids, hexoses and hexosamines. In normal cartilage content of hexosamines did not alter with age but concentration of uronic acids was gradually decreased especially distinct at the senile age. Content of hexoses was increased from birth up to 35 years old age and then it was decreased. In degeneratively impaired cartilage content of glycosaminoglycans was decreased; content of all three carbohydrates studied was lesser in the impaired cartilage as compared with normal tissue from persons of the same age.

УДК 616.83-053.3-07: [616.153.915+616.153.96]-02:615.356: [577.161.1+577.161.3

С. Л. Няньковский, М. Ф. Тимочко

## ВЛИЯНИЕ ВИТАМИНОВ А И Е НА НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЛИПИДНОГО И БЕЛКОВОГО ОБМЕНА У ДЕТЕЙ С ПЕРИНАТАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Львовский медицинский институт

По данным литературы, у 4—12 % новорожденных наблюдается гипоксически-травматическое поражение центральной нервной системы (ЦНС). Кроме того, эти дети имеют различную соматическую патологию, составляют группу высокого риска в отношении инфекционно-воспалительных и аллергических заболеваний [2, 7, 8, 9].

В связи с тем, что в патогенезе гипоксии ведущим звеном является нарушение обмена веществ, ее часто называют своеобразной «биохимической травмой плода». При этом биохимические расстройства затрагивают углеводно-фосфорный, жировой, витаминный, минеральный и белковый обмен, нарушается морфофункциональное состояние ряда органов и систем, прежде всего головного мозга, иммунных и эндокринных органов. Создаются условия для усиления свободнорадикального окисления, накопления перекисей липидов, вызывающих необратимые изменения клеток, нарушения энергетических и ферментных систем. Интенсификация обмена приводит к

быстрой истощаемости запасов глюкозы, липидов, сдвигу обмена в сторону катаболизма [4—6, 11]. В связи с этими изменениями такие дети подвергаются инфекции, заболевания протекают у них тяжело, сопровождаются выраженными токсикозами, зачастую приводящими к летальному исходу.

Большую роль в патологических изменениях обмена веществ и иммунных реакций играет нарушение обеспеченности организма жирорастворимыми витаминами А и Е [3].

Известно, что транспорт жирорастворимых витаминов от матери к плоду лимитирован, интенсивное их накопление в тканях плода наблюдается в течение последних недель беременности и значительно снижается при токсикозах, различных нарушениях маточно-плацентарного кровообращения, гипоксии. В результате у детей с хронической внутриутробной гипоксией образуется относительный дефицит витаминов А и Е. Этот дефицит нарастает при позднем прикла-



Т а б л и ц а 1

Исходное содержание витаминов А и Е, липидов и белков в сыворотке крови у детей исследуемой и контрольных групп

Обследуемые	Витамин А, мкг на 100 мл	Витамин Е, мкг на 100 мл	Холестерин, ммоль/л	β-липо- протеиды, усл. ед.	МДА, ммоль/мл	Общий белок, г/л	Альбу- мин, %	Глобулины, %			
								альфа-1	альфа-2	бета	гамма
1. Дети с перинатальной патологией ЦНС и токсикозом (100)	4,3±0,2	0,36±0,01	2,76±0,07	23,6±0,9	60,7±1,6	64,8±0,7	55,9±0,6	6,9±0,1	12,4±0,3	11,9±0,2	12,8±0,3
2. Дети с перинатальной патологией ЦНС без токсикоза (25)	5,4±0,4	0,41±0,03	3,35±0,08	27,2±0,7	73,0±2,7	59,6±0,9	59,5±0,9	6,5±0,2	11,9±0,4	11,3±0,3	10,6±0,3
3. Дети с инфекционно-воспалительным заболеванием без патологии ЦНС (25)	15,8±0,7	0,81±0,2	3,94±0,13	35,6±1,2	102±6,2	71,9±0,8	53,6±0,8	6,5±0,2	11,4±0,3	12,2±0,2	16,0±0,3
P <sub>1-2</sub>	<0,05	>0,05	<0,001	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001	>0,05	>0,05	>0,05	<0,001
P <sub>1-3</sub>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,001
P <sub>2-3</sub>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	>0,05	>0,05	>0,05	<0,001

Т а б л и ц а 2

Влияние витаминов А и Е на исследуемые показатели белкового и липидного обмена

Сроки и группы обследуемых	Витамин А, мкг на 100 мл	Витамин Е, мкг на 100 мл	Холестерин, ммоль/л	Бета-липо- протеиды, усл. ед.	МДА, ммоль/мл	Общий белок, г/л	Альбу- мин, %	Глобулины, %			
								альфа-1	альфа-2	бета	гамма
Исходный уровень (1-я группа)	4,3±0,2	0,36±0,01	2,76±0,07	23,6±0,9	60,7±1,6	64,8±0,7	55,9±0,6	6,9±0,1	12,4±0,3	11,9±0,2	12,8±0,3
Через 7 дней подгруппа 1	4,3±0,3	0,37±0,03	2,72±0,08	25,3±0,9	62,9±2,9	66,6±0,9	57,4±1,0	7,0±0,2	12,2±0,4	10,8±0,2	12,2±0,5
подгруппа 2	4,8±0,2	0,90±0,03	3,40±0,19	31,4±1,6	85,3±2,9	67,6±0,9	56,5±0,9	7,3±0,6	11,1±0,3	11,4±0,2	13,9±0,6
подгруппа 3	10,2±0,3	0,78±0,02	3,78±0,15	31,9±1,4	106±2,6	65,6±0,6	53,9±1,0	6,6±0,2	12,6±0,4	13,2±0,4	14,2±0,4
P <sub>2-3</sub>	>0,05	<0,001	<0,01	<0,01	<0,001	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05
P <sub>2-4</sub>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05	<0,001	<0,05
P <sub>3-4</sub>	<0,001	<0,05	>0,05	>0,05	<0,001	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05	<0,01	>0,05
Через 14 дней подгруппа 1	4,5±0,3	0,36±0,03	3,05±0,11	28,7±1,2	69,2±2,1	63,9±1,4	58,0±1,1	6,9±0,2	11,5±0,3	11,0±0,3	12,7±0,5
подгруппа 2	5,1±0,2	1,19±0,06	3,59±0,19	32,7±1,6	94,7±3,4	68,7±0,8	56,2±0,8	7,0±0,2	10,9±0,2	11,3±0,2	14,5±0,9
подгруппа 3	19,8±0,4	0,96±0,02	4,15±0,12	38,2±1,2	91,6±1,1	70,0±0,9	54,7±0,8	6,5±0,2	12,0±0,2	12,1±0,3	14,4±0,4
P <sub>5-6</sub>	>0,05	<0,001	<0,05	>0,05	<0,001	<0,01	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
P <sub>5-7</sub>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,05	>0,05	>0,05	<0,05	<0,05
P <sub>6-7</sub>	<0,001	<0,001	<0,05	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,001	<0,05	>0,05

дивании ребенка к груди, при искусственном вскармливании, инфекционно-воспалительных заболеваниях.

Целью нашего исследования явилось изучение обеспеченности витаминами А и Е детей первого года жизни с перинатальной патологией ЦНС без инфекционно-воспалительных заболеваний и при развитии инфекционного токсикоза, а также влияние парентерального введения указанных витаминов при токсикозах на некоторые показатели белкового и липидного обмена.

### Методика

Обследовано 100 детей первого года жизни (1-я группа) с перинатальной патологией ЦНС в условиях палаты интенсивной терапии в динамике токсикоза, при инфекционно-воспалительных заболеваниях (острые респираторные вирусные инфекции, сепсис, пневмония, энтероколит). Исследования проводили в день поступления, а также на 7-е и 14-е сутки лечения. В зависимости от характера лечения дети этой группы были в дальнейшем разделены на 3 подгруппы: подгруппу 1 составили 30 детей, не получавших в комплексе общепринятой интенсивной терапии витаминов А и Е; подгруппу 2 — 30 детей, получавших дополнительно витамин Е парентерально в дозе 10 мг на 1 кг массы тела в сутки; подгруппу 3 — 40 детей, получавших дополнительно комплекс витаминов А и Е в виде препарата «Аевит» парентерально в дозе 0,1 мл на 1 кг массы тела в сутки (но не более 1 мл).

В качестве контроля служили 25 детей с перинатальной патологией ЦНС без инфекционно-воспалительных заболеваний (2-я группа) и 25 детей с инфекционно-воспалительными заболеваниями, без перинатальной патологии ЦНС, в состоянии средней тяжести, адекватно реагирующих на заболевание (3-я группа). Средний возраст детей всех групп был сопоставимым.

В сыворотке крови определяли содержание холестерина,  $\beta$ -липопротеидов, общего белка и белковых фракций по общепринятым методикам, витамина А по методике Бессея в модификации А. А. Анчовой [1], витамин Е [12], уровень малонового диальдегида (МДА) [10].

### Результаты

Проведенные исследования показали, что у детей с перинатальной патологией ЦНС без инфекционно-воспалительных заболеваний (4-я группа) отмечалось низкое содержание в сыворотке крови витаминов А и Е, холестерина,  $\beta$ -липопротеидов, еще более снижающееся при развитии инфекционно-воспалительных заболеваний. Содержание общего белка и гамма-глобулина, также сниженное у детей

с перинатальной патологией ЦНС, обнаруживало тенденцию к увеличению при развитии инфекционно-воспалительных заболеваний.

У детей без перинатальной патологии ЦНС (5-я группа) перечисленные показатели с небольшими колебаниями соответствовали возрастным нормам (табл. 1).

У детей 1-й группы (табл. 2) исходно низкое содержание витаминов А, Е и МДА, а также общего белка и гамма-глобулина практически не изменялось в процессе лечения. Сниженным оставалось содержание холестерина,  $\beta$ -липопротеидов, с незначительной тенденцией к увеличению при улучшении состояния.

У детей 2-й группы после 1-й недели применения витамина Е достоверно повышался уровень этого витамина, холестерина,  $\beta$ -липопротеидов, МДА и гамма-глобулина. Отдельные показатели еще более возросли после 14-дневного курса витамина Е.

В группе детей, получавших «Аевит», при исследовании на 7-й день достоверно повышалось содержание витаминов А и Е, холестерина,  $\beta$ -липопротеидов, МДА и гамма-глобулина. По сравнению с детьми 2-й группы, концентрация витамина Е в сыворотке была несколько ниже, а витамина А — значительно выше, возрастал уровень МДА,  $\alpha$ -2- и  $\beta$ -глобулинов.

Назначение «Аевита» в течение 14 дней приводило к достоверному повышению уровня витаминов А и Е, холестерина,  $\beta$ -липопротеидов, МДА, общего белка, глобулинов, приближая их к возрастной норме.

Таким образом, у детей первого года жизни с перинатальной патологией ЦНС имеется выраженный дефицит витаминов А и Е, не корригирующийся без дополнительного введения витаминов и сопровождающийся значительными нарушениями липидного и белкового обмена. Включение в комплекс интенсивной терапии «Аевита» в дозе 0,1 мл на 1 кг массы тела в сутки в течение 2 нед улучшает обеспеченность организма витаминами А и Е, нормализует некоторые показатели белкового и липидного обмена. Увеличение концентрации МДА в сыворотке крови при назначении витаминов А и Е, по-видимому, связано с увеличением количества субстрата перекисного окисления.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Анисова А. А. — В кн.: Биохимические методы исследований в клинике / Под ред. А. А. Покровского. М., 1969, с. 463—469.
2. Бадалян Л. О. Детская неврология. М., 1984.
3. Витамины в педиатрии / Под ред. Е. М. Лукьяновой. Киев, 1984.
4. Дещкина М. Ф. Внутречерепная родовая травма новорожденных. Автореф. дис. докт. мед. наук. М., 1969.
5. Елизарова И. П. Церебральные нарушения у новорожденных, перенесших родовую травму и асфиксию. Л., 1977.
6. Кирюченко А. П. Влияние вредных факторов на плод. М., 1978.
7. Перинатальная патология / Под ред. М. Я. Студеникина и др. М., 1984.
8. Петров-Маслаков М. А. — В кн.: Антенатальная охрана плода. М., 1968, с. 39—47.
9. Ромоданов А. П., Бродский Ю. С. Родовая черепно-мозговая травма у новорожденных. Киев, 1981.
10. Тимирбулатов Р. А., Селезнев Е. И. — Лаб. дело, 1981, № 4, с. 209—211.
11. Dorand R. D. — *Pediat. Clin. N. Amer.*, 1977, vol. 24, p. 455—461.

12. Hansen L. G., Warwick W. J. — *Amer. J. clin. Path.*, 1969, vol. 51, p. 538.

Поступила 05.03.85

## EFFECT OF VITAMINS A AND E ON SOME PATTERNS OF LIPID AND PROTEIN METABOLISM IN CHILDREN WITH PERINATAL PATHOLOGY OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM

S. L. Nyan'kovsky, M. F. Timochko

Medical School, Lvov

In children with perinatal pathology of central nervous system content of vitamins A and E was decreased in blood serum. At the same time, some patterns of lipid and protein metabolism were altered. These alterations were especially distinct in pathological conditions accompanied by inflammatory reaction due to infections. Parenteral administration of a complex of vitamins A and E (drug "Aevit") within 2 weeks led to normalization of the content of these vitamins in blood serum. At the same time, the altered patterns of lipid and protein metabolism were normalized.

УДК 616.36-092.9-02:661.183.121-07

В. В. Фролькис, В. К. Кольтовер, Е. Н. Горбань, Г. И. Парамонова,  
Е. В. Щербицкая

## ВЛИЯНИЕ ЭНТЕРОСОРБЦИИ НА СИГНАЛЫ ЭПР ПЕЧЕНИ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Институт геронтологии АМН СССР, Киев, Институт химической физики АН СССР,  
Черноголовка, Московская область

Известно, что под влиянием энтеросорбции из плазмы крови удаляется ряд эндогенных токсических метаболитов и биологически активных веществ, происходит модификация аминокислотного и липидного состава кишечного содержимого [6, 7]. Ранее было показано, что удаление из организма токсических продуктов жизнедеятельности, играющих существенную роль в генезе старения, приводит к увеличению продолжительности жизни старых животных [10]. Вместе с тем механизмы влияния энтеросорбции на организм животного и продолжительность жизни нуждаются в углубленном изучении. Поскольку энтеросорбция оказывает существенное влияние на метаболические процессы в печени за счет изменения энтерогепатической циркуляции, представлялось целесообразным изучить влияние энтеросорбции на ферментные системы, катализирующие окислительно-восстановительные реакции в гепатоцитах, с использованием метода ЭПР-спектроскопии.

## Методика

Опыты проводили на белых крысах-самцах Вистар двух возрастных групп: взрослых (8 мес) и старых (24 мес). Энтеросорбцию осуществляли в течение 30 дней. Энтеросорбент группы СКН животные получали вместе с пищей в количестве 0,2 мл на 100 г массы тела. Животных декапитировали на 3-и сутки после последнего приема сорбента.

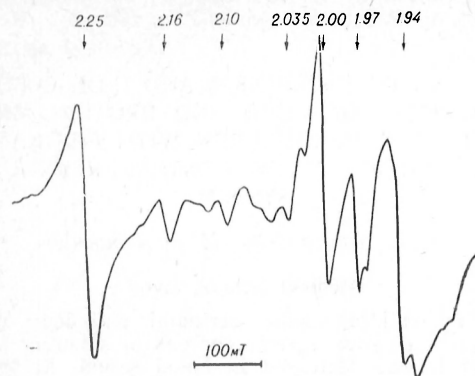
Образцы ткани печени для ЭПР-спектроскопии готовили по стандартной методике в виде цилиндрических столбиков длиной 20 мм и диаметром 3 мм. Сигналы ЭПР регистрировали на спектрометре Е-109 ("Varian", США), оборудованном внутренним стандартом, при температуре 77 К, амплитуде высокочастотной модуляции 10 Гс и микроволновой мощности 0,2 мВт (при регистрации сигналов с  $g=2,00$ ) или 10 мВт (при регистрации остальных сигналов) [4].

Полученные данные обрабатывали статистически с использованием  $t$ -критерия Стьюдента.

## Результаты

На рисунке представлен типичный спектр ЭПР печени крыс. Для количественной характеристики спектров





Спектр ЭПР печени крысы.

Возраст животного 8 мес. Условия регистрации: температура 77 К, амплитуда модуляции 10 Гс, микроволновая мощность 10 мВт, усиление  $8 \times 10^2 \times 10$ ; стрелками указаны значения  $g$ -факторов спектральных линий.

измеряли интенсивности (амплитуды от пика к пику) соответствующих сигналов. Интенсивность сигнала с  $g = 1,94$  пропорциональна содержанию железо-серных белков (ЖСБ) митохондриальных дыхательных цепей с негемовым железом в восстановленном состоянии; интенсивность сигнала с  $g = 2,00$  — содержанию митохондриальных флавопротеидов в свободнорадикальной семихинонной форме (СФ), а сигнала с  $g = 2,25$  — содержанию в ткани цитохрома Р-450 с гемовым железом в низкоспиновой окисленной форме. Кроме этих интенсивных линий, в спектре ЭПР печени регистрируется сигнал сульфитоксидазы — митохондриального фермента в восстановленном состоянии с атомом молибдена  $Mo^{5+}$  в активном центре ( $g = 1,97$ ). Слабые линии с  $g = 2,16$  и  $g = 2,10$  принадлежат главным образом еще не идентифицированным  $Mn^{2+}$ -содержащим белкам эндоплазматического ретикулума, а сигнал с  $g = 2,035$  представляет собой наложение сигнала

лов нитрозилильных комплексов негемового железа и  $Cu^{2+}$ -содержащих белков [2, 11].

Результаты измерений интенсивности сигналов ЭПР представлены в таблице. Следует прежде всего отметить возрастные различия сигналов у контрольных животных. Старые животные по сравнению с молодыми характеризуются пониженной интенсивностью сигналов митохондриальных ЖСБ, СФ и сульфитоксидазы, а также существенно меньшей интенсивностью сигнала цитохрома Р-450. Эти данные согласуются с результатами предыдущих исследований [4]. Кроме того, в печени старых животных значительно ослаблены сигналы  $Mn^{2+}$  и сигнал с  $g = 2,035$ .

Воздействие энтеросорбента на молодых животных приводит к существенному ослаблению сигналов цитохрома Р-450, ЖСБ, СФ, марганца и особенно сигнала с  $g = 2,035$ . Интенсивность сигнала сульфитоксидазы в печени молодых животных не изменялась. В опытах со старыми животными интенсивность сигнала цитохрома Р-450 уменьшалась под влиянием энтеросорбции примерно в той же степени, что и в опытах со взрослыми крысами. Однако действие энтеросорбента на другие сигналы печени было иным. Интенсивность сигналов ЖСБ, СФ, марганца и сигнала с  $g = 2,035$  существенно не изменялась, тогда как интенсивность сигнала сульфитоксидазы резко возрастала (см. таблицу).

### Обсуждение

Функционирование ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные реакции в клетке, в том числе ЖСБ, флавопротеидов и цитохрома Р-450, сопровождается случай-

Влияние энтеросорбции на интенсивность сигналов ЭПР в печени крыс разного возраста (в усл. ед.)

Сигнал ЭПР ( $g$ -Фактор)	Молодые животные		Старые животные	
	контроль	энтеросорбции	контроль	энтеросорбции
1,94	$0,89 \pm 0,02$	$0,72 \pm 0,06$	$0,77 \pm 0,10$	$0,80 \pm 0,08^*$
2,00	$0,52 \pm 0,04$	$0,42 \pm 0,03$	$0,43 \pm 0,04$	$0,40 \pm 0,07^*$
2,25	$1,10 \pm 0,20$	$0,90 \pm 0,10$	$0,70 \pm 0,10$	$0,60 \pm 0,10$
2,035	$0,12 \pm 0,04$	$0,06 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,02^*$
2,16	$0,20 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,02$	$0,14 \pm 0,04$	$0,13 \pm 0,03^*$
2,10	$0,10 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,02^*$
1,97	$0,38 \pm 0,04$	$0,40 \pm 0,04^*$	$0,30 \pm 0,09$	$0,49 \pm 0,04$

\*  $P > 0,05$  по сравнению с контролем.

ными ошибками, в результате которых происходит одноэлектронное восстановление кислорода с образованием свободных супероксидных радикалов  $O_2^-$ . Радикалы  $O_2^-$  и химически активные продукты их реакций (например, радикалы  $OH\cdot$ ) токсичны, они способны инициировать повреждение ДНК, перекисное окисление липидов, активацию гуанилатциклазы и другие нежелательные процессы [1, 3, 5, 13].

Снижение с возрастом интенсивности окислительных процессов и, следовательно, активности энергообразующих систем ограничивает функциональные возможности клеток при старении [9, 12]. Вместе с тем эти изменения имеют и определенное адаптационное значение, ибо ограничивают интенсивность образования токсических побочных метаболитов, в том числе свободных радикалов. Действительно, как следует из полученных данных, при старении снижается активность как ферментов электронного транспорта, так и других белков, содержащих ионы металлов переменной валентности.

Под влиянием энтеросорбции в печени взрослых и старых животных снижается интенсивность сигналов ЭПР цитохрома P-450. По-видимому, это связано с удалением из плазмы крови в результате энтеросорбции токсических веществ, являющихся субстратами системы ферментов микросомального окисления и эндогенными индукторами синтеза цитохрома P-450.

У старых животных под влиянием энтеросорбции увеличивается интенсивность сигнала ЭПР сульфитоксидазы. Усиление этого сигнала свидетельствует о росте содержания восстановленной формы фермента, что обусловлено повышением концентрации его субстрата (сульфита), связанным с усилением катаболизма серосодержащих аминокислот цистеина и метионина [8, 11].

Как свидетельствуют приведенные данные, энтеросорбция оказывает выраженное влияние на интенсивность окислительно-восстановительных процессов в печени. Снижение активности электронотранспортных ферментных систем под влиянием энтеросорбции сопровождается уменьшением скорости образования побочных продуктов окислительного метаболизма свобод-

норадикальной природы. Снижение концентрации активных свободных радикалов в клетках наряду с уменьшением других токсических продуктов может лежать в основе геропротекторного эффекта энтеросорбции.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бурлакова Е. Б., Молочкина Е. М., Пальмина Н. П., Слепухина Л. В. — *Вопр. мед. химии*, 1976, № 4, с. 541—546.
2. Ванин А. Ф., Кубрина Л. Н., Лисовская И. Л. и др. — *Биофизика*, 1971, № 4, с. 650—656.
3. Воскресенский О. Н. — В кн.: Молекулярные и клеточные механизмы старения. Киев, 1981, с. 38—39.
4. Гуськова Р. А., Виленчик М. М., Кольтовер В. К. — *Биофизика*, 1980, № 1, с. 102—105.
5. Кольтовер В. К. — *Успехи совр. биол.*, 1983, т. 96, № 4, с. 85—100.
6. Лопухин Ю. М., Молоденков М. Н. *Гемосорбция*. М., 1978.
7. Николаев В. Г. *Метод гемокарбоперфузии в эксперименте и клинике*. Киев, 1984.
8. Основы биохимии / Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э. и др.: Пер. с англ. М., 1981.
9. Фролькис В. В. *Старение. Нейрогуморальные механизмы*. Киев, 1981.
10. Фролькис В. В., Николаев В. Г., Богацкая Л. П. и др. — *Физиол. журн.*, 1984, т. 30, № 1, с. 30—39.
11. Dodd N. J. F. — In: *Metal Ions in Biological Systems* / Ed. H. Sigel. New York, 1980, vol. 10, p. 95—128.
12. Frolkis V. V. — In: *Physiology of Cell Aging* / Ed. V. V. Frolkis. Basel, 1984, p. 153—174.
13. Halliwell B. — *FEBS Lett.*, 1978, vol. 92, p. 321—326.

Поступила 11.02.85

## EFFECT OF ENTEROSORPTION ON EPR SIGNALS IN LIVER TISSUE OF RATS OF DIFFERENT AGE

V. V. Frolkis, V. K. Koltover, E. N. Gorban, G. I. Paramonova, E. V. Shcherbitskaya

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

Liver EPR signals were studied in adult (8 months) and old (24 months) Wistar male rats after the 30 days course of enterosorption carried out daily. The signals were analyzed at the values of  $g=1.94, 2.00, 2.25, 2.035, 2.16, 2.10$  and  $1.97$ . Age-dependent differences were found in liver EPR signals of intact animals, i. e. the intensity of signals of  $g=1.97, 2.00, 1.97$  and  $2.25$  was decreased in old animals. In adult animals enterosorption caused a decrease of signals of  $g=2.25, 1.94, 2.00, 2.16$  and  $2.10$ . In old animals the treatment led to a dissimilar effect: the intensity of signals was decreased at the ranges of  $g=2.25$ , distinctly increased at  $g=1.97$  and unaltered at the other EPR signal values studied. Geroprotective action of enterosorption is discussed considering the decrease in enzymatic activity of electron transport systems due to the treatment studied.

А. М. Тырышкин, Б. Ю. Сальник, Е. В. Долгих

## ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ, АКТИВНОСТЬ НАД·Н-ОКСИДАЗНОЙ И СУКЦИНАТОКСИДАЗНОЙ СИСТЕМ В МИТОХОНДРИЯХ ТЕСТИКУЛ КРЫС ПРИ АЛЛОКСАНОВОМ ДИАБЕТЕ

Кафедра биохимии МБФ ЦНИЛ Томского медицинского института

К настоящему времени накоплен значительный материал, свидетельствующий о существенном снижении при диабете в ткани печени содержания большинства кислот трикарбонового цикла [4], изменении активности ферментов этого метаболического пути [13, 15], нарушении функционирования митохондрий (МХ) [1, 14]. Состояние биоэнергетики тестикул в условиях этой патологии до настоящего времени изучено недостаточно. Между тем, судя по данным литературы, в условиях диабета существенно нарушена репродуктивная функция человека и животных: отмечаеся снижение содержания гонадотропинов в плазме крови и угнетение процессов стероидогенеза [10, 12]. Возникают морфологические изменения в ткани тестикул [11]. Ранее нами были выявлены незначительные сдвиги в функциональном состоянии МХ тестикул диабетических крыс при содержании глюкозы в плазме крови 11 ммоль/л [8]. В плане дальнейшего изучения состояния биоэнергетики семенников диабетических животных целью настоящей работы явилось изучение функционирования МХ тестикул крыс при более тяжелой форме аллоксанового диабета.

### Методика

Опыты проводили на беспородных крысах-самках с массой тела 180—220 г. Диабет вызывали однократным подкожным введением аллоксана моногидрата ("Reanal", ВНР) из расчета 200 мг на 1 кг массы животного. Исследования проводили на 14-е сутки после введения аллоксана.

Митохондрии из ткани тестикул выделяли, как описано [9]. Среда выделения содержала 0,25 М сахарозу, 1 мМ ЭДТА pH 7,4. Скорость дыхания МХ регистрировали полярографическим методом при 26 °С в кювете вместимостью 1 мл в среде следующего состава: 0,2 М сахароза, 10 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 7 мМ  $\text{MgCl}_2$  pH 7,4. Субстраты окисления: сукцинат (конечная концентрация 10 мМ) и смесь малат — глутамат (конечная концентрация по 5 мМ). АДФ и ДНФ добавляли в конечной концен-

трации 200 и 40 мкМ соответственно. О функциональных параметрах энергетических систем МХ судили по скорости потребления кислорода при наличии субстрата окисления ( $V_{4n}$ ), после добавки АДФ ( $V_3$ ), в отрегулированном состоянии ( $V_{4o}$ ) и после добавки разобщителя ДНФ ( $V_D$ ). Рассчитывали также коэффициент дыхательного контроля по Чансу — Уильямсу ( $V_3 : V_{4o}$ ), время фосфорилирования добавленного АДФ ( $T_{\Phi}$ ) и отношение АДФ : 0.

Часть МХ замораживали и после оттаивания регистрировали активность НАД·Н-оксидазных и сукцинатоксидазных систем, как описано в работе [6]. Среда измерения содержала  $5 \cdot 10^{-4}$  М ЭДТА в 0,03 М фосфатный буфер pH 7,4. Изучение термостабильности полиферментных систем проводили при 28 °С. Реакцию начинали добавлением к суспензии МХ в ячейку полярографа объемом 1 мл НАД·Н<sub>2</sub> в конечной концентрации 3 мкМ, сукцината — 10 мкМ. Скорость окисления субстратов при исследовании дыхательной активности МХ, а также активности полиферментных систем выражали в нанограмм-атомах кислорода, потребляемого за 1 мин при 26 °С в расчете на 1 мг белка МХ. Содержание митохондриального белка определяли биуретовым методом, глюкозы в плазме крови — орто-толуидиновым методом с помощью набора фирмы "Lachema" (ЧССР). Содержание инсулина в плазме крови определяли с помощью набора РИО-инс-ПГ-125/ (СССР). Результаты обработаны статистически с применением критерия *t*-Стьюдента и непараметрического критерия Вилкоксона — Манна — Уитни.

### Результаты и обсуждение

Функциональное состояние МХ тестикул исследовали у крыс с содержанием глюкозы в плазме крови  $20 \pm 2$  ммоль/л (в контроле —  $5 \pm 1$  ммоль/л). Инсулинзависимая форма диабета подтверждена определением уровня инсулина в плазме крови. Содержание последнего у подопытных животных составляло  $64,8 \pm 7,7$  пмоль/л (в контроле —  $87,2 \pm 5,8$  пмоль/л).

Результаты, представленные в таблице, свидетельствуют о том, что аллоксановый диабет приводит к изменению дыхательной и фосфорилирующей активности МХ тестикул при окислении сукцината и малата — глутамата. Так, при использовании в качестве субстрата окисления сукцината отме-



Потребление кислорода (в нгА  $O_2$ /мин·мг белка) митохондриями тестикул крыс при аллоксановом диабете ( $M \pm m$ )

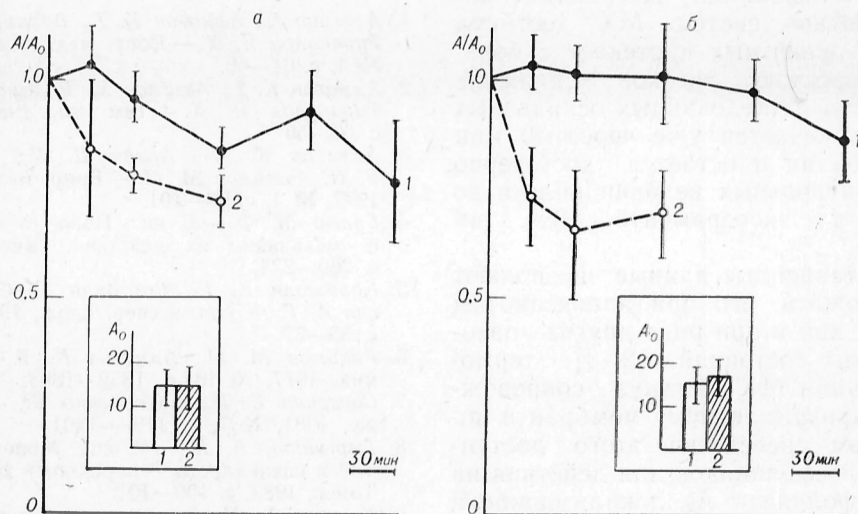
Группа эксперимента	$V_{4п}$	$V_3$	$V_{4о}$	$V_p$	КДК	АДФ:0	$T_{\phi}$
Сукцинат							
Контрольная группа	27,9±1,5	42,3±1,6	26,9±1,2	41,5±1,2	1,56±0,01	1,99±0,14	63,0±4,0
Подопытная группа	22,6±1,0*	32,8±2,1*	26,3±1,6	34,1±2,7*	1,25±0,05*	1,38±0,09*	83,3±5,5*
Малат—глутамат							
Контрольная группа	15,8±1,3	28,8±0,7	20,9±1,0	23,1±0,6	1,39±0,05	2,54±0,03	68,6±4,5
Подопытная группа	12,4±0,3*	21,6±0,9*	17,6±1,3	17,9±1,1*	1,15±0,04*	2,51±0,08	75,1±4,7

Примечание. В контрольных и подопытных группах было по 6 животных. КДК—коэффициент дыхательного контроля. Звездочка—величины, достоверно отличающиеся от контроля ( $P < 0,05$ ).

чали снижение  $V_{4п}$  (на 19 %),  $V_3$  (на 23 %) и  $V_p$  (на 18 %) по сравнению с таковыми в контроле. При этом существенно изменялись и параметры окислительного фосфорилирования: коэффициент дыхательного контроля снижался на 18 %, коэффициент АДФ:0 падал на 31 %, время фосфорилирования добавленного АДФ удлинялось на 31 % по сравнению с контрольными значениями. Скорость окисления смеси малат — глутамат митохондриями тестикул крыс при аллоксановом диабете достоверно снижалась во всех метаболических состояниях (см. таблицу). Особенно резко уменьшалась скорость ДНФ-стимулированного дыхания, что может свиде-

тельствовать о глубоких нарушениях переноса электронов по НАД-зависимому пути дыхательной цепи МХ. Установлено снижение коэффициента дыхательного контроля (на 17 %). Время фосфорилирования добавленного АДФ в присутствии МХ подопытных животных достоверно не отличалось от соответствующих контрольных величин.

Наряду с оценкой патологического состояния путем определения параметров окислительного фосфорилирования и активности полиферментных систем надежная информация о состоянии МХ может быть получена путем изучения их деградации различными внешними факторами [3]. Результаты, представленные на рисунке, свиде-



Термостойкость НАД·Н-оксидазной и сукцинатоксидазной систем митохондрий тестикул крыс.

$A$  — ферментативная активность митохондрий после воздействия контролируемого нагревания (28 °С),  $A_0$  — ферментативная активность митохондрий, не подвергавшихся тепловому воздействию (в нанogramм-атомах  $O_2$ ·мин<sup>-1</sup>·мг белка<sup>-1</sup>); а — термостабильность НАД·Н-оксидазной системы, б — термостабильность сукцинатоксидазной системы митохондрий; 1 — контроль, 2 — диабет. По оси абсцисс — время; по оси ординат — относительная активность ( $A/A_0$ ).

тельствуют о том, что активность НАД·Н-оксидазной и сукцинатоксидазной систем подопытной и контрольной групп животных, измеренная сразу после размораживания МХ (A<sub>0</sub>), достоверно не различается между собой. Установлено, что в результате преинкубации при 28 °С в течение 4 ч «термостабильность» сукцинатоксидазной системы МХ тестикул контрольных животных оказалась выше НАД·Н-оксидазной, что соответствует данным литературы по другим тканям [1, 3]. Так, относительная активность сукцинатоксидазы остается практически неизменной в течение 3 ч и лишь к 4-му часу эксперимента резко падает. Изменение НАД·Н-оксидазной активности препарата МХ тестикул интактных крыс имеет волнообразный характер. В течение 1-го часа преинкубации относительная активность НАД·Д-оксидазной системы изменяется незначительно, затем следует резкое снижение через 2 ч преинкубации, к 3-му часу отмечается тенденция к восстановлению уровня НАД·Н-оксидазной активности, однако к 4-му часу эксперимента наблюдается существенное падение последней (см. рисунок).

В аналогичных условиях термоинактивации МХ тестикул крыс с аллоксановым диабетом устойчивость сукцинатоксидазной и НАД·Н-оксидазной систем уменьшается. Деградация полиферментных систем МХ тестикул опытных животных протекает с большей скоростью: резкое снижение активности исследованных оксидазных систем отмечается уже через 30 мин преинкубации и остается достоверно ниже контрольных величин вплоть до окончания эксперимента (см. рисунок).

Представленные данные позволяют предположить, что при аллоксановом диабете, как и при ряде других патологических состояний [2, 3], термоинактивация МХ тестикул сопровождается «разрыхлением» мембран и повышением вследствие этого доступности фосфолипидов для действия на них фосфолипазы A<sub>2</sub>, локализованной, по данным [7], на внутренней мембране МХ. В литературе имеются сведения об активации этого фермента в МХ печени при аллоксановом диабете [5]. Вполне вероятно, что аналогичная направленность нарушений имеет место

и в МХ тестикул диабетических животных. Исходя из этого, можно предположить, что при недостатке инсулина происходит активация фосфолипазы A<sub>2</sub>. В результате нарушения фосфолипид-белковых взаимодействий во внутренней мембране МХ фермент может атаковать субстраты окисления, что в свою очередь приводит к серьезным нарушениям функционирования цепи переноса электронов и процессов сопряженного с дыханием фосфорилирования. Определенный вклад в снижение интенсивности дыхания, отмеченное нами, очевидно, вносит дефицит субстратов цикла трикарбоновых кислот, наблюдаемый при диабете [4]. В результате этого в ткани тестикул нарушается синтез АТФ, субстрата крайне необходимого для обеспечения таких энергозависимых функций органа, как сперматогенная и эндокринная.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что при аллоксановом диабете происходят серьезные функциональные и, возможно, структурные изменения МХ тестикул крыс, приводящие к резкому нарушению дыхательной и фосфорилирующей способности последних, что может иметь решающее значение в нарушениях сперматогенной и эндокринной функций тестикул при диабете.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Агзамов Х., Алматов К. Т., Рахимов М. М., Туракулов Я. Х. — *Вопр. мед. химии*, 1983, № 1, с. 61—66.
2. Алматов К. Т., Агзамов Х., Рахимов М. М., Туракулов Я. Х. — *Там же*, 1982, № 4, с. 50—56.
3. Алматов К. Т., Аулов Д. М., Ахмеров Р. Н., Рахимов М. М. — *Вопр. мед. химии*, 1977, № 1, с. 96—101.
4. Гулый М. Ф. — В кн.: *Новое о гормонах и механизме их действия*. Киев, 1977, с. 260—274.
5. Карагезян К. Г., Вартамян Г. С., Паносян А. Г. — *Бюл. exper. биол.*, 1981, № 8, с. 35—37.
6. Рахимов М. М., Алматов К. Т. — *Биохимия*, 1977, № 10, с. 1852—1863.
7. Северина Е. П., Евтодиенко Ю. В. — *Там же*, 1981, № 7, с. 1199—1201.
8. Тырышкин А. М. — В кн.: *Молодые ученые и специалисты — народному хозяйству*. Томск, 1983, с. 100—101.
9. Хлынин С. М. Влияние переменного магнитного поля на некоторые метаболические процессы в семенниках. Дис. канд. мед. наук. Томск, 1977.
10. Benitez A., Peres Siaz J. — *Experientia* (Basel), 1982, vol. 38, p. 907—908.
11. Gupta R. A., Dixit V. P. — *Arch. Biol. (Liege)*, 1981, vol. 92, p. 387—405.

12. Howland B. E., Zebrowski E. J. — Horm. Metab. Res., 1976, vol. 8, p. 465—469.
13. Murthy A. S. N., Baguer N. Z. — Arch. Biochem., 1980, vol. 204, p. 264—269.
14. Ozawa K., Kaimiyama Y., Kimura K. et al. — J. lab. clin. Med., 1977, vol. 89, p. 937—945.
15. Storey J. M., Bailey E. — Enzyme, 1978, vol. 23, p. 382—387.

Поступила 11.02.85

# OXIDATIVE PHOSPHORYLATION, ACTIVITY OF NADH-OXIDASE AND SUCCINATE OXIDASE SYSTEMS IN MITOCHONDRIA OF TESTES FROM RATS WITH ALLOXAN DIABETES

A. M. Tyryshkin, B. Yu. Sal'nik, E. V. Dolgikh

Chair of Biochemistry, Central Research Laboratory, Medical School, Tomsk

Decrease in  $V_{4P}$ ,  $V_3$  and  $V_P$ , in coefficient of respiratory control, in the ratio ADP:O as

well as an increase in duration of phosphorylation of ADP involved in oxidation of succinate were found in testes mitochondria from rats with alloxan diabetes (content of glucose  $20 \pm 2$  mmol/L in blood plasma). If a mixture of malate and glutamate was used as a substrate of oxidation, the rate of mitochondrial respiration and coefficient of respiratory control were decreased in testes of diabetic rats under conditions of all the metabolic states studied. At the same time, sensitivity of NADH-oxidase and succinate oxidase systems to controlled heating ( $28^\circ$ ) was distinctly decreased in the testes mitochondrial membranes of the impaired animals as compared with controls. The data obtained suggest that distinct functional and, apparently, structure alterations occurred in the testes mitochondrial membranes of rats with alloxan diabetes.

УДК 616.438-02:615.356:577.161.11

Ю. И. Афанасьев, В. И. Ноздрин, Л. П. Бобова, Ю. Т. Волков

## ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ ТИМУСА В МЕХАНИЗМЕ АДЬЮВАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ РЕТИНОВОЙ КИСЛОТЫ

1 ММИ им. И. М. Сеченова, Москва

Одной из активных форм витамина А, обладающей выраженными иммуностимулирующими свойствами, является ретиноевая кислота. На основании ранее полученных фактов [1, 2] было высказано предположение, что в основе механизма адьювантного действия ретиноевой кислоты лежит эритроцитарная аутоантигенная стимуляция. Ретиноевая кислота при ее повышенном поступлении в организм появляется в крови в не связанном с транспортным белком состоянии и повреждает цитолемму клеток крови, прежде всего эритроцитов, освобождая мембранно-связанные антигены. С элиминацией этих антигенов связано увеличение количества и активности лимфоцитов и макрофагов [3, 5].

Роль тимуса в механизме адьювантного действия витамина А, ретиноевой кислоты и ретиноидов не изучена. В этом направлении известны лишь две работы, в которых было показано, что под действием витамина А изменяется масса тимуса в норме [4] и при хирургическом стрессе [7]. В настоящем сообщении приводятся морфометрические, цитофотометрические и автордиографические данные об изменениях в тимусе у лабораторных

грызунов, получавших ретиноевую кислоту и ее эфиры.

### Методика

Опыты были поставлены на взрослых половозрелых лабораторных грызунах обоего пола: крысах Вистар и мышах СВА и  $F_1$ (C57B1/6X X CBA). Линия и пол животных в каждом опыте указаны в таблицах. Ретиноевую кислоту использовали в водорастворимой форме и в виде ее эфиров. Название веществ, дозы и способы введения указаны в таблицах. Вещества получены из лаборатории химии полиеновых соединений (зав. — проф. Г. И. Самохвалов) НПО «Витамины» Министерства медицинской промышленности СССР. Для морфометрических исследований тимус взвешивали, фиксировали в смеси формалина,  $96^\circ$  этанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 9:3:1, парафиновые срезы окрашивали рутинными красителями. Площадь коркового и мозгового вещества долек тимуса определяли с помощью окуляр-микрометра. Для цитофотометрии срезы окрашивали при стандартных условиях [6] основным фуксином по Фельгену после гидролиза 5 н. HCl (40 мин при  $22^\circ\text{C}$ ). Оптическую плотность ДНК-фуксина определяли на цитофотометре Цетопан Райхерт при длине волны 565 нм, зонд — больше ядра. Диплоидный эквивалент ДНК определяли фотометрией ядер лимфоцитов краевой зоны фолликулов селезенки и мягкотных шнуров мезентериальных лимфатических узлов от тех же животных. Препараты окрашивали одновременно с тимусом. Для автордиографического исследования за 18, 12 и 6 ч до умерщвления



Таблица 1

Влияние однократного внутрибрюшинного введения 1% масляных растворов МР и метил-7,8-дигидроретиноата (МДГР) на массу и площадь долек тимуса у крыс-самцов Вистар на 10-й день опыта ( $M \pm m$ ;  $n=8-10$ )

Препарат	Доза, мл	Масса, мг	Площадь долек, усл. ед.	Площадь коркового вещества, %	Площадь мозгового вещества, %
МДГР	4	$14 \pm 1$	$87 \pm 7$	20	80
МДГР	2	$15 \pm 0,7$	$102 \pm 3$	25	75
МР	4	$12 \pm 1$	$82 \pm 7$	28	72
МР	2	$14 \pm 0,9$	$88 \pm 3$	15*	75
Растворитель (масло)	4	$15 \pm 0,8$	$101 \pm 13$	32	68
Интактные животные		$16 \pm 1$	$114 \pm 5$	46	54

Примечание. Здесь и в табл. 2 звездочкой отмечены величины, статистически достоверно отличающиеся от контроля (группа животных, которым вводили растворитель;  $P < 0,05$ ).

мышам вводили по 0,4 мкКи  $^3\text{H}$ -тимидина. Срезы экспонировали с ядерной эмульсией М НИИХимфотопроект в течение 20 сут и окрашивали рутинными красителями. В препаратах подсчитывали пролиферативный пул лимфоцитов как отношение количества клеток, включивших в свои ядра  $^3\text{H}$ -тимидин (не менее 5 гранул серебра на клетку), к количеству всех клеток (в процентах).

Для изучения эффекта «переноса» крысы были разделены на группы «доноров» и «реципиентов». Крысам-донорам 1-й группы однократно внутрибрюшинно вводили 8 мл 1% масляного раствора полностью транс-метилретиноата (МР). К 9-му дню после инъекции у животных развивались признаки гипервитаминоза А и анемии: снижение массы тела, покраснение кожи на морде и животе, потускнение волос, снижение концентрации гемоглобина до 10 г на 100 мл и содержания эритроцитов до  $3,9 \text{ млн/мм}^3$ . На 10-й день крыс умерщвляли. Кровь стабилизировали цитратом натрия и вводили крысам-реципиентам 1-й группы. Реципиентам 2-й группы инъекцировали цитратную донорскую кровь, предварительно прогретую при  $60^\circ\text{C}$  в течение 30 мин для повреждения форменных элементов. Животные-реципиенты 3-й группы получали от крыс-доноров цитратную кровь. Через 72 ч животных умерщвляли. Препараты тимуса готовили, как описано выше. Для умерщвления всех животных использовали хлороформный наркоз. Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики.

## Результаты и обсуждение

У крыс на 10-й день после однократного внутрибрюшинного введения эфиров ретиноевой кислоты развивалась устойчивая тенденция к снижению массы тимуса за счет уменьшения площади коркового вещества долек (табл. 1). Сходные изменения развивались у мышей при многократном подкожном нанесении этих веществ (табл. 2). Уменьшение площади коркового вещества тимуса связа-

но с изменениями в крови. Это следует из того, что при введении сингенным крысам крови от А-гипервитаминозных животных изменения в тимусе имеют ту же направленность, что и при введении крови, поврежденной нагреванием, и ретиноевой кислоты (табл. 3). Анализ гистограмм содержания ДНК показывает, что в корковом веществе лимфоциты состоят из диплоидной и тетраплоидной клеточных популяций (см. рисунок). Лимфоциты мозгового вещества являются в основном диплоидными. Введение ретиноевой кислоты не отражается на содержании ДНК в клетках мозгового вещества. В коре происходит уменьшение содержания тетраплоидных и увеличение диплоидных лимфоцитов.

Таблица 2

Влияние многократного накожного (2 капли 1 раз в 5 дней) нанесения 1% бензольных растворов МР и метил-7,8-дигидроретиноата (МДГР) на соотношение площадей коркового и мозгового вещества долек тимуса мышей-самцов  $F_1(\text{C57Bl/6} \times \text{CBA})$  на 36-й день опыта ( $M \pm m$ ;  $n=15-20$ )

Препарат	Площадь, %	
	коркового вещества	мозгового вещества
МДГР	18	82
МР	15*	85
Растворитель (бензол)	24	76
Интактные	41	59

Таблица 3

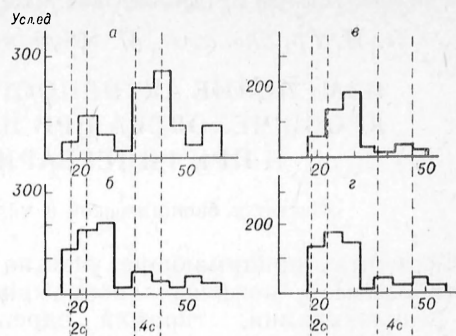
Влияние внутривенного введения 2 мл крови от крыс, получивших внутрибрюшинно 8 мл 1% масляного раствора МР, на соотношения площадей коркового и мозгового вещества долек тимуса у крыс-самок Вистар на 3-й день опыта ( $M \pm m$ ;  $n=10$ )

Вводимое вещество	Площадь, %	
	коркового вещества	мозгового вещества
Кровь от животных, получивших МР	49	51
Кровь, предварительно прогретая при 60 °С в течение 30 мин	50	50
Кровь от интактных животных	54	46
Без воздействия	56	44

В опыте на мышах СВА обнаружено, что внутрибрюшинное введение МР (0,3 мл 0,14 % раствора через день) сопровождается увеличением численности пролиферативного пула. Так, на 14-й день эксперимента в корковом веществе тимуса количество лимфоцитов, включивших в свои ядра  $^3\text{H}$ -тимидин, составило  $59 \pm 4$  % (в контроле —  $24 \pm 3$  %;  $P < 0,001$ ). В мозговом веществе помеченными были в контрольной группе —  $9 \pm 1$  %, в опытной —  $11 \pm 1,5$  % лимфоцитов.

Сопоставляя полученные данные, можно предположить, что введение ретиноевой кислоты сопровождается усиленным включением покоящихся тетраплоидных клеток коркового вещества в пролиферацию. Образующиеся при этом диплоидные клетки покидают орган, что приводит к уменьшению площади коркового вещества, долек и массы органа в целом. Видимо, тимус в ответ на появление под действием ретиноевой кислоты большого количества аутоантигенов начинает в возрастающем объеме поставлять Т-лимфоциты, способные в дальнейшем превращаться в эффекторные клетки и усиливать иммунитет.

Таким образом, введение ретиноевой кислоты и ее эфиров лабораторным грызунам сопровождается увеличением объема пролиферативного пула лимфоцитов коркового вещества, уменьшением содержания тетра- и увеличением — диплоидных лимфоци-



Гистограммы оптической плотности комплекса ДНК-фуксин ядер лимфоцитов коркового (а, б) и мозгового (в, г) веществ долек тимуса крыс Вистар, получавших внутрибрюшинно через день 5 раз по 0,5 мл 1 % раствора водорастворимой формы ретиноевой кислоты. Окраска по методу Фельгена.

По осям абсцисс — оптическая плотность ядер лимфоцитов (в усл. ед.); по осям ординат — количество клеток; а и в — интактные животные; б и г — животные, получавшие водорастворимую форму ретиноевой кислоты; 2с, 4с — диплоидный и тетраплоидный эквиваленты ДНК.

тов, тенденцией к снижению массы тимуса за счет уменьшения площади коркового вещества долек. Этот эффект может быть опосредован изменениями, которые происходят в крови под действием ретиноевой кислоты.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Афанасьев Ю. И., Ноздрин В. И., Бахшиян М. З. и др. — Бюл. exper. биол., 1982, № 4, с. 76.
- Афанасьев Ю. И., Ноздрин В. И., Фофанова К. А. и др. — Там же, № 12, с. 20.
- Афанасьев Ю. И., Ноздрин В. И., Михайлов О. И. — Успехи совр. биол., 1983, т. 95, с. 358.
- Лидак М. Ю., Плещитый К. Д. Витамин А и синтетические ретиноиды в иммунологии и онкологии. Рига, 1984.
- Ноздрин В. И., Субботин С. М. — Вopr. онкол., 1983, № 9, с. 96.
- Ноздрин В. И., Яцковский А. Н., Мурников В. Т. — В кн.: Системные свойства тканевых организаций. М., 1977, с. 173.
- Seifter E., Rettura G., Seifter J. et al. — Fed. Proc., 1973, vol. 32, N 3, P 1, p. 4094.

Поступила 14.02.85

#### POSSIBLE ROLE OF THYMUS IN ADJUVANT ACTION OF RETINOIC ACID

Yu. I. Afanasjev, V. I. Nozdrin, L. P. Bobova, Yu. T. Volkov

I Medical School, Moscow

Administration of retinoic acid and of its esters into experimental animals stimulated proliferation of thymus lymphocytes, decreased the tetraploid lymphocytes and increased the amount of diploid cells. The thymus mass tended to decrease as a result of contraction in the area of the gland cortical layer. Alterations in blood, which occurred in presence of retinoic acid, may be responsible for the effect observed.

Л. И. Гриднева, А. М. Абубакирова, И. В. Прошина, Л. В. Ильина

## ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИНОКСИДАЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ НЕКОТОРЫХ ВИДАХ АНЕСТЕЗИИ И ПРИ ГИПЕРБАРИЧЕСКОЙ ОКСИГЕНАЦИИ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Ферменты, принимающие участие в метаболизме биогенных моноаминов (2-фенилэтиламин, тирамин, адреналин, норадреналин, серотонин и др.), диаминов (путресцин, кадаверин), полиаминов (спермин, спермидин) и некоторых синтетических аминов (бензиламин, 4-нитробензиламин, ксилитендиамин), согласно международной классификации, подразделяют на флавиновые аминоксидазы (АО), или моноаминоксидазы (МАО; КФ 1.4.3.4.), медьсодержащие АО, или диаминоксидазы (ДАО; КФ 1.4.3.6), а также еще не включенные в международную классификацию растворимые АО (бензиламиноксидазы) сыворотки и плазмы крови и лизилоксидазы соединительной ткани [3].

За последние годы заметно возрос интерес к АО сыворотки крови человека. По-видимому, это связано с появлением работ, свидетельствующих об изменении активности АО при различных патологических состояниях. Так, установлено, что при тяжелых ожогах наблюдается резкое снижение активности АО сыворотки крови [24] и значительное повышение активности ДАО [23]. Показано, что активность АО сыворотки крови человека заметно возрастает при хроническом фиброзе и циррозе печени [18—20]. Наблюдали повышение активности АО сыворотки крови при возникновении лекарственной аллергии у больных туберкулезом легких [6]. Имеются данные об изменении активности АО сыворотки крови женщин с акушерской и гинекологической патологией. Известно, что в сыворотке крови беременных появляется и быстро возрастает при увеличении срока беременности отсутствующая в норме активность ДАО [16, 21, 22]. Установлено изменение активности АО крови у женщин в течение менструального цикла и при аменорее [17, 28].

В настоящей работе проводили исследования активности АО сыворотки крови женщин с акушерской и гине-

кологической патологией в нескольких аспектах. В связи с тем что имеются данные о влиянии некоторых нейротропных лекарств и местных анестетиков на активность митохондриальной МАО и АО плазмы крови [14, 19], целью данной работы явилось изучение воздействия на активность АО сыворотки крови человека некоторых видов анестезии, наиболее часто применяемых в настоящее время в акушерстве и гинекологии. Известно, что хирургическое вмешательство, как и другие стрессорные воздействия, приводят к стимуляции симпатико-адреналовой системы и повышению выведения из организма катехоламинов [7, 8], в метаболизме которых участвует митохондриальная МАО [2]. В настоящей работе исследован не освещенный в литературе вопрос об активности растворимых АО сыворотки крови больных в до- и послеоперационном периоде. Ранее были описаны изменения каталитических свойств митохондриальных МАО печени и мозга при воздействии на организм повышенного давления кислорода [4]. Широкое применение гипербарической оксигенации (ГБО) в акушерской и гинекологической практике [10, 11] побудило нас провести исследование влияния гипероксии на активность АО сыворотки крови при лечении женщин с гинекологической патологией.

### Методика

Кровь здоровых женщин была предоставлена Центральным институтом переливания крови Минздрава СССР, кровь женщин с акушерской и гинекологической патологией — Всесоюзным научно-исследовательским центром по охране здоровья матери и ребенка Минздрава СССР.

Сыворотку получали путем центрифугирования в течение 15 мин при 6000 g свернувшейся крови, взятой в сухую посуду. Полученную сыворотку хранили в течение 2—3 нед при  $-20^{\circ}\text{C}$  (за это время активность АО практически не изменялась).

Активность АО и ДАО сыворотки крови человека определяли по методу, описанному ра-



нее [26] и модифицированному В. П. Пекке-лем и А. З. Киркель в лаборатории биохимии аминов и других азотистых оснований Института биологической и медицинской химии (ИБМХ) АМН СССР. Метод основан на определении содержания образующихся в результате окислительного дезаминирования аминов под действием АО и ДАО соответствующих альдегидов путем их экстракции из кислой или щелочной среды органическими растворителями.

Субстратами служили бензиламин хлоргидрат (отечественного производства, дважды перекристаллизованный) для определения активности АО [26], 4-диметиламинометилбензиламин (ксилилендиамин) дихлоргидрат (синтезированный в лаборатории органической химии ИБМХ АМН СССР) для определения активности ДАО [13] и 4-нитробензиламин (синтезирован в лаборатории органической химии ИБМХ АМН СССР), который, по-видимому, служит субстратом как для АО, так и для ДАО [30].

Для определения активности АО 0,4—0,5 мл сыворотки инкубировали в пробе (конечный объем 1,5 мл), содержащей 0,08 М калий-фосфатный буфер pH 7,6 и один из субстратов в насыщающей концентрации (1,5 мкмоль). В качестве контролей использовали пробы, содержащие сыворотку крови и буферный раствор без субстрата, и пробы, которые содержали только субстрат и буфер. Инкубацию проводили при 37°C в течение 2—3 ч; за это время реакция протекла в соответствии с уравнением нулевого порядка. Реакцию останавливали добавлением 0,2 мл 1 н. HCl (если в качестве субстрата использовали бензиламин и 4-нитробензиламин) или равный объем пробы объем насыщенного раствора двууглекислого натрия (если субстратом служил ксилилендиамин); тем самым в пробе создавали ту величину pH, при которой в дальнейшем проходила практически полная экстракция соответствующего альдегида. Далее к пробам добавляли по 3 мл гексана и экстрагировали в течение 5 мин при энергичном встряхивании на механическом аппарате. При данных условиях опыта экстракция альдегидов в органический растворитель составляла около 90 %. Оптическую плотность полученных гексановых экстрактов измеряли на СФ-16. Измерения проводили против гексана при длине волны 241, 248 и 258 нм при использовании в качестве субстратов бензиламина, ксилилендиамина и 4-нитробензиламина соответственно. Ферментативную активность выражали в условных единицах [26]:  $\Delta E \cdot 100$  за 1 ч в 1 мл сыворотки крови, где  $\Delta E$  — разность между оптической плотностью опытной пробы и таковой контрольных проб.

Кровь у роженниц брали при абдоминальном родоразрешении до начала операции и введения наркотических средств, в момент извлечения плода, после введения наркотических препаратов, после окончания операции, экстази трахеи и пробуждения роженницы.

Кровь во время родов брали в динамике: при раскрытии шейки матки на 3—4 см, при раскрытии шейки матки на 7—8 см, после введения обезболивающих препаратов, во время II периода родов.

Пуповинную кровь плода брали сразу после рождения, до первого крика новорожденного.

Обезболивание родов осуществляли введе-

нием лексир (0,25 мг/кг) или  $\gamma$ -оксибутирата натрия (0,02 г ГОМК на 1 кг массы тела роженницы). Оперативное вмешательство производили под комбинированным эндотрахеальным наркозом по общепринятой методике. Премедикация включала введение метацина (1 мг) и димедрола (10—20 мг). Индукцию в наркоз осуществляли раствором сомбревина (8—10 мг/кг), кеталаром (1,3—1,5 мг/кг) или сочетанием кеталара с сомбревином (50 и 500 мг соответственно). Основной наркоз поддерживали закисью азота (60—70 %) с кислородом (40—30 %) в сочетании с электроанестезией, нейролептангестезией или дробным введением кеталара.

Электроанестезию осуществляли с помощью аппаратов «Электронаркон-1» или ЛЭНАР при силе тока 1,5—2 мА, частоте следования импульсов 750—1000 Гц, длительности импульса 0,2—0,3 мс. Кеталар вводили по 50 мг каждые 20—25 мин, фентанил — по 0,05—1 мг каждые 20 мин и дроперидол по 2,5—5 мг.

У женщин с гинекологической патологией наркоз проводили по методике комбинированной нейролептангестезии. Вводный наркоз осуществляли внутривенным введением тиопентал-натрия (5 мг на 1 кг массы тела больной). Анестезию поддерживали закисью азота с кислородом (в соотношении 3 : 1) с дробным введением фентанила (0,05 мг/кг) и дроперидола (0,3 мг/кг). Мышечную релаксацию поддерживали деполаризующими релаксантами (дителином из расчета 1,5 мг на 1 кг массы тела больной). Эндотрахеальный наркоз закисью азота в сочетании с электроанальгезией при гинекологических операциях проводили по следующей методике. Премедикация: промедол (20—40 мг), дипразин (25—50 мг), атропина сульфат (0,5—1 мг). Для вводного наркоза применяли пропанидид (сомбревин) (8—10 мг/кг), тиопентал-натрий, гексенал (6—8 мг/кг), кеталар (2 мг/кг). Основной наркоз поддерживали закисью азота (60—70 %) с кислородом (40—30 %) в сочетании с электроанальгезией, проводимой с помощью аппарата «Электронаркон-1» при силе тока 1,5—2 мА, частота следования импульсов 500—1000 Гц, длительности импульса 0,2—0,6 мс (расположение электродов лобно-затылочное).

ГБО осуществляли в отечественной одноместной барокамере «Ока-МТ» с автоматической системой кондиционирования в течение 30—40 мин; предел повышенного давления в период сатурации 2 ата.

## Результаты и обсуждение

Для изучения возможного влияния различных способов анестезии на активность АО сыворотки крови обследовали 154 роженницы 22—40 лет. 9 роженниц были с нормальной беременностью и родами, 12 роженницам с хронической гипоксией плода проводили обезболивание родов лексиром, 20 роженницам с острой гипоксией плода — обезболивание ГОМК, 113 роженницам было произведено кесарево сечение.

По современным представлениям, анестетики и анальгетики повышают

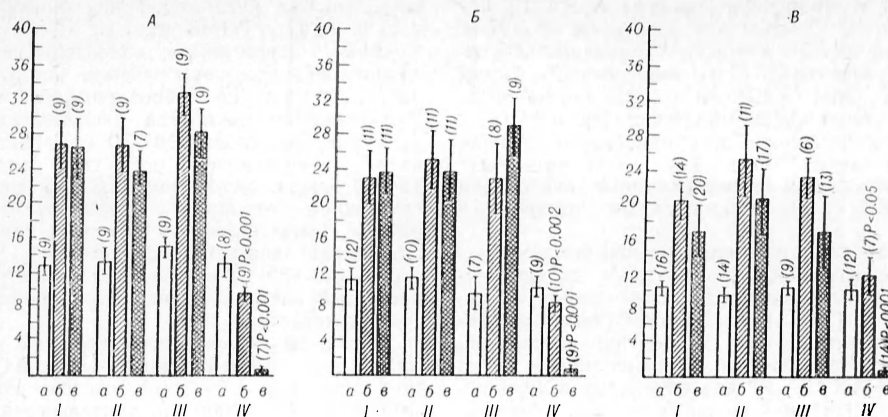


Рис. 1. Активность АО сыворотки крови рожениц (при родах с обезболиванием или без него) и плода.

*I* — начало родов (исходная сыворотка), раскрытие шейки матки на 3—4 см; *II* — раскрытие шейки матки на 7—8 см; *III* — II период родов; *IV* — сыворотка крови плода. Пробы содержали 0,4—0,5 мл сыворотки крови, 0,3 мл, 0,4 М калий-фосфатного буфера рН 7,6, 0,2 мл  $1 \cdot 10^{-3}$  М раствора одного из субстратов, дистиллированную воду до конечного объема 1,5 мл. Инкубация 2—3 ч при 37 °С. *A* — нормальные роды; *B* — роды при введении лексир (хроническая гипоксия плода); *V* — роды при введении ГОМК (острая гипоксия плода), *a* — дезаминирование бензиламина, *b* — 4-нитробензиламина, *v* — ксилитендиламина. По оси ординат — скорость дезаминирования субстратов ( $\Delta E \cdot 100$  за 1 ч в 1 мл). Представлены средние арифметические величины со стандартными ошибками средних арифметических ( $M \pm m$ ) и показатели статистической достоверности различий ( $P$ ) по отношению к *I*. В скобках число опытов.

общую устойчивость тканей мозга и сердца в условиях гипоксии [1], уменьшают активность симпатической нервной системы, снижают тонус сосудов матки, улучшают кровоток в ней [15, 27]. Нами при обезболивании родов с целью защиты ЦНС плода от гипоксического поражения при острой и хронической гипоксии его были использованы лексир и ГОМК.

Показания для кесарева сечения в 93 % наблюдений были сочетанными: наличие экстрагенитальной (гипертоническая болезнь, вегетососудистая дистония по гипотоническому типу, врожденные и приобретенные пороки сердца) и акушерской (поздние токсикозы, хроническая и острая гипоксия плода, преждевременная отслойка нормально расположенной плаценты, предлежание плаценты) патологии. В зависимости от вида анестезии исследованные нами роженицы были разделены на 3 группы. Оперативное вмешательство производили с использованием методики нейролептангезии (42 женщины), комбинированной электроангезии (41) и кеталара (30 рожениц).

Из представленных на рис. 1, *I, a* и рис. 2, *I, a* данных следует, что дезаминирование бензиламина в сыворотке крови больных достоверно не отличалось от такового в сыворотке крови доноров (здоровые небеременные

женщины) (рис. 3, *I, a*), что согласуется с данными литературы [26] о том, что при беременности активность АО сыворотки крови не изменяется.

В сыворотке крови рожениц (рис. 1, *v* и рис. 2, *v*) обнаружена отсутствующая в сыворотке крови небеременных женщин (см. рис. 3, *I, v*) активность ДАО, что также согласуется с данными литературы [21, 22].

В сыворотке крови рожениц наблюдали увеличение более чем в 2 раза ( $P < 0,001$ ) дезаминирования 4-нитробензиламина (рис. 1, *b* и рис. 2, *b*) по сравнению с таковым в сыворотке крови доноров (см. рис. 3, *I, b*).

Как видно из представленных данных, активность как АО, так и ДАО сыворотки крови не изменялась в течение родов или в процессе кесарева сечения (см. рис. 1, *I—III* и рис. 2, *I—III*).

Достоверных различий дезаминирования бензиламина и 4-нитробензиламина в сыворотке крови плода (рис. 1, *IV, a, b*, и рис. 2, *IV, a, b*) и сыворотке крови небеременных женщин (см. рис. 3, *I, a, b*) не наблюдали. Активность ДАО, о которой судили по дезаминированию ксилитендиламина, в сыворотке пуповинной крови почти у всех новорожденных (см. рис. 1, *IV, v* и рис. 2, *IV, v*), так же как и в сыворотке крови небеременных женщин (см. рис. 3, *I, v*), практически отсут-

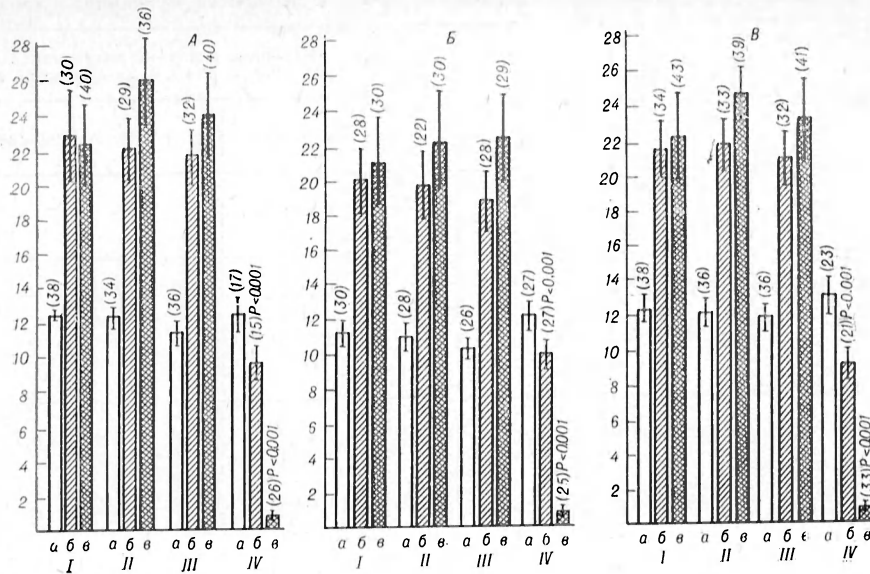


Рис. 2. Влияние различных видов наркоза на активность АО сыворотки крови роже-  
ниц и плода при абдоминальном родоразрешении.

I — сыворотка крови роженицы до введения наркоза (до начала операции); II — сыворотка крови роженицы после введения наркоза (в момент извлечения плода); III — сыворотка крови роженицы после окончания операции и экстабации трахеи; IV — сыворотка крови плода. А — нейроралестезия; Б — кеталаровый наркоз; В — электроанестезия. Остальные обозначения и состав проб те же, что на рис. 1.

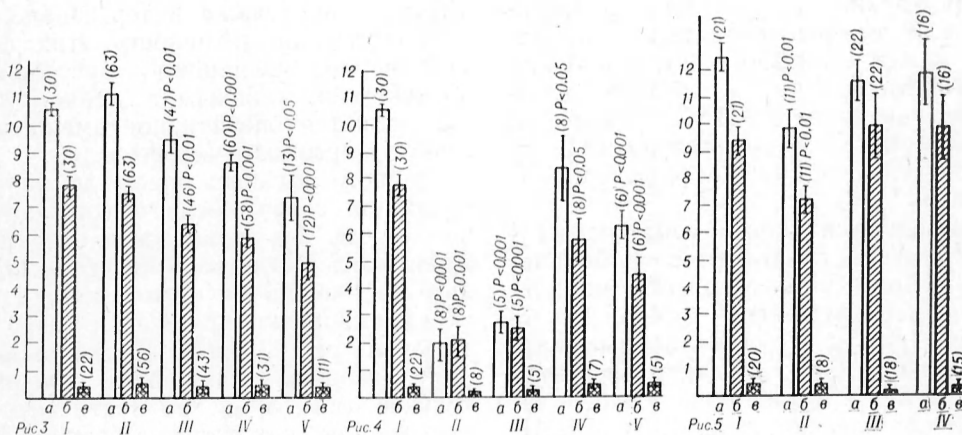


Рис. 3. Изменение активности АО сыворотки крови человека после гинекологических операций.

I — сыворотка крови доноров (небеременные женщины); II — сыворотка крови больных до начала операции; III — сыворотка крови больных сразу же после окончания операции; IV — сыворотка крови больных на 2-е сутки после операции; V — сыворотка крови больных на 3-и сутки после операции.  $P$  рассчитано по отношению к II. Остальные обозначения и состав проб те же, что на рис. 1.

Рис. 4. Активность АО сыворотки крови больных при парезе кишечника.

I — сыворотка крови доноров (небеременные женщины); II — сыворотка крови больных с послеоперационным парезом кишечника на 2-е сутки после операции; III — сыворотка крови больных с послеоперационным парезом кишечника на 3-и сутки после операции; IV — сыворотка крови больных с легкой формой послеоперационного пареза кишечника (2-е сутки после операции); V — сыворотка крови больных с легкой формой послеоперационного пареза кишечника (3-и сутки после операции).  $P$  рассчитано по отношению к I. Остальные обозначения и состав проб те же, что на рис. 1.

Рис. 5. Влияние ГБО на активность АО сыворотки крови человека.

I — сыворотка крови больных вторичной аменореей до начала лечения ГБО; II — сыворотка крови больных после 1—4 сеансов ГБО; III — сыворотка крови больных после 5—7 сеансов ГБО; IV — сыворотка крови больных после 8—10 сеансов ГБО.  $P$  рассчитано по отношению к I. Остальные обозначения и состав проб те же, что на рис. 1.



**Дезаминирование ксилилендиамин (активность ДАО) в сыворотке пуповинной крови**

Вид родоразрешения	Способ анестезии	Число больных	Интервал величины активности ДАО, ΔЕ · 100 за 1 ч в 1 мл сыворотки крови				
			0—4	4—10	10—20	20—100	100 и более
Нормальные роды	—	9	1,0±0,2 (9)	—	—	—	—
Роды с обезболиванием	Введение ГОМК	18	1,1±0,3 (14)	4,6 6,2	14,2 12,2	—	—
	Введение лексира	11	0,8±0,3 (11)	—	—	—	—
Кесарево сечение	Кеталаровый наркоз	30	1,1±0,2 (25)	4,8 6,7 9,8	11,4	48,7	—
	Электроанестезия	38	1,0±0,2 (33)	4,0 9,1 9,8	16,2	—	117,9
	Нейролептанестезия	33	0,8±0,2 (26)	5,0 5,5 8,4 9,4	16,9	—	104,3 282,6

Пр и м е ч а н и е. Прочерк — данные отсутствуют, в скобках — число новорожденных.

ствовала. Однако следует отметить, что в некоторых группах рожениц у новорожденных в сыворотке крови наблюдали значительное дезаминирование ксилилендиамин (см. таблицу). Объяснить причину и значение повышения активности ДАО сыворотки крови плода на основании имеющихся данных пока не представляется возможным.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что различные способы анестезии, применяемые при абдоминальном родоразрешении: нейролептанестезия (рис. 2, А), кеталаровый наркоз (рис. 2, Б), электроанестезия (рис. 2, В), а также для обезболивания родов: лексир (рис. 1, Б), ГОМК (рис. 1, В) — не оказывают статистически достоверного влияния на активность АО и ДАО сыворотки крови как рожениц (в период родоразрешения), так и плода.

Нами были обследованы также 79 больных с гинекологической патологией в возрасте 19—55 лет, которым производили операции по поводу опухолей внутренних половых органов: надвлагалищную ампутацию, экстирпацию матки, удаление придатков, а также реконструктивно-пластические операции. Было исследовано влияние различных способов наркоза

(нейролептанестезия, электроанестезия) на активность АО сыворотки крови. Нас также интересовало, не изменяется ли активность этих ферментов под влиянием стрессорного воздействия, каковым в данном случае является оперативное вмешательство, на организм человека [8].

Кровь у больных брали до начала операции, сразу после ее окончания, на 2-е и 3-и сутки после операции. Активность АО сыворотки крови больных достоверно не отличалась от таковой сыворотки крови здоровых людей (см. рис. 3, I, II). После окончания операции наблюдали незначительное (на 15 %), но статистически достоверное снижение дезаминирования бензиламина и 4-нитробензиламина (рис. 3, III, а, б); на 2-е и 3-и сутки снижение дезаминирования этих субстратов достигало 21—22 и 33—34 % соответственно (рис. 3, IV, V, а, б). Дезаминирования ксилилендиамин ни в одном опыте практически обнаружено не было.

Наблюдаемое снижение активности АО сыворотки крови больных в послеоперационном периоде может быть обусловлено влиянием применяемых при операции наркотических препаратов. Также можно предположить, что снижение активности АО сыворотки

крови человека в раннюю фазу послеоперационного периода, а именно в 1—3-и сутки, является результатом сильного стрессорного воздействия [8].

Среди обследованных больных с гинекологической патологией была выявлена группа женщин, у которых послеоперационный период был отягощен возникновением выраженного пареза кишечника. У них на 2-е и 3-и сутки после операции наблюдали значительно сниженное дезаминирование бензиламина (на 75—80 %) и 4-нитробензиламина (на 65—75 %) по сравнению с таковым в сыворотке крови доноров (рис. 4, I—III, а, б). В сыворотке крови больных, у которых парез кишечника проходил в легкой форме, снижение дезаминирования бензиламина и 4-нитробензиламина по сравнению с нормой составляло около 20—25 % на 2-е сутки и около 40 % на 3-и сутки после операции (см. рис. 4, I, IV, V, а, б). Дезаминирования ксилilenдиаминa практически не было обнаружено (рис. 4, в).

Представленные данные позволили нам предположить, что возникновение пареза кишечника, который можно рассматривать как дополнительное стрессорное воздействие на организм человека в послеоперационный период, вызывало резкое снижение активности АО сыворотки крови, наблюдаемое нами на 2-е и 3-и сутки после хирургического вмешательства. Можно также предположить, что резкое снижение активности АО сыворотки крови является характерным именно при парезе кишечника.

Исследование влияния ГБО на активность АО сыворотки крови человека было проведено у 19 больных вторичной аменореей яичникового генеза, в связи с чем возможные циклические изменения активности АО были исключены. Некоторые больные были обследованы в течение 2—3 курсов лечения. Кровь у больных брали до начала лечения и после очередного сеанса ГБО.

Дезаминирование бензиламина и 4-нитробензиламина в сыворотке крови больных до лечения ГБО было выше на 15 % ( $P < 0,001$ ) и 20 % ( $P < 0,002$ ) соответственно, чем дезаминирование этих аминов в сыворотке крови здоровых людей (рис. 5, I, II, а, б), что согласуется с данными лите-

ратуры [17]. После 2—4 сеансов ГБО отмечается небольшое, примерно на 22—25 %, но статистически достоверное снижение дезаминирования бензиламина и 4-нитробензиламина по сравнению с таковым в сыворотке больных до начала лечения ГБО (см. рис. 5, II, III, а, б). После 5—7 и 8—10 сеансов ГБО дезаминирование бензиламина и 4-нитробензиламина возвращалось к исходному уровню (рис. 5, IV, V, а, б). Дезаминирование ксилilenдиаминa во всех случаях практически отсутствовало (рис. 5, в).

Известно, что при гипероксии происходит накопление продуктов перекисного окисления липидов в тканях, с чем связано нарушение активности митохондриальной MAO [5]. Мы предположили, что снижение дезаминирования бензиламина и 4-нитробензиламина при их инкубации с сывороткой крови больных после 1—4 сеансов ГБО также может являться результатом накопления липидных перекисей в тканях. Возвращение активности АО сыворотки крови после 7—10 сеансов ГБО к исходному уровню, по видимому, по аналогии с митохондриальной MAO [25] может свидетельствовать об адаптации фермента.

Следует отметить, что из 19 обследованных у 1, прошедшей 2 курса лечения, после 8—10 сеансов ГБО было обнаружено резкое, примерно в 2,5—5 раз снижение дезаминирования бензиламина и в 3,5—11 раз — 4-нитробензиламина. Такая чувствительность фермента к воздействию ГБО может свидетельствовать о существовании полиморфизма АО сыворотки крови человека.

Некоторые проблемы генетического полиморфизма достаточно подробно изучены на примере таких ферментов, как сывороточная холинэстераза или глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа [9, 12]. Возможно, что у некоторых индивидуумов (в нашем случае у 1 из 19) АО сыворотки крови отличается от таковой людей большей чувствительностью к определенным воздействиям, например к ГБО. Возникновение у некоторых больных с гинекологической патологией послеоперационного пареза кишечника, сопровождающегося резким снижением в сыворотке крови дезаминирования бензиламина и 4-нитробензиламина, также можно объяснить полиморфизмом фермента,

т. е. существованием у отдельных людей (у 8 из 79) такой формы АО сыворотки крови, которая отличается, в частности, особенно высокой чувствительностью к стрессорным воздействиям (хирургическое вмешательство) или лекарственным препаратам, использованным для наркоза при операции. Применение ГБО для лечения и профилактики послеоперационного пареза кишечника у больных не оказывало статистически достоверного влияния на активность АО сыворотки крови.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Волинский Б. Г., Мартынов Л. А., Солун Н. С. — Пат. физиол., 1981, № 5, с. 65.
2. Горкин В. З. — Вопр. мед. химии, 1974, № 3, с. 227.
3. Горкин В. З. Аминоксидазы и их значение в медицине. М., 1981.
4. Горошинская И. А. — Вопр. мед. химии, 1979, № 3, с. 328.
5. Горошинская И. А., Броновицкая З. Г. — Там же, 1976, № 5, с. 621.
6. Казаков К. С., Пятаева Э. В., Сидорова Л. Л. — Пробл. туб., 1983, № 6, с. 34.
7. Матлина Э. Ш. — Успехи физиол. наук, 1972, т. 3, с. 92.
8. Матлина Э. Ш., Меньшиков В. В. Клиническая биохимия катехоламинов. М., 1967, с. 274.
9. Мхеидзе М. О., Пекарская Н. А., Шапошников А. М. — Лаб. дело, 1981, № 2, с. 97.
10. Петровский Б. В., Ефуди С. Н. Основы гипербарической оксигенации. М., 1976.
11. Побединский Н. М., Прошина И. В., Фанченко Н. Д. Гипербарическая медицина. М., 1983, с. 133.
12. Харрис Г. Основы биохимической генетики человека: Пер. с англ. М., 1973, с. 118.
13. Bardsley W. G., Crabbe M. J., Shindler J. S., Ashford J. S. — Biochem. J., 1972, vol. 127, p. 875.
14. Buron M., Gruch R., Levitt M., Kane J. — Psychiat. Res., 1982, vol. 7, p. 179.
15. Chandedson O., Farquer P., Challmel M. — Rev. franç. Gynec., 1975, vol. 70, p. 247.
16. Ghal W. A., Raibert R. F., Vale A. M., Golubjatnikov R. — Brit. J. Obstet. Gynec., 1982, vol. 89, p. 202.
17. Gilmore N. J., Robinson D. S., Nies A. et al. — J. psychosom. Res., 1971, vol. 15, p. 215.
18. Gressner A. M. — J. clin. Chem. clin. Biochem., 1980, vol. 18, p. 921.
19. Gressner A. M., Roebruck P. — Clin. chim. Acta, 1982, vol. 124, p. 315.
20. Gressner A. M., Roebruck P. — J. clin. Chem. clin. Biochem., 1983, vol. 21, p. 19.
21. Hansson R. — Acta obstet. gynec. scand., 1969, vol. 48, p. 19.
22. Hansson R., Tryding N., Tornqvist. — Ibid., p. 8.
23. Lahiri S., Basu A., Banerjee C. — Biochem. Pharmacol., 1971, vol. 20, p. 3225.
24. Levinsohn R. — Clin. chim. Acta, 1977, vol. 81, p. 247.
25. Liles G. A. — Life Sci., 1978, vol. 22, p. 603.
26. McEwen Ch. M., Cohen J. D. — J. Lab. clin. Med., 1963, vol. 62, p. 766.
27. Myers K., Myers S. — Amer. J. Obstet. Gynec., 1979, vol. 33, p. 83.
28. Rlaiber E. L., Kobayashi Y., Broverman D. M., Hall F. — J. clin. Endocr., 1971, vol. 33, p. 630.
29. Ysahara H., Wada I., Sakamoto K., Kanujo K. — Jap. J. Pharmacol., 1982, vol. 32, p. 213.
30. Zeller E. A. — Advanc. Biochem. Pharmacol., 1972, vol. 5, p. 167.

Поступила 14.03.85

#### ALTERATIONS OF AMINE OXIDASES ACTIVITY IN HUMAN BLOOD SERUM UNDER CONDITIONS OF ANESTHESIA OF VARIOUS TYPES AND IN HYPERBARIC OXYGENATION

L. I. Gridneva, A. M. Abubakirova, I. V. Proshina, L. V. Il'ina

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

Some types of anesthesia, used usually in labor anesthesia (sodium hydroxybutyrate, le-xir) or in abdominal delivery (neuroleptanesthesia, cetalar narcosis, electroanesthesia) did not affect distinctly the activity of amine oxidases in blood sera of women in labor and of fetus. In some groups of women in labor the neonates were found, blood serum of which exhibited high activity of diamine oxidase, not observed in normal state. A slight decrease in deamination of benzylamine (20 %) and 4-nitrobenzylamine (30 %) was observed in patients with gynecological diseases within 2 and 3 days after operations. If intestinal paresis developed in the patients within the postoperative period deamination of these substrates was decreased by 75-80 % in blood sera. After 2-4 courses of hyperbaric oxygenation a slight but statistically distinct decrease (by 22-25 %) in the rate of deamination of benzylamine and 4-nitrobenzylamine was found in blood sera of the patients.



Р. А. Мирзоян, А. А. Потапов, М. В. Писецкая

## β-ЭНДОРФИН И КОРТИКОТРОПИН В КРОВИ У БОЛЬНЫХ В ОСТРОМ ПЕРИОДЕ ТЯЖЕЛОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ

ИИИ по биологическим испытаниям химических соединений, Купавна Московской области, и Институт нейрохирургии им. Н. Н. Бурденко АМН СССР, Москва

Течение и исход тяжелой закрытой черепно-мозговой травмы, представляющей собой одну из форм тяжелого стресса, во многом определяется адаптационными возможностями организма. В связи с этим выявление новых сторон компенсаторных реакций организма в условиях травмы головного мозга представляет несомненный интерес.

В последние годы значительно расширились представления о нейрогуморальных механизмах регуляции функции организма в условиях экстремального воздействия. В частности, показано существование в мозге эндогенных опиоидных пептидов, обладающих широким спектром физиологической активности, одним из проявлений которой является защитная, адаптивная функция [2, 4, 8].

β-Эндорфин — один из наиболее активных представителей этой группы соединений обнаружен в значительных количествах в передней и промежуточной долях гипоталамуса и ядрах гипоталамуса, где он синтезируется из общего с кортикотропином белка — предшественника проопиомеланокортина [5]. При этом гипоталамус является основным источником β-эндорфина крови, а гипоталамус — цереброспинальной жидкости [6].

В ряде работ установлено повышение уровня β-эндорфина в крови при различных формах экспериментального стресса [4, 10]. Полагают, что β-эндорфин включается в формирование неспецифической реакции на стресс наряду со структурно и генетически связанным с ним кортикотропином. β-Эндорфин рассматривается также с позиций его значения в развитии при стрессе ряда патологических синдромов (боль, нарушения функции дыхания, сердечно-сосудистой и других систем).

Задачей настоящей работы явилось выяснение вопроса об участии β-эндорфина в нейроэндокринном ответе организма на травму головного моз-

га. С этой целью проведено определение содержания β-эндорфина в плазме крови у больных в динамике острого периода тяжелой черепно-мозговой травмы в сопоставлении с уровнем кортикотропина и кортизола, играющих важную роль в формировании адаптационных реакций организма на экстремальное воздействие.

### Методика

Обследовано 22 больных в возрасте от 17 до 55 лет с изолированной тяжелой черепно-мозговой травмой. Контрольную группу составили 10 здоровых лиц.

Все больные поступили в Институт нейрохирургии в тяжелом или крайне тяжелом состоянии не позже чем через 24 ч после получения травмы. У 10 из них (1-я группа) в момент поступления сознание было угнетено до глубокого оглушения или сопора и у 12 (2-я группа) — до умеренной или глубокой комы (2-я группа). 11 больных оперированы по поводу суб-, эпидуральных или внутримозговых гематом. 7 больных умерли в различные сроки (от 3 до 20 сут) после травмы.

Из 22 обследованных больных 19 в комплексе интенсивной терапии получали дексозон от 0,2 до 0,3 мг/кг/сут, начиная с 1-х суток после травмы с постепенным уменьшением дозы и дальнейшей отменой его на 5—7-е сутки. В процессе лечения использовали салуретики и осмотические диуретики, по показаниям анальгетические и седативные средства. При нарушении дыхания проводили искусственную вентиляцию легких в режиме гипервентиляции.

Кровь для исследования гормонов брали в момент поступления в институт до начала лечения, а затем в утренние часы (с 8 до 9 ч) на 2—5-е сутки после травмы. Пробы крови брали не ранее чем через 10 ч после последней инъекции анальгетиков и седативных препаратов.

Содержание β-эндорфина определяли радиоиммунным методом с использованием наборов фирмы INC (США), кортикотропина и кортизола — фирмы "Sogin" (Франция). β-Эндорфин определяли после отделения его от фракции β-липопротеина и белка, дающих перекрестную реакцию с антисывороткой к β-эндорфину, методом гель-хроматографии на колонках.

### Результаты и обсуждение

В результате исследования было выявлено два типа изменений уровня кортикотропина в крови у больных в

**Содержание гормонов в крови у больных с тяжелой черепно-мозговой травмой ( $M \pm m$ )**

Группа обследуемых	Сутки после травмы	Кортикотропин, пмоль/л	Кортизол, пмоль/л	$\beta$ -эндорфин, пмоль/л
Контрольная				
1-я	1-е	$7,6 \pm 1,5$ (10)	$302 \pm 11$ (10)	$4,2 \pm 0,9$ (10)
	2-е	$56,0 \pm 9,7$ (10)*	$2040 \pm 276$ (10)*	$8,9 \pm 1,0$ (9)*
	3—5-е	$8,0 \pm 2,1$ (8)**	$1398 \pm 172$ (9)*	$14,4 \pm 2,5$ (7)*
		$5,0 \pm 1,6$	$843 \pm 208$ (6)*	$3,3 \pm 1,8$ (6)
2-я	1-е	$7,4 \pm 1,9$ (12)	$947 \pm 249$ (7)*	$8,6 \pm 1,1$ (8)*
	2-е	$5,0 \pm 1,2$ (10)	$1086 \pm 268$ (7)*	$11,0 \pm 2,6$ (6)*
	3—5-е	$4,0 \pm 1,9$ (6)	$752 \pm 161$ (6)	$7,0 \pm 2,0$ (5)*

**Примечание.** Одной звездочкой отмечены величины, достоверно отличающиеся от соответствующих показателей у здоровых людей ( $P < 0,05$ ); двумя — величины, различающиеся при сравнении 1-й и 2-й групп больных ( $P < 0,05$ ). В скобках — число обследуемых.

1-е сутки после травмы. У больных 1-й группы наблюдалось выраженное (в 2—10 раз) повышение в крови содержания кортикотропина (см. таблицу). Уровень кортизола у этих больных также был существенно увеличен (в среднем в 8 раз).

У обследуемых 2-й группы достоверных изменений концентрации в крови кортикотропина не отмечалось. При этом у 5 человек этой группы уровень кортикотропина был на верхней, у 7 — на нижней границе нормы. У этих больных отмечалось статистически достоверное увеличение кортизола в крови.

Содержание  $\beta$ -эндорфина в крови у больных в 1-е сутки после травмы повышалось в среднем в 2 раза как при первом, так и втором типе изменений уровня кортикотропина (см. таблицу).

При анализе клинического течения и тяжести травмы было установлено, что выраженные изменения содержания гормонов крови (первый тип реакции) в первые сутки после травмы наблюдались у больных с более тяжелым поражением мозга и исходом заболевания. В этой группе больных у 7 из 10 обследованных при поступлении состояние было крайне тяжелым, умерло 5 больных. У больных со вторым типом изменений содержания гормонов в крови тяжелое состояние было у 5 из 12 лиц, при этом умерли 2 человека.

На 2-е сутки после травмы на фоне глюкокортикоидной терапии отмечалось снижение уровня кортикотропина у всех больных до средних, а на 3—5-е сутки — до нижних значений нормы. Содержание  $\beta$ -эндорфина, в отличие от кортикотропина, на 2-е сутки после травмы имело тенденцию к повышению, что было обусловлено уве-

личением уровня пептида в крови больных, оперированных в 1-е сутки после травмы (см. таблицу).

Анализ данных, полученных при измерении концентрации  $\beta$ -эндорфина и кортикотропина в группе оперированных больных (11 человек), выявил статистически достоверное увеличение содержания  $\beta$ -эндорфина и уменьшение концентрации кортикотропина в 1-е сутки после операции, по сравнению с уровнем гормонов крови до операции — соответственно от  $8,2 \pm 1,5$  до  $16,0 \pm 2,8$  пмоль/л ( $P < 0,05$ ) и от  $32,2 \pm 8,8$  до  $11,5 \pm 2,9$  пмоль/л ( $P = 0,05$ ).

В дальнейшем динамика изменений уровня  $\beta$ -эндорфина имела сходную с кортикотропином направленность в сторону снижения в крови у больных на 3—5-е сутки после травмы (см. таблицу).

Из 22 обследуемых 4 поступили в клинику в алкогольном опьянении разной степени. Какой-либо корреляции между приемом алкоголя и изменением концентрации исследованных гормонов выявлено не было, хотя ограниченность наблюдений не позволяет сделать окончательных выводов в этом отношении.

Таким образом результаты наших исследований свидетельствуют о повышении в крови больных в 1-е сутки после травмы содержания  $\beta$ -эндорфина наряду с увеличением уровня кортикотропина и кортизола. Эти данные позволяют высказать предположение об участии  $\beta$ -эндорфинергической системы гипофиза в развитии реакций адаптации в условиях тяжелой черепно-мозговой травмы.

Индукцированное стрессом повышение в крови содержания  $\beta$ -эндорфина и кортикотропина, снимаемое гипо-

физэктомией и введением дексазона, установлено в эксперименте на животных [4, 10]. Показано также одновременное увеличение в крови уровня  $\beta$ -эндорфина и кортикотропина при введении кортиколиберина [9]. Полагают, что  $\beta$ -эндорфин может быть модулятором стимулируемой стрессом секреции кортикостероидов. Предположение основывается на данных о наличии высокоспецифических опиатных рецепторов в корковом и мозговом слое надпочечника и о дозозависимом влиянии *in vitro*  $\beta$ -эндорфина на синтез глюкокортикоидов в клетках коры надпочечника [3, 11].

Исходя из вышеизложенного, можно полагать, что  $\beta$ -эндорфин в остром периоде тяжелой черепно-мозговой травмы, характеризующимся внезапной надпочечниковой кортикостероидной недостаточностью [1], может обладать стероидогенным действием, т. е. выступать в роли агониста кортикотропина в развитии неспецифической реакции на стресс. Это может иметь особую значимость в условиях снижения способности аденогипофиза секретировать кортикотропин.

Как показали наши исследования, у ряда больных на 1-е сутки и у всех больных на 2-е сутки после травмы отмечалось снижение в крови уровня кортикотропина. Это могло быть связано как с ингибированием его секреции экзогенно вводимыми кортикостероидами (на 2-е сутки после травмы), известным механизмом обратной отрицательной связи, так и с истощением резервных возможностей аденогипофиза. В пользу последнего предположения свидетельствует отсутствие у больных стимуляции секреции кортикотропина в ответ на операцию. Следовательно, наблюдаемое в этих условиях увеличение содержания  $\beta$ -эндорфина можно рассматривать как компенсаторную реакцию, направленную на стимуляцию эндогенной секреции кортикостероидов.

Как уже было отмечено выше, в литературе существует представление о корреляции при стрессе между содержанием в крови  $\beta$ -эндорфина и кортикотропина. Однако в опытах *in vitro* одновременная секреция кортикотропина и  $\beta$ -эндорфина в ответ на введение кортиколиберина отмечалась в клетках передней доли гипофиза и отсутствовала в клетках промежуточ-

ной доли [7]. Следует отметить при этом, что в передней доле гипофиза осуществляется в основном синтез кортикотропина, тогда как значительная часть  $\beta$ -эндорфина синтезируется в промежуточной доле [12].

Наши исследования показали, что при тяжелой черепно-мозговой травме изменения в крови уровня  $\beta$ -эндорфина и кортикотропина не всегда имеют однонаправленный характер. В частности, увеличение содержания  $\beta$ -эндорфина в ряде случаев наблюдается на фоне снижения в крови кортикотропина. Наблюдаемая нами, а также другими исследователями разнонаправленность изменений содержания указанных пептидов может быть связана в известной мере с существованием наряду с общими с кортикотропином автономных путей регуляции синтеза и секреции  $\beta$ -эндорфина.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Давыдов В. В. — В кн.: Нервные и эндокринные механизмы стресса. Кишинев, 1980, с. 104—121.
2. Amir Sh., Brown L. W., Amil Z. — *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 1979, vol. 4, p. 77—86.
3. Chavkin C., Cox B. M., Goldstein A. — *Molec. Pharmacol.*, 1979, vol. 15, p. 751—753.
4. Guillemin R., Vargo T., Rossier J. et al. — *Science*, 1979, vol. 197, p. 1067—1069.
5. Herbert E. — *Trends biol. Sci.*, 1981, vol. 6, p. 184—188.
6. Kerdellhue B., Bethea C., Ling M. et al. — *Brain Res.*, 1982, vol. 231, p. 85—91.
7. Mains R. E., Eipper B. A. — *J. biol. Chem.*, 1979, vol. 254, p. 7885—7894.
8. Martin A. — *Life Sci.*, 1980, vol. 26, p. 497—510.
9. Nissbaum S. R., Carr D. B., Bergland R. M., Kliman B. — *Endocrinology*, 1983, vol. 112, p. 1877—1879.
10. Rossier J. E., French E. D., Rivier C. et al. — *Nature*, 1977, vol. 270, p. 618—620.
11. Shanker G., Sharma R. K. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1979, vol. 86, p. 1—5.
12. Vermees L., Mulder G. H., Smellin P. G., Tilders F. J. H. — *Life Sci.*, 1980, vol. 27, p. 1761—1768.

Поступила 14.02.85

#### $\beta$ -ENDORPHIN AND CORTICOTROPIN IN BLOOD OF PATIENTS WITH CRITICAL CRANIOCEREBRAL INJURY AT THE ACUTE PERIOD

R. A. Mirzozan, A. A. Potapov, M. W. Pisetskaya

Institute for Biological Testing of Chemical Compounds, Kupavna, Moscow Region, N. N. Burdenko Institute of Neurosurgery, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

An increase in content of  $\beta$ -endorphin simultaneously with either low or high con-



centrations of corticotropin were observed in blood of patients with critical craniocerebral injury at the first day of the trauma. The content of  $\beta$ -endorphin was increased and the content of corticotropin was decreased in blood of the patients within one day after the surgical treatment of sub-, epi- and intracerebral hema-

tomias. No correlation between contents of  $\beta$ -endorphin and corticotropin was noted. The data obtained suggest existence of various pathways for regulation of  $\beta$ -endorphin synthesis and secretion, which are independent from the corticotropin regulation processes.

УДК 616-008.929.15+616-008.931:577.152.311]-001.28

М. И. Душкин, А. В. Долгов

## АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ХОЛЕСТЕРИНОВОГО МЕТАБОЛИЗМА И СОДЕРЖАНИЕ ЛИПИДОВ В ПЕЧЕНИ, АОРТЕ, НАДПОЧЕЧНИКАХ И СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫСЫ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ТРИТОНА WR 1339

Институт терапии СО АМН СССР, Новосибирск

Развитие генерализованного липидоза в результате введения тритона WR 1339 (полимер пара-изооксифениленфенола) является удобной патофизиологической моделью изучения последствий и причин нарушения активности липолитических ферментов [3]. Известно, что образование комплексов детергента с липопротеидами (ЛП) приводит к нарушению равновесия между синтезом липидов в тканях и их выведением из крови [3], накоплению экзогенных липидов в лизосомах клеток ретикулоэндотелиальной системы и снижению активности некоторых лизосомальных липолитических ферментов [1]. Однако процессы гидролиза и синтеза эфиров холестерина (ЭХС) в условиях нарушения транспорта экзогенного холестерина (ХС) в цитоплазму клеток мало изучены, хотя представляют несомненный интерес для понимания патофизиологических механизмов нарушения холестеринового обмена [10].

Целью настоящего исследования явилось изучение взаимосвязи между изменением активности ферментов синтеза и гидролиза ЭХС и содержанием липидов в печени, аорте, надпочечниках и крови в условиях максимального накопления лизосомотропного препарата тритона WR 1339 в тканях крысы.

### Методика

Работа проведена на 60 крысах-самцах Вистар массой 140—160 г. 30 животных брали в опыт через 72 ч после однократного внутрибрюшинного введения 100 мг тритона WR 1339 («Serva», ФРГ) на 100 г массы тела, поскольку ранее было установлено, что макси-

мум накопления  $^{131}$ I-тритона WR 1339 в тканях крысы приходится на 4—8-е сутки после внутрибрюшинного введения препарата в дозе 85—100 мг на 100 г массы тела, и в это же время состояние лизосом гепатоцитов наиболее напоминает изменение свойств частиц при лизосомных болезнях накопления [1, 21]. 30 контрольным животным одновременно и тем же способом вводили физиологический раствор. На 4-е сутки после инъекции крыс декапировали, печень и надпочечники гомогенизировали в растворе 0,25 М сахарозы, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ трис-HCl pH 7,4 из расчета 1:5 (масса:объем). Гомогенат печени центрифугировали при 12 000 g в течение 30 мин для измерения в надосадочной жидкости активности цитоплазматической холестеролаэстеразы (ХЭазы) и ацил-CoA: холестерол О-ацил-трансферазы (АХАТ, К.Ф. 2.3.1.26) и при 105 000 g в течение 60 мин для определения неседиментируемой активности лизосомальных ферментов. Лизосомальную фракцию печени интактных животных получали методом дифференциального центрифугирования.

Аорту иссекали на участке от сердца до бифуркации, очищали от жира и адвентиции и измельчали в криостате ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) микротомом при толщине среза 10 мк. Ткань гомогенизировали в растворе 5 мМ трис-HCl 7,4, 1 мМ ЭДТА.

Активность лизосомальной (pH 4,0) и цитоплазматической (pH 8,0) ХЭаз (К.Ф. 3.1.1.13) определяли по гидролизу холестерил- ( $1-^{14}\text{C}$ ) олеата (удельная радиоактивность 27 Ки/моль; «Amersham», Англия), включенного в состав лецитиновых лизосом [7]. Инкубационная смесь состояла из 25 мкл субстрата в виде липосом, содержащих 2,5 мкг холестерололеата (радиоактивность около 80 000 нм/мин), 0,1 мл белковой пробы (1—5 мг белка) и 0,2 мл 0,2 М цитрат-фосфорного буфера pH 4,0 или 0,2 мл 0,2 М трис-HCl-буфера pH 8,0. Инкубацию проводили в течение 2 ч при  $37^{\circ}\text{C}$ . Экстракцию ( $1-^{14}\text{C}$ ) олеиновой кислоты осуществляли, как описано в литературе [7]. Активность АХАТ определяли по включению ( $1-^{14}\text{C}$ ) холестерина (удельная радиоактивность 53,5 мКи/мМ; «Amersham», Англия), как описано в работе [11], в среде (конечный объем 0,75 мл) следующего состава: 15—20 мг белка цитоплазматического экстракта печени, 8 мг/л бычьего сывороточного альбумина (Koch-Light), 0,1 М фосфатного буфера pH 7,4, 26,7 мМ

Содержание основных фракций липидов в гомогенатах печени, аорты, надпочечников и в сыворотке крови при воздействии тритона WR1339 ( $M \pm m$ )

Липидная фракция	Аорта, мкг липида на 1 мг белка		Сыворотка крови, мг%		Печень, мкг липида на 1 мг белка		Надпочечники, 1 мкг липидов на 1 мг белка	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
ХС	1,4±0,2	2,4±0,3*	17,3±1,3	70,9±13*	1,8±0,24	2,0±0,21*	1,85±0,23	2,1±0,18
ЭХС	0,8±0,12	1,6±0,11*	57,9±3,5	139±9,2*	1,05±0,08	2,38±0,18*	7,77±0,22	8,65±0,58*
ТГ	1,7±0,2	5,68±0,36*	23,6±1,3	152±10*	2,0±0,09	4,48±0,22*	1,62±0,12	3,71±0,44*
ФЛ	3,8±0,23	4,05±0,36	75,1±5,6	124±16*	20,5±1,1	37,8±1,5*	5,64±0,27	5,4±0,39
НЭЖК			16,2±1,3	33,2±3*				

Примечание. Здесь и в табл. 2 звездочкой отмечены достоверные различия по сравнению с контролем ( $P < 0,05$ ); число измерений  $n = 22$ .

АТФ, 1 мМ коэнзима А («Serva», ФРГ) и ( $1-^{14}\text{C}$ ) холестерина радиоактивностью около  $10^6$  имп/мин. Инкубация продолжалась 60 мин при  $37^\circ\text{C}$ . Реакцию останавливали добавлением 10 мл смеси хлороформ — метанола (2:1). Активность лецитинхолестеролацилтрансферазы (ЛХАТ) сыворотки крови определяли при 4-часовой инкубации ( $37^\circ\text{C}$ ) 0,1 мл сыворотки подопытных животных и 0,4 мл инактивированной нагреванием ( $56^\circ\text{C}$ ) сыворотки крови интактных животных, содержащей ( $1-^{14}\text{C}$ ) холестерин (удельная радиоактивность 53,5 мКи/моль) радиоактивностью 500 000 имп/мин. Радиоактивность продуктов ферментативных реакций измеряли в 10 мл диоксанового сцинтиллятора повышенной эффективности счета [2] в жидкостном сцинтилляционном счетчике Mark-3 (США).

Активность лизосомальной кислой фосфатазы и кислой  $\beta$ -D-галактозидазы определяли по гидролизу п-нитрофенилфосфата и п-нитрофенил- $\beta$ -D-галактопиранозида («Serva», ФРГ) [8].

Липиды экстрагировали смесью хлороформ — метанол (2:1) [9]. Отдельные классы липидов получали методом тонкослойной хроматографии на стеклянных пластинках с силикагелем Н в системах гексан — этиловый эфир — ледяная уксусная кислота (60:40:1 и 90:10:1). Количественное определение ХС и ЭХС [22], триглицеридов (ТГ), неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК) и фосфолипидов (ФЛ) [16] осуществляли спектрофотометрически. Концентрацию белка определяли стандартным методом [15]. Статистическую обработку данных осуществляли методом вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

## Результаты и обсуждение

Как видно из табл. 1, введение тритона WR 1339 в наших условиях эксперимента приводило к увеличению содержания основных классов липидов в сыворотке крови. Шестикратное увеличение уровня ТГ и четырехкратное возрастание концентрации ХС на фоне снижения величины отношения ЭХС к свободному ХС (3,3 в контроле и 1,9 в опыте) являются, вероятно, следствием снижения актив-

ности липопротеидлипазы и ЛХАТ. Определение активности ЛХАТ показало, что в сыворотке крови подопытных животных резко снижено превращение ХС в ЭХС (табл. 2).

Хорошо известно, что тритон WR 1339 образует комплексы с ЛП плазмы крови [21], что затруждает взаимодействие липолитических ферментов с субстратом [19] и в то же время способен непосредственно ингибировать липопротеидлипазу [17] и ЛХАТ [18]. В последнее время нарушение активности липолитических ферментов крови связывают со снижением концентрации апопротеина А I (активатора ЛХАТ) и С II (активатора липопротеидлипазы) до их полного исчезновения в ЛП высокой плотности (ЛПВП) [12] в результате высокого сродства тритона WR 1339 к ЛПВП [13]. Рост содержания ЭХС и ФЛ в крови, вероятно, обусловлен нарушением обратного рецепторзависимого захвата ЛП паренхиматозными клетками печени вследствие изменения нормального состава апопротеинов в ЛП и угнетения превращения ЛП очень низкой плотности (ЛПОНП) в ЛП низкой плотности (ЛПНП) при воздействии детергента [12]. В то же время известно, что комплексы ЛП крови и тритона WR 1339 накапливаются прежде всего в клетках ретикулоэндотелиальной системы [3, 6]. При этом паренхиматозные клетки могут испытывать относительный недостаток экзогенного ХС и усиливать его эндогенный синтез. Нарушение обмена липидов сопровождается накоплением ХС, ЭХС, ТГ и ФЛ в органах подопытных животных (см. табл. 1).

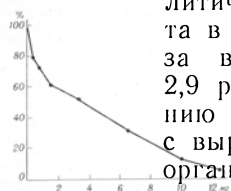
Данные, представленные в табл. 2, свидетельствуют о том, что причиной нарушения транспорта экзогенного

Т а б л и ц а

Активность ХЭаз в гомогенатах печени аорты и надпочечников, АХАТ в печени (надсодочная жидкость после центрифугирования 12 000 g, 30 мин) и ЛХАТ в сыворотке крови при воздействии тритона WR1339 ( $M \pm m$ )

Объект	Лизосомальная ХЭаза, нмоль гидролизованного субстрата на 1 мг белка в 1 мин		топлазматическая ХЭаза, нмоль гидролизованного субстрата на 1 мг белка в 1 мин		АХАТ, % эстерификации ХС на 1 мг белка в 1 час		ЛХАТ, в % эстерификации ХС за 4 ч	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
Печень	1,69	0,19	0,45 ± 0,06	0,24	3,44 ± 0,25	1,4 ± 0,2*		
Аорта	1,77	0,12	0,63 ± 0,13	0,7 ± 0,2	1,6 ± 0,23*			
Надпочечники	1,59	0,21	0,54 ± 0,07	1,4 ± 1,7	1,4 ± 0,74*			
Кровь							15,3 ± 0,5	2,9 ± 0,38*

Примечание. Активность цитоплазматической ХЭазы печени определяли в надсодочной жидкости после центрифугирования (12 000 g, 30 мин).



ХС в клетках может быть недостаточная функция кислой ХЭазы лизосом, содержащих тритон WR 1339. Гидролитическая активность этого фермента в эксперименте снижалась в 4 раза в печени, в 2,5 раза в аорте и в 2,9 раза в надпочечниках по сравнению с контролем, что коррелировало с выраженным ростом уровня ЭХС в органах. В то же время удельная активность лизосомальных ферментов, не принимающих участия в гидролизе липидов: кислой фосфатазы ( $66,08 \pm 2,38$  нмоль п-нитрофенола на 1 мг белка в 1 мин в контроле и  $74,67 \pm 6,4$  нмоль на 1 мг белка в 1 мин в опыте) и  $\beta$ -D-галактозидазы соответственно ( $1,87 \pm 0,12$  и  $1,91 \pm 0,2$ ), практически не изменялась.

Характер изменения активности кислой ХЭазы при воздействии детергента, вероятно, связан с модификацией интерфазы взаимодействия фермента с ЛП, следствием чего является

снижение его способности гидролизовать ЭХС. Об этом свидетельствует ингибирование активности кислой ХЭазы во фракции «легких митохондрий» печени интактных животных тритоном WR 1339 in vitro (см. рисунок). Установлено, что при содержании от 6 до 12 мг на 1 мл инкубационной среды детергент снижал скорость гидролиза ЭХС от 50 до 5 % от контрольного уровня активности фермента.

Накопление детергента в лизосомах клеток печени приводит также к нарушению функций лизосомальных мембран. Об этом свидетельствует увеличение пессидиментируемой активности кислой фосфатазы ( $6,2 \pm 0,42$  усл. ед. в контроле и  $9,07 \pm 0,8$  усл. ед. в опыте;  $n=22$ ,  $P<0,05$ ),  $\beta$ -D-галактозидазы (соответственно  $7,4 \pm 0,68$  и  $9,0 \pm 1,2$ ,  $n=16$ ,  $P<0,05$ ) и кислой ХЭазы ( $6,9 \pm 0,55$  и  $11,3 \pm 1,2$ ,  $n=16$ ,  $P<0,05$ ), выраженной в процентах от общей активности. Сходные данные об изменении пессидиментируемой активности лизосомальных ферментов печени крысы в результате введения детергента были получены в более ранних работах [5].

Исследования, проведенные на культуре фибробластов человека [10], показали, что нарушение транспорта экзогенного ХС в цитоплазму клеток сопровождалось усилением синтеза эндогенного ХС и снижением скорости синтеза ЭХС. В соответствии с этими представлениями в наших условиях эксперимента активность АХАТ в печени подопытных животных достоверно снижалась более чем в 2 раза по отношению к контролю (см. табл. 2). В то же время известно, что внутрибрюшинные инъекции тритона

Влияние тритона WR 1339 на активность кислой ХЭазы фракции «легких митохондрий» печени крысы.

По оси абсцисс — содержание детергента в 1 мл инкубационной среды; по оси ординат — активность кислой ХЭазы (в % от контроля)



WR 1339 вызывали усиление скорости синтеза эндогенного ХС в печени крысы [4, 14]. Именно этим можно объяснить повышение содержания свободного ХС в печени и аорте (см. табл. 1).

Наименее изучена регуляция активности цитоплазматической ХЭазы в условиях нарушения притока экзогенного ХС в клетках. В результате введения детергента удельная активность фермента достоверно увеличивалась в аорте в 2 раза и в надпочечниках в 1,5 раза по отношению к контролю и имела тенденцию к росту в печени (см. табл. 2). Незначительные изменения концентрации ХС и ЭХС в надпочечниках (см. табл. 1) на фоне снижения активности лизосомальной ХЭазы (см. табл. 2), вероятно, можно объяснить активацией цитоплазматической ХЭазы, катализирующей гидролиз депо ЭХС, и, следовательно, компенсирующей общее содержание ХС в надпочечниках.

Таким образом, характер изменения липидного метаболизма при воздействии детергента связан с недостаточной функцией лизосомальной ХЭазы, следствием чего является накопление ЭХС и ТГ в лизосомах и нарушение транспорта экзогенного ХС в цитоплазму клеток. Поэтому развитие липидов в тканях животных, получавших тритон WR 1339, можно рассматривать как модель «лизосомальных болезней накопления» липидов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Короленко Т. А. Биохимические аспекты лизосомотропизма. Новосибирск, 1983, с. 27—47.
2. Остерман Л. А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. М., 1983, с. 204—205.
3. Полякова Э. Д., Климова Т. А. — Пат. физиол., 1973, № 1, с. 74—77.
4. Полякова Э. Д., Дижес Э. Б., Климова Т. А. и др. — Биохимия, 1981, № 2, с. 296—305.
5. Титова В. Г., Короленко Т. А., Якобсон Г. С. — Бюл. экспер. биол., 1978, № 8, с. 230—232.
6. Boman D., Berg T. — Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 1975, Bd 356, S. 301—308.
7. Brecher P., Chobanian J., Small D. M.,

- Chobanian A. V. — J. Lipid Res., 1976, vol. 17, p. 239—247.
8. Burton B. R., Llood J. B. — Biochem. J., 1976, vol. 160, p. 631—639.
9. Folch J., Lees M., Stanley H. S. — J. biol. Chem., 1957, vol. 226, p. 497—509.
10. Goldstein J. L., Brunschede G. Y., Brown M. S. — Ibid., 1975, vol. 250, p. 7854—7862.
11. Heller F. R. — Lipids, 1983, vol. 18, p. 18—24.
12. Ishikawa T., Fidge N. — J. Lipid Res., 1979, vol. 20, p. 254—264.
13. Jamamoto K., Shen B., Zarins Ch., Scanu A. M. — Arteriosclerosis, 1984, vol. 4, p. 418—434.
14. Kandutsch A. A., Saucier S. E. — J. biol. Chem., 1969, vol. 244, p. 2299—2305.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. — J. biol. Chem., 1951, vol. 192, p. 265—275.
16. Marsh J. B., Weinstein D. B. — J. Lipid Res., 1966, vol. 7, p. 574—576.
17. Sheorain V. S., Rao T. N., Subrahmanyam D. — Enzyme, 1980, vol. 25, p. 81—86.
18. Soler-Artalaga C., Russel R. L., Heimberg M. — Arch. Biochem., 1977, vol. 178, p. 135—139.
19. Scanu A. — Advanc. Lipid Res., 1965, vol. 3, p. 63—138.
20. Teng M. N., Kaplan A. — J. biol. Chem., 1974, vol. 249, p. 1064—1070.
21. Walliaux R. — In: Handbook of Molecular Cytology. Amsterdam, 1966, p. 1159—1178.
22. Zak B., Dichenman R., Whithe E. et al. — Amer. J. clin. Path., 1954, vol. 24, p. 1307.

Поступила 26.02.85

#### ACTIVITY OF ENZYMES OF CHOLESTEROL METABOLISM AND LIPID COMPOSITION IN LIVER, AORTA, ADRENAL GLANDS AND BLOOD OF RATS AFTER TRITON WR 1339 TREATMENT

M. I. Dushkin, A. V. Dolgov

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

Injection of Triton WR 1339 into Wistar rats caused a marked increase in contents of free and ester-bound cholesterol, triglycerides, phospholipids and free fatty acids in tissues and a decrease in the activity of lecithin: cholesterol acyltransferase in blood. An increase in concentration of cholesterol esters in tissues was due to a decrease in activity of lysosomal cholesteryl esterase *in vivo* and *in vitro* and to an increase in non-sedimentable activities of acid phosphatase,  $\beta$ -galactosidase and cholesteryl esterase. The decrease in proteolytic degradation of cholesterol esters was accompanied by an increase in the activity of tissue cytoplasmic cholesteryl esterase and by a decrease in activity of acyl-CoA: cholesterol O-acyltransferase in liver tissue.

Д. Д. Петрунин, Ю. С. Татаринев, В. В. Мурашко, А. И. Баранов,  
А. В. Каменец, Г. А. Олефиренко

## СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РАСТВОРИМЫХ АНТИГЕНОВ ЛЕЙКОЦИТОВ ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЙ

ИИ ММИ им. Н. И. Пирогова

В последнее время найден новый подход к характеристике функционального состояния лейкоцитов при различной патологии, основанный на идентификации системы индивидуальных растворимых антигенов лейкоцитов (РАЛ). Параллельное исследование РАЛ в гемолизатах наряду с тестированием их секреции в сыворотку крови позволяет количественно на молекулярном уровне оценить функциональное состояние лейкоцитов [2, 3]. Хотя конкретное функциональное значение каждого из 9 РАЛ, идентифицированных к настоящему времени, предполагается установить лишь в ходе последующих исследований, уже сейчас представляется очевидным, что система РАЛ охватывает самые различные стороны функциональной активности лейкоцитов (весьма вероятно, что в число РАЛ входят лейкоцитарные ферменты и иммунорегуляторы типа лимфокинов, монокинов, кейлонов).

В настоящее время существует более 25 теорий патогенеза атеросклероза, каждая из которых по-своему трактует ведущее звено данного заболевания [1]. Представляет определенный интерес функциональное состояние лейкоцитов при различных формах коронарного атеросклероза, поскольку, например, доказано влияние измененных липопротеидных фракций сыворотки на функцию гранулоцитов [6] и описана характерная кинетика лейкоцитов крови при развитии инфаркта миокарда [4].

Целью настоящего исследования явилась сравнительная оценка функционального состояния лейкоцитов на уровне индивидуальных РАЛ при тяжелом хроническом течении коронарного атеросклероза с наличием постинфарктного кардиосклероза и острым инфаркте миокарда.

В целях дифференциации неспецифических изменений в системе РАЛ при остром инфаркте миокарда, свя-

занных с наличием воспалительных и деструктивных процессов вообще, нами дополнительно обследована вторая контрольная группа больных с острой пневмонией, а также проведено иммунодиффузионное определение С-реактивного белка (С-РБ) — общепризнанного индикатора интенсивности процессов деструкции и воспаления в сыворотках крови всех групп больных.

### Методика

Определение РАЛ в гемолизатах, приготовленных путем замораживания — оттаивания форменных элементов проб венозной крови, проводили иммунодиффузионным методом с использованием 7 стандартных моноспецифических тест-систем [5] к каждому из этих антигенов. Получение моноспецифических антисывороток к РАЛ путем иммунизации кроликов полужоженными препаратами РАЛ и адекватного истощения иммунных сывороток описано ранее [2, 3]. Для выведения стандартной тест-системы на С-РБ использована моноспецифическая антисыворотка к этому белку (НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова).

Иммунодиффузионный анализ проводили с использованием стандартных моноспецифических тест-систем [5], чувствительность которых при использовании расширенной лунки для анализируемой пробы составляла для отдельных РАЛ от 0,1 до 0,3 мг%.

Обследованы больные, страдающие ишемической болезнью сердца (ИБС) и острой пневмонией при поступлении в клинику до начала стационарного лечения. При постановке диагноза учитывали комплекс данных клинического и лабораторного обследования, на основе которых были набраны две группы больных, страдающих атеросклерозом коронарных артерий: 1-я с острым инфарктом миокарда, 2-я — с ИБС и постинфарктным кардиосклерозом (наличие перенесенного инфаркта миокарда в анамнезе объективно свидетельствовало о тяжелом течении коронарного атеросклероза). Контрольную группу (контроль I) составили 9 практически здоровых доноров, причем в предварительных исследованиях в спектре изучаемых РАЛ не было выявлено заметных половых и возрастных различий.

### Результаты и обсуждение

В табл. 1 и 2 представлены результаты сравнительного иммунохимиче-

Т а б л и ц а 1

Сравнительное иммунодиффузионное определение РАЛ в гемолизатах больных коронарным атеросклерозом и острой пневмонией (в мг%;  $M \pm m$ )

Группа больных	Число наблюдений	РАЛ-1	РАЛ-2	РАЛ-3	РАЛ-5	РАЛ-6	РАЛ-8	РАЛ-9
Контроль I	9	3,3±0,5	13,2±3,3	1,1±0,2	0,06±0,01	0,22±0,02	0,09±0,01	0,62±0,08
1-я	24	4,6±0,7	23,3±3,7	2,0±0,3	0,06±0,01	0,66±0,12*	0,11±0,01	1,02±0,14*
2-я	19	5,1±0,8	16,7±2,0	2,4±0,3*	0,11±0,02	0,67±0,07*	0,35±0,08*	0,94±0,07*
Контроль II	7	5,4±1,3	35,4±7,7	2,7±0,5*	0,06±0,01	1,04±0,16*	0,14±0,07	1,14±0,18*

\* Здесь и в табл. 2  $P < 0,05$  по сравнению с контролем I.

ского определения 7 индивидуальных РАЛ в гемолизатах больных ИБС и острой пневмонией (контроль II), а также РАЛ-1, РАЛ-2 и РАЛ-3 (которые относятся к «секретируемым» антигенам) — в сыворотках крови этих же больных. Как видно из табл. 1, в группе больных с острым инфарктом миокарда имеет место статистически достоверное трехкратное повышение содержания в гемолизатах РАЛ-6 и полуторократное — РАЛ-9. Кроме того, выявлена тенденция к повышению уровней РАЛ-1, РАЛ-2 и РАЛ-3, которая, однако, не принимала статистически достоверного характера. В то же время аналогичные изменения установлены в группе больных с острой пневмонией (см. табл. 1), что может свидетельствовать об их неспецифическом характере и до некоторой степени объясняться лейкоцитозом, сопровождающим эти заболевания. О наличии сходной степени интенсивности воспалительных и деструктивных явлений у лиц обследуемых групп, страдающих острым инфарктом миокарда и острой пневмонией, свидетельствуют также весьма близкие показатели сывороточных концентраций С-РБ (см. табл. 2), которые в пределах чувствительности тест-системы не определялись ни в одной сыворотке крови доноров.

У больных ИБС с развившимся постинфарктным кардиосклерозом в

гемолизатах статистически достоверно увеличилось содержание РАЛ-3 (в 2 раза), РАЛ-6 (в 3 раза), РАЛ-8 (в 4 раза) и РАЛ-9 (в 1,5 раза), а для РАЛ-1, РАЛ-2 и РАЛ-5 отмечена лишь тенденция к повышению уровней (см. табл. 1).

Следует подчеркнуть, что если у больных, страдающих коронарным атеросклерозом и имеющих высокие показатели содержания РАЛ-5 и РАЛ-8, развивается острый инфаркт миокарда, то при этом происходит параллельное резкое снижение содержания этих РАЛ до нормальных уровней (возможно, эта динамика развивается в предынфарктном периоде).

Наиболее существенные изменения в функциональном состоянии лейкоцитов у больных коронарным атеросклерозом выявлены при исследовании секреции некоторых РАЛ в сыворотку крови. Так, сывороточные уровни РАЛ-1 и РАЛ-2 примерно в 10 раз превышали нормальные величины как при остром инфаркте миокарда, так и при хроническом течении атеросклероза коронарных артерий с развитием постинфарктного кардиосклероза. В связи с этим высокие сывороточные концентрации РАЛ-1 и РАЛ-2 можно считать характерными не только для острого инфаркта миокарда, но и для коронарного атеросклероза вообще. С другой стороны, патологическую секрецию РАЛ-1 и

Т а б л и ц а 2

Сравнительное иммунодиффузионное определение РАЛ и С-РБ в сыворотке крови больных коронарным атеросклерозом и острой пневмонией (в мг%;  $M \pm m$ )

Группа больных	Число наблюдений	РАЛ-1	РАЛ-2	РАЛ-3	С-РБ
Контроль I	9	0,04±0,01	0,06±0,01	0,18±0,01	—
1-я	24	0,35±0,13*	0,67±0,18*	0,18±0,01	6,8±1,4
2-я	19	0,38±0,12*	0,87±0,29*	0,19±0,01	2,5±0,9
Контроль II	7	0,13±0,02*	0,64±0,24*	0,19±0,01	8,7±2,7

РАЛ-2 лейкоцитами в сыворотку крови нельзя рассматривать как специфическую особенность ИБС, поскольку аналогичное явление (хотя и менее выраженное) отмечено при заболевании острой пневмонией (см. табл. 2). Интересно, что при таком выраженном усилении секреции РАЛ-1 и РАЛ-2 лейкоцитами при ИБС интенсивность выброса в сыворотку крови не изменяется, что говорит об избирательном изменении секреторной активности лейкоцитов. Проведенные дополнительные эксперименты по индикации патологической секреции в сыворотку крови РАЛ-5, РАЛ-6, РАЛ-8 и РАЛ-9 (в норме секреция которых не определяется на уровне чувствительности иммунодиффузионного анализа) у больных с ИБС обеих групп дали отрицательные результаты.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что хроническое течение атеросклероза коронарных артерий сопровождается существенным изменением функционального состояния лейкоцитов крови, напоминающим таковое при острых воспалительных и деструктивных процессах, причем этот факт интересно сопоставить с весьма значительными сывороточными уровнями С-РБ. Представляется допустимым предположить, что выявленные изменения в функциональном статусе системы лейкоцитов при ИБС могут иметь непосредственное отношение к патогенезу атеросклеротического процесса.

Таким образом, большая часть изученных нами параметров, характеризующих функциональное состояние лейкоцитов, существенно и односторонне изменена при обеих выделенных формах ИБС (патологическая секреция РАЛ-1 и РАЛ-2 в сыворотку крови, повышение уровней РАЛ-3, РАЛ-6 и РАЛ-9 в гемолизатах), что свидетельствует о хроническом напряжении системы лейкоцитов при развитии атеросклеротического процесса. С этих позиций снижение лейкоцитарных уровней РАЛ-5 и РАЛ-8 при развитии острого инфаркта миокарда можно трактовать как своего рода «истощение», «перенапряжение», «декомпенсацию» лейкоцитарной системы.

Значение выявленных изменений функционального состояния лейкоцитов в патогенезе атеросклероза подлежит специальному изучению.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Анестиади В. Х., Нагорнев В. А. — Арх. пат., 1984, № 3, с. 10—18.
2. Петрунин Д. Д., Лопухин Ю. М., Швеценко О. П. — Бюл. exper. биол., 1983, № 7, с. 72—74.
3. Петрунин Д. Д., Лопухин Ю. М., Молоденок М. И. и др. — Иммунология, 1983, № 4, с. 68—71.
4. Пименко В. А., Яблунский Н. И., Царбаев Б. А. и др. — Гематол. и трансфузиол., 1984, № 5, с. 43—45.
5. Храмова Н. И., Абелев Г. И. — Бюл. exper. биол., 1961, № 12, с. 107—111.
6. Wiernik A., Jarstrand C., Angalin B. — J. clin. Lab. Immunol., 1983, vol. 11, p. 207—208.

Поступила 06.03.85

УДК 616.5-006.6-07:616.5-008.931:577.152.344

И. Д. Гроздова, А. В. Михайловский, И. Р. Эшба, С. П. Петухов,  
В. Ю. Васильев, Е. С. Северин

### ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОТЕИНКИНАЗ В КОЖЕ ПРИ РАКЕ

Кафедра биохимии МГУ им. М. В. Ломоносова

Известно, что злокачественная трансформация ткани сопровождается изменениями активности многих ферментов [3]. Определение активности некоторых из них (например, кислой и щелочной фосфатаз, галактозилтрансферазы, лизоцима) можно использовать как тест при диагностике (соответственно рака простаты, печени, яичников, острой миелобластом-

ной лейкемии) для установления стадии развития болезни и прогнозирования, оценки эффективности лечения, раннего выявления рецидивов. Установлено [4], что к ферментам, активность которых коррелирует со степенью злокачественной трансформации, относятся и протеинкиназы, ферменты переносящие фосфорильную группу с молекулы АТФ на белки —



субстраты. Регрессия гормонстимулированных опухолей яичников под действием дибутирил-цАМФ сопровождалась увеличением активности цАМФ-зависимых протеинкиназ [4]. Такой же эффект вызывает ингибирование деления клеток мышечной меланомы в культуре [8]. Напротив, при трансформации фибробластов вирусом SV-40 *in vitro* активность цАМФ-зависимых протеинкиназ в них снижается [5].

В противоположность этим ферментам активность цАМФ-независимых протеинкиназ увеличивается в ткани при злокачественной трансформации: в опухолях молочной железы [9], слизистой оболочки толстой кишки [1], лимфоцитах при острой лимфобластной лейкемии [7]. Отмечено [1], что расчет отношения активности цАМФ-зависимых протеинкиназ к активности цАМФ-независимых протеинкиназ в той же ткани позволяет с высокой степенью достоверности отличать трансформированную ткань от нормальной и предложили учитывать этот показатель при диагностике рака.

В настоящей работе на биопсийном материале кожи лица и головы проведен анализ активности цАМФ-зависимых и цАМФ-независимых протеинкиназ в норме и в опухоли. В опухолях обнаружено снижение соотношения этих ферментов по сравнению с нормой. В большинстве опухолей значительно увеличена активность цАМФ-независимых протеинкиназ.

### Методика

Исследование проведено на биопсийном материале, полученном от 21 больного с меланомой или базалиомой, развившихся в различных участках лица и головы. У всех больных биоптаты были взяты непосредственно из опухоли, а у троих — также из непораженного участка кожи на расстоянии примерно 10—15 см от опухоли. Диагноз был поставлен на основании клинического и гистологического анализа. Контрольную группу составляли 18 биоптатов кожи из околоушной области здоровых лиц. Материал после взятия сразу замораживали в жидком азоте и хранили при температуре  $-196^{\circ}$  в течение 1—2 мес.

**Получение тканевых экстрактов.** Биоптаты гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в 0,3 мл раствора, содержащего 5 мМ трис-HCl буфер pH 7,4, 2 мМ ЭДТА, 3 мМ NaF, 0,5 мМ дитиотреитол, 0,5 мМ фенилметилсульфонилфторид и 150 мМ NaCl [1]. Гомогенат центрифугировали 15 мин при 12 000 g. Концентрацию белка в экстракте определяли по методу Лоури.

**Определение фосфотрансферазной активности.** Активность протеинкиназ определяли по количеству радиоактивного  $\gamma$ -фосфата АТФ, перенесенного на белок-субстрат. Об активности цАМФ-зависимых «гистоновых» протеинкиназ (ГП) в экстракте судили по фосфорилированию гистона H1 в присутствии цАМФ под действием тканевого экстракта, а об активности цАМФ-независимых «казеиновых» киназ (КК) — по фосфорилированию казеина. Активность определяли в среде инкубации (80 мкл), содержащей 50 мМ буфер трис-морфолиноэтилсульфоновая кислота pH 6,7, 1 мМ ЭГТА, 5 мМ  $MgCl_2$ , 1 мМ дитиотреитол, 2 мМ NaF, 4—7 мкг суммарного белка тканевого экстракта и 50 мкМ АТФ с  $\gamma$ - $^{32}P$ -АТФ (Ленинград) или  $\gamma$ - $^{32}P$ -АТФ (Ташкент) ( $3\text{--}5 \cdot 10^5$  расп/мин). Инкубационная среда для определения активности ГП содержала также 0,2 мг гистона H1, 5 мкМ и цАМФ и 0,5 мМ метилизобутилксантин, а при определении активности КК в инкубационную среду добавляли 0,3 мг казеина. Реакцию проводили в течение 10—25 мин при  $30^{\circ}C$ . Останавливали реакцию добавлением 20 мкл смеси 0,5 М ЭДТА, 5 мМ АТФ, 20 мМ  $Na_2P_2O_7$ , 10 мМ  $Na_2HPO_4$  и 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина. Аликваты по 50 мкл наносили на фильтры (размером  $18 \times 18$  мм, бумага Ватман 3 ММ) и фиксировали белки на фильтре в 10 % трихлоруксусной кислоте (ТХУ) в течение 30 мин. После 4—5-кратной отмывки от радиоактивного АТФ в 6 % ТХУ фильтры обезвоживали ацетоном и высушивали. Радиоактивность просчитывали в толуольном сцинтилляторе ЖС-106 на жидкостном радиоспектрометре SL 4000 фирмы «Intertechnique» (Франция).

Гистон H1 из тимуса теленка выделяли по методу [6].

### Результаты и обсуждение

Целью работы являлось сравнение системы фосфорилирования белков в здоровой коже и при ее злокачественной трансформации по активности двух типов протеинкиназ. Для этого необходимо было уточнить некоторые условия определения их активности в экстрактах биоптатов.

Установлено, что зависимость активности ферментов от их концентрации носит линейный характер до концентрации суммарного белка тканевого экстракта в пробе 100 мкг/мл (рис. 1). В последующих опытах определение активности ферментов проводили в области линейной зависимости при концентрации экстрактивного белка 50—90 мкг/мл.

При работе в этом диапазоне концентраций ферментов реакция фосфорилирования белков-субстратов развивалась линейно во времени на протяжении 30 мин (рис. 2). Поэтому при определении активности протеинкиназ в тех биоптатах, где она была низка, увеличивали время проведения

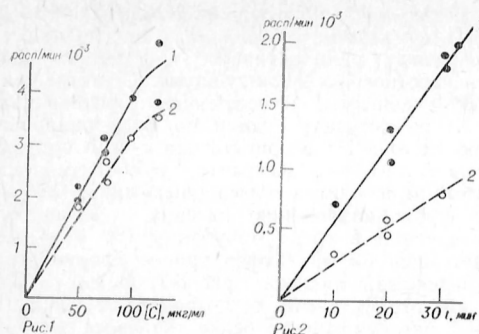


Рис. 1. Зависимость активности протеинкиназ от концентрации.

По оси абсцисс — концентрация белков тканевого экстракта в пробе для определения активности, по оси ординат — активность цАМФ-зависимой (1) и цАМФ-независимой (2) протеинкиназ.

Рис. 2. Развитие во времени реакции фосфорилирования белков под действием тканевого экстракта.

По оси абсцисс — время (в мин), по оси ординат — активность (в р.мол/мин). 1 и 2 — фосфорилирование гистона H1 и казеина соответственно.

реакции вплоть до 25 мин, но не изменяли количество экстракта в пробе.

Активность протеинкиназ обоих типов практически не изменялась при рН 6,5—8,0 (рис. 3). В дальнейшем определение активности ферментов проводили при рН 6,5—7,0, т. е. в условиях, когда значение ГП/КК не зависит от рН.

Приведенные на рисунках данные были получены на биоптатах нормальной кожи. Протеинкиназы в экстрактах тканей опухолей обладали такими же свойствами.

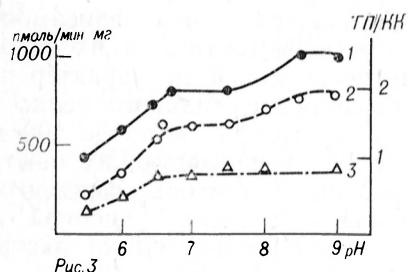


Рис. 3. Зависимость активности протеинкиназ от рН.

1 — отношение ГП/КК; 2 — активность ГП; 3 — активность КК.

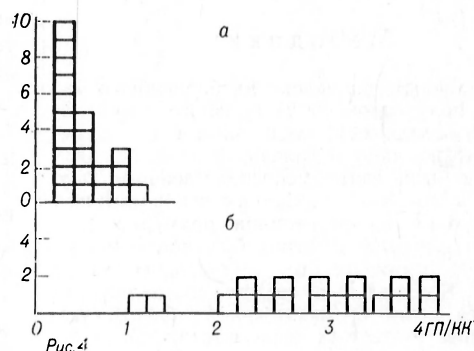


Рис. 4. Отношение активности цАМФ-зависимых протеинкиназ к активности цАМФ-независимых в нормальной коже и в опухолях.

а — рак, б — норма. По оси ординат — число биоптатов. Каждый квадрат представляет значение, полученное на 1 биоптате. Разброс значений ГП/КК в группе опухолевых биоптатов и в контрольной группе одинаков и составляет около 60 % от среднего значения ГП/КК в данной группе.

В вышеописанных условиях определяли активность ГП и КК в экстрактах биоптатов, разделенных на две группы: 18 биоптатов здоровой кожи и 21 биоптат из опухолей, меланом (2 биоптата) и базалиом (19 биоптатов), развившихся в разных участках лица и головы. Кроме них, во 2-ю группу включены 3 биоптата, взятые у больных из участка непораженной кожи на расстоянии 10—15 см от опухоли (см. таблицу).

Активность КК в опухолях была существенно выше (в среднем в 10 раз), чем в норме. Ранее было показано, что активность КК в клетках возрастает перед митозом [2]. Можно предположить, что активность КК в опухолях отражает увеличение доли делящихся клеток в ткани. Следует отметить, что в 5 опухолевых биоптатах (из 21 исследованного) активность КК была близка по своему значению к норме. Поэтому данный показатель не может служить достоверным признаком трансформации ткани.

Как видно из данных таблицы, активность ГП в опухолях была также несколько увеличена. Однако это увеличение было незначительным (в среднем в 1,3 раза) по сравнению с активацией КК. Вследствие этого во всех опухолевых биоптатах, за исключением одного, удельная активность КК превышала таковую ГП.

На основании полученных экспериментальных данных было рассчитано отношение ГП/КК в каждом биоптате.

**Сравнительный анализ активности протеинкиназ в норме и при опухолях кожи лица и головы**

№	Норма		ГП/КК	Патология			
	ГП	КК		диагноз	ГП	КК	ГП/КК
1	63,7	64	1	Базалиома щеки	213	921	0,23
2	39	35	1,2	Базалиома ушной раковины	400	1636	0,24
				То же 2N	276	245	1,1
3	36,4	19	1,9	Базалиома щеки	860	3059	0,28
				» » 3N	112	156	0,7
4	54,6	26	2	Базалиома носогубной складки	23	68	0,3
5	226	106	2,1	Базалиома носа	166	545	0,3
6	82,5	38	2,2	То же лба	194	580	0,33
7	117	47	2,5	То же виска	220	630	0,35
8	153	62	2,5	Рецидив базалиомы щеки	51	140	0,36
9	204	71	2,9	Базалиома носа	81	213	0,38
10	27	9,5	2,9	» »	134	342	0,39
11	70	23	3	» »	70	156	0,45
12	225	71	3,2	Меланома щеки	127	275	0,46
13	118	36	3,2	» »	183,5	353	0,52
14	172	47	3,6	Множественная базалиома щеки	28	54	0,5
15	44	12	3,7	Базалиома щеки	174	309	0,56
16	56	15	3,7	» волосистой части головы	105	179	0,58
				То же 16N	98,5	60	1,64
17	283	70	4	Базалиома угла глаза	35	49	0,7
18	224	57	4	» носа	119	142	0,84
19				» подглазничной области	73	83	0,87
20				То же виска	68	78	0,87
21				» » носа	42	36	1,1
$M \pm m$	$122 \pm 70$	$45 \pm 21$	$2,75 \pm 0,74$		$160 \pm 107$	$469 \pm 434$	$0,5 \pm 0,2$

Примечание. ГП и КК — удельная активность протеинкиназ (в пмолях на 1 мг белка в 1 мин) 2N, 3N и 16N — биоптаты, взятые из непораженной области у больных на расстоянии от опухолей 2, 3 и 16 соответственно. В опухолевой группе подчеркнуты значения активности КК, сравнимые с таковой в норме.

В норме соотношение ферментов принимало значение от 1 до 3,7, причем в 90 % случаев оно было более 1,5.

В опухолях отношение ГП/КК снижено по сравнению с нормой (в среднем в 5 раз). В 20 биоптатах (из 21) ГП/КК принимало значения от 0,2 до 0,9. Изменения, наблюдавшиеся в малигнизированной ткани, не зависели от типа опухоли и ее местоположения.

Следует отметить, что в здоровой на вид коже больных базалиомой на расстоянии 10—15 см от опухоли (биоптаты 2N, 3N) отношение ГП/КК также было ниже нормы, хотя и выше, чем непосредственно в опухоли, тех же больных.

На гистограмме (рис. 4) видно, что доверительные интервалы значений ГП/КК для нормы и опухолей не перекрываются. В 95 % опухолей происходит уменьшение этого показателя

до значений, не свойственных нормальной коже.

Таким образом, в большинстве опухолей кожи возрастает удельная активность цАМФ-независимых казеиновых киназ по сравнению со здоровой тканью. Вследствие этого уменьшается отношение ГП/КК. Снижение этого показателя, по-видимому, является одним из характерных признаков развития опухоли.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Васильев В. Ю., Дорофеев Г. И., Ивашкин В. Т. и др. — Бюл. exper. биол., 1984, № 6, с. 717—719.
2. Трахт И. Н., Гроздова И. Д., Северин Е. С., Гнуцев Н. В. — Биохимия, 1980, № 4, с. 636.
3. Biochemical markers for cancer / Ed. T. Ming Chu. New York, 1982.
4. Cho-Chung Y. S., Clair T., Zubialde J. P. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1978, vol. 85, p. 1150—1155.
5. Gharrett A. J., Malkinson A. M., Sheppard J. R. — Nature, 1976, vol. 264, p. 673.

6. Jones E. W. — Biochem. J., 1964, vol. 92, p. 55—59.
7. Horenstein A., Piras M. M., Mordoh J., Piras R. — Exp. Cell. Res., 1976, vol. 101, p. 260—266.
8. Ludwig K. W., Lowey B., Niles R. M. — J. biol. Chem., 1980, vol. 255, p. 5999—6002.
9. Sharoni J. — Europ. J. Cancer., 1984, vol. 20, p. 277—282.

Поступила 25.02.85

#### ALTERATION IN ACTIVITY OF PROTEIN KINASES IN SKIN UNDER CONDITIONS OF MALIGNANCY

I. D. Grosdova, A. V. Mikhailovsky, I. R. Eshba, S. N. Pelukhov, V. Yu. Vasil'ev, E. S. Severin

Chair of Biochemistry, M. V. Lomonosov State University, Moscow

The phosphorylating enzymes of human skin were studied in bioptic samples of normal tis-

sue (18 samples) and tumors (21 cases), melanomas and basaliomas, which developed in different regions of head and face. The activity of cAMP-dependent and cAMP-independent protein kinases was tested in skin extracts using histone H1 and casein as substrates of phosphorylation, respectively. In most tumors the casein kinase activity was found to be significantly elevated (about 10-fold) as compared with normal counterparts. The histone kinase activity was only slightly elevated in tumors (by 30 %). For each bioptic sample the ratio of histone kinase activity versus casein kinase activity was calculated. In normal skin this ratio constituted from 1 to 3.7, while in 90 % of samples it was higher than 1.5. In all tumors except one the ratio was decreased down to 0.2-0.9. The effect did not depend upon the type of malignancy and tumor location. The change in the protein kinase ratio is considered to be a specific feature of transformed tissue.

УДК 616.153.915-02:577.175.322]-092.9-07

В. Е. Рыженков, Ю. А. Панков, А. М. Чистякова, Ю. М. Кеда,  
Д. С. Серрано, М. Н. Рябцев, Ю. П. Швачкин

#### ВЛИЯНИЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО ТЕТРАДЕКАПЕПТИДА, СООТВЕТСТВУЮЩЕГО АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ 31—44 СОМАТОТРОПИНА ЧЕЛОВЕКА, НА ЛИПИДЫ КРОВИ И ПЕЧЕНИ КРЫС

Институт экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград и Институт экспериментальной эндокринологии и химии гормонов АМН СССР, Москва

Известно, что белковый гормон гипофиза соматотропин (СТ) оказывает ростостимулирующее действие и участвует в регуляции жирового обмена. После длительного латентного периода СТ увеличивает липолиз в жировой ткани и уменьшает липогенез [10, 23, 25]. Отмечено, что у пациентов с избыточной массой тела и гипертриглицеридемией снижен уровень СТ в крови [5, 14, 17]. Поскольку ростостимулирующее действие СТ видоспецифично, применение этого гормона в клинике затруднено.

В целях поиска активных веществ целенаправленного действия, лишенных видоспецифичности, в Институте экспериментальной эндокринологии и химии гормонов АМН СССР был проведен ферментативный гидролиз СТ человека и показано, что некоторые низкомолекулярные его фрагменты сохраняют ту или иную активность, свойственную нативному гормону [3]. При этом тетрадеканептид (ТДП) с ами-

нокислотной последовательностью 31—44 СТ оказывал липолитическое действие, во много раз превышающее таковое исходного гормона, в опытах как *in vitro* на жировой ткани крыс, кроликов и человека, так и *in vivo* на крысах и кроликах [6—9]. Установлено, что выделяющиеся при стимуляции липолиза неэстерифицированные жирные кислоты (НЭЖК) включаются в синтез триглицеридов (ТГ) в печени с последующей секрецией в кровь липопротеидов (ЛП) очень низкой плотности (ЛПОНП), обогащенных ТГ, которые трансформируются в высокоатерогенные липопротеиды низкой плотности (ЛПНП), обогащенные холестерином (ХС) [1, 13].

В связи с указанным обстоятельством в настоящей работе изучено влияние синтетического пролонгированного ТДП с аминокислотной последовательностью 31—44 СТ человека на липиды печени и крови, а также на



спектр ЛП и на активность липолитических ферментов сыворотки крови крыс.

### Методика

В эксперименте использовали крыс-самцов массой 260—280 г. ТДП вводили внутрибрюшинно в течение 14 дней (100 мкг на 1 кг массы тела в 0,5 мл физиологического раствора) ежедневно утром частично голодавшим (17 ч в сутки) животным. В контрольной группе вводили равный объем физиологического раствора. После инъекции ТДП или физиологического раствора через 3 ч животным давали корм, затем через 4 ч его убирали. Через 3 ч после последней инъекции животных взвешивали, быстро декапитировали, собирали кровь, определяли массу печени и надпочечников.

В сыворотке крови исследовали содержание НЭЖК [16], фосфолипидов (ФЛ) [26], общего ХС [20]. Содержание  $\alpha$ -ХС определяли в надосадочной жидкости после осаждения пре- $\beta$  и  $\beta$ -ЛП [12]. Активность липопротеидлипазы (ЛПЛ) и печеночной триглицеридлипазы (ПТГЛ) определяли в сыворотке крови по методу, опубликованному ранее [24], в модификации [4]. Спектр ЛП сыворотки крови определяли методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле [2]. В печени исследовали содержание ХС и ТГ. Экстракцию липидов сыворотки крови или определенного количества ткани печени проводили смесью хлороформ — метанол (2 : 1) [11]. Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики, используя для оценки степени различий по группам *t*-критерий Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

Как показали результаты опытов на крысах, находившихся на режиме частичного голодания, к концу эксперимента отмечалось снижение массы тела животных. При этом не наблюдалось существенных различий показателей у животных, получавших ТДП или физиологический раствор (снижение на  $14,0 \pm 9$  и  $13,0 \pm 4$  г соответственно). Масса надпочечников и печени в этих группах также не различалась ( $16,9 \pm 0,1$  и  $16,4 \pm 0,1$ , 3,2 и 3,3 г на 100 г массы тела животного соответственно).

Следует отметить тенденцию к снижению содержания общего ХС в сыворотке крови в группе крыс, получавших ТДП ( $1,27 \pm 0,11$  ммоль/л), по сравнению с контрольными ( $1,57 \pm 0,08$  ммоль/л). Содержание ФЛ как в контрольной группе (введение физиологического раствора), так и в опытной (введение ТДП) существенно не различалось (табл. 1).

Содержание НЭЖК в сыворотке крови у 80 % животных, получавших

Таблица 1

Влияние ТДП (100 мкг/кг) на липиды сыворотки крови и печени крыс при 14-дневном введении

Липиды	Контроль	+ ТДП
Сыворотки крови, ммоль/л:		
ХС	$1,57 \pm 0,08$ (6)	$1,27 \pm 0,11$ (10)
ТГ	$1,32 \pm 0,1$ (6)	$1,24 \pm 0,1$ (10)
ФЛ	$2,03 \pm 0,16$ (6)	$1,86 \pm 0,1$ (10)
$\alpha$ -ХС	$0,58 \pm 0,05$ (6)	$0,55 \pm 0,05$ (10)
НЭЖК, мэкв/л	$588 \pm 92$ (6)	$985 \pm 136$ (8)*
Печени, мг/г:		
ХС	$4,6 \pm 0,3$ (6)	$4,8 \pm 0,3$ (10)
ТГ	$14,4 \pm 1,6$ (6)	$13,8 \pm 1,5$ (10)

Примечание. В скобках — число животных. Звездочкой отмечено  $P < 0,05$ .

ТДП, было достоверно выше по сравнению с таковым крыс контрольной группы. При этом у контрольных животных, получавших физиологический раствор и находившихся в условиях частичного голодания в течение 14 дней, содержание НЭЖК было выше в 2 раза, чем у неголодавших животных.

Таким образом, полученные результаты показали, что хроническое введение ТДП крысам-самцам в небольшой дозе в условиях частичного голодания приводит к достоверному нарастанию уровня НЭЖК в сыворотке крови. В то же время под влиянием ТДП не наблюдалось увеличения содержания ТГ в печени и в крови (см. табл. 1). Изучение липопротеидного спектра сыворотки крови крыс показало, что существенных изменений в распределении ЛП сыворотки крови как в опытной, так и в контрольной группах не обнаруживалось. В сыворотке крови животных обеих групп присутствовали все классы ЛП: пре- $\beta$ -ЛП (ЛПОНП),  $\beta$ -ЛП (ЛПНП),  $\alpha$ -ЛП (ЛПВП). Интенсивность окрашенных полос, отражающая концентрацию этих ЛП у крыс, получавших ТДП или физиологический раствор, была одинаковой.

Определение содержания  $\alpha$ -ХС показало, что абсолютная величина ХС, связанного с  $\alpha$ -ЛП животных обеих групп, не изменилась ( $0,58 \pm 0,05$  и  $0,55 \pm 0,05$  ммоль/л соответственно), но доля  $\alpha$ -ХС от общего ХС у животных,

Таблица 2

Действие пролонгированного ТДП (100 мкг/кг) на активность ЛПЛ и П-ТГЛ сыворотки крови крыс

Активность ферментов (мкмоль НЭЖК в 1 мл за 1 ч)	Контроль	+ ТДП
ЛПЛ исходная	0 (5)	0,85±0,26 (8)
ЛПЛ после гепарина	47,9±2,9 (10)	42,9±6,0 (10)
П-ТГЛ после гепарина	4,7±0,7 (10)	4,9±0,3 (10)

получавших ТДП, имела тенденцию к увеличению и составляла в среднем 43 %, а у крыс контрольной группы — 37,5 %. Увеличение содержания НЭЖК при отсутствии увеличения уровня ТГ при длительном введении ТДП могло быть в определенной степени связано с влиянием ТДП на активность липопротеидлипаз, гидролизующих ЛП, обогащенные ТГ. Для проверки этого предположения было проведено определение активности ЛПЛ и П-ТГЛ.

После введения крысам гепарина (350 ЕД/кг внутривентриально) активность ЛПЛ в сыворотке крови животных, получавших в течение 14 дней ТДП, возросла в несколько меньшей степени, чем в контроле ( $P > 0,05$ ; табл. 2).

Достоверной разницы в активности ЛПЛ в сыворотке крови контрольных и подопытных животных не обнаружено. Не изменилась активность и П-ТГЛ после введения гепарина этим животным (см. табл. 2).

Возможно, что в условиях активации гормончувствительной липазы жировой ткани накапливающиеся жирные кислоты в крови, выделяющиеся под влиянием ТДП, снижают активность ЛПЛ, так как между этими липазами существуют реципрокные отношения, опосредованные НЭЖК [15, 18, 21].

Исходя из полученных данных можно полагать, что образующиеся под влиянием ТДП жирные кислоты быстрее окисляются и не вовлекаются в синтез ТГ в печени. Известно, что при воздействии СТ на жировой обмен отмечается не только активирование мобилизации жира из жировых депо, но и окисление его в тканях [10]. Это свойство присуще, очевидно, и изученному нами ТДП.

В опытах на крысах-самцах было изучено влияние однократного введения синтетического ТДП на содержание НЭЖК в крови голодавших в течение 17 ч и сытых животных. Контрольным животным вводили 0,5 мл физиологического раствора внутривентриально, подопытным — 270 мкг/кг ТДП. Через 3 ч брали кровь.

По нашим данным, ТДП не оказал влияния на уровень НЭЖК в крови сытых животных, хотя и был применен в 2,5 раза большей дозе по сравнению с предыдущей. При изучении содержания НЭЖК в крови крыс, голодавших в течение 17 ч, было отмечено увеличение их уровня до  $391 \pm 47,4$  мкэкв/л по сравнению с содержанием НЭЖК в сыворотке крови голодавших крыс ( $237,0 \pm 37,9$  мкэкв/л), введение ТДП голодавшим крысам привело к дальнейшему увеличению содержания НЭЖК (до  $555,0 \pm 64,3$  мкэкв/л;  $P < 0,05$ ).

Полученные результаты подтверждают данные о стимулирующем действии голодания на липолиз в жировой ткани [23], а также ранее полученные результаты о свойстве ТДП увеличивать липолиз в жировой ткани разных видов животных в условиях голодания [8]. Они показывают также, что, несмотря на значительный жиромобилизирующий эффект ТДП, в крови животных не накапливаются ТГ и атерогенные ЛП. Последнее указывает на перспективность применения ТДП в качестве средства для стимуляции липолиза в жировой ткани.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Климов А. Н. — В кн.: Дислипипротендемии и ишемическая болезнь сердца. М., 1980, с. 11—24.
2. Магачева Е. Я. — Вопр. мед. химии, 1973, № 6, с. 652—655.
3. Панков Ю. А. — В кн.: Перспективы биорганической химии в создании новых лекарственных препаратов. Рига, 1982, с. 34.
4. Солитернова И. Б., Пикульчева Н. Г. — Вопр. мед. химии, 1979, № 2, с. 204—208.
5. Шурыгин Д. Я., Сидоров К. А., Мазуров В. И. — Пробл. эндокринологии, 1973, № 5, с. 18—22.
6. Юдаев Н. А., Швачкин Ю. П., Рябцев М. И. и др. — Биоорганическая химия, 1975, № 10, с. 1531—1532.
7. Юдаев Н. А., Панков Ю. А., Кеда Ю. М. и др. — Биохимия, 1976, т. 41, № 5, с. 843—846.
8. Юдаев Н. А., Панков Ю. А., Кеда Ю. М. и др. — Там же, № 8, с. 1484—1487.
9. Юдаев Н. А., Панков Ю. А., Кеда Ю. М.

- и др. — Там же, 1979, т. 44, № 10, с. 1779—1785.
10. *Astwood E. B.* — In: The Pharmacological Basis of Therapeutics / Ed. L. Goodman, A. Gilman. New York, 1965, p. 1515—1539.
  11. *Bragdon J. H.* — In: Lipids and the Steroid Hormones in Clinical Medicine / Ed. F. W. Sunderman. Philadelphia, 1960, p. 7—8.
  12. *Burnstein M., Samalle V.* — Clin. chim. Acta, 1960, vol. 5, p. 609.
  13. *Carlson L., Oro L.* — Atherosclerosis, 1973, vol. 18, p. 1—9.
  14. *Crepaldi G., Tiengo A., Muggeo M., Fedele O.* — In: Hungarian Arteriosclerosis Conference. 4th. Abstracts. Budapest, 1976, p. 56.
  15. *Havel R., Carlson L.* — Metabolism, 1964, vol. 13, p. 1402.
  16. *Itaya K., Ui M.* — J. Lipid. Res., 1965, vol. 6, p. 16—20.
  17. *Jacono J., Del Gindice N., Ghionni A.* et al. — Folia endocr., 1971, vol. 24, p. 235—246.
  18. *Khoo J. C., Steinberg D., Huang J. J., Vagelos R. R.* — J. biol. Chem., 1976, vol. 251, p. 2882—2890.
  19. *Neri B. P., Frings C. S.* — Clin. Chem., 1973, vol. 19, p. 1201—1202.
  20. *Neuslosz S. M.* — Biochem. Z., 1930, Bd 225, S. 115—140.
  21. *Nikkilä E. A., Pykälä O.* — Life Sci., 1968, vol. 7, p. 1303—1309.
  22. *Paulikova E., Ahlersova E., Ahlers J.* — Biologia (Praha), 1979, vol. 34, p. 441—448.
  23. *Raben M. S., Hollenberg H.* — J. clin. Invest., 1959, vol. 38, p. 484—488.
  24. *Riley S. E., Robinson D. S.* — Biochim. biophys. Acta, 1960, vol. 5, p. 609.
  25. *Swislowski M., Sonenberg M., Yamasaki N.* — Endocrinology, 1970, vol. 87, p. 900.
  26. *Vaskovsky V. E., Kostetsky E. G., Vassentin J. M.* — J. Chromatogr., 1975, vol. 114, p. 129—141.

Поступила 07.03.85

# EFFECT OF SYNTHETIC TETRADECAPEPTIDE, INVOLVING THE 31-44 AMINO ACID SEQUENCE OF HUMAN GROWTH HORMONE, ON LIPIDS IN RAT BLOOD AND LIVER TISSUE

V. E. Ryzhenkov, Yu. A. Pankov, A. M. Chystyakova, Yu. M. Keda, D. S. Serrano, M. N. Ryabtsev, Yu. P. Shvachkin

Institute of Experimental Endocrinology and Hormone Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Although synthetic tetradecapeptide, involving the 31-44 amino acid sequence of human growth hormone, exhibited a distinct lipolytic effect, content of triglycerides was not increased in rat blood and liver tissue during chronic experiments. At the same time, the level of atherogenic lipoproteins as well as activities of postheparin lipase and liver triglyceride lipase were also unaltered. The data obtained suggest that the tetradecapeptide studied stimulated simultaneously both lipolysis and oxidation of free fatty acids.

УДК 615.332:582.796+615.276.2].015.4:612.015.1:577.152.361]-064

А. Д. Сахибов, С. Ф. Соколова, Н. М. Мирсалихова

## ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ИНГИБИРОВАНИЯ Na, K-АТФАЗЫ ГОССИПОЛОМ И МЕГОСИНОМ

Ташкентский медицинский институт, Институт биохимии АН Узбекской ССР, Ташкент

Госсипол (1,1'-6,6', 7,7'-гексаокси-3,3', диметил-5,5'-диизопропил-6,6'-диформил-2,2'-динафталин) — природный полифенол хлопчатника — привлекает внимание исследователей в связи с многообразием химических и биологических свойств. Работами ряда авторов выявлена иммуносупрессивная [1], антифертильная [13] и противовирусная [5, 6] активность госсипола. Широкие возможности для химической модификации и получения различных полусинтетических производных, а также наличие мощной сырьевой базы делают перспективным исследование механизмов биологической активности госсипола и ряда его производных. На основе госсипола синтезировано около 100 производных, среди которых батриден и мего-

син обладают выраженной иммуносупрессивной активностью.

В настоящее время батриден используется в клинике как иммуносупрессор при пересадке почек. Мегосин предложен в качестве нового иммуносупрессивного средства.

Анализируя литературные данные, мы обратили внимание на тот факт, что контроль за процессами активации лимфоцитов осуществляет мембранно-связанная Na, K-АТФаза [17], которая участвует и в регуляции иммунологического выброса гистамина [11]. Для нормального течения акросомной реакции сперматозоидов во время оплодотворения необходимо непосредственное участие ионов K<sup>+</sup>, поступление которых обеспечивается Na, K-АТФазой [16].

Na, K-АТФаза — транспортный фермент плазматических мембран, осуществляющий активный транспорт  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  против концентрационного градиента, — имеет большое значение для поддержания определенного ионного состава клетки и создания электрохимического потенциала на ее плазматической мембране. Запасаемая таким образом энергия используется клеткой в различных физиологических процессах.

Принимая во внимание описанные выше свойства госсипола и его производных, механизм действия которых до настоящего времени не выяснен, нам представилось целесообразным изучить свойства высокоочищенных препаратов Na, K-АТФазы в присутствии госсипола и мегосина, так как подобные исследования могли бы дать новые сведения для объяснения молекулярных механизмов биологического действия этих соединений.

### Методика

Препарат Na, K-АТФазы получали из мозгового слоя почек свиньи методом [12] в модификации [10]. Активность Na, K-АТФазы определяли в среде следующего состава: 30 мМ трис pH 7,4, 120 мМ NaCl, 30 мМ KCl, 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1 мМ АТФ, 1 мМ ЭДТА. Неорганический фосфор определяли, как описано в работе [15], белок — по Лоури и соавт. [14]. Растворы испытуемых веществ готовили следующим образом: мегосин первоначально растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО), затем доводили дистиллированной водой до рабочей концентрации испытуемого соединения, при этом конечная концентрация ДМСО соответствовала 0,01 %. Госсипол растворяли в ДМСО, добавляли этанол и затем доводили дистиллированной водой до рабочей концентрации испытуемого соединения, конечная концентрация ДМСО составляла 0,01 %, этанола — 0,2 %. В контрольные пробы ДМСО и этанол добавляли в такой же концентрации. Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента с использованием критерия  $t$ .

### Результаты и обсуждение

Ранее нами было обнаружено воздействие мегосина на препараты Na, K-АТФазы [7] и был проведен сравнительный анализ ингибирующего эффекта госсипола и его производных на высокоочищенные препараты Na, K-АТФазы [9].

Мы установили, что при ингибировании Na, K-АТФазной активности ( $I_{50}$ ) госсиполом и его производным

Зависимость ингибирования Na, K-АТФазной активности мегосином ( $1 \cdot 10^{-6}$  М) от времени инкубации и концентрации АТФ

Время инкубации, мин	Концентрация АТФ, мМ	
	1	0,33
3	$46,2 \pm 1,8$	$31,7 \pm 1,1$
5	$56,0 \pm 1,0$	$33,3 \pm 1,2$
10	$67,8 \pm 1,3$	$35,8 \pm 0,8$
15	$68,8 \pm 1,5$	$41,4 \pm 1,3$

величины  $I_{50}$  (М) составляли: госсипола  $\sim 1,9 \cdot 10^{-6}$ ; мегосина  $\sim 3,4 \cdot 10^{-6}$ ; батридена  $\sim 3,9 \cdot 10^{-6}$ .

Величины  $I_{50}$  исследуемых соединений обнаруживали зависимость от количества вносимого в пробу ферментного препарата; при этом наблюдали усиление ингибирующего эффекта с уменьшением концентрации белка.

Нами изучено влияние мегосина и госсипола на свойства высокоочищенных препаратов Na, K-АТФазы. Наши исследования обратимости эффекта инактивации Na, K-АТФазы мегосином свидетельствуют об обратимости данного процесса примерно на 50 % после 50-кратного разбавления.

Исследование зависимости процента ингибирования Na, K-АТФазной активности мегосином от времени инкубации и концентрации АТФ показало, что увеличение времени инкубации с 3 до 15 мин сопровождалось повышением процента ингибирования (см. таблицу).

Известно, что свойства Na, K-АТФазы во многом зависят от физико-химического состояния окружающих ее липидов [3, 8]. Вопрос о том, обусловлен ли ингибирующий эффект мегосина взаимодействием с липидным компонентом фермента, мы попытались разрешить при помощи построения графиков температурной зависи-

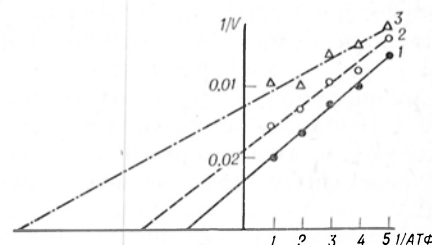


Рис. 1. Влияние мегосина на активность Na, K-АТФазы (в координатах Лайнуивера — Берка).

1 — контроль; 2 — мегосин,  $5 \cdot 10^{-7}$  М; 3 — мегосин  $1 \cdot 10^{-6}$  М.



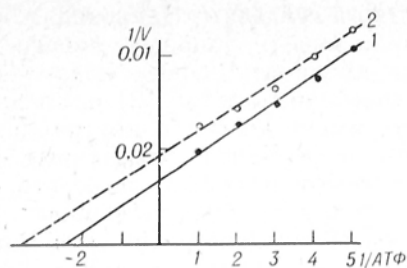


Рис. 2. Влияние госсипола на активность Na, К-АТФазы (в координатах Лайнуивера — Берка).

1 — контроль; 2 — госсипол,  $5 \cdot 10^{-7}$  М.

мости активности Na, К-АТФазы в координатах Аррениуса в присутствии мегосина, поскольку перегиб на графиках Аррениуса обусловлен перестройками в липидной части мембраны [4]. Мы обнаружили, что в контрольном эксперименте излом на графике наблюдается в области 21—22°; после воздействия мегосина в концентрации  $5 \cdot 10^{-7}$  М, вызывающей 10 % ингибирование Na, К-АТФазной активности, этот перегиб не устраняется и находится в тех же пределах. Эти данные позволяют считать, что мегосин не вызывает заметных изменений физико-химических свойств липидов и не изменяет характера белок-липидных взаимодействий.

Для решения вопроса о взаимодействии исследуемых соединений с белковым компонентом транспортного фермента мы исследовали активность препаратов Na, К-АТФазы, обработан-

ных мегосином и госсиполом, в присутствии различных концентраций АТФ. Обнаружено уменьшение величин  $K_m$  и  $V_{max}$  по сравнению с контролем, что соответствует бесконкурентному типу ингибирования (рис. 1, 2). Данные, полученные при действии более высоких концентраций мегосина и госсипола, в координатах Лайнуивера — Берка не линейаризируются. Полученные результаты свидетельствуют об образовании под действием данных препаратов сложного фермент-субстрат-ингибиторного комплекса. Под действием мегосина и госсипола в концентрации  $2 \cdot 10^{-6}$  М изменяется сродство фермента к ионам Na.

На рис. 3, а, б представлена зависимость активности Na, К-АТФазы от соотношения Na/K в среде инкубации в присутствии исследуемых соединений. При взаимодействии мегосина и госсипола в концентрации  $2 \cdot 10^{-6}$  М с препаратами Na, К-АТФазы при 1 мМ АТФ исчезала активация, наблюдаемая в области высоких концентраций Na (пик в области 60 мМ Na) (см. рис. 3, а). При низких значениях АТФ — 0,33 мМ — устранения активации в тех же пределах не происходило (см. рис. 3, б). При более низких концентрациях испытуемых веществ сродство к ионам Na изменялось незначительно.

Проведенные исследования совместного действия мегосина и специфического ингибитора транспортного фермента олиторизида на препараты Na,

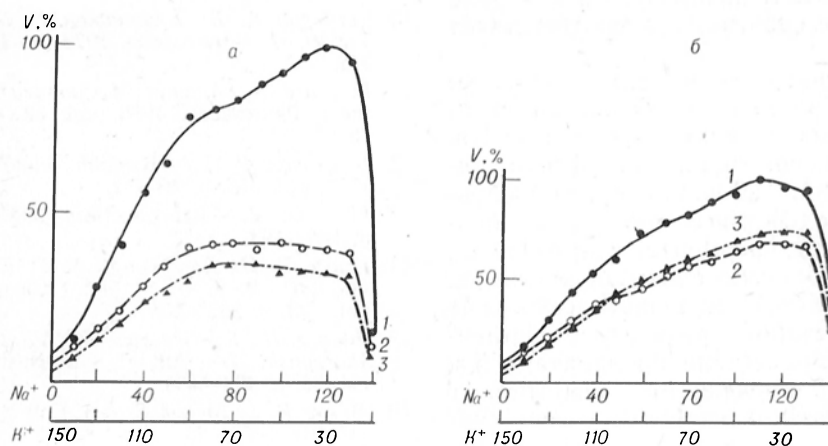


Рис. 3. Зависимость активности Na, К-АТФазы от соотношения Na/K (мМ/мМ) при 1 мМ АТФ (а) и 0,33 мМ АТФ (б).

1 — контроль; 2 — мегосин,  $2 \cdot 10^{-6}$  М; 3 — госсипол  $2 \cdot 10^{-6}$  М.

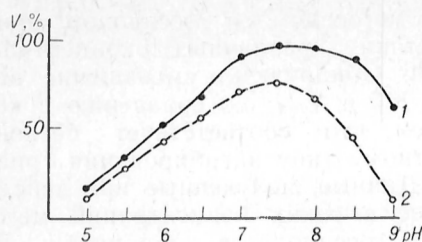


Рис. 4. Зависимость активности Na, К-АТФазы от pH среды инкубации.  
1 — контроль; 2 — мегосин,  $2 \cdot 10^{-6}$  М.

К-АТФазы показали, что под действием мегосина в концентрации  $5 \cdot 10^{-6}$  М (ингибирование на 60—70 %) и при более низких концентрациях данного соединения не изменялась константа ингибирования ( $K_i$ ) для олиторизида, которая соответствовала в контроле  $1,3 \cdot 10^{-6}$  М. Это свидетельствует о том, что мегосин не оказывает влияния на центр связывания Na, К-АТФазы с сердечными гликозидами.

При исследовании влияния pH среды инкубации на активность Na, К-АТФазы, обработанной мегосином в концентрации  $2 \cdot 10^{-6}$  М, нами было обнаружено, что по сравнению с контролем препарат ингибирует Na, К-АТФазную активность при всех значениях pH от 5,0 до 9,0 (рис. 4). Сдвиг pH в область высоких значений приводит к некоторому усилению инактивации фермента мегосином. При более низких концентрациях мегосина этот эффект проявляется слабее. Однако максимум активности в контроле и опыте не сдвигается и соответствует pH 7,5.

Проведенные нами исследования по изучению влияния мегосина на свойства высокоочищенных препаратов Na, К-АТФазы показали, что эффект ингибирования, по-видимому, обусловлен взаимодействием препарата с белковой частью фермента, с которой он образует довольно сложный комплекс. Предполагается наличие нескольких мест связывания препарата с ферментом. Взаимодействие препарата с Na, К-АТФазой происходит, вероятно, с внутриклеточной стороны, о чем свидетельствует зависимость эффекта ингибирования от концентрации АТФ и ионов Na, а также то обстоятельство, что этот же процесс не влияет на

сродство к сердечным гликозидам. Мегосин по своей природе лиофилен, может проникать через плазматические мембраны клеток [2] и, следовательно, имеет доступ к внутриклеточной части фермента. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что эффект ингибирования мегосином Na, К-АТФазой активности *in vitro* может иметь место в живом организме. Аналогичный механизм, по-видимому, лежит также в основе ингибирующего действия госсипола.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Арипов У. А., Уразметов К. Г., Исмаилов П. И. и др. — В кн.: Актуальные вопросы трансплантологии и иммуносупрессивной терапии. Ташкент, 1982, с. 28—37.
2. Арипов У. А., Сахибов А. Д., Касымов Б. З. и др. — Хим.-фарм. журн., 1983, № 8, с. 908—911.
3. Болдырев А. А. — Успехи физиол. наук, 1981, т. 12, № 2, с. 91—130.
4. Болдырев А. А. — Науч. докл. высш. школы. Биол. науки, 1979, № 3, с. 5—17.
5. Вичканова С. А., Горюнова Л. В. — Антибиотики, 1968, № 9, с. 828.
6. Горюнова Л. В., Вичканова С. А. — Фармакол. и токсикол., 1969, № 5, с. 615.
7. Максумов Н. М., Мирсалихова Н. М., Соколова С. Ф., Сахибов А. Д. — В кн.: Всесоюзный симпозиум по полифенольным соединениям, 4-й. Тезисы докладов. Ташкент, с. 30.
8. Мирсалихова Н. М. — В кн.: Транспорт ионов через биологические мембраны и механизмы действия физиологически активных соединений. Ташкент, 1982, с. 142—163.
9. Соколова С. Ф., Мирсалихова Н. М., Сахибов А. Д., Кузнецов А. М. — В кн.: Вопросы трансплантологии и иммуносупрессии. Ташкент, 1983, с. 79—83.
10. Четверин А. Б., Бражников Е. Б., Чиргадзе Ю. Н. — Биохимия, 1979, № 5, с. 945—952.
11. Frossard N., Amellal M., Landry Y. — Biochem. Pharmacol., 1983, vol. 32, p. 3259—3562.
12. Jorgensen P. L. — Biochim. biophys. Acta, 1974, vol. 356, p. 36—52.
13. Liou G. Z. — Reproduction, 1981, vol. 5, p. 189—193.
14. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. — J. biol. Chem., 1951, vol. 193, p. 265—275.
15. Panusz H. T., Graszlyk G., Wilmanska D., Skarzynski J. — Analyt. Biochem., 1970, vol. 35, p. 494—504.
16. Mrsny R. J., Meizel S. — J. Cell Biol., 1981, vol. 91, p. 77—82.
17. Szamel M., Schneider S., Resch K. — J. biol. Chem., 1981, vol. 256, p. 9198—9204.

Поступила 07.03.85

STUDIES ON THE MECHANISM OF INHIBITION OF Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase BY MEGOSIN AND GOSSYPOL

A. D. Sakhibov, S. F. Sokolova, N. M. Mirsalikhova

Kinetic patterns of megosin and gossypol

УДК 617-001.17-008.6-036.11-07:616.36-008.339.15-39

В. Е. Рябинин, Р. И. Лифшиц

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРОСОМ ПЕЧЕНИ И СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ПЕРИОД ОСТРОЙ ОЖОГОВОЙ ТОКСЕМИИ

Кафедра биоорганической и биологической химии Челябинского медицинского института

Борьба со сложным процессом ожоговой аутоинтоксикации является актуальной проблемой [9]. Важным звеном в дезинтоксикационной терапии могут быть усилия, направленные на восстановление функциональной активности мембран эндоплазматической сети (ЭПС) печени, участвующих в детоксикации экзо- и эндотоксинов, биотрансформации различных ксенобиотиков и в регуляции синтеза многих биологически активных веществ.

В литературе имеются некоторые сведения о нарушении микросомальной системы окисления лекарств в печени у обожженных животных [12, 13], но отсутствуют данные о взаимосвязи ЭПС с другими кислородпотребляющими системами печени в условиях термического поражения. Целью настоящего исследования явилось изучение активности микросом и их функциональной зависимости от интенсивности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в период острой ожоговой токсемии.

Методика

Термический ожог III<sup>a</sup>—III<sup>b</sup> степени (10—15 % поверхности тела) наносили беспородным белым крысам-самцам массой 180—220 г под эфирным наркозом с помощью кварцево-галогеновой лампы. Микросомы выделяли из печени животных по методу, приведенному ранее [14]. Монооксигеназную активность определяли, как описано в работе [7]. Скорость деметилирования диметиланилина (ДМА) устанавливали по количеству образующегося формальдегида, а скорость *n*-гидроксилирования анилина — по количеству *n*-аминофенола. Активность глюкозо-6-фосфатазы исследовали по накоплению неорганического фосфата [16] в среде инкубации, содержащей 100 мМ трис-HCl буфер pH 7,4, 1 мМ ЭДТА, 16 мМ MgCl<sub>2</sub>. Регистрацию поглощения кислорода микросомами проводили в такой же среде инкубации с добавлением 1 мМ НАДФ·Н, 6 мМ ДМА и 3 мМ анилина на полярографе

effects on properties of highly purified Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase were studied. Inhibition of the enzymatic activity appears to occur due to interaction of these compounds with the enzyme bound to the intracellular side of the transport enzyme.

LP-7 с помощью электрода типа Кларка при температуре 37 °С. Для определения функциональной активности микросом рассчитывали следующие показатели: скорость поглощения кислорода при окислении эндогенных субстратов ( $V_{энд}$ ), добавлении НАДФ·Н ( $V_{НАДФ·Н}$ ), ДМА ( $V_{ДМА}$ ), анилина ( $V_{ан}$ ), коэффициент стимуляции дыхания ( $V_{НАДФ·Н} / V_{энд}$ ) и соотношение скоростей поглощения кислорода —  $V_{ДМА} / V_{НАДФ·Н}$  и  $V_{ан} / V_{НАДФ·Н}$ .

Интенсивность ПОЛ в плазме крови устанавливали по накоплению диеновых конъюгатов [4] и малонового диальдегида [11]. НАДФ·Х·Н- и аскорбатзависимое ПОЛ (НЗП и АЗП) микросом определяли в среде инкубации, содержащей 40 мМ трис-HCl буфер pH 7,4, 0,5 мМ НАДФ·Н или 0,5 мМ аскорбата, 2 мМ АДФ, 50 мкМ FeSO<sub>4</sub> [15]. Содержание белка определяли с помощью биуретового реактива, содержание общих липидов — с сульфофосфованилиновым реактивом [8].

Результаты и обсуждение

Нанесение термической травмы подопытным животным приводит к значительному подавлению монооксигеназной активности микросом печени. При определении НАДФ·Н-зависимой скорости окисления ДМА и анилина в препаратах микросом наблюдались снижение N-деметиلاзной и *n*-гидроксилазной активности цитохрома P-450: скорость окисления ДМА через 1—7 сут и анилина через 1—3 сут составляла соответственно 50—80 и 70—75 % от контроля (табл. 1). Через 7 сут после термической травмы скорость окисления анилина в микросомах печени начинала превышать контрольный уровень и достигала 155 %. Аналогичную тенденцию в гидроксилировании анилина можно было наблюдать и при полярографической регистрации дыхания (табл. 2). Различная скорость окисления ДМА и анилина через 7 сут после травмы требует своего объяснения. Одной из причин может быть сти-

Т а б л и ц а 1

Активность некоторых ферментов микросом печени после ожога ( $M \pm m$ ; в нмоль продукта на 1 мг белка в 1 мин)

Сутки после травмы	Деметилаза ДМА	<i>n</i> -анилингидроксилаза	Глюкозо-6-фосфатаза
1-е	$5,1 \pm 0,3^*$	$0,11 \pm 0,02^{**}$	$0,11 \pm 0,01^*$
3-и	$11,9 \pm 0,7$	$0,12 \pm 0,01^{**}$	$0,091 \pm 0,003^*$
7-е	$8,8 \pm 0,6^{**}$	$0,25 \pm 0,01^*$	$0,071 \pm 0,002^*$
Контроль	$10,5 \pm 0,5$	$0,16 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,001$

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2, 3 в каждой группе по 10 животных; одна звездочка —  $P < 0,001$  по сравнению с контролем (без ожога), две —  $P < 0,05$ .

муляция окисления анилина эндогенными модификаторами, которые образуются в период ожоговой токсемии (продукты протеолиза и т. п.). Изменение активности изучаемых монооксигеназ может явиться, кроме того, результатом нарушения функционирования определенных подфракций цитохрома Р-450, ответственных за N-деметилазную и *n*-гидроксилазную реакции.

О нарушении функций НАДФ·Н-зависимой редокс-цепи эндоплазматического ретикулума свидетельствует и значительное уменьшение скорости потребления кислорода микросомами подопытных животных при окислении эндогенных субстратов ( $V_{\text{энд}}$ ) и эндогенного НАДФ·Н ( $V_{\text{НАДФ·Н}}$ ) (см. табл. 2). Угнетение  $V_{\text{энд}}$  может быть также результатом снижения общего содержания нуклеотидов, в частности ди- и трифосфопиридиновых производных, что характерно для периода острой ожоговой токсемии [3]. Величина коэффициента стимуляции дыхания микросом обожженных животных не отличается от нормы, что свидетельствует о сохранении электронтранспорт-

ной цепи микросом (см. табл. 2). Показатели других коэффициентов также практически не отличались от нормальных.

Исследование индикаторного фермента мембран эндоплазматического ретикулума — глюкозо-6-фосфатазы — показало, что весь период острой ожоговой токсемии характеризуется значительным увеличением активности этого фермента — 300 % и более от контрольного уровня (см. табл. 1). Такая реакция может быть обусловлена изменением целого ряда как нейрогуморальных, так и клеточных механизмов регуляции. Исследования, проведенные в нашей лаборатории [6], показали, что термическое поражение вызывает компенсаторное усиление процесса глюконеогенеза, способствующее восполнению запасов гликогена и характеризующееся повышенной активностью глюкозо-6-фосфатазы и уменьшением содержания глюкозо-6-фосфата. Одним из факторов, способных регулировать активность этого фермента, является концентрация в цитозоле ионов  $\text{Ca}^{2+}$  [17]. Проведенные ранее эксперименты показали, что в крови обожженных собак может происходить

Т а б л и ц а 2

Скорость потребления кислорода микросомами печени крыс в период острой ожоговой токсемии (в нмоль  $\text{O}_2$  на 1 мг белка в 1 мин;  $M \pm m$ )

Время после ожога, сутки	$V_{\text{энд}}$	$V_{\text{НАДФ·Н}}$	$V_{\text{ДМА}}$	$V_{\text{ан}}$	$\frac{V_{\text{НАДФ·Н}}}{V_{\text{энд}}}$	$\frac{V_{\text{ДМА}}}{V_{\text{НАДФ·Н}}}$	$\frac{V_{\text{ан}}}{V_{\text{НАДФ·Н}}}$
1-е	$4,3 \pm 0,3^*$	$6,6 \pm 0,5^{***}$	$5,7 \pm 0,5$	$3,3 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,1$	$0,93 \pm 0,05$	$0,53 \pm 0,06$
3-и	$5,4 \pm 0,6^{***}$	$9,9 \pm 1,0^{**}$	$7,8 \pm 0,8$	$3,7 \pm 0,5$	$1,8 \pm 0,1$	$0,79 \pm 0,04$	$0,37 \pm 0,06$
7-е	$5,8 \pm 0,6^{***}$	$19,5 \pm 2,5$	$15,8 \pm 2,3$	$8,1 \pm 1,9$	$3,4 \pm 0,6^{**}$	$0,83 \pm 0,07$	$0,41 \pm 0,08$
Контроль	$9,2 \pm 0,5$	$15,4 \pm 1,9$	$11,0 \pm 2,2$	$5,2 \pm 1,5$	$1,7 \pm 0,3$	$1,1 \pm 0,3$	$0,54 \pm 0,2$

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 3 три звездочки  $P < 0,01$ .



Интенсивность образования продуктов ПОЛ в плазме крови и микросомах печени крыс в период острой ожоговой токсемии ( $M \pm m$ )

Сутки после травмы	Ацилгидроперекиси, $\Delta D$ на 1 мг липидов	МДА, мкМ на 1 г липидов	АЗП, мкМ МДА на 1 мг белка в 1 мин	НЗП, мкМ МДА на 1 мг белка в 1 мин
1-е	$1,63 \pm 0,2$	$1,13 \pm 0,1$	$0,27 \pm 0,01$	$0,50 \pm 0,01^*$
3-и	$1,88 \pm 0,2^{**}$	$1,65 \pm 0,1$	$0,30 \pm 0,02$	$0,77 \pm 0,03^{***}$
7-е	$5,8 \pm 1,7^{**}$	$7,11 \pm 3,7^{**}$	$0,25 \pm 0,006^{***}$	$0,50 \pm 0,02^{***}$
Контроль	$1,14 \pm 0,3$	$1,65 \pm 0,3$	$0,27 \pm 0,01$	$0,50 \pm 0,01^*$

образование токсических пептидов, способных вызывать дезэнергизацию митохондрий и подавление их  $Ca^{2+}$ -аккумулирующей способности [10]. Это приводит к ингибированию кальцевого «насоса» в клетке с развитием многочисленных последствий, одним из которых может быть увеличение проницаемости мембран микросом с усилением механизма дефосфорилирования глюкозо-6-фосфата, более доступного в этом случае для трансмембранной системы переноса метаболитов.

Нарушение функционирования мембраносвязанных ферментов микросом печени в период острой ожоговой токсемии не должно носить случайный характер и сопряжено, по-видимому, с изменением функциональной активности других внутриклеточных кислород-зависимых систем, в частности ПОЛ.

Результаты проведенных исследований показывают, что термическая травма приводит к существенной активации НЗП во все сроки наблюдения по сравнению с нормой (табл. 3). Интенсивное образование продуктов ПОЛ может приводить к нарушению структуры микросомальных мембран, понижению активности электронтранспортной цепи и некоторых мембраносвязанных ферментов, в том числе N-деметилазы ДМА и *n*-анилингидроксилазы. Существование реципрокных отношений между реакциями ПОЛ и монооксигеназной системой объясняется, кроме того, наличием общих электротранспортных комплексов, включающих НАДФ·Н-цитохром P-450-редуктазу и цитохром P-450. Наличие конкурентных механизмов приводит к тому, что усиление НЗП при термической травме может сопровождаться подавлением окисления НАДФ·Н в среде инкубации, содержащей ЭДТА и блокирующей систему ПОЛ (см. табл. 3).

Установлено [5], что ферментативное ПОЛ является важным физиологическим механизмом разборки внутриклеточных мембранных структур, способным регулировать уровень развития системы оксигеназ эндоплазматического ретикулума печени. Однако чрезмерная активация этого процесса при патологических состояниях (в том числе при ожоговой травме) может приводить к деградации мембран микросом и разрушению цитохрома P-450.

Изучение активности АЗП показало, что нанесение термической травмы не оказывает существенного влияния на эту систему в начальный период заболевания (1—3-и сутки), в то время как через 7 сут после травмы наблюдается достоверное угнетение этого процесса (см. табл. 3). Аналогичные данные были получены и при полярографической регистрации дыхания микросом в среде, содержащей 100 мМ трис-HCl буфер, 0,5 мМ аскорбата и 12 мкМ  $FeSO_4$ . Как известно [14], реакции ПОЛ в системах АЗП и НЗП индуцируются различными радикалообразующими центрами и, следовательно, в них должны окисляться разные непасыщенные жирные кислоты. В поздний период ожоговой токсемии возможно усиление метаболизма легко окисляемых липидов, тогда при активации АЗП *in vitro* скорость образования МДА по мере развития патологии закономерно понижается. Основанием для такого предположения могут явиться данные работы [1], свидетельствующие о том, что при ожоговой болезни способность липидов к окислению при индукции процесса *in vitro* понижается, хотя количество продуктов ПОЛ *in vivo* повышается. Результаты исследования, проведенного нами, подтверждают такую точку зрения: накопление ацилгидроперексидей и МДА в плазме крови обожженных животных

становится максимальным через 7 сут после травмы — 300 % и более от нормы (см. табл. 3).

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о существенном нарушении функциональной активности микросом печени и значительном влиянии процессов ПОЛ на систему монооксигеназ при острой ожоговой токсемии, что может явиться важным фактором повреждения системы детоксикации организма и развития соответствующих метаболических и токсических расстройств. Большое значение при этом приобретает разработка новых подходов к лечению обожженных, заключающаяся не только в применении антиоксидантной терапии, но и использовании средств, способных активировать ферментные системы микросом печени.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Аристархова С. А., Бурлакова Е. Б., Заец Т. Л. — *Вопр. мед. химии*, 1983, № 4, с. 102—105.
2. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. М., 1975.
3. Вальдман Б. М., Рябинин В. Е. — В кн.: *Метаболические основы острой ожоговой токсемии*. Омск, 1977, с. 6—24.
4. Гаврилов В. Б., Мишкорудная М. И. — *Лаб. дело*, 1983, № 3, с. 33—36.
5. Казан В. Е., Новиков К. Н., Савов В. М. и др. — *Науч. докл. высш. школы. Биол. науки*, 1984, № 3, с. 21—22.
6. Камилов Ф. Х., Ефименко Г. П. и др. —

- В кн.: *Метаболические основы острой ожоговой токсемии*. Омск, 1977, с. 25—104.
7. Карузина И. И., Арчаков А. И. — В кн.: *Современные методы в биохимии*. М., 1977, с. 57—60.
  8. Колб В. Г., Камышиников В. С. *Клиническая биохимия*. Минск, 1976, с. 152—154.
  9. Лифшиц Р. И. — В кн.: *Метаболические основы острой ожоговой токсемии*. Омск, 1977, с. 135—141.
  10. Лифшиц Р. И., Рябинин В. Е., Чарная Л. Ф. и др. — *Вопр. мед. химии*, 1980, № 1, с. 63—66.
  11. Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г. — В кн.: *Современные методы в биохимии*. М., 1977, с. 63—68.
  12. Durlowski L., Fruncillo R. J. — *J. Trauma*, 1982, vol. 22, p. 950—953.
  13. Fruncillo R. J., Di Gregorio G. J. — *Ibid.*, 1983, vol. 23, p. 523—529.
  14. Kamath S. A., Narayan K. A. — *Analyt. Biochem.*, 1972, vol. 48, p. 53—61.
  15. Placer Z. A. et al. — *Ibid.*, 1966, vol. 16, p. 359—364.
  16. Swanson M. A. — *Meth. Enzymol.*, 1955, vol. 2, p. 541—547.
  17. Yamaguchi Masayoshi — *Acta endocr. (Kbh.)*, 1983, vol. 102, p. 572—576.

Поступила 03.04.85

#### THE FUNCTIONAL STATE OF LIVER MICROSOMES AND LIPID PEROXIDATION AT THE EARLY PERIOD OF BURNS TOXEMIA

V. E. Ryabinin, R. I. Lifshits

Chair of Bioorganic and Biological Chemistry, Medical School, Chelyabinsk

Thermal trauma impaired the functional state of liver microsomes. Impairment of the monooxygenase system was due to activation of lipid peroxidation during the early period of burns toxemia.

УДК 616.379-008.64-07:616.155.1-008.93:577.164.11

В. Г. Чобитько, Н. Б. Захарова, В. И. Рубин

#### ВЗАИМОСВЯЗЬ НАРУШЕНИЙ ОБМЕНА ТИАМИНА И ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ЭРИТРОЦИТАХ БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ И ПУТИ ИХ ЛЕКАРСТВЕННОЙ КОРРЕКЦИИ

Кафедры эндокринологии, биоорганической и биологической химии Саратовского медицинского института

Имеются данные о нарушении обмена витамина В<sub>1</sub> при сахарном диабете [3, 6, 9]. Так, при обследовании больных с различным клиническим течением сахарного диабета была выявлена недостаточность тиамина, наиболее выраженная у больных с тяжелой формой заболевания в стадии декомпенсации. Характер выявленных изменений

в обмене витамина В<sub>1</sub> при данной форме заболевания — снижение активности транскетолазы и повышение ТДФ-эффекта — позволяет говорить о снижении участия тиамина в ТДФ-зависимых ферментативных реакциях и повышении суточной экскреции этого витамина с мочой. Снижение участия тиамина в ТДФ-зависимых процессах

ет являться следствием нарушения фосфорилирования, требующего энергетических затрат [7], поскольку в литературе имеются сообщения о снижении энергетических ресурсов при сахарном диабете [4].

Целью настоящего исследования является изучение связи между нарушениями в обмене витамина В<sub>1</sub> у больных сахарным диабетом и состоянием энергетического обмена. Предпринята попытка подбора лекарственного препарата, который оказывал бы наилучшее корригирующее воздействие на выявленные метаболические нарушения.

## Методика

Исследовали кровь, полученную у 12 больных с тяжелой формой сахарного диабета в период декомпенсации обменных процессов (9 женщин и 3 мужчин в возрасте от 29 до 50 лет) и у 6 здоровых лиц (3 женщин и 3 мужчин в возрасте от 18 до 35 лет). Кровь брали из локтевой вены палочкой с гепарином (12 МЕ/мл). Эритроциты выделяли трехкратным отмыванием в Кребс-Рингер-фосфатном буфере, содержащем 100 мМ NaCl, 3 мМ KCl, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1,2 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 мМ трис-HCl, 5 мМ глюкозы, pH 7,4. Разведенные буфером до показателя гематокрита 40 % эритроциты каждого обследуемого лица в равном объеме помещались в 5 термостатируемых кювет. 1-я кювета была контрольной, в остальные через 60 мин после начала инкубации вносили добавки: во 2-ю кювету инсулин (0,667 ЕД/на 1 мл взвеси эритроцитов); в 3-ю — инсулин и тиаминбромид (0,833 · 10<sup>-3</sup> мг/мл); в 4-ю — инсулин и кокарбоксилазу (0,694 · 10<sup>-3</sup> мг/мл); в 5-ю — инсулин, тиамин и аденин (0,139 · 10<sup>-3</sup> мг/мл).

Добавки вносили из расчета среднетерапевтических доз лекарственных препаратов, за исключением инсулина, который был взят в дозе, заведомо превышающей среднетерапевтическую. Срок внесения добавок выбран с учетом полученных нами данных о сохранении высокой активности энергетических процессов в эритроцитах доноров до 3 ч при данных условиях инкубации и о наступлении относительной стабилизации показателей метаболизма эритроцитов через 1 ч после ее начала. Инкубацию проводили при 37 °C в течение 180 мин при постоянном перемешивании. Показатели обмена витамина В<sub>1</sub> (активность транскетолазы и величину ТДФ-эффекта), гликолиза (содержание глюкозы лактата) и энергетического обмена эритроцитов — содержание АТФ, АДФ, АМФ и 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ) — исследовали до, а также через 60 и 180 мин инкубации. Показатели гемогликолиза исследовали в кислоторастворимой фракции эритроцитов, которую получали путем осаждения белков 0,8 н. хлорной кислотой в отношении 1 : 1. Полученный центрифугат нейтрализовали 2 М раствором K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> и использовали для определения содержания

глюкозы глюкозооксидазным методом [11], лактата в реакции с лактатдегидрогеназой [11], 2,3-ДФГ по реакции с хромотроповой кислотой [10], количества адениловых нуклеотидов методом тонкослойной хроматографии на пластинках силуфол [2].

Для оценки соотношения активности энергосинтезирующих и энергоутилизирующих систем эритроцитов был использован показатель относительной концентрации АТФ [8]:

$$ATF_{отн} = \frac{[ATF]}{[ATF] + [ADP] + [AMP]}.$$

Для оценки отношения прямой и обратной реакций преобразования АДФ в аденилаткиназной реакции был использован коэффициент К:

$$K = \frac{[ATF] \cdot [AMF]}{[ADP]^2}$$

Показатели обмена тиамин определяли в гемолизате, приготовленном из взвеси эритроцитов в разведении 1 : 10. Исследовали активность транскетолазы и величину ТДФ-эффекта [5].

Полученные данные обработаны статистически с использованием критерия Вилкоксона — Манна — Уитни [1].

## Результаты и обсуждение

Полученные данные представлены в табл. 1 и 2. Подтверждено, что в эритроцитах, выделенных из крови больных с тяжелой формой диабета в период декомпенсации обменных процессов, нарушен обмен витамина В<sub>1</sub> (активность транскетолазы снижена до 90 % от контроля,  $P < 0,05$ , ТДФ-эффект увеличен до 21,1 %,  $P = 0,005$ ) и имеет место перестройка гемогликолиза. Высокое содержание в клетках глюкозы (148 % от контроля,  $P = 0,005$ ), лактата (146 % от контроля,  $P = 0,01$ ) и 2,3-ДФГ (149 % от контроля,  $P = 0,005$ ) свидетельствует об активации этого процесса.

Повышение концентрации метаболитов гликолиза в эритроцитах происходит на фоне уменьшения содержания в них АТФ (92 % от контроля,  $P < 0,01$ ), суммы аденилатов (94 % от контроля,  $P = 0,05$ ), относительной концентрации АТФ (97 % от контроля,  $P < 0,01$ ) и снижения коэффициента К (82 % от контроля,  $P < 0,05$ ). Обнаруженные изменения в метаболизме эритроцитов, выделенных из крови больных сахарным диабетом, прослеживаются также при инкубации клеток *in vitro*

Таблица 1

Исходные показатели обеспеченности витамина В<sub>1</sub>, энергетического обмена и гемогликолиза эритроцитов здоровых людей и больных сахарным диабетом (глюкоза, лактат, 2,3-ДФГ, в ммоль/л, активность транскетолазы в ммоль/л, содержание адениловых нуклеотидов в ммоль/л).

Группа обследованных	АТФ	АДФ	АМФ	Сумма аденилатов	АТФ/огн	К	Глюкоза	Лактат	2,3-ДФГ	Транскетолаза	ТДФ-эффект, %
Доноры (6)	451±8,31	88,4±3,26	28,3±0,45	568±10,9	0,79±0,004	1,70±0,06	4,97±0,30	1,64±0,18	4,79±0,34	15,7±0,25	11,5±1,29
Больные сахарным диабетом (12)	414±8,79	86,6±3,37	29,1±0,28	535±9,91	0,77±0,006	1,39±0,08	7,36±0,49	2,39±0,17	7,14±0,41	14,1±0,40	21,1±1,02
P	<0,01	>0,05	>0,05	0,05	<0,01	<0,05	0,005	0,01	0,005	<0,05	0,005

(табл. 2) и свидетельствуют о том, что в эритроцитах на фоне интенсивно протекающих процессов гликолиза нарушается соотношение между энергосинтезирующими и энергоутилизирующими процессами с преобладанием последних. Выявленные изменения в энергетическом обмене могут, по-видимому, являться одним из факторов, способствующих нарушению фосфорилирования витамина В<sub>1</sub> при сахарном диабете.

Проведенная *in vitro* коррекция выявленных нарушений в обмене витамина В<sub>1</sub> в эритроцитах больных диабетом путем введения в состав инкубационной среды лекарственных препаратов из расчета их среднетерапевтических доз показала (см. табл. 2), что все примененные добавки оказывают положительное влияние на выявленные нарушения. Однако степень их воздействия была различной. Так, инсулин за 120 мин инкубации улучшает показатели обмена витамина В<sub>1</sub> в эритроцитах больных диабетом, но не приводит к полной их нормализации. Влияние совместной добавки тиамин и инсулина лишь незначительно превышает положительное воздействие на показатели обмена витамина В<sub>1</sub>, оказываемое инсулином, вносимым в инкубационную среду в качестве самостоятельной добавки ( $P>0,05$ ). Наилучший эффект на изучаемые показатели оказывают добавки инсулина с кокарбоксилазой и инсулина в сочетании с тиамин и аденином, что также подтверждает предположение о нарушении фосфорилирования витамина В<sub>1</sub> при сахарном диабете и позволяет объяснить это нарушение низким уровнем энергетических процессов в клетке. За 120 мин инкубации в присутствии указанных препаратов в эритроцитах больных диабетом происходит нормализация активности транскетолазы и ТДФ-эффекта. Кроме того, эти добавки оказывают выраженное стимулирующее воздействие на выработку АТФ, что происходит за счет ускорения образования АТФ в ходе гликолиза и активации альтернативного пути синтеза адениловых нуклеотидов в эритроците.

Полученные данные позволяют предположить, что лечение больных сахарным диабетом с наличием тиаминовой недостаточности должно проводиться с помощью кокарбоксилазы или сочетания тиамин и адениновых препаратов.



Перестройка метаболизма эритроцитов больных сахарным диабетом при инкубации клеток с инсулином, тиаминном, кокарбоксилазой и аденином (разность между исследуемыми показателями через 60 и 180 мин инкубации)

Добавки в инкубационную среду	АТФ	Сумма аденилатов	Глюкоза	Лактат	2,3-ДФГ	Транскеталаза	ТДФ-эффект, %
Без добавок	28,0±6,99	37,9±7,90	-2,02±0,21	4,89±0,60	-1,03±0,15	0,62±0,16	-1,78±0,38
Инсулин	26,2±6,05	32,9±8,05	-2,88±0,21 $P_1<0,05$	5,03±0,43	-1,26±0,13	1,04±0,13 $P_1=0,05$	-4,30±1,10 $P_1<0,005$
Инсулин + тиамин	46,7±16,5 $P_1<0,05$ $P_2=0,01$	53,0±10,1 $P_1<0,05$	-3,40±0,23	5,33±0,42	-1,18±0,20	1,28±0,18	-7,20±0,73 $P_1<0,005$
Инсулин + кокарбоксилаза	70,0±0,53 $P_1=0,005$ $P_2<0,05$	87,3±9,37 $P_1<0,005$ $P_2=0,05$	-3,52±0,26 $P_1<0,05$	5,60±0,54	-0,22±0,05 $P_1<0,05$ $P_2<0,05$	2,20±0,20 $P_1<0,05$	-13,8±2,30 $P_1<0,05$
Инсулин + тиамин + аденин	67,1±10,5 $P_1=0,01$ $P_2=0,005$	82,9±18,6 $P_1=0,05$	-3,36±0,30 $P_1<0,05$ $P_4=0,05$	5,92±0,64	-0,65±0,10 $P_1=0,05$ $P_2<0,05$ $P_4<0,05$	2,14±0,29 $P_1<0,05$	-10,2±0,92 $P_1<0,05$

П р и м е ч а н и е.  $P_1$  — по отношению к изменению аналогичного показателя за 2 ч инкубации в Кребс-Рингер-фосфатном буфере;  $P_2$  — по отношению к изменению в присутствии инсулина;  $P_3$  — по отношению к изменению в присутствии инсулина и тиамина;  $P_4$  — по отношению к изменению в присутствии инсулина и кокарбоксилазы. Значение  $P$  приведены только для статистически достоверно различающихся пар величин ( $P \leq 0,05$ ).

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. Л., 1973.
2. Захарова Н. Б., Рубин В. И. — Лаб. дело, 1980, № 12, с. 735—738.
3. Зелинский Б. А., Зелинский С. Ц. — В кн.: Теоретические и практические аспекты изучения питания человека. М., 1980, т. 1, с. 147—148.
4. Карабун П. М. — В кн.: Актуальные проблемы физиологии, биохимии и патологии эндокринной системы. М., 1972, с. 344.
5. Спиричев В. Б., Блажеевич Н. В., Исаева В. А. и др. — Вopr. питания, 1973, № 6, с. 6—11.
6. Томашевский Я. И., Пискорский В. И., Величко А. Я. и др. — В кн.: Актуальные вопросы клинической эндокринологии. Киев, 1984, с. 19—23.
7. Туманов В. Н., Требухина Р. В. — Вopr. мед. химии, 1981, № 6, с. 785—788.
8. Холоденко Б. Н. — Биофизика, 1980, № 2, с. 258—265.
9. Чобитко В. Г. — Казан. мед. журн., 1984, № 5, с. 356—357.
10. Bartlett J. R. — J. biol. Chem., 1959, vol. 234, p. 466—471.
11. Bergmeyer H. U. Methods of Enzymatic Analysis. Weinheim, 1965, s. 573—581.

Поступила 03.04.85

## INTERRELATIONSHIP BETWEEN IMPAIRMENTS IN THIAMIN METABOLISM AND ENERGY METABOLISM IN ERYTHROCYTES OF PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS AND APPROACH TO THE CORRECTION OF THESE IMPAIRMENTS WITH DRUGS

V. G. Chobit'ko, N. B. Zakharova, V. I. Rubin  
Medical School, Saratov

Erythrocytes, obtained from blood of 12 patients with diabetes mellitus and of 6 donors, were incubated in isotonic medium at 37° within 180 min. Patterns of thiamin metabolism (activity of transketolase and TDP-effect), of glycolysis (content of glucose, lactate) and of energy metabolism (АТФ, АДФ, АМР and 2,3-DPG) were studied during the incubation. The ratios of energy-synthesizing and energy-consuming reactions were shifted towards the latter reactions in erythrocytes of the patients, which appears to be among the factors responsible for impairment of thiamin metabolism in diabetes. In order to correct the impairments found some drugs, such as insulin, thiamin, cocarboxylase, thiamin combined with adenine were added into the incubation medium. Insulin and cocarboxylase as well as insulin combined with thiamin and adenine exhibited the best effect on the patterns studied; these drugs normalized the vitamin B<sub>1</sub> metabolism and improved the parameters of energy metabolism within 120 min of incubation in erythrocytes isolated from blood of patients with diabetes mellitus.

## ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ПОВЫШЕНИЕМ АНТИОКИСЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИПИДОВ И АКТИВНОСТЬЮ СВЕРТЫВАЮЩЕЙ СИСТЕМЫ КРОВИ

Межфакультетская проблемная НИЛ молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского МГУ им. М. В. Ломоносова. Институт химической физики АН СССР, Москва

Липиды играют важную роль в процессе свертывания крови, начиная с момента повреждения эндотелиальных клеток и тромбоцитов. Некоторые авторы полагают, что нарушение целостности клеточных мембран является главным условием инициирования свертывания крови.

Установлено, что состав фосфолипидов клеточных мембран способен регулировать процессы свертывания крови. Важным является и степень ненасыщенности жирных кислот, входящих в структуру фосфолипидов и способность липидов к окислению.

Синтетические антиоксиданты являются универсальными модификаторами состава и структуры клеточных мембран. Можно было ожидать, что введение синтетического антиоксиданта может повлиять на процесс свертывания крови за счет изменения как антиокислительной активности липидов (АОА) и процесса перекисного окисления, так и относительного содержания фосфолипидов, ненасыщенных жирных кислот.

Поэтому нам представляется важным установить связи между изменениями в показателях свертывания крови и АОА липидов, величина которой определяется составом и физико-химическими свойствами липидов клеточных мембран.

### Методика

В опытах были использованы мыши линии Balb и беспородные.

Для определения общего времени свертывания 0,3 мл крови, взятой из яремной вены, переносили в пробирку, которую помещали в водяную баню при 37 °С. Определяли время с момента взятия крови до момента образования сгустка [6].

Концентрацию фибриногена и фибринолитическую активность устанавливали, как описано в работе [1].

Для определения АОА липиды из органов (печень, почки, селезенка) животных извлекали, как описано в работе [5]. Моделью для определения АОА липидов служило термиче-

ское окисление метилового эфира олеиновой кислоты кислородом воздуха в присутствии липидов при температуре 36 °С.

Для характеристики АОА липидных вытяжек использовали величину  $(\tau - \tau_0)/P$ , где  $\tau_0$  и  $\tau$  — периоды индукции (в часах) окисления метилолсате чистого и с липидной вытяжкой соответственно,  $P$  — концентрация липидов в метилолсате (в граммах на 1 мл). За величину периода индукции принимали время окисления метилолсате до накопления перекисей в количестве 0,02 ммоль/г.

В качестве биологических моделей, в которых процессы проходят на повышенном уровне АОА, были использованы следующие: 1) введение животным синтетического антиоксиданта; 2) развитие асцитного рака Эрлиха; 3) восстановление печени после частичной гепатэктомии.

Частичную гепатэктомию проводили стандартным методом Хиггинса — Андерсона у мышей линии Balb. В качестве контроля были использованы ложнооперированные животные.

Асцитный рак Эрлиха переносили беспородным мышам массой 20—22 г на 7-й день развития асцита в количестве  $6-7 \cdot 10^6$  клеток внутривенно.

Препарат из класса ингибиторов свободнорадикальных процессов — дибунол (инол; 4-метил-2,6-дитретбутилфенол) в растворе (3 %) твина-80 вводили однократно в дозах 30 мг/кг.

### Результаты

*Изменение АОА липидов при введении дибунола, в процессе развития рака Эрлиха и при восстановлении печени после частичной гепатэктомии.* Данные об АОА липидов печени при вве-

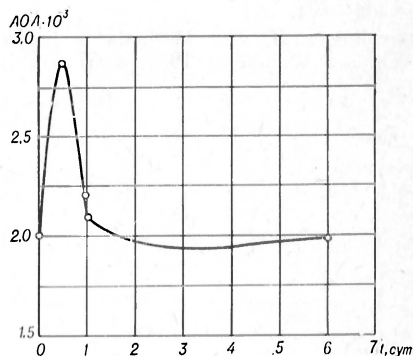


Рис. 1. Изменение АОА липидов печени после введения дибунола (30 мг/кг).

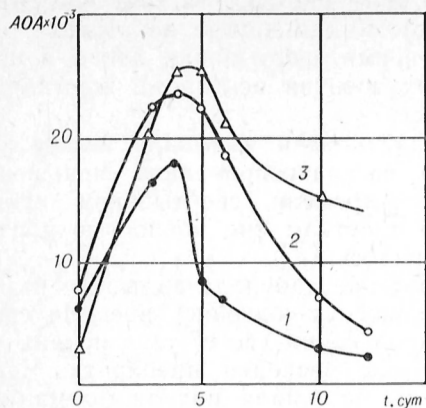


Рис. 2. Изменение АОА липидов печени (1), почек (2) и селезенки (3) мышей при развитии асцитного рака Эрлиха.

дении антиоксиданта представлены на рис. 1. При введении животным 60 мг/кг дибунола АОА резко повышается в 1-е сутки, а затем возвращается к исходному уровню.

На рис. 2 приведены кривые изменения АОА липидов печени, почек и селезенки мышей при развитии асцитного рака Эрлиха. Для всех изученных органов эта величина и достигала максимальных значений на 4—5-е сутки развития асцита.

Величины АОА липидов печени, почек, селезенки после частичной гепатэктомии (рис. 3) достигали максимальных значений на 4-е сутки после операции.

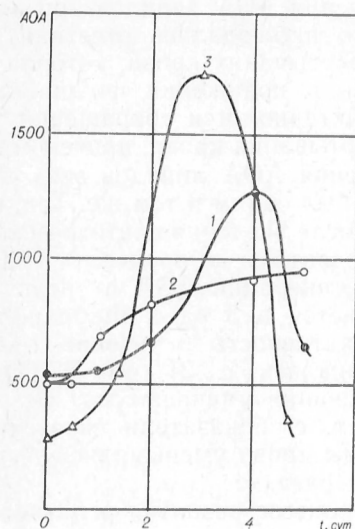


Рис. 3. Изменение АОА липидов печени (1), почек (2) и селезенки (3) в процессе восстановления печени после частичной гепатэктомии.

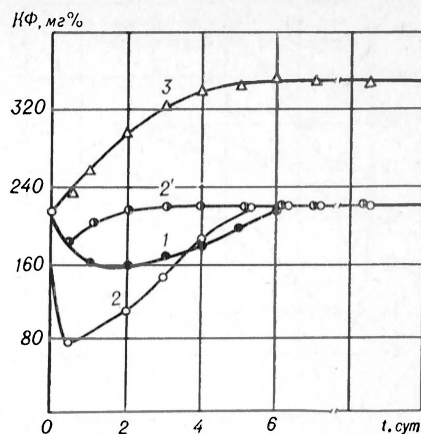


Рис. 4. Изменение содержания фибриногена в крови мышей после введения дибунола (1), после частичной гепатэктомии (2), (2' — ложная операция), в процессе развития асцитного рака Эрлиха (3).

*Изменение концентрации фибриногена в процессе развития асцитного рака Эрлиха, при восстановлении печени после частичной гепатэктомии и после введения дибунола.* Введение дибунола вызывает снижение содержания фибриногена в крови животных (от 220 мг% в контроле до 160 мг%) (рис. 4).

При восстановлении печени после частичной гепатэктомии также наблюдалось снижение в крови уровня фибриногена, которое достигало к 12 ч после операции 73 мг%; затем этот показатель постепенно восстанавливался до нормальных величин (см. рис. 4). У ложнооперированных животных происходило незначительное и кратковре-

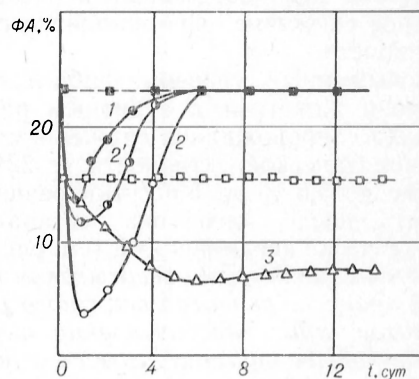


Рис. 5. Изменение фибринолитической активности крови у мышей после введения дибунола (1), частичной гепатэктомии (2, 2' — ложная операция) в процессе развития асцитного рака Эрлиха (3).

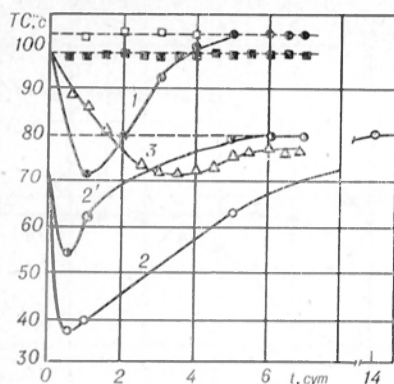


Рис. 6. Изменение общего времени свертывания крови после введения дибунула (1), частичной гепатэктомии (2, 2'), в процессе развития асцитного рака Эрлиха (3).

менное снижение содержания фибриногена в крови.

В процессе развития асцитного рака Эрлиха концентрация фибриногена в крови увеличивалась от 22 мг% в норме до 355 мг% к 5-м суткам развития асцита, причем этот уровень сохранялся до терминальной стадии (см. рис. 4).

*Изменение фибринолитической активности в процессе развития асцитного рака Эрлиха, при восстановлении печени после частичной гепатэктомии и после введения дибунула.* При введении дибунула и в процессе восстановления печени после частичной гепатэктомии наблюдали резкое снижение фибринолитической активности (рис. 5), но ее уровень довольно быстро нормализовался (у оперированных — к 14-му дню, а при введении антиоксиданта — уже на 5-е сутки). Ложная операция вызывала кратковременное и незначительное снижение фибринолитической активности.

Повышенный уровень фибриногена в крови животных с асцитным раком Эрлиха сопровождался снижением фибринолитической активности (с 22% в норме до 5,6% на 5-е сутки развития асцита, после чего она оставалась практически неизмененной (см. рис. 5).

*Изменение времени свертывания крови в процессе развития асцитного рака Эрлиха, при восстановлении печени после частичной гепатэктомии и после введения дибунула.* При всех изученных процессах наблюдали сокращение общего времени свертывания крови (рис. 6). На 5-е сутки развития асцита оно уменьшалось в 3 раза и состав-

ляло примерно 33 с (в контроле 101—103 с). Как и другие показатели, общее время свертывания крови в процессе развития асцита не нормализовалось.

Гепатэктомия вызывала резкое (до 38 с), по кратковременное уменьшение общего времени свертывания крови. К 14-м суткам оно полностью нормализовалось.

Введение дибунула вызывало незначительное уменьшение времени свертывания крови (до 67 с) в первые часы после введения препарата. Через 5 дней наступала полная нормализация этого показателя.

## Обсуждение результатов

Ранее было показано, что изменения АОА липидов в органах животных происходят однотипно с изменениями в липидах крови как при развитии различных патологий, так и при введении животному синтетического антиоксиданта. Поэтому отмеченный нами характер колебания АОА липидов в печени, почках и селезенке мышей при различных воздействиях отражает характер изменения АОА липидов крови, и полученные корреляции между показателями свертывающей системы крови и АОА липидов изученных органов мы можем отнести к изменениям АОА липидов крови.

Обнаружено, что во всех случаях повышения АОА липидов органов животного наблюдалась ответная реакция свертывания крови, которая выражалась в понижении фибринолитической активности и сокращении времени свертывания крови, причем масштаб изменения АОА липидов этих показателей был одним и тем же. Так, например, после введения синтетического антиоксиданта и в процессе репаративной регенерации АОА в среднем увеличивается в 3 раза. Фибринолитическая активность в течение 1-х суток уменьшалась с 21 до 7,7%, время свертывания уменьшалось со 101 до 38 с, т. е. показатели свертывающей системы крови уменьшались в среднем в 2,8 раза.

В процессе развития асцитного рака Эрлиха масштаб изменения липидов, фибринолитической активности и времени свертывания крови был также одинаковым.



Однако концентрация фибриногена в крови изменялась не идентично в трех изученных случаях. Концентрация фибриногена уменьшалась после операции и при введении животным антиоксиданта. В процессе развития асцитного рака Эрлиха содержание фибриногена монотонно увеличивалось. Это дает основание думать, что такое расхождение направленности изменения концентрации фибриногена и фибринолитической активности и общего времени свертывания крови является отражением патологических изменений при развитии асцитного рака Эрлиха.

Существуют различия и в изменении этих показателей во времени. Так, время достижения максимальных значений АОА и минимальных параметров свертывающей системы крови различно. При введении дибунола оно практически совпадает, при репаративной регенерации печени АОА липидов достигает максимальных значений позднее, чем обнаруживается минимум фибринолитической активности и общего времени свертывания. При развитии асцитного рака Эрлиха АОА достигает максимума несколько раньше, чем отмечается минимум показателей свертывающей системы крови.

Рассматривая изменения в свертывающей системе крови при изучаемых воздействиях, следует отметить, что после введения антиоксиданта и в процессе восстановления печени после частичной гепатэктомии показатели свертывающей системы крови нормализуются; в противоположность этому при развитии асцитного рака Эрлиха параметры свертывающей системы крови не имеют стадии нормализации.

Каков механизм взаимосвязи АОА и показателей свертывающей системы крови?

В настоящее время показано, что состояние липидной компоненты мембран, концентрация липопротеидов в крови, состав фосфолипидов, их насыщенность оказывают серьезное влияние на факторы свертывающей системы крови.

Показано, что фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин, извлеченные из тромбоцитов, способны стимулировать свертывание крови. Фосфатидилсерин наиболее активен в тестах, характеризующих свертывание крови. К свойствам, которые наиболее очевидно отражаются на гемокоагуляционной

активности, относится размер суспендированных частиц, заряд их поверхности, состав жирных кислот. Наряду со способностью ускорять свертывание крови, фосфолипиды в зависимости от их концентрации могут выполнять роль ингибиторов свертывания крови [3, 4]. Антикоагулирующее действие фосфолипидов зависит от их жирнокислотного состава и среды, в которой изучается ингибирующее влияние фосфолипидов на процесс свертывания крови.

Так, обнаружено, что некоторые фосфолипиды способны тормозить реакцию тромбин — фибриноген. Фосфатидилсерин и смесь фосфолипидов, содержащая фосфатидилсерин, тормозят тромбинолиз, взаимодействуя с субстратом (протромбином) и угнетают реакцию тромбин — фибриноген по типу сопряженного торможения [4].

Из литературы известно, что введение антиоксидантов приводит к изменению состава фосфолипидов, отношения фосфолипиды/холестерин, межбелковых взаимоотношений, вязкости липидов мембран. Такого рода закономерности обнаруживаются и при других процессах, воздействующих на уровень АОА. Существуют общие закономерные связи между этими показателями, которые однако нарушаются в случае патологических процессов, в частности при злокачественном росте [2].

Обнаруженные нами общие закономерности в изменении АОА (при введении антиоксиданта и после частичной гепатэктомии) и показателей свертывания крови и определенные нарушения этих связей в процессе злокачественного роста позволяют нам придавать большое значение изменению скорости окислительных реакций в липидах в процессах свертывания крови. Однако мы предполагаем, что ведущую роль играет изменение не уровня АОА, а состава липидов, происходящее при окислительных реакциях. Эта точка зрения подтверждается экспериментальными данными о различиях времени достижения экстремальных значений АОА и показателей свертывающей системы крови. Можно ожидать также, что введение антиоксидантов в системе *in vitro* будет оказывать иное действие, поскольку антиоксиданты в этих условиях не влияют на состав липидов, а изменяют общий уровень АОА.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Андреев Г. В. — Лаб. дело, 1962, № 5, с. 3—6.
2. Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте / Бурлакова Е. Б., Алесенко А. В., Молочкина Е. М. и др. М., 1975.
3. Бышевский А. Ш., Мухачева И. А. — Биохимия, 1976, т. 41, с. 543—547.
4. Терсенов О. А., Чабанов М. К. — Вopr. мед. химии, 1981, № 5, с. 619—623.
5. Bligh E. V., Dyer W. J. — Canad. J. Biochem. Physiol., 1959, vol. 37, p. 911—915.
6. Lee R. J., White P. D. — Amer. J. med. Sci., 1913, vol. 145, p. 495—503.

Поступила 09.04.85

### CORRELATION BETWEEN AN INCREASE IN THE LIPID ANTIOXIDATIVE ACTIVITY AND THE ACTIVITY OF BLOOD COAGULATION SYSTEM

E. B. Romanenko, A. V. Alesenko, E. B. Burlakova

A. N. Belozersky Interfaculty Problem Research Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry, M. V. Lomonosov State University, Institute of Chemical Physics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Relationship between alterations in the state of lipid antioxidative activity (AOA) and the

patterns of blood coagulation system (content of fibrinogen, the rate of fibrinolytic activity and the period of blood coagulation) were studied after administration of a synthetic antioxidant ionol into animals and after partial hepatectomy and with Ehrlich ascites hepatoma. An increase in the lipid AOA in animal tissues correlated with a decrease in fibrinolytic activity and in the blood coagulation period. Concentration of fibrinogen was decreased similarly after hepatectomy and after the antioxidant administration. In the course of development of Ehrlich ascites hepatoma concentration of fibrinogen was increased. Interrelationship found between the alterations in lipid AOA and the patterns of blood coagulation as well as distinct impairment of these relations during malignant growth confirmed high importance of alterations in the rate of oxidative reactions for the processes of blood coagulation.

УДК 616.5-001.4-003.9-008.93:577.1113]-074

С. А. Силаева, Б. Я. Хацернова, Г. Н. Берченко, А. Я. Николаев,  
А. Б. Шехтер

### ДИНАМИКА СИНТЕЗА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В ГРАНУЛЯЦИОННОЙ ТКАНИ КОЖНЫХ РАН КРЫС

Кафедра биохимии и лаборатория экспериментальной патоморфологии ЦНИЛ I ММИ  
им. И. М. Сеченова

Клетки большинства дифференцированных тканей зрелого организма имеют весьма ограниченную способность к размножению. Одно из исключений составляет соединительная ткань, которая на протяжении всей жизни организма сохраняет способность отвечать на самые разные патогенные стимулы активной пролиферацией. Проявлением репаративной функции соединительной ткани является образование грануляционно-фиброзной ткани, представляющей собой универсальную реакцию организма на повреждение [12].

Наиболее изученной моделью новообразования соединительной ткани является процесс заживления ран, которому посвящено большое число экспериментальных и клинических исследований. Однако до настоящего времени вопрос о механизмах заживления остается весьма актуальным и требует многопланового подхода с комплекс-

ным использованием биохимических и морфологических методов.

В данной работе сделана попытка с помощью биохимических методов охарактеризовать динамику синтеза нуклеиновых кислот в грануляционной ткани, образующейся у крыс после нанесения им полнослойных кожных ран и сопоставить полученные результаты с морфометрическими показателями этой ткани.

### Методика

Работа была проведена на белых крысах-самцах массой 150—180 г. В экспериментах использовали грануляционную ткань, которую получали в результате нанесения полнослойной кожной вырезанной раны в области спины. Для предотвращения высыхания, контракции и эпителизации раневой поверхности, в раны вводили тефлоновые кольца диаметром 2,0 см как описано в литературе [9], что позволяло получать грануляционную ткань в чистом виде.

Через разные сроки после нанесения раны (со 2-х по 11-е сутки) животных декапитиро-

вали. За 1,5 ч до декапитации животным вводили внутривенно  $^3\text{H}$ -тимидин из расчета 100 мкмоль на 100 г массы животного и  $^{14}\text{C}$ -оротат из расчета 50 мкмоль на 100 г массы животного. С площади, ограниченной кольцом, собирали грануляционную ткань, которую помещали в охлажденный 0,9 % NaCl. Все последующие операции проводили при температуре 0–4 °C. Ткань измельчали, гомогенизировали в 19 объемах среды, содержащей 0,25 М сахарозу, 0,03 М трис-HCl pH 8,0, 0,25 М KCl, 0,05 М Mg  $(\text{CH}_3\text{COO})_2$  в гомогенизаторе с тefлоновым пестиком. Ядра и митохондрии, выделенные с помощью методов описанных ранее [6, 11], использовали для определения содержания ДНК, РНК и включения в них меченых предшественников.

Фракции микросом и цитоплазматических белков получали из постмитохондриальной жидкости центрифугированием при 105 000 g. Белки цитоплазматической фракции добавляли в инкубационные пробы для определения активности тимидинкиназы и нуклеозидфосфотрансферазы [8], а также использовали эту фракцию для количественного определения РНК и включения в нее  $^{14}\text{C}$ -оротата. Содержание белка во всех фракциях определяли по Лоури и соавт. [16].

Количественное определение ДНК и РНК проводили по модифицированному методу [10].

Интенсивность синтеза ДНК устанавливали по включению  $^3\text{H}$ -тимидина в кислотонерастворимую фракцию в пересчете на 1 мг ДНК. Интенсивность синтеза РНК оценивали аналогично по включению  $^{14}\text{C}$ -оротата. Оценку радиоактивности и количественное содержание нуклеиновых кислот проводили в одних и тех же пробах.

Одновременно со 2-х по 9-е сутки после операции ежедневно грануляционную ткань подвергали морфометрическому исследованию. На гистологических препаратах, окрашенных гематоксилином, эозином, микрофуксином по ван Гизону и толуидиновым синим, проводили подсчет клеточной плотности (содержание клеток на единицу площади) и вычисляли процентное содержание клеток разного типа: фибробластов, макрофагов, нейтрофилов, эндотелия капилляров. Для морфометрического исследования использовали морфометрическую сетку С. Б. Стефанова. Цифровые данные обрабатывали методом статистики с оценкой достоверности результатов по критерию Стьюдента [1].

### Результаты и обсуждение

Как видно из рис. 1, кривая содержания суммарной ДНК (сДНК) грануляционной ткани на разных сроках заживления раны (в пересчете на 1 г сырой массы ткани) имеет два максимума, приходящиеся на 3-и и 6–7-е сутки. Поскольку этот показатель отражает общее содержание клеточных элементов в ткани, целесообразно сопоставить его с результатами морфометрического исследования клеточной плотности, т. е. средним числом всех клеток на условную единицу площади (ячейку морфометрической сетки).

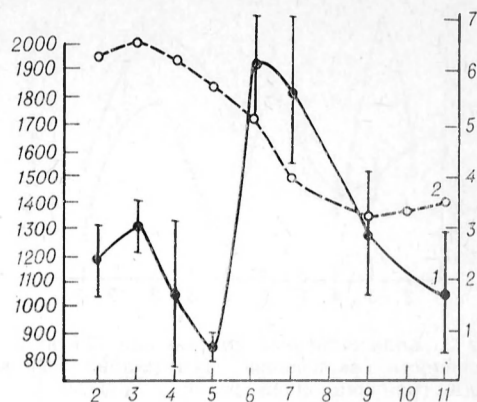


Рис. 1. Количественное содержание (1) и интенсивность включения  $^3\text{H}$ -тимидина (2) в сДНК грануляционной ткани в процессе заживления ран.

Здесь и на рис. 2–5 по оси абсцисс — сутки после нанесения раны. Здесь и на рис. 3 по оси ординат: слева — содержание ДНК (в мг на 1 г ткани), справа — интенсивность включения  $^3\text{H}$ -тимидина (в имп на 1 мг ДНК в 1 мин).

Как видно из рис. 2, клеточная плотность ткани растет непрерывно со 2-х по 7-е сутки, а затем, как и кривая содержания ДНК, снижается. Это объясняется тем, что при созревании грануляционной ткани увеличивается синтез клетками компонентов межклеточного матрикса (коллагена, протеогликанов, гликопротеинов), вследствие чего снижается относительное содержание клеток и соответственно удель-

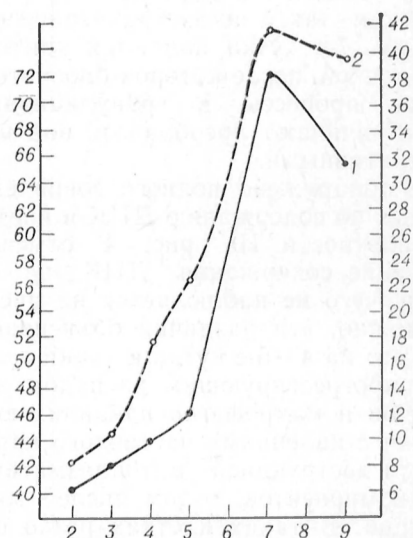


Рис. 2. Общая клеточная плотность (1) и плотность фибробластов (2) в грануляционной ткани в процессе заживления ран.

По оси ординат: слева — общее число клеток на 1 ед. площади; справа — число фибробластов на 1 ед. площади.

Таблица 1

Оценка вклада метки яДНК во включение  $^3\text{H}$ -тимидина (Т) в сДНК в разные сроки после нанесения раны

Сутки после нанесения раны	Число опытов	яДНК/сДНК · 100
2-е	9	17
3-и	4	26
4-е	6	15
5-е	4	19
6-е	4	14
7-е	6	34
9-е	3	41
10-е	3	37
11-е	3	22

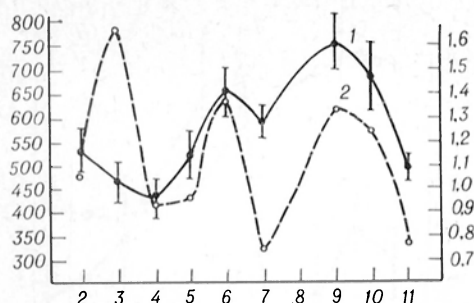


Рис. 3. Количественное содержание (1) и интенсивность включения  $^3\text{H}$ -тимидина (2) в яДНК грануляционной ткани в процессе заживления ран.

ный вес клеточного материала, в том числе ДНК.

Основной вклад в изменение содержания ДНК вносят фибробласты, которые являются наиболее быстрорастущей клеточной популяцией. Этот вывод следует из морфометрических исследований, по данным которых плотность фибробластов стремительно нарастает со 2-х по 7-е сутки и незначительно снижается к 9-м суткам. В это время процентное отношение фибробластов ко всем клеткам растет непрерывно со 2-х (12%) до 9-х (65%) суток без тенденции к снижению, что объясняется более выраженным уменьшением числа других клеток, особенно лейкоцитов, по сравнению с фибробластами. Таким образом, как по биохимическим, так и по морфометрическим данным, 7-е сутки являются критической точкой, после которой биосинтетические процессы в грануляционной ткани начинают преобладать над пролиферативными.

Не обнаружено полного совпадения данных по содержанию ДНК и клеточной плотности. На рис. 1 отмечено снижение содержания ДНК на 5-е сутки, чего не наблюдается на рис. 2. Возможно, эти различия объясняются тем, что на 4—5-е сутки в ткани в связи с прогрессирующим распадом лейкоцитов и макрофагов накапливаются клетки с явлениями частичного карิโอлиза и деструкцией цитоплазматических компонентов, в том числе митохондрий. В таких клетках резко снижается содержание ядерной и митохондриальной ДНК (МТ). Следует отметить, что кривая клеточной плотности с 5-х по 7-е сутки поднимается значительно более круто, чем со 2-х по

5-е сутки. Это связано с тем, что в ранний период заживления идут два противоположно направленных процесса: рост фибробластов и распад клеток воспалительного экссудата.

Результаты определения динамики включения  $^3\text{H}$ -тимидина в сДНК гомогенатов в расчете на 1 мг ДНК не соответствуют данным о росте числа клеток и увеличении содержания ДНК в ткани (см. рис. 1). Кривая временной зависимости интенсивности включения  $^3\text{H}$ -тимидина в ДНК имела максимум в области 2—3-х суток и затем плавно снижалась к 7—9-м суткам. Чтобы выяснить, насколько эта кривая отражает характер включения метки в ядерную ДНК (яДНК), мы выделили из грануляционной ткани ядра и определили зависимость изменения содержания яДНК и интенсивности включения в нее  $^3\text{H}$ -тимидина от времени. Как видно из рис. 3, кривая зависимости включения  $^3\text{H}$ -тимидина в яДНК от сроков заживления представляет ломаную линию с тремя максимумами, приходящимися на 3, 6 и 9-е сутки. Эти результаты согласуются с морфометрическими и радиоавтографическими данными о 3-х суточной периодичности в увеличении синтеза яДНК и митотического индекса в грануляционной ткани лабораторных животных [2]. Они указывают на синхронизацию определенной части фибробластов в осуществлении процессов репликации и делении клеток.

При сопоставлении интенсивности включения метки в сДНК и яДНК обращает на себя внимание тот факт, что включение  $^3\text{H}$ -тимидина в яДНК даже в области максимумов значительно ниже, чем в ДНК гомогенатов. Посколь-



Таблица 2

Количественное содержание и интенсивность включения  $^3\text{H}$ -тимидина в яДНК и мтДНК грануляционной ткани, выделенной в разные сроки после нанесения раны

Сутки после нанесения раны	Включение $^3\text{H}$ -тимидина		Количество яДНК		Включение $^3\text{H}$ -тимидина		Количество мтДНК		Коэффициент мечения, имп мтДНК / имп яДНК	Количество мтДНК от сДНК, %
	число опытов	имп/мин на 1 мг	число опытов	мг на 1 г ткани	число опытов	имп на 1 мг ДНК в 1 мин	число опытов	мг на 1 г ткани		
2	11	1054	13	533	4	8 794	5	68	8,3	5,8
3	6	1668	9	466	4	12 247	3	73	7,3	5,6
4	6	932	7	429	3	10 043	3	78	10,8	7,6
5	9	955	7	520	4	7 839	3	67	8,2	8,0
6	7	1342	8	660	3	11 016	3	65	15,5	3,4
7	9	743	12	567	3	7 383	3	67	5,5	3,6

ку интенсивность включения метки в препараты ДНК оценивали по количеству  $^3\text{H}$ -тимидина (в импульсах в 1 мин), включенного 1 мг ДНК, то, зная эти величины для сДНК и яДНК, можно оценить, какой процент метки сДНК обеспечивается за счет яДНК. Как видно из табл. 1, на 2—5-е сутки после нанесения раны за счет яДНК обеспечивается 15—25% метки сДНК. В более поздние сроки заживления, вклад ядерного материала возрастает к 9-м суткам до 41% и затем на 11-е сутки падает до 22%.

Поскольку включение  $^3\text{H}$ -тимидина в сДНК помимо яДНК учитывает интенсивность мечения мтДНК, было сделано предположение, что в грануляционной ткани идет активный синтез мтДНК, который обуславливает характерный для гомогената ход кривой включения метки. Такое предположение кажется тем более оправданным, что на 2-е и 4-е сутки в новообразованной ткани фибробласты составляют соответственно 12 и 44,5% от общего числа клеток и представлены главным образом юными формами, которые содержат больше митохондрий, чем зрелые клетки [5]. Значительную часть клеточной популяции в этот период составляют нейтрофильные лейкоциты и макрофаги, для которых также характерно высокое содержание митохондрий, обеспечивающих энергией фагоцитарные и синтетические процессы в этих клетках. Высокая функциональная активность всех клеточных элементов грануляционной ткани требует хорошего энергоснабжения и, возможно, активного митохондриогенеза.

Для проверки этого предположения было определено содержание мтДНК

и оценена интенсивность включения  $^3\text{H}$ -тимидина в мтДНК фракции митохондрий из грануляционной ткани на 2—7-е сутки заживления раны. Как видно из табл. 2, включение  $^3\text{H}$ -тимидина в мтДНК в 8—15 раз более интенсивно, чем в яДНК, при этом процентное содержание мтДНК от сДНК клетки максимально на 4—5-е сутки (7,5—8,0%), а затем с увеличением количества яДНК постепенно снижается к 7-м суткам заживления приблизительно вдвое. При этом следует иметь в виду, что значения процентного содержания мтДНК значительно занижены и носят ориентировочный характер, так как в опытах не удается учесть потери, обусловленные довольно жесткими условиями гомогенизации ткани (10 тракций), способной разрушить часть митохондрий, процедурой выделения и очистки этих органелл. Однако они подтверждают предположение о том, что характер кривой мечения  $^3\text{H}$ -тимидином сДНК обусловлен активным митохондриогенезом в клетках, существующих в раневой ткани на ранних сроках заживления с последующим снижением интенсивности этого процесса.

Известно, что показателем интенсивности репликативных процессов в тканях является активность тимидинкиназы [8]. Тимидинкиназа — фермент обеспечивающий синтез ДНК с участием тимидиловых нуклеотидов за счет реутилизации эндогенного тимидина и характерный только для пролиферирующей ткани [13—15]. В настоящей работе определяли активность тимидинкиназы и нуклеозидфосфотрансферазы, которая, как было показано ранее [7], наряду с тимидинкина-

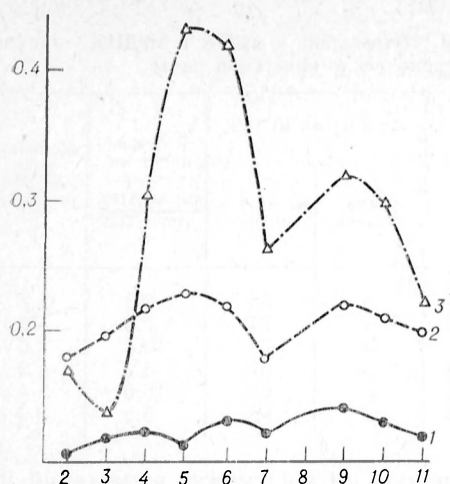


Рис. 4. Активность тимидинкиназы и нуклеозидфосфотрансферазы в сыворотке крови и грануляционной ткани в процессе заживления ран.

По оси ординат — удельная активность ферментов. 1 — нуклеозидфосфотрансфераза ткани, 2 — тимидинкиназа ткани, 3 — тимидинкиназа сыворотки ( $E_{0.01} - E_K$ ).

зой может участвовать в обеспечении синтеза ДНК с использованием тимидиловых нуклеотидов по запасному пути.

Из рис. 4 видно, что для грануляционной ткани отмечали возрастание активности тимидинкиназы к 3—4-м суткам с сохранением ее на почти постоянном уровне вплоть до 9-х суток. В сыворотке крови для этого фермента наблюдали 2 пика активности, приходящиеся на 5-е и 9-е сутки. Активность нуклеозидфосфотрансферазы была значительно ниже, чем тимидинкиназы, хотя и в этом случае изменение активности фермента в ткани имело волнообразный характер, что совпадало по времени с максимумами синтеза ДНК в ядрах.

Следует отметить, что возрастание активности тимидинкиназы в сыворотке крови и грануляционной ткани в области максимумов синтеза яДНК по величине соизмеримо с увеличением активности этого фермента в гепатоцитах печени через 24 ч после операции частичной гепатэктомии. Это позволяет предположить, что интенсивность репликативных процессов в указанных тканях приблизительно одинакова.

Показано [3, 9, 17], что временные параметры синтеза коллагена и других клеточных белков коррелируют с количественными изменениями РНК.

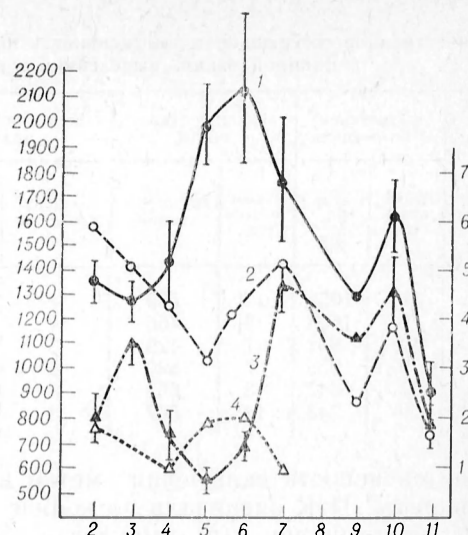


Рис. 5. Количественное содержание и интенсивность включения  $^{14}C$ -оротата в сРНК и яРНК грануляционной ткани в процессе заживления ран.

По оси ординат: слева — содержание РНК (в мг на 1 г ткани), справа — интенсивность включения  $^{14}C$ -оротата (в имп на 1 мг РНК в 1 мин). 1 — содержание сРНК; 2 — включение  $^{14}C$ -оротата в сРНК; 3 — содержание яРНК; 4 — включение  $^{14}C$ -оротата в яРНК.

Для того чтобы судить о белоксинтезирующей активности исследуемой ткани, оценивали синтез РНК на основании определения количественного содержания и интенсивности включения  $^{14}C$ -оротата в кислотонерастворимую РНК-содержащую фракцию ядер и гомогената грануляционной ткани. Как видно из рис. 5 на кривых временной зависимости изменения содержания в расчете на 1 г ткани суммарной и ядерной РНК (сРНК и яРНК), обнаруживали пики, сдвинутые во времени относительно друг друга на несколько суток. Характер этих кривых в 1-ю неделю созревания грануляционной ткани свидетельствует о том, что при максимальном накоплении сРНК содержание яРНК становится минимальным, по-видимому, за счет выхода из ядер в цитоплазму клеток. Первый пик сРНК наблюдали на 5—6-е сутки, а второй — на 10-е сутки. По данным наших гистохимических и ультраструктурных исследований, в эти периоды наблюдается усиление биосинтетических процессов в фибробластах [12]. Можно думать, что первый пик обусловлен образованием новых РНК для биосинтеза белковых компонентов протеогликанов, коллагена и гликопротеинов, активно накапливающихся в тка-

ни в этот период. Второй пик отвечает периоду наиболее активной продукции коллагеновой мРНК, что согласуется с данными В. И. Мазурова [4]. При морфологическом исследовании в этот период обнаруживается наибольшее накопление коллагеновых волокон в грануляционной ткани.

Таким образом, по нашим данным, в процессе формирования грануляционной ткани в полнослойных вырезанных ранах крыс, согласно результатам морфометрических исследований, идет непрерывный рост содержания клеточных элементов на единицу площади со 2-х по 7-е сутки в основном за счет фибробластов. Затем этот показатель снижается. Увеличение числа клеточных элементов частично происходит в результате деления фибробластов. Динамика изменения интенсивности включения  $^3\text{H}$ -тимидина в яДНК имеет волнообразный характер. Интервалы между волнами синтеза яДНК, а следовательно и деление клеток составляет приблизительно 3 сут. С 3-х по 9-е сутки отмечается повышение активности тимидинкиназы в грануляционной ткани и сыворотке крови.

Изменение содержания сДНК гомогенатов ткани в наибольшей степени соответствует общей клеточной плотности и содержанию фибробластов. Кривая включения  $^3\text{H}$ -тимидина в сДНК не отражает характера синтеза яДНК, поскольку включение метки в мтДНК (особенно в ранний период) в 8—15 раз более интенсивно, чем в яДНК. Интенсивность включения  $^3\text{H}$ -тимидина в мтДНК предполагает активный митохондриогенез в клетках грануляционной ткани на ранних сроках заживления.

Динамика изменения содержания сРНК и яРНК обнаруживает два пика, сдвинутых по времени относительно друг друга, что свидетельствует о волнообразном усилении биосинтетических процессов в клетках.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гладилин К. Л., Рачинский С. Э. — Успехи биол. химии, 1979, т. 20, с. 229—256.
2. Дудникова Г. Н. — Бюл. экспер. биол., 1979, № 8, с. 204—207.
3. Ильина Т. М. Комплексное исследование

грануляционной ткани кожных ран без лечения и при стимуляции коллагеновыми препаратами. Автореф. дис. канд. биол. наук. М., 1982.

4. Мазуров В. И. Биохимия коллагеновых белков. М., 1974.
5. Серов В. В., Шехтер А. Б. Соединительная ткань. М., 1981.
6. Силаева С. А., Данилова Н. И., Дебов С. С. — Биохимия, 1977, т. 42, № 11, с. 1973—1977.
7. Силаева С. А., Исаева Л. В., Николаев А. Я. — Там же, № 9, с. 1668—1673.
8. Силаева С. А., Хацернова Б. Я., Шереметьевская Т. Н. — Вopr. мед. химии, 1983, № 2, с. 57—60.
9. Слуцкий Л. И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани. Л., 1969.
10. Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича. М., 1977, с. 313—316.
11. Шереметьевская Т. Н., Силаева С. А. и др. — Вopr. мед. химии, 1974, № 4, с. 430—435.
12. Шехтер А. Б., Берченко Г. Н., Николаев А. В. — Арх. пат., 1984, № 2, с. 20—29.
13. Bello L. G. — Exp. cell. Res., 1974, vol. 89, p. 263—274.
14. Bernard B., Preston B. et al. — Biol. Neonate, 1977, vol. 31, p. 225—228.
15. Kohn D., Stadler J. et al. — Gastroenterology, 1980, vol. 79, p. 907—911.
16. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. — J. biol. Chem., 1951, vol. 193, p. 265—275.
17. Parker M. J., Judge K., Gerers W. — Nucl. Acids. Res., 1982, vol. 10, p. 5879—5891.

Поступила 18.01.85

#### DYNAMICS OF NUCLEIC ACID SYNTHESIS IN GRANULATION TISSUE OF RAT SKIN WOUNDS

S. A. Silaeva, B. Ya. Khatsernova, G. N. Berchenko, A. Ya. Nikolaev, A. B. Shekhter

Chair of Biochemistry, Laboratory of Experimental Pathomorphology, Central Research Laboratory, I. M. Sechenov I Medical School, Moscow

Dynamics of nucleic acid synthesis was studied in granulation tissue, harvested within 2-11 days after an injury of rats with full-layer skin wounds, simultaneously with evaluation of the morphometric patterns of the tissue. Synthesis of nuclear DNA exhibited a wave-shaped dynamics. The intervals between the maximal values of the DNA synthesis constituted 3 days. Within the early steps of wound healing the intensive incorporation of  $^3\text{H}$ -thymidine into mitochondrial DNA was found, which appears to occur due to active mitchondriogenesis. In dynamics of total and nuclear RNA contents two peaks were observed, which did not coincide in time, thus suggesting the wave-shaped increase in biosynthetic processes in cells.

С. М. Струкова, Б. А. Умарова, М. Кулибали

## НАРУШЕНИЕ ГЕПАРИНОМ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТРОМБИНА С ФИБРИНОГЕНОМ И РЕЦЕПТОРАМИ ПРОТИВОСВЕРТЫВАЮЩЕЙ СИСТЕМЫ

Кафедра физиологии человека и животных МГУ

К настоящему времени установлено, что тромбин — полифункциональный фермент, который взаимодействует со многими белками и клетками крови и стенок сосудов, регулируя процессы, направленные как на ускорение свертывания крови, так и на торможение этого процесса, сохранение жидкого состояния крови [2, 9]. Так, тромбин, связываясь со специфическими рецепторами клеток, индуцирует агрегацию тромбоцитов, синтез ими тромбоксана  $A_2$  и в то же время стимулирует освобождение из эндотелия простагличина и активацию белка С, вызывающего локальное освобождение тканевого активатора плазминогена [9]. Особый интерес представляет связывание тромбина со специфическими рецепторами сосудистого русла, обеспечивающее возбуждение нейрогуморальной противосвертывающей системы [2].

В основе регуляторного действия тромбина лежит высокое сродство к рецепторам клеток (превышающее на 2—4 порядка сродство к субстратам), создаваемое с помощью особого участка молекулы вне собственно активного центра — дополнительного центра узнавания высокомолекулярных соединений [2, 4, 9].

Нарушение этого центра в молекуле  $\alpha$ -тромбина при его превращении в  $\beta/\gamma$ -форму лишает фермент не только свертывающей активности, но и способности взаимодействовать с рецепторами стенок сосудов и «запускать» триггерный механизм противосвертывающей системы [13]. Ответственность центра узнавания за возбуждение функции противосвертывающей системы доказана опытами по внутривенному введению и перфузии каротидного синуса кроликов ДИФ- $\alpha$ -тромбином [13], активный центр которого блокирован диизопропилфторфосфатом (ДИФФ). Исходя из данных об определяющей роли центра узнавания во взаимодействии с высокоаф-

финными участками рецепторов клеток, можно полагать, что блокада этого центра приведет к нарушению триггерного механизма противосвертывающей системы. Ранее установлено, что гепарин связывается с тромбином вне активного центра [10], полностью или частично блокирует центр узнавания фермента [6] и нарушает высокоаффинное связывание с тромбоцитами [15].

В настоящей работе анализировали состояние эффекторного звена противосвертывающей системы подопытных животных после внутривенного введения комплексов  $\alpha$ -тромбин — гепарин и ДИФ- $\alpha$ -тромбин — гепарин.

### Методика

В работе использовали  $\alpha$ -тромбин активностью 1500—2000 NIH ед. на 1 мг белка, полученный очисткой коммерческого препарата по методу [7]. ДИФ- $\alpha$ -тромбин получали блокадой  $\alpha$ -тромбина ДИФФ в конечной концентрации 1 мкМ в фосфатном буфере, pH 7,5 в течение 1 ч при 20 °С. Следовая свертывающая активность ДИФ- $\alpha$ -тромбина не превышала 0,01 NIH ед. на 1 мл препарата. Определяли стехиометрию связывания гепарина  $\alpha$ -тромбином титрованием фермента лигандом, регистрируя падение свертывающей активности тромбина до образования комплекса (молярное соотношение  $\alpha$ -тромбин — гепарин — 1:1) и проводя гельфильтрацию на сефакириле S-200 [11]. При взаимодействии ДИФ- $\alpha$ -тромбина с гепарином (гельфильтрацией на сефакириле S=200) также показано образование эквимольного комплекса. Содержание гепарина в комплексе определяли методом [14], содержание белка — спектрофотометрически.

Опыты *in vivo* проводили на самцах белых крыс массой 180—200 г. Препараты в объеме 1 мл вводили в V. jugularis и через 5 мин после инъекции брали кровь для анализов. В работе использовано 205 животных. Определяли тромбиновое время плазмы, неферментативный фибринолиз, суммарную фибринолитическую активность [1], ферментативную фибринолитическую активность [8] и концентрацию в плазме крови растворимого фибрина [12]. Включение рефлекторной дуги противосвертывающей системы осуществляли внутривенным введением подопытным животным 0,06 мл 2,5 % раствора аминазина за 15 мин до инъекции препарата  $\alpha$ -тромбина.



## Результаты и обсуждение

Ранее было установлено [5], что полноценный эффекторный ответ противосвертывающей системы на внутривенно введенный  $\alpha$ -тромбин в концентрации 1 мкМ, характеризуется усиленной секрецией тучными клетками гепарина, который может оказывать ингибирующее действие на начальную стадию реакции тромбина с фибриногеном [3]. Для подтверждения способности гепарина нарушать взаимодействие тромбина с фибриногеном проведена следующая серия экспериментов.

Подопытным животным с выключенной с помощью аминазина рефлексорной дугой противосвертывающей системы вводили  $\alpha$ -тромбин (8 NIH ед. на 1 мл препарата) и регистрировали в крови высокий уровень растворимого фибрина ( $68,8 \pm 5,8$  мкг/мл в контроле и  $313,1 \pm 33,6$  мкг/мл в опыте;  $n=9$ ;  $P<0,001$ ).

Повышение в крови уровня растворимого фибрина свидетельствует о начальной стадии протеолитического расщепления фибриногена тромбином, полимеризации фибрин-мономеров (при сохранении фибриногенетида В) с молекулами фибриногена и служит показателем тромбинемии [3].

Другой группе животных перед инъекцией  $\alpha$ -тромбина вводили малые дозы гепарина. Предварительное введение 2 ед. гепарина существенно снижает в крови концентрацию рас-

творимого фибрина (до  $187,2 \pm 19,9$  мкг/мл;  $n=11$ ;  $P<0,001$ ). Эти данные свидетельствуют о защитном эффекте гепарина, предотвращающего взаимодействие тромбина с фибриногеном, и подтверждают обнаруженное ранее [3] ингибиторное действие гуморальных агентов противосвертывающей системы (гепарина) на начальную стадию реакции тромбина с фибриногеном.

Специфичность взаимодействия тромбина с фибриногеном обусловлена как структурными особенностями субстрата, так и существованием в молекуле фермента центра узнавания высокомолекулярных соединений, комплементарного соответствующему участку в фибриногене [4, 9]. Центр узнавания может частично блокироваться гепарином [10], причем сродство связывания тромбина с гепарином на 2 порядка выше, чем с фибриногеном [2]. По-видимому, гепарин может конкурировать с фибриногеном за центр узнавания в молекуле тромбина.

Возникает вопрос, может ли гепарин, блокируя центр узнавания тромбина, препятствовать взаимодействию фермента со специфическими рецепторами стенки сосуда?

Для выяснения этого вопроса во второй серии экспериментов подопытным животным внутривенно вводили  $\alpha$ -тромбин в комплексе с гепарином и определяли показатели, характеризующие состояние противосвертывающей системы. Внутривенное введение

Т а б л и ц а 1

Изменение показателей состояния противосвертывающей системы после внутривенного введения крысам комплекса  $\alpha$ -тромбин — гепарин (0,7 мкМ) или  $\alpha$ -тромбина (1,4 мкМ)

Показатель	Вводимый препарат		
	0,85 % раствор NaCl	$\alpha$ -тромбин — гепарин	$\alpha$ -тромбин
Тромбиновое время, с	$17,7 \pm 0,4$ (10)	$17,4 \pm 0,7$ (10) $P>0,5$	$23,8 \pm 0,6$ (10) $P<0,001$
Суммарная фибринолитическая активность, мм <sup>2</sup>	$41,3 \pm 0,6$ (12)	$43,1 \pm 0,8$ (12) $P>0,5$	$51,9 \pm 1,4$ (12) $P<0,001$
Неферментативный фибринолиз, мм <sup>2</sup>	$32,3 \pm 0,5$ (12)	$33,9 \pm 0,7$ (12) $P>0,5$	$42,4 \pm 1,0$ (12) $P<0,001$
Ферментативная фибринолитическая активность, мм <sup>2</sup>	$57,2 \pm 1,3$ (10)	$58,0 \pm 3,2$ (10) $P>0,5$	$85,1 \pm 1,3$ (10) $P<0,001$

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2—4 в скобках — число животных.

Т а б л и ц а 2

Изменение показателей состояния противосвертывающей системы после внутривенного введения гепарина (0,8 мкМ)

Показатель	Вводимый препарат	
	0,85 % раствор NaCl	гепарин
Тромбиновое время, с	30,6±0,3 (10)	69,7±4,1 (10) $P<0,001$
Суммарная фибринолитическая активность, мм <sup>2</sup>	39,0±1,3 (10)	42,6±1,2 (10) $P<0,1$
Неферментативный фибринолиз, мм <sup>2</sup>	30,6±1,0 (10)	36,0±1,4 (10) $P<0,01$
Ферментативная фибринолитическая активность, мм <sup>2</sup>	59,3±4,05 (10)	69,4±3,9 (10) $P>0,1$

$\alpha$ -тромбина в концентрации 1,4 мкМ вызывало полноценный эффекторный ответ противосвертывающей системы, выражающийся в достоверном увеличении (по сравнению с контролем) тромбинового времени, неферментативного фибринолиза, суммарной фибринолитической активности и ферментативной фибринолитической активности (табл. 1). При внутривенном введении фермента в комплексе с гепарином исследуемые параметры состояния противосвертывающей системы не отличались от таковых после введения физиологического раствора. Введение гепарина (табл. 2) в концентрации, эквивалентной его содержанию в комплексе с  $\alpha$ -тромбином, вызывало достоверное увеличение у подопытных животных тромбинового времени и неферментативного фибринолиза, отражающих активность образующихся комплексных соединений гепарина с белками крови.

Известно, что тромбин в комплексе с гепарином сохраняет 40 % свертывающей активности [6]. Чтобы исключить эффекты  $\alpha$ -тромбина, обусловленные его действием как протеолитического фермента и возможностью его взаимодействия с антитромбином III, реагирующим по активному центру, в последующих экспериментах использовали ДИФ- $\alpha$ -тромбин, в котором каталитический участок активного центра блокирован ДФ. Такая модификация фермента лишает

его свертывающей активности, способности взаимодействовать с антитромбином III и другими белками, но сохраняет реактивность к специфическим рецепторам сосудистой стенки [13].

В отдельной серии опытов определяли состояние противосвертывающей системы после внутривенного введения различных доз ДИФ- $\alpha$ -тромбина (от 0,1 до 0,7 нмоль/мл). Отмечен зависимый от дозы эффект действия ДИФ- $\alpha$ -тромбина на показатели, характеризующие состояние противосвертывающей системы (табл. 3). Так, уже при введении 0,1 нмоль ДИФ- $\alpha$ -тромбина на 5-й минуте эксперимента достоверно повышалась ферментативная фибринолитическая активность и неферментативный фибринолиз. В определенном пределе концентраций (от 0,1 до 0,5 мкМ) наблюдали усиление ответа противосвертывающей системы, обусловленное повышением концентрации центра узнавания. Можно полагать, что блокада центра узнавания гепарином или другим лигандом будет препятствовать связыванию ДИФ- $\alpha$ -тромбина с рецепторами тромбина, что не может не отразиться на реакции противосвертывающей системы. Для проверки этого предположения определяли показатели состояния противосвертывающей системы после внутривенного введения ДИФ- $\alpha$ -тромбина в комплексе с гепарином (табл. 4). В этом случае параметры, характеризующие состояние противосвертывающей системы (неферментативный фибринолиз, суммарная фибринолитическая активность, ферментативная фибринолитическая активность и тромбиновое время) не отличались от параметров, исследованных после введения физиологического раствора, тогда как введение одного ДИФ- $\alpha$ -тромбина (в концентрации 0,25 мкМ) приводило к достоверному эффекторному ответу противосвертывающей системы (см. табл. 4).

Можно полагать, что гепарин, секретируемый в кровотоке из тканевых депо при возбуждении противосвертывающей системы или введенный извне, создает мощный антикоагулянтный и фибринолитический фон, вступающий в комплексные соединения с белками крови, в том числе с тромбином. Блокируя в молекуле тромбина центр

Дозозависимый эффект действия ДИФ- $\alpha$ -тромбина на показатели состояния противосвертывающей системы

Показатель	0,85 % раствор NaCl	Количество введенного ДИФ- $\alpha$ -тромбина, нмоль/мл			
		0,1	0,3	0,5	0,7
Тромбиновое время, с	30,0 $\pm$ 0,3 (10)	32,0 $\pm$ 0,6 (11) $P < 0,02$	34,2 $\pm$ 0,6 (10) $P < 0,001$	—	40,5 $\pm$ 1,6 (10) $P < 0,001$
Суммарная фибринолитическая активность, мм <sup>2</sup>	42,1 $\pm$ 0,8 (10)	44,5 $\pm$ 1,1 (12) $P > 0,5$	48,0 $\pm$ 1,9 (11) $P < 0,01$	52,8 $\pm$ 1,3 (15) $P < 0,001$	51,8 $\pm$ 0,9 (12) $P < 0,01$
Неферментативный фибринолиз, мм <sup>2</sup>	33,1 $\pm$ 0,4 (10)	36,0 $\pm$ 1,0 (12) $P < 0,02$	39,0 $\pm$ 1,2 (11) $P < 0,001$	43,1 $\pm$ 0,7 (15) $P < 0,001$	43,8 $\pm$ 0,8 (12) $P < 0,001$
Ферментативная фибринолитическая активность, мм <sup>2</sup>	44,7 $\pm$ 0,9 (10)	54,0 $\pm$ 1,9 (11) $P < 0,001$	54,7 $\pm$ 1,8 (10) $P < 0,001$	65,1 $\pm$ 5,4 (11) $P < 0,001$	63,7 $\pm$ 2,3 (11) $P < 0,001$
Активность активатора плазминогена, мм <sup>2</sup>	38,0 $\pm$ 1,2 (10)	42,6 $\pm$ 1,7 (11) $P < 0,05$	42,6 $\pm$ 2,5 (10) $P < 0,1$	—	50,5 $\pm$ 2,5 (10) $P < 0,001$
Активность плазмينا, мм <sup>2</sup>	7,8 $\pm$ 0,5 (10)	10,0 $\pm$ 0,9 (11) $P < 0,05$	12,0 $\pm$ 0,6 (10) $P < 0,001$	—	13,8 $\pm$ 0,6 (11) $P < 0,001$

Т а б л и ц а 4

Изменение показателей состояния противосвертывающей системы после внутривенного введения крысам комплекса ДИФ- $\alpha$ -тромбин — гепарин (0,25 мкМ) или ДИФ- $\alpha$ -тромбина (0,25 мкМ)

Показатель	Вводимый препарат		
	0,85 % раствор NaCl	ДИФ- $\alpha$ -тромбин — гепарин	ДИФ- $\alpha$ -тромбин
Тромбиновое время, с	31,4 $\pm$ 0,8 (10)	32,7 $\pm$ 0,4 (13) $P > 0,1$	39,8 $\pm$ 1,0 (11) $P < 0,001$
Суммарная фибринолитическая активность, мм <sup>2</sup>	43,0 $\pm$ 0,7 (10)	41,9 $\pm$ 0,7 (15) $P > 0,5$	46,1 $\pm$ 1,0 (11) $P < 0,02$
Неферментативный фибринолиз, мм <sup>2</sup>	32,8 $\pm$ 0,6 (10)	33,1 $\pm$ 0,5 (15) $P > 0,5$	39,3 $\pm$ 0,7 (11) $P < 0,001$
Ферментативная фибринолитическая активность, мм <sup>2</sup>	44,1 $\pm$ 1,0 (10)	44,9 $\pm$ 1,3 (10) $P > 0,5$	51,5 $\pm$ 2,3 (10) $P < 0,01$

узнавания высокомолекулярных соединений, гепарин препятствует дальнейшему взаимодействию тромбина с рецепторами противосвертывающей системы, а также нарушает полноценное связывание с фибриногеном и другими специфическими субстратами и рецепторами клеток, во взаимодействии тромбина с которыми участвует центр узнавания.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А. — Лаб. дело, 1971, № 6, с. 326.
2. Кудряшов Б. А., Струкова С. М. — Успехи совр. биол., 1984, т. 97, № 2, с. 193.
3. Кудряшов Б. А., Струкова Б. А., Умарова Б. А. — Кардиология, 1981, № 5, с. 21.
4. Серейская А. А., Кибирев В. К., Серебряный С. Б. — В кн.: Биохимия животных и человека. Киев, 1981, вып. 5, с. 3.
5. Струков А. И., Струкова С. М., Хлебникова Т. Г. и др. — Бюл. экспер. биол., 1982, № 6, с. 116.
6. Струкова С. М., Семенова О. А., Киреева Е. Г. — Биохимия, 1980, № 4, с. 738.
7. Струкова С. М., Умарова Б. А., Киреева Е. Г. и др. — Там же, 1978, № 4, с. 708.
8. Astrup T., Mullertz S. — Arch. Biochem., 1952, vol. 40, p. 346.
9. Fenton J. W. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1981, vol. 370, p. 468.
10. Le E. H., Orton C., Feinman R. D. — Biochemistry (Wagh.), 1974, vol. 13, p. 5012.
11. Radoff S., Danishefsky I. — Thrombos. Res., 1981, vol. 22, p. 353.
12. Stachurska J., Srpilman H., Latallo L. et al. — Reumatologia, 1972, vol. 10, p. 303.

13. *Strukova S. M., Umarova B. A., Milroshina T. N.* et al. — *Thrombos. ' Res.*, 1982, vol. 26, p. 2593.
14. *Warren R., Wysocki A.* — *Surgery*, 1958, vol. 44, p. 435.
15. *White G. G., Lundblad R., Griffith M.* — *J. biol. Chem.*, 1981, vol. 256, p. 1763.

Поступила 04.06.85

#### IMPAIRMENT BY HEPARIN OF THE INTERACTION OF THROMBIN WITH FIBRINOGEN AND RECEPTORS OF THE ANTICOAGULATION SYSTEM

*S. M. Strukova, B. A. Umarova, M. Kulibali*

Chair of Human and Animal Physiology,  
M. V. Lomonosov State University, Moscow

Administration of heparin (2 un) into rats with depression of the anticoagulation system before treatment of the animals with  $\alpha$ -trom-

bin (8 NIH un) inhibited the enzyme interaction with blood fibrinogen, which was manifested as a distinct decrease in content of soluble fibrin in blood as compared with its concentration evaluated after the treatment with thrombin. Heparin inhibited the reaction of thrombin with specific receptors in vascular walls. The effector response of the anticoagulation system, which is specific for interaction of free  $\alpha$ -thrombin with the cell wall receptors, was not observed if thrombin was administered intravenously together with heparin. The patterns of the anticoagulation system were not altered after administration of the equimolar complex of DIP (diisopropyl phosphoril)- $\alpha$ -thrombin and heparin, although free DIP- $\alpha$ -thrombin activated distinctly the anticoagulation system. The data obtained suggest that heparin, which inhibits partially the recognition site in thrombin molecule, impaired also the enzyme ability to bind to the specific receptors of vascular walls and therefore it impaired the distinct response of the anticoagulation system.

## МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 616.379-008.64-07:616.153.962.4-097-02:616.379-008.6:577.175.722

*А. А. Галыбин, Г. А. Ермолин, Л. В. Курманова*

### ТВЕРДОФАЗНЫЙ ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ИНСУЛИНУ

Институт экспериментальной кардиологии ВКНЦ АМН СССР, Лаборатория иммунохимии, Москва

Идиопатический сахарный диабет определяется как расстройство метаболизма, связанное с недостаточностью инсулина, характеризующееся при полном клиническом развитии нарастающей гипергликемией и заболеванием сосудов атеросклеротического и микроангиопатического характера [10].

В развитии идиопатического диабета I типа, или инсулинзависимого диабета (ИЗД), важную роль играют ауто- и антитела к экзогенному либо эндогенному инсулину [14], из которых первые являются компонентом механизма регуляции экспрессии гормона [9], последние — результатом иммунного ответа организма больного на инсулинотерапию [7, 20].

Необходимость количественной оценки антител к инсулину появилась в связи с установлением достаточно

четкой корреляции между тяжестью клинического течения и прогнозом заболевания, с одной стороны, и длительностью специфической терапии, инсулинрезистентностью, аллергическими и местными липоатрофическими явлениями, с другой [11, 12, 23, 24].

Выявлению и анализу таких антител посвящено значительное число работ, являющихся в основном вариантами радиоиммунного анализа и направленных на преодоление многочисленных трудностей, связанных с разделением циркулирующего инсулина и антител к нему в исследуемых образцах [6, 9, 13, 18].

Задачей настоящего исследования является разработка твердофазного иммуноферментного метода (ТИФМ) количественного определения антител к инсулину.



Рис. 1. Типичный профиль элюции аутоантител к инсулину с BrCN-сефарозного сорбента.

По оси абсцисс — число фракций, по оси ординат — оптическая плотность.

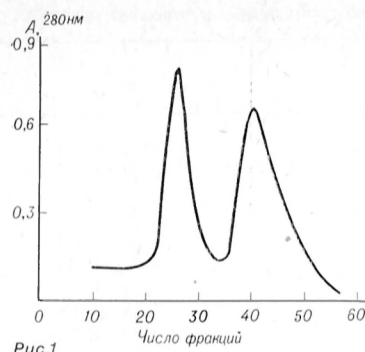


Рис. 1

Рис. 2. Типичная калибровочная кривая разработанной тест-системы.

По оси абсцисс — концентрация калибрующих антител; здесь и на рис. 3—5 по оси ординат — экстинкция.

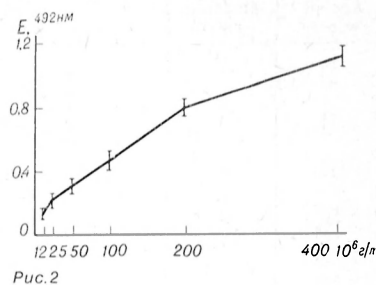


Рис. 2

## Методика

Отработку параметров тест-системы проводили на коллекции сывороток детей, больных диабетом, полученной из Городской клинической детской больницы № 1 (Москва), а также на случайной выборке сывороток доноров, полученной из Центральной станции переливания крови (Москва) и сыворотках пациентов с верифицированным отсутствием сахарного диабета, представленных лабораторией клинической биохимии Института клинической кардиологии ВКНЦ.

Для количественного калибрования реакции использовали смесь поликлональных ауто- и антител к инсулину, выделенных из плазмы больного инсулинрезистентным диабетом (предоставлена кафедрой гематологии ЦОЛИУВ, Москва) методом аффинной хроматографии на BrCN-сефарозном имунсорбенте, нагруженном инсулином [5]. Содержание иммуноглобулинов в смеси по их классам определяли с помощью иммуоферментной тест-системы, разработанной в нашей лаборатории [3].

Твердой фазой служили полихлорвиниловые микротитровальные планшеты «Titertek» (Нидерланды). В качестве связывающего агента был использован свиной инсулин «моноклоновой» стадии очистки, полученный из Центральной лаборатории завода эндокринных препаратов (Каунас).

Проявление комплекса связывающий агент — лиганд (инсулин — антитело) осуществляли конъюгатом козьих поликлональных антител к легким цепям ( $\kappa$  и  $\lambda$ ) иммуноглобулинов человека с ферментом — пероксидазой из корня хрена. Пероксидаза RZ-3,0 получена из Научно-производственного объединения «Биохимреактив» (Рига). Конъюгат синтезирован методом периодатного окисления [22].

Субстратная смесь включала в себя 0,01 % раствор ортофенилендиамина и 0,003 % раствор  $H_2O_2$  в 0,05 М цитратном буфере, pH 4,7. Реакцию ингибировали 50 % раствором  $H_2SO_4$ .

Для построения калибровочной кривой в концентрациях от  $400 \cdot 10^{-6}$  до  $12,5 \cdot 10^{-6}$  г/л использовали смесь аффинных человеческих поликлональных ауто- и антител к инсулину. При постановке реакции в стандартном варианте исследуемые сыворотки разводили в соотношениях 1 : 200 и 1 : 400. Рабочее разведение конъюгата составляло 1 : 250. Субстратную смесь готовили ex tempore и вносили в планшеты на 30 мин. Сыворотки, стандарт и конъюгат разводили 0,05 % раствором Tween-20 в 0,01 М фосфатно-солевом буфере, pH 7,2 и инкубировали 1 ч при 37 °C.

Оптимальную концентрацию иммобилизованного на твердой фазе инсулина определяли в пределах от  $1 \cdot 10^{-1}$  до  $1 \cdot 10^{-4}$  г/л (по белку). pH комплексирующего раствора подбирали в значениях от 4 до 10 в 0,01 М цитратном и карбонат-бикарбонатном буферах. Оптимальный температурный режим инкубации и ее продолжительность определяли при 4 и 37 °C в интервале от 1 до 20 ч.

## Результаты

Нами было проведено 7 экспериментов по аффинному выделению ауто- и антител к инсулину из смеси донорских сывороток и плазмы инсулинрезистентного больного диабетом. На рис. 1 показан типичный профиль элюции антител с антигенного сорбента. При пропускании через колонку 0,2 М глицин-HCl-буфера, pH 2,8 со скоростью 25 мл/ч антитела элюируются с сорбента обычно двумя пиками, что свидетельствует о гетерогенности антител по аффинитету и принадлежности к различным классам иммуноглобулинов. В таблице представлены данные количественного распределения иммуноглобулинов по классам в элюатах антител при стандартном объеме элюатов 10 мл. Из калибровочной кривой тест-системы, приведенной на рис. 2, следует, что рабочий участок находится в пределах от  $200 \cdot 10^{-6}$  до  $25 \cdot 10^{-6}$  г/л.

В процессе подбора оптимальной концентрации инсулина, иммобилизуемого на твердой фазе (данные представлены графически на рис. 3), оказалось, что максимальная чувствительность метода достигается при концентрации  $10 \cdot 10^{-3}$  г/л. Увеличение концентрации связывающего агента в растворе от  $20 \cdot 10^{-3}$  до  $100 \cdot 10^{-3}$  г/л не приводило к дальнейшему повышению чувствительности, что свидетельствует о полном насыщении гидрофобных связей на твердой фазе.

Номер эксперимента	Номер фракции элюата	IgG	IgA	IgM
I	1	12,2±1,31	2,5±0,32	—
	2	17,3±1,81	10,2±9,4	4,8±0,6
II	1	45,2±3,9	—	—
	2	22,3±1,91	8,4±0,7	—
III	1	5,3±0,7	0,72±0,06	0,86±0,07
	2	10,3±1,1	0,84±0,08	0,48±0,05
IV	1	3,8±0,5	0,32±0,03	—
	2	0,34±0,02	0,38±0,04	—
V	1	3,9±0,3	0,23±0,02	—
	2	5,6±0,6	0,66±0,08	0,38±0,03
VI	1	4,9±0,4	—	0,51±0,06
	2	8,1±0,9	0,95±0,11	0,42±0,04
VII	1	0,21±0,03	—	—
	2	3,5±0,4	2,1±0,2	0,57±0,07

Примечание. Прочерк — антител не обнаружено.

При определении значения рН комплексирующего буфера найдены 2 пика повышенной чувствительности реакции — при рН 8,5 и 9,5, однако наибольшая адсорбция инсулина на полихлорвинил происходит при рН 9,5 в 0,01 М карбонат-бикарбонатном буферном растворе (рис. 4).

Зависимость адсорбции инсулина на полихлорвиниле от температуры и времени (рис. 5) проявляется в том, что максимум связывания обеспечивается инкубацией не менее 16 ч при 4°C либо в течение 2 ч при 37°C.

Таким образом, оптимальное связывание инсулина с твердой фазой, обеспечивающее максимальную чувствительность метода, происходит при концентрации  $10 \cdot 10^{-3}$  г/л в 0,01 М карбонат-бикарбонатном буфере, рН 9,5 и времени инкубации не менее 16 ч при 4°C, что согласуется с результатами исследований, посвященных нековалентной иммобилизации различных белков на твердой фазе [1, 4, 8, 15].

Для контроля специфичности тест-системы в ней были исследованы аутоантитела к миоглобину человека,

полученные в нашей лаборатории, в концентрациях от  $5 \cdot 10^{-6}$  до  $400 \times 10^{-6}$  г/л. Результаты реакции по оптической плотности не превышали исходных значений конъюгата.

Исследование с помощью ТИФМ с приведенными выше параметрами сывороток доноров и пациентов с верифицированным отсутствием ИЗД позволило определить пределы нормального содержания аутоантител к инсулину —  $35,2 \pm 12,4 \cdot 10^{-3}$  г/л для данного метода. Анализ сывороток больных ИЗД разных степеней тяжести выявил в большинстве случаев увеличение количества суммарных антител и аутоантител по сравнению с нормой (рис. 6). Это коррелирует с данными авторов, исследовавших инсулинсвязывающую способность антител радиоиммунным методом [16, 17, 19, 21].

ТИФМ количественного определения антител к инсулину прост в постановке, объективен в инструментальном учете, доступен для массовых исследований, не нуждается в предварительном извлечении инсулина из образца.

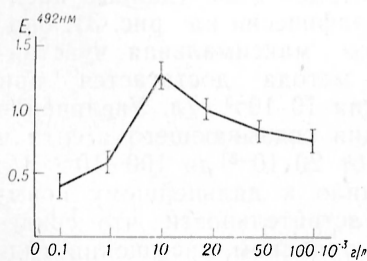


Рис. 3

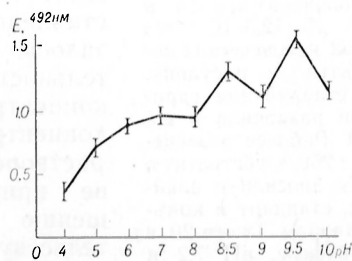


Рис. 4

Рис. 3. Выбор концентрации инсулина, иммобилизуемого на твердой фазе.

По оси абсцисс — концентрация инсулина.

Рис. 4. Подбор pH буферного раствора для иммобилизации инсулина.

Рис. 5. Определение температурного режима и времени инкубации инсулина с твердой фазой.

По оси абсцисс — время. 1, 2 — инкубация при 37 и 4 °С соответственно.

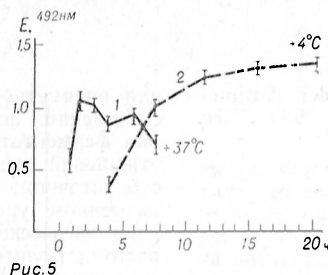
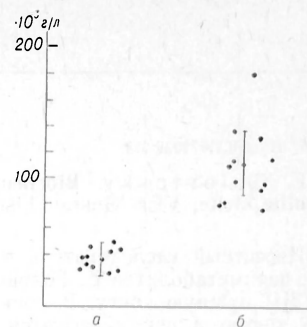


Рис. 6. Результаты анализа сывороток доноров (а) и больных ИЗД (б) различных степеней тяжести.

По оси абсцисс — образцы сывороток, по оси ординат — концентрация ауто- и антител к инсулину.



Разработанный ТИФМ позволяет количественно определять нормальные и патологические уровни антител к инсулину в сыворотке крови человека. Предлагаемый метод может быть использован для диагностики ИЗД, оценки тяжести его течения у больных в клинике, а также при массовых профилактических обследованиях.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Дзантиев Б. Б., Егоров А. М. — Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева, 1982, т. 27, с. 442.
2. Закс А. С., Быкова А. А. — В кн.: Факторы естественного иммунитета при различных физиологических и патологических состояниях. Челябинск, 1978, вып. 5, с. 13.
3. Курманова Л. В., Ермолин Г. А., Эткин А. Ф., Цветков В. С. — Лаб. дело, 1984, № 2, с. 80.
4. Лысенко А. Я., Ермолин Г. А., Цветков В. С. — В кн.: Иммунодиагностика тропических и паразитарных болезней. М., 1980, с. 36.
5. Туркова Я. Аффинная хроматография: Пер. с англ. М., 1980, с. 114.
6. Andersen O. O., Brunfeldt K., Abildgaard F. — Acta endocr. (Kbh.), 1972, vol. 69, p. 195.
7. Andersen O. O. — Ibid., vol. 71, p. 126.
8. Butler G. E. — Meth. Enzymol., 1981, vol. 73, Pt B, p. 482.
9. Dixon K. — Clin. Chem., 1974, vol. 20, p. 1275.
10. Fajans S. S., Cloutier M. C., Crowther R. L. — Diabetes, 1978, vol. 27, p. 1112.
11. Folling I. — Acta endocr. (Kbh.), 1976, Suppl. 205, p. 199.
12. Galloway J. A., Bressler R. — Med. Clin. N. Amer., 1978, vol. 62, p. 663.
13. Gaze S., West N. J., Steward M. W. — J. immunol. Meth., 1973, vol. 3, p. 357.
14. Goldman J., Balwin D., Rubenstein A. H.

et al. — J. clin. Invest., 1979, vol. 63, p. 1050.

15. Herrman G. E. — Meth. Enzymol., 1981, vol. 73, Pt B, p. 239.
16. Kuzuja T., Matsuda A., Saito T., Yoshida S. — Endocr. jap., 1978, vol. 25, p. 597.
17. Mustajja B. E., Daggett P. R., Nabarro J. D. N. — Diabetologia, 1977, vol. 13, p. 311.
18. Nakagawa S., Saito N., Nakayama H. et al. — Ibid., 1978, vol. 14, p. 33.
19. Oakley N. W. — Lancet, 1976, vol. 1, p. 994.
20. Reeves W. G. — Ibid., 1971, vol. 2, p. 490.
21. Reeves W. G., Kelly U. — J. immunol. Meth., 1980, vol. 34, p. 329.
22. Vilson M. B., Nakane P. K. — In: Immunofluorescence and Related Staining Techniques/Eds W. Knapp et al. Amsterdam, 1978, p. 215.
23. Witters L. A., Ohman J. L., Weir G. C. et al. — Amer. J. Med., 1977, vol. 63, p. 703.
24. Wright A. D., Walsh C. H., Fitzgerald M. G., Malins J. M. — Brit. med. J., 1979, vol. 1, p. 25.

Поступила 05.08.85

#### SOLID PHASE IMMUNOENZYMATIC PROCEDURE FOR ESTIMATION OF ANTIBODIES TOWARDS INSULIN

A. A. Galybin, G. A. Ermolin, L. V. Kurmanova  
Institute of Experimental Cardiology, All-Union

Cardiological Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

A test system for quantitative estimation of antibodies towards insulin was developed using the solid phase immunoenzymatic procedure. The test system was calibrated using affinity antibodies towards insulin, obtained after immunosorption of blood plasma of insulin-resistant patient with diabetes. The normal content of autoantibodies, estimated by means of the procedure in human blood serum, constituted  $35.2 \cdot 10^{-3} \pm 12.4 \cdot 10^{-3}$  g/l. In the patients with diabetes increased content of autoantibodies towards insulin was usually determined —  $70 \cdot 10^{-3} - 180 \cdot 10^{-3}$  g/l.

УДК 615.276.2.07(049.32)

E. Golovinsky. *Biochemie der Antimetabolite*. Jena, VEB Gustav Fischer, 1984, 226 c.

Известный исследователь в области изучения антиметаболитов Е. Головинский выпустил в ГДР нужную книгу. В достаточно лаконичной форме в ней излагаются такие вопросы, как поиск моделей новых антиметаболитов, их синтез, биологическое изучение, установление механизма действия, использование в медицине и молекулярной биологии, развитие резистентности к ним и др.

В настоящее время наука об антиметаболитах представляет собой одну из пограничных областей современных химии, физики, молекулярной биологии, биохимии, экспериментальной биологии и медицины, генетики, энзимологии, микробиологии и других отраслей науки. Исследования в области антиметаболитов имеют фундаментальное значение, так как результаты их не только играют прикладную роль в биологии и медицине, но и способствуют изучению механизмов разнообразных процессов жизнедеятельности клетки и могут быть использованы в таких областях науки, как молекулярная биология и генетика.

Книга содержит 7 глав. В главе 1 обсуждаются пути направленного синтеза антиметаболитов и принципы конструирования их структуры. С этих позиций рассмотрены возможности создания антиметаболитов путем замещения атомов водорода, метильных, метиленовых, гидроксильных и карбоксильных групп в молекуле метаболита другими атомами или группировками, модификацией кольца гетероциклов, углеводной и фосфатной частей нуклеозидов и нуклеотидов. При этом обсуждаются проблемы вариации электронной и геометрической структуры и соответствующих изменений химико-биологических свойств получаемых соединений. В частности, обсуждены проблемы взаимодействия антиметаболитов и их аналогов с ферментами, биополимерами и другими биологическими субстратами. В главе 2 рассматриваются методы обнаруже-

ния антиметаболитной активности химических соединений, исследования кинетики торможения ферментативных реакций, конкурентных отношений веществ с близкой структурой на субклеточном, клеточном, органном и организменном уровнях. Обсуждены методы микробиологического исследования потенциальных антиметаболитов, пути и возможности использования клеточных и тканевых культур с этой целью.

Подробно обсуждены биохимические механизмы действия антиметаболитов (глава 3). Специальный раздел отведен летальному синтезу. Серьезное внимание уделено вопросам деструкции и дезактивации антиметаболитов, в частности биохимическим реакциям, обуславливающим потерю активности и распад разных групп антиметаболитов (глава 4).

Интерес представляют и главы, посвященные рассмотрению основных групп известных антиметаболитов и их применению в медицине. Обсуждены вопросы избирательной токсичности, различные аспекты резистентности к антиметаболитным воздействиям, принципы комбинированной химиотерапии. Достаточно подробно изложены современное состояние экспериментальной химиотерапии и методы тестирования противоопухолевой и противовирусной активности потенциальных антиметаболитов. Специально рассмотрены вопросы влияния антиметаболитов на иммунную систему, пути создания и использования ингибиторов, стимуляторов и модуляторов иммунной системы.

Монография Е. Головинского охватывает весь круг проблем, связанных с конструированием, синтезом, изучением и применением антиметаболитов. Эта книга заинтересует работников многих специальностей, исследующих самые разные проблемы жизнедеятельности клетки, способы и средства воздействия на нее. Желательно было бы иметь эту монографию в русском переводе.

Проф. Б. А. Ивин, проф. В. А. Филлов  
(Ленинград)

## ХРОНИКА

### МЕДИЦИНСКАЯ БИОХИМИЯ НА V ВСЕСОЮЗНОМ БИОХИМИЧЕСКОМ СЪЕЗДЕ

27—31 января 1986 г. в Киеве проходил V Всесоюзный биохимический съезд, в работе которого приняла участие 1700 специалистов. На съезде присутствовали гости из Болгарии, ГДР, Польши, Чехословакии и Югославии. Функционировало 25 симпозиумов по различным областям теоретической и прикладной

биохимии, два из них были посвящены истории биохимии и ее преподаванию в вузах страны.

Важное место в работе съезда занял симпозиум «Медицинская биохимия». Его открыл акад. АМН СССР С. С. Дебов. Он подчеркнул значение медицинской биохимии для реше-



ния фундаментальных и практических задач различных отраслей медицины, указал на достижения физико-химической биологии и биотехнологии, благодаря которым открываются новые возможности диагностики и лечения многих заболеваний.

На первом заседании с программным докладом «Клиническая энзимология: проблемы и пути развития» выступил член-корр. АМН СССР Б. Ф. Коровкин (Москва). Были освещены достижения в области двух основных направлений медицинской энзимологии — энзимодиагностики и энзимопатологии; намечены пути дальнейшего развития и широкого внедрения в клинику новых методов определения ферментов и изоферментов. Подчеркнута необходимость создания наборов готовых реактивов и автоматизированных систем, использования экспресс-методов для ежегодной диспансеризации населения страны. 5 других докладов были посвящены обсуждению вопросов, связанных с исследованиями ключевых ферментных систем обмена веществ. Акад. АМН СССР Т. Т. Березов (Москва) представил новые данные о бактериальном ферменте — глутамин (аспарагин)азе, его физико-химических свойствах, субстратной специфичности, отношении к ингибиторам и возможности его испытания как перспективного противоопухолевого препарата. С интересом было выслушано сообщение И. И. Никольской (Москва) «ДНК метилазы прокарнот и эукариот». Установлена существенная роль этих ферментов в процессах эмбриогенеза и развития высших организмов, их связь с ионотическими процессами и инфекционными заболеваниями, участием ферментов в ДНК-белковых взаимодействиях. Изучению свойств, физиологической роли протектолитического фермента карбоксикапепсина, его участию в регуляции кровяного давления был посвящен доклад акад. АМН СССР В. Н. Ореховича, Ю. Е. Елисеевой, Л. В. Павлихиной (Москва). Приведены результаты по выделению ингибитора фермента из сыворотки крови, синовиальной жидкости и лейкоцитов человека. В сообщении В. З. Горкина и соавт. (Москва) представлены данные о существовании множественных форм мембранно-связанных аминопексидаз в тромбоцитах, крови человека, митохондриях головного мозга и плаценты, которые отличаются от известных аминопептидаз А и Б; подчеркнута важность их определения для диагностики заболеваний головного мозга и профессиональных интоксикаций. К. Н. Веремеенко и Л. И. Кизим (Киев) посвятили свое выступление характеристике свойств плазмина, связанного с  $\alpha_2$ -макроглобулином, привели результаты изучения тромболитического действия модифицированного фермента на тромбы, экспериментально вызванные у животных. Большой интерес вызвал доклад акад. АМН СССР И. П. Ашмарина (Москва) «Гипотеза о континууме регуляторных пептидов». В нем обобщены сведения о взаимосвязи отдельных регуляторных пептидов и наличии непрерывных переходов между спектрами их активностей, а также существовании функционального и структурного континуума. В. П. Торчилов (Москва) обобщил мате-

риалы по методам иммобилизации в создании систем направленного транспорта лекарств. Особое внимание было обращено на получение лечебных препаратов путем связывания их с веществами (обычно иммуноглобулинами), способными распознавать очаг поражения и специфически с ним связываться. Показана возможность направленного транспорта модифицированных липосом в зону некроза при экспериментальном инфаркте миокарда и внутрисосудистых повреждениях. В обзорном докладе И. С. Кулаева, А. И. Северина, Г. В. Абрамочкина (Пушкино) суммированы данные о гидролитических ферментах микроорганизмов, которые разрушают клеточные стенки бактерий, грибов и высших организмов. Отмечена перспективность использования литических ферментов бактерий в лечении ряда заболеваний человека и животных.

Два доклада были посвящены актуальным проблемам перекисного окисления и механизма действия антиоксидантов. Привлек внимание доклад Е. Б. Бурлаковой (Москва) «Биохимические механизмы действия антиоксидантов». Подчеркивалось, что в основе влияния этих веществ лежит торможение перекисного окисления липидов вследствие их взаимодействия с перекисными радикалами и специфическими структурами мембраны. Ф. З. Меерсон (Москва) представил экспериментальные данные, свидетельствующие об активации перекисного окисления липидов в сердечной мышце в условиях стресса и ишемии, приводящих к фибрилляции сердца. В. А. Сакс, В. В. Куприянов (Москва) доложили о результатах изучения методом ядерно-магнитного резонанса метаболизма фосфорных соединений при ишемии, а также поиска новых эффективных кардиопротекторов (в частности, препаратов фосфокреатина). А. А. Дельвиг (Москва) сообщил о молекулярных механизмах нарушения синтеза коллагена при геномных мутациях. Снижение уровня этого белка аномальными штаммами связано с усиленным распадом проколлагена в результате нарушения посттрансляционного его созревания. В. А. Юркин (Москва) представил материалы о патогенетических механизмах развития холеры и других острых кишечных инфекций, указал на необходимость сохранения нативной структуры бактериальных энтеротоксинов при их проникновении в клетку. Показаны особенности функционирования аденилатциклазной системы в энтероцитах человека. Т. Г. Панкова и соавт. (Новосибирск) доложили о биохимических механизмах устойчивости малярийного паразита к лекарствам и путях ее преодоления. Установлено, что плазмодий содержит ферментную систему микросомальных монооксигеназ, которые окисляют хлорохин и другие лечебные препараты. Синтезированы эффективные ингибиторы этих ферментов.

На трех заседаниях симпозиума было заслушано 15 докладов, представлено 105 стендовых сообщений. На специальном заседании «за круглым столом» обсуждались вопросы, касающиеся новых методов исследования и перспектив развития медицинской биохимии.

Проф. К. Н. Веремеенко

## СОДЕРЖАНИЕ

- Ивков Н. Н., Капитанов А. Б. Биохимические механизмы действия низкомолекулярных хлорорганических алифатических соединений на организм человека и животных (Обзор)
- Головенко Н. Я., Галкин Б. Н. Биохимические механизмы простагландинсинтетазного соокисления ксенобиотиков (Обзор)
- Григорьянц О. О., Гомазков О. А. Энкефалинобразующие ферменты (Обзор)
- Лохов Р. Е., Цахилив Ю. Б., Таранов А. Г. Чувствительность гипофизарно-овариальной системы животных к негормональному препарату RL-S
- Денисенко В. А., Горбач З. В., Островский Ю. М. О регуляции активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы печени крыс при  $B_1$ -недостаточности
- Алматов К. Т., Мирталипов Д. Т., Касымова Г. М., Абидов А. Измерение фосфолипидного состава и окислительного фосфорилирования в митохондриях печени при гепатите
- Глинка Е. Ю., Беляева Н. Ф., Быковская К. Н., Коган З. С. Некоторые регуляторные свойства фруктозо-1,6-бисфосфатазы печени крысы в норме и при экспериментальной аутоиммунной кардиомиопатии
- Григорович Ю. А., Булгадаева С. А. Сравнительное изучение активности фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов из сердца кролика и сердца быка
- Надилов Н. К., Ленская Е. Г., Сагиндыкова С. Е., Токмурзин Ж. У., Айдарханов Б. Б. Антиоксидантная активность и накопление тканями токоферолов нового природного источника
- Оконенко Л. Б. Прополис как ингибитор свободнорадикального окисления липидов при сальмонеллезе
- Яхнина Д. Н., Агабекова И. И. Влияние  $\alpha$ -токоферола на обмен глутаминовой кислоты и содержание пикотинамидных коферментов в гепатоцитах
- Канунникова Н. П., Ковальчук В. Г. Особенности функционирования систем дофамина и ГАМК в мозге животных с различной продолжительностью этанолового сна
- Андреанова И. П., Зуевский В. В., Рабовский А. Б., Цыбульская М. В., Никитин Ю. С., Хохлова Т. Д. Удаление липопротеидных комплексов холестерина из плазмы крови с использованием силехромов
- Соцкий О. П., Саркисова Г. М., Чухаджян Г. А., Шахбатян Ш. Ш., Паглавян В. Г., Арутунян В. М., Еганян Г. А. Изменения активности  $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазы лейкоцитов крови у больных артериальной гипертензией
- Панин Л. Е., Русских Г. С., Филатова Т. Г. Влияние адреналина, гидрокортизона и ЛПВП сыворотки крови на активность множественных форм глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в печени крыс
- Болданова Н. Б., Мигушина В. Л., Шатинина С. З., Добрынина О. В. Защитное действие фосфатидилхолиновых липосом при экспериментальном токсическом гепатите
- Михайлин В. С., Кондрашин А. А., Березов Т. Т. Исследование особенностей иммубилизации и каталитических свойств оте-

## CONTENTS

- Ivov, N. N., Kapitanov, A. B. Effects of low molecular chlororganic aliphatic compounds on human and animal organisms (a review)
- Golovenko, N. Ya., Galkin, B. N. Biochemical mechanisms of prostaglandin synthetase co-oxidation of xenobiotics (a review)
- Grigoryants, O. O., Gomazkov, O. A. Enkephaline-forming enzymes (a review)
- Lokhov, R. E., Tsakhikov, U. B., Taranov, A. G. Effect of the preparation RL-S on the hypophysis-ovarian system of barren cows
- Denisenko, V. A., Gorbach, Z. V., Ostrovsky, Yu. M. Regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in rat liver tissue in vitamin  $B_1$  deficiency
- Almatov, K. T., Mirtalipov, D. T., Kasymova, G. M., Abidov, A. Phospholipid composition and oxidative phosphorylation in liver mitochondria in hepatitis
- Glinka E. Yu., Belyaeva, N. F., Bykovskaya, K. N., Kogan, Z. S. Some regulatory properties of liver fructose-1,6-bisphosphatase in normal rats and in animals with experimental autoimmune cardiomyopathy
- Grigorovich, Yu. A., Bulgadaeva, S. A. Properties of cyclic nucleotide phosphodiesterases from bovine and rabbit heart tissues
- Nadirov, N. K., Lenskaya, E. G., Sagindykova, S. E., Tokmurzin, Zh. U., Aidarkhanov, B. B. The antioxidant activity and accumulation in tissues of tocopherols obtained from a new natural source
- Okonenko, L. B. Propolis as an inhibitor of lipid free-radical oxidation in salmonellosis
- Yakhnina, D. N., Agabekova, I. I. Effect of  $\alpha$ -tocopherol on metabolism of glutamic acid and content of nicotinamide coenzymes in hepatocytes
- Kanunnikova, N. P., Koval'chuk, V. G. Characteristics of functional activities of the dopamine and GABA systems in brain of animals with different duration of ethanol narcosis
- Andrianova, I. P., Zuevsky, V. V., Rabovsky, A. B., Tsybul'skaya, M. V., Nikitin, Yu. S., Khokhlova, T. D. Elimination of cholesterol lipoprotein complexes from blood plasma using sylochromes
- Solsky, O. P., Sarkisova, G. M., Chukhadzhan, G. A., Shakhbatyan, Sh. Sh., Paglavanyan, V. G., Arutyunyan, V. M., Eganian, G. A. Alterations in activity of N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase in leukocytes of patients with hypertension
- Panin, L. E., Russkikh, G. S., Filatova, T. G. Effect of adrenaline, hydrocortisone and high density lipoproteins from blood serum on activity of multiple glucose-6-phosphate dehydrogenase forms in rat liver tissue
- Boldanova, N. B., Shatinina, S. Z., Migushina, V. L., Dobrynina, O. V. Protective effect of phosphatidyl choline-containing liposomes in experimental toxic hepatitis
- Michailin, V. S., Kondrashin, A. A., Berезov, T. T. Peculiarities of immobilization and catalytic properties of native com-

- чественного коммерческого препарата L-аспарагиназы в липосомах, сформированных из фосфолипидов соевых бобов
- 68 *Косягин Д. В.* Концентрация гликозаминогликанов в неизмененном и дегенеративно измененном суставном хряще людей разного возраста
- 73 *Няньковский С. Л., Тимошко М. Ф.* Влияние витаминов А и Е на некоторые показатели липидного и белкового обмена у детей с перинатальной патологией центральной нервной системы
- 76 *Фролькис В. В., Кольтовер В. К., Горбань Е. П., Парамонова Г. И., Шчербицкая Е. В.* Влияние энтеросорбции на сигналы ЭПР печени крыс разного возраста
- 79 *Тырышкин А. М., Сальник Б. Ю., Долгих Е. В.* Окислительное фосфорилирование, активность НАД·Н-оксидазной и сукцинатоксидазной систем в митохондриях тестикул крыс при аллоксановом диабете
- 82 *Афанасев Ю. И., Поздрин В. И., Бобова Л. П., Волков Ю. Т.* Возможная роль тимуса в механизме адьювантного действия ретиноевой кислоты
- 85 *Гриднева Л. И., Абубакирова А. М., Прошина И. В., Ильина Л. В.* Изменение активности аминоксидаз сыворотки крови человека при некоторых видах анестезии и при гипербарической оксигенации
- 88 *Мирзоян Р. А., Потапов А. А., Писецкая М. В.* β-Эндорфин и кортикотропин в крови у больных в остром периоде тяжелой черепно-мозговой травмы
- 95 *Душкин М. И., Долгов А. В.* Активность ферментов холестеринавого метаболизма и содержание липидов в печени, аорте, надпочечниках и сыворотке крови крысы при воздействии тритона WR 1339
- 98 *Петрунин Д. Д., Татаринов Ю. С., Мурашко В. В., Баранов А. П., Каменец А. В., Олефиренко Г. А.* Сравнительные иммунохимические исследования растворимых антигенов лейкоцитов при атеросклерозе коронарных артерий
- 102 *Гроздова И. Д., Михайловский А. В., Эшба И. Р., Петухов С. П., Васильев В. Ю., Северин Е. С.* Изменение активности протеинкиназ в коже при раке
- 104 *Рыженков В. Е., Панков Ю. А., Чистякова А. М., Кеда Ю. М., Серрано Д. С., Рябцев М. Н., Швачкин Ю. П.* Влияние синтетического тетрадекапептида, соответствующего аминокислотной последовательности 31—44 соматотропина человека, на липиды крови и печени крыс
- 108 *Сахибов А. Д., Соколова С. Ф., Мирсалихова Н. М.* Изучение механизма ингибирования Na, K-АТФазы госсиполом и мегосином
- 111 *Рябинин В. Е., Лифшиц Р. И.* Функциональная активность микросом печени и состояние системы перекисного окисления липидов в период острой ожоговой токсемии
- 115 *Чобитко В. Г., Захарова Н. Б., Рубин В. И.* Взаимосвязь нарушений обмена тиамина и энергетических процессов в эритроцитах больных сахарным диабетом и пути их лекарственной коррекции
- 118 *mercinal l-asparaginase in liposomes formed from soybean phospholipids*
- Kosyagin, D. V.* Concentration of glycosaminoglycans in normal and degenerative joint cartilage from persons of various age
- Nyan'kovsky, S. L., Timochko, M. F.* Effect of vitamins A and E on some patterns of lipid and protein metabolism in children with perinatal pathology of central nervous system
- Frolkis, V. V., Koltover, V. K., Gorban, E. N., Paramonova, G. I., Shcherbitskaya, E. V.* Effect of enterosorption of EPR signals in liver tissue of rats of different age
- Tyryshkin, A. M., Sal'nik, B. Yu., Dolgikh, E. V.* Oxidative phosphorylation, activity of NADH-oxidase and succinate oxidase systems in mitochondria of testes from rats with alloxan diabetes
- Afanasjev, Yu. I., Nozdryn, V. I., Bobova, L. P., Volkov, Yu. T.* Possible role of thymus in adjuvant action of retinoic acid
- Gridneva, L. I., Abubakirova, A. M., Proshina, I. V., Il'ina, L. V.* Alterations of amine oxidases activity in human blood serum under conditions of anesthesia of various types and in hyperbaric oxygenation
- Mirzozan, R. A., Potapov, A. A., Pisetskaya, M. W.* β-Endorphin and corticotropin in blood of patients with critical craniocerebral injury at the acute period
- Dushkin, M. I., Dolgov, A. V.* Activity of enzymes of cholesterol metabolism and lipid composition in liver, aorta, adrenal glands and blood of rats after Triton WR 1339 treatment
- Petrinin, D. D., Tatarinov, Yu. S., Murashko, V. V., Baranov, A. P., Kamenets, A. V., Olefirenko, G. A.* Comparative immunochemical assay of leukocytic soluble antigens in coronary atherosclerosis
- Grozdova, I. D., Mikhailovskiy, A. V., Eshba, I. R., Pelukhov, S. P., Vasil'ev, V. Yu., Severin, E. S.* Alteration in activity of protein kinases in skin under conditions of malignancy
- Ryzhenkov, V. E., Pankov, Yu. A., Chystyakova, A. M., Keda, Yu. M., Serrano, D. S., Ryabtsev, M. N., Shvachkin, Yu. P.* Effect of synthetic tetradecapeptide, involving the 31-44 amino acid sequence of human growth hormone, on lipids in rat blood and liver tissue
- Sakhibov, A. D., Sokolova, S. F., Mirsalikhova, N. M.* Studies on the mechanism of inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase by megosin and gossypol
- Ryabinin, V. E., Lifshits, R. I.* The functional state of liver microsomes and lipid peroxidation at the early period of burns toxemia
- Chobil'ko, V. G., Zakharova, N. B., Rubin, V. I.* Interrelationship between impairments in thiamin metabolism and energy metabolism in erythrocytes of patients with diabetes mellitus and approach to the correction of these impairments with drugs

- Романенко Е. Б., Алесенко А. В., Бурлакова Е. Б. Взаимосвязь между повышением антиокислительной активности липидов и активностью свертывающей системы крови 122
- Силаева С. А., Хацернова Б. Я., Берченко Г. Н., Николаев А. Я., Шехтер А. Б. Динамика синтеза нуклеиновых кислот в грануляционной ткани кожных ран крыс 126
- Струкова С. М., Умарова Б. А., Кулибали М. Нарушение гепарином взаимодействия тромбина с фибриногеном и рецепторами противосвертывающей системы 132

#### Методы биохимических исследований

- Галыбин А. А., Ермолин Г. А., Курманова Л. В. Твердофазный иммуоферментный метод количественного определения антител к инсулину 136

#### Рецензия

#### Хроника

- Romanenko, E. B., Alesenko, A. V., Burlakova, E. B. Correlation between an increase in the lipid antioxidative activity and the activity of blood coagulation system
- Silaeva, S. A., Khatsernova, B. Ya., Berchenko, G. N., Nikolaev, A. Ya., Shekhter, A. B. Dynamics of nucleic acid synthesis in granulation tissue of rat skin wounds
- Strukova, S. M., Umarova, B. A., Kulibali, M. Impairment by heparin of the interaction of thrombin with fibrinogen and receptors of the anticoagulation system

#### Methods of Biochemical Investigations

- Galybin, A. A., Ermolin, G. A., Kurmanova, L. V. Solid-phase immunoenzyme assay of antibodies to insulin

#### Book Reviews

#### Current Events

Техн. редактор Э. А. Шешнёва

Корректор И. М. Шувалова

Сдано в набор 17.03.86. Подписано в печать 17.04.86. Формат 70×108<sup>1/16</sup> Бумага тип. № 1  
Гарнитура литературная Печать высокая Печ. л. 9,00 усл. печ. л. 12,60 усл. кр.-отт. 13,13  
Уч.-изд. л. 15,82 Тираж 1531 Цена 1 р. 30 к. Заказ 776

Издательство Ордена Трудового Красного Знамени  
«Медицина», Москва 101838, Петроверигский пер., 6/8.

Ордена Трудового Красного Знамени  
Чеховский полиграфический комбинат  
ВО «Союзполиграфпром» Государственного комитета СССР  
по делам издательств, полиграфии и книжной торговли  
142300, г. Чехов Московской области