

ТОМ XXXII

ВЫПУСК 5

СЕНТЯБРЬ — ОКТЯБРЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1986

# ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

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

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БАЕВ А. А. (Москва)  
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. Н. (Ленинград)  
ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)

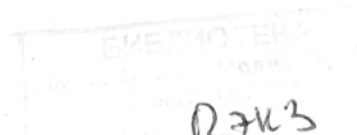
Адрес редакции журнала:

Москва 109801, Солянка, 14

АМН СССР

Тел. 297-16-44

Зав. редакцией Л. А. Фирсова



Н. В. Шинкаренко

# ХИМИЧЕСКАЯ ОСНОВА ПОВЕДЕНИЯ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА В ОРГАНИЗМЕ ЧЕЛОВЕКА (ОБЗОР)

Ленинградский технологический институт им. Ленсовета, Ленинград

Ранее [3] были кратко описаны некоторые болезни, возникающие в результате фотодинамического эффекта, а также принципы фотодинамической терапии. Считается, что основным разрушающим агентом в этих процессах является синглетный кислород ( $^1O_2$ ).

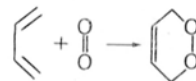
Необходимо отметить, что существуют два принципиальных механизма фотоокисления [2, 15, 22]. Процесс фотоокисления с участием синглетного кислорода принято называть механизмом типа II. Процесс же, в котором сенсибилизатор в возбужденном состоянии взаимодействует непосредственно с субстратом или растворителем с образованием радикалов при отрыве атома водорода или переноса электрона, называют процессом типа I. Последующие реакции этих радикалов с кислородом дают продукты окисления. В сложных системах определение точного механизма бывает весьма затруднительным. Однако установлено, что процесс с участием радикалов более эффективен в неполярных средах, тогда как механизм с участием синглетного кислорода доминирует в полярной среде [26]. Таким образом, при изучении модельных систем различные растворители могут даже смещать механизм фотореакций от типа I к типу II, и наоборот. Продукты фотоокисления типа II изучены более широко, чем типа I.

При фотодинамическом воздействии повреждаются определенные специфические химические мишени, а именно остатки гистидина, триптофана, метионина, тирозина и цистеина в белках, гуаниновые остатки в нуклеиновых кислотах, ненасыщенные жирные кислоты и холестерин в мембранах. Хотя химические продукты многих из этих молекулярных мишеней еще неизвестны, однако некоторые реакции достаточно хорошо изучены [15]. Во многих случаях первичные продукты нестабильны и очень быстро дают вторичные продукты при комнатной температуре [15].

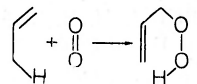
Существует пять классов реакций синглетного кислорода, которые лежат в основе взаимодействия синглетного

кислорода с молекулами биологических мишеней [15, 52]:

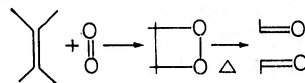
1) реакции диеновых соединений (ароматические соединения, гетероциклы), в которых кислород присоединяется в положениях 1,4 к диеновой системе с образованием циклической эндоперекиси:



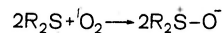
2) окисление олефинов с атомами водорода в аллильном положении до аллильных гидроперекисей, в которых двойная связь смещается по положению:



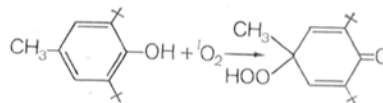
3) присоединение кислорода к богатой электронами двойной связи с образованием диоксетаинов [51]. Многие диоксетаины легко разрушаются до карбонильных фрагментов при температуре ниже комнатной [8, 51]. Часть этих карбонильных соединений образуется в возбужденном состоянии с последующей люминесценцией:



4) окисление сульфидов до сульфоксидов [19]:



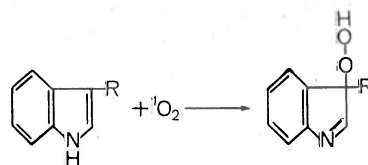
5) реакции замещенных фенолов с образованием гидроксидиенонов [37, 58]:



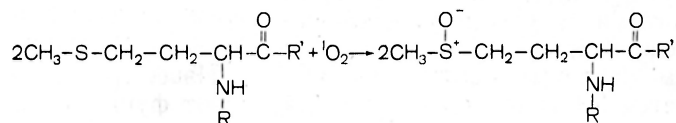


Известные реакции молекул биологических мишеней с синглетным кислородом описаны ниже [15, 52].

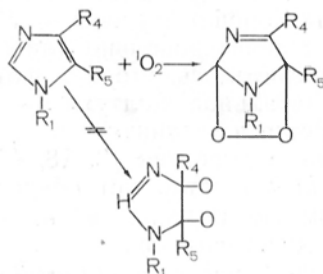
**Гистидин.** В исследовании, проведенном при низких температурах, было показано, что первичными продуктами окисления гистидина и различных родственных имидазолов синглетным кислородом являются эндоперекиси [48]. Эти эндоперекиси очень нестабильны, особенно когда  $R_1 = H$ , и разлагаются даже при температурах



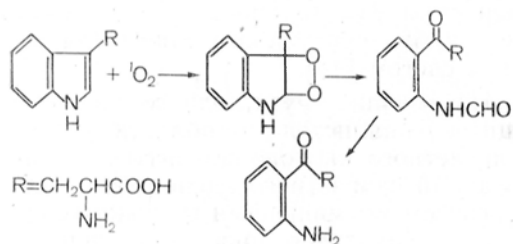
**Метионин.** Дегградация метионина ответственна за потерю активности некоторых важных ферментов. При взаимодействии с синглетным кислородом образуется сульфоксид:



порядка  $-80^\circ\text{C}$ . При нагревании образуется сложная смесь продуктов, состав которой неизвестен:



**Триптофан.** Продукты фотоокисления триптофана чрезвычайно сложны, и ход реакции зависит от многих факторов [60]. В работе [49] было установлено наличие 1,2-диоксетана в качестве промежуточного продукта. Первичным выделяемым продуктом является N-формилкинуруенин, который очень легко превращается в кинуруенин [50]:

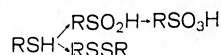


В работе [54] показано, что  ${}^1\text{O}_2$  присоединяется к триптофану с образованием гидроперекиси со смещением связи в соседнее положение:

При детальном изучении реакций метионина [57] было обнаружено, что они зависят от pH. Когда pH достаточно низок, так что аминогруппа протонируется (или ацилируется в случае пептида), идет сравнительно простая реакция, дающая сульфоксид в качестве первичного продукта. Когда аминогруппа находится в свободном состоянии (при высоких pH, когда она не ацилируется), образуется интермедиат «дегидрометионин», который затем испытывает медленный гидролиз, давая сульфоксид метионина в довольно сложном процессе.

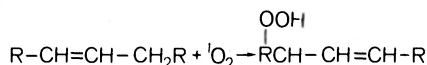
**Тирозин.** Продукты фотоокисления тирозина изучены мало. С синглетным кислородом он взаимодействует недостаточно эффективно [58]. Установлено, что фотоокисление кольца тирозина обычно идет по механизму типа I [2, 15].

**Цистеин.** Реакции фотоокисления цистеина тоже изучены недостаточно. При определенных условиях были выделены сульфиновые и сульфоновые кислоты, в других случаях был выделен дисульфид [2, 15, 25, 52]:

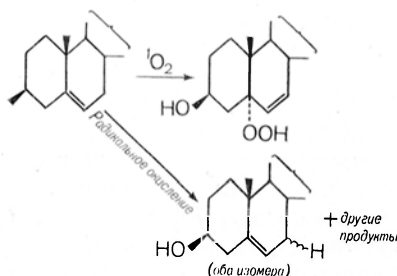


Важной мишенью для фотоокислительного повреждения являются мембраны [2, 13, 15, 52]. Считается, что пероксидация липидов ответственна за потерю стабильности мембраны и ее биологической функции. Ненасыщенные жирные кислоты липидов, реагируя с синглетным кислородом, образу-

ют гидроперекиси, при этом двойная связь обязательно смещается:



Если возможен более чем один продукт, то часто образуется весь набор их. Однако в некоторых случаях эта реакция очень специфична. Например, холестерин признан лучшим маркером синглетного кислорода из-за исключительной специфичности его реакции с последним, основным продуктом которой является 5- $\alpha$ -гидроперекись, тогда как другие перекиси образуются лишь в небольшом количестве. В свободнорадикальном же окислении холестерина образуется сложная смесь, включающая 7 $\alpha$ - и  $\beta$ -гидроперекиси и многие другие продукты, но 5 $\alpha$ -гидроперекись не образуется:

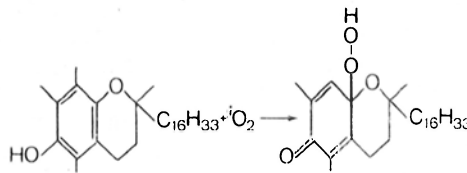


Реакции синглетного кислорода с нуклеиновыми кислотами изучены очень мало [60]. Обычно образуются сложные смеси продуктов, и точный ход реакции неизвестен. Первоначальным продуктом фотоокисления урацила при низких температурах в жидком аммиаке является гидроперекись [59]. При нагревании этот продукт расщепляется. Однако урацил не является существенной мишенью для синглетного кислорода.

Установлено, что ДНК в виде двойной спирали приблизительно в 10 раз более фотолabile, чем соответствующая однонитчатая ДНК [61].

$\alpha$ -Токоферол (витамин  $\epsilon$ ) является важным биологическим антиоксидантом. Он реагирует с синглетным кислородом двумя путями: физически (тушение) и химически с образова-

ем очень нестабильного гидропероксидиенона [12]:



Тушение синглетного кислорода —  $\alpha$ -токоферолом является доминирующим процессом, образование же химического продукта — второстепенным.

Известно, что каротиноиды выполняют функцию защиты от синглетного кислорода в фотосинтезирующих организмах [35].

Чрезвычайно интересным биологическим субстратом является билирубин. Он прекрасный акцептор синглетного кислорода. Продукты их взаимодействия были хорошо изучены *in vitro* [9, 36]. В течение довольно длительного времени считалось, что при фототерапии неонатальной желтухи билирубин разрушается в организме в процессе этого взаимодействия [2, 18, 44]. Однако недавно четко установлено, что механизм фототерапии иной, а именно под действием синего света билирубин превращается в метастабильный геометрический изомер, который гораздо более растворим в воде, чем естественный билирубин, и легко выводится из организма [40, 41]. Таким образом, при фототерапии снижается концентрация билирубина в крови и соответственно снижается вероятность того, что этот пигмент будет диффундировать в мозг, где он проявляет свое токсическое действие. По данным статистики, в 1974 г. около 2,5 % всех детей, рожденных в США, были подвергнуты фототерапии, т. е. длительному облучению ярким синим или белым светом [40].

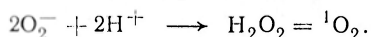
По мнению Фута, одного из ведущих специалистов в области химии синглетного кислорода, исследования реакций синглетного кислорода с биологическими мишенями в сложных системах находятся пока в начальной стадии [15].

Известно, что псориаз успешно лечат с помощью PUVA-терапии, где используется комбинация облучения мощным УФ-светом с приемом внутрь

8-метоксипсоралена (PUVA—psoralen+UV—A). PUVA-аппараты используются в нашей стране. Однако в литературе появилась настораживающая информация о том, что у некоторых пациентов PUVA-терапия промотирует кожный канцерогенез. При этом большему риску подвержены пациенты, ранее получившие дозу ионизирующей радиации. Особому риску подвергаются больные, уже имевшие кожные карциномы до PUVA-терапии [56]. Авторы этого исследования предполагают, что риск канцерогенеза связан со способностью организма пациента восстанавливать поврежденные ДНК. В связи с этими результатами был поставлен вопрос о необходимости выяснения участия синглетного кислорода в механизме PUVA-терапии [23].

#### *Нефотокимическое образование синглетного кислорода в организме*

С давних пор внимание исследователей привлекала биологическая токсичность супероксидрадикала  $O_2^-$ . Было высказано несколько предположений относительно механизма этой токсичности. Одно из них состояло в том, что в процессе спонтанной (некатализированной) дисмутации  $O_2^-$  в водной среде образуется синглетный кислород, который разрушает биологические молекулы [21, 27, 43].

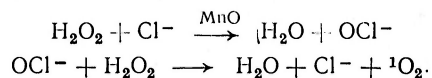


В течение десятилетия эта реакция была предметом дискуссий [7, 10, 11, 20, 21, 24, 27, 28, 33, 39, 42, 43, 46, 53], при этом одни исследователи представили данные, подтверждающие образование синглетного кислорода в этой реакции, другие получили отрицательный результат. Однако в 1981 г. Хан представил бесспорное доказательство образования синглетного кислорода в этой реакции, зарегистрировав непосредственно люминесценцию синглетного кислорода, соответствующую переходу  $O_2({}^1\Delta) \rightarrow O_2({}^3\Sigma)$ , с помощью сконструированного им высокочувствительного спектрометра, и тем самым завершил многолетнюю дискуссию [29]. Следует отметить, что подобный спектрометр, регистрирующий излучение синглетного кислорода в растворах, был создан ранее в МГУ советским ученым Красновским [1].

В 1972 г. Аллен и др. опубликовали интересное сообщение о том, что синглетный молекулярный кислород действует как бактерицидный агент в фагоцитозе, т. е. в процессе, в котором некоторые типы белых кровяных клеток, такие как полиморфно-ядерные лейкоциты, поглощают и разрушают микроорганизмы [5]. Механизм поглощения микробов этими клетками был объектом дискуссий в течение примерно столетия [38]. Исследуя процесс фагоцитоза, Аллен и др. наблюдали хемилюминесценцию, происхождение которой они объяснили следующим образом. Синглетный кислород реагирует с областями высокой электронной плотности в микробialных субстратах с образованием замещенных диоксетанов, которые диссоциируют на электронно-возбужденные карбонильные фрагменты, релаксирующие в основное состояние путем хемилюминесценции. Они обнаружили, что интенсивность этого излучения коррелирует со всеми переменными, которые изменяют бактерицидную активность. Хемилюминесценция не наблюдалась в отсутствие кислорода, а также в тех случаях, когда в системе присутствовали только лейкоциты или только микробы. Кроме того, хемилюминесценция отсутствовала в опытах с полиморфно-ядерными лейкоцитами, взятыми у пациентов с хроническим гранулематозом, при котором лейкоциты неспособны убивать микроорганизмы. Авторы считают, что синглетный кислород в этой системе образуется при спонтанной дисмутации супероксидрадикала  $O_2^-$ , образующегося в процессе метаболизма.

Авторами ряда работ [6, 14] установлено, что при фагоцитозе полиморфно-ядерные лейкоциты интенсивно продуцируют  $O_2^-$ . Эти авторы наблюдали также отсутствие продуцирования  $O_2^-$  лейкоцитами, взятыми у пациентов с хроническим гранулематозом.

По мнению автора работы [38], синглетный кислород здесь образуется не в результате дисмутации  $O_2^-$ , а в трехкомпонентной системе: миселопероксидаза (МПО) — галогенид — перекись водорода следующим образом:



Галогенид при каталитическом участии миелопероксидазы окисляется перекисью водорода до гипогалогенит-иона, который реагирует с другой молекулой  $H_2O_2$ . Реакция же гипогалогенит-иона с перекисью водорода является классической химической реакцией продуцирования синглетного кислорода (см., например, обзор [4]).

Клебанов и др. [30—32, 47] также предположили, что подобная трехкомпонентная система ответственна за бактерицидную активность полиморфно-ядерных лейкоцитов и, используя тушители  $O_2^-$ , успешно ингибировали эту бактерицидную активность.

Другие авторы [45] несколько позже представили несомненные доказательства того, что система пероксидаза —  $H_2O_2$  — галогенид генерирует синглетный кислород, и в свою очередь высказали мнение, что именно синглетный кислород ответствен за бактерицидную активность лейкоцитов. В подтверждение этой гипотезы Кринский [34] обнаружил, что каротиноиды защищают микроорганизмы от уничтожения лейкоцитами. Однако в недавних работах Фута и др. [16, 17], в которых были проведены исследования продуцирования синглетного кислорода лейкоцитами, получен отрицательный результат.

Таким образом, вопрос об участии синглетного кислорода в процессе фагоцитоза находится пока на стадии дискуссии. По мнению Хана [29], с помощью спектрометра, непосредственно регистрирующего люминесценцию синглетного кислорода, можно было бы решить этот вопрос окончательно.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Красновский А. А. мл. — Биофизика, 1976, т. 21, с. 748.
2. Фут Х. — В кн.: Свободные радикалы в биологии. М., 1979, т. 2, с. 96.
3. Шинкаренко Н. В. — Вopr. мед. химии, 1984, № 2, с. 114.
4. Шинкаренко Н. В., Алесковский В. Б. — Успехи химии, 1981, т. 50, с. 406.
5. Allen R. C., Stjerholm, Steele R. H. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1972, vol. 47, p. 679.
6. Babior B. M., Kipnes R. S., Curnette J. T. — J. clin. Invest., 1973, vol. 52, p. 741.
7. Barlow G. E., Bisby R. H., Cundall R. B. — Radiat. Phys. Chem., 1979, vol. 13, p. 73.
8. Bartlett P. D., Landis M. E. — In: Singlet Oxygen / Ed. H. H. Washerman, R. W. Murray. New York, 1979, p. 244.
9. Bonnett R., Stewart J. C. M. — J. chem. Soc. chem. Commun., 1972, p. 596.
10. Bors W., Saran M., Lengfelder E. et al. — Curr. Top. radiat. Res., 1974, vol. 9, p. 247.
11. Bus J. S., Aust S. D., Gibson J. E. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1974, vol. 58, p. 749.
12. Clough R. L., Yee B. G., Foote C. S. — J. Amer. chem. Soc., 1979, vol. 101, p. 683.
13. Cohen S., Ojanpera S. — Ibid., 1975, vol. 97, p. 5633.
14. Curnette J. T., Whitten D. M., Babior B. M. — New Engl. J. Med., 1974, vol. 290, p. 593.
15. Foote C. S. — In: Oxygen and Oxy-radicals in Chemistry and Biology / Ed. M. A. J. Rodgers, E. L. Powers. New York, 1981, p. 425.
16. Foote C. S. — In: Pathology of Oxygen / Ed. A. P. Autor. New York, 1982, p. 21.
17. Foote C. S., Abskerli R. B., Clough R. L., Lehrer R. I. — In: Bioluminescence and Chemiluminescence / Ed. M. A. DeLuca, W. D. McElroy. New York, 1980, p. 81.
18. Foote C. S., Ching T.-Y. — A. Amer. chem. Soc., 1975, vol. 97, p. 6209.
19. Foote C. S., Peters J. W. — Ibid., 1971, vol. 93, p. 3795.
20. Foote C. S., Shook F. C., Abakerli R. A. — Ibid., 1980, vol. 102, p. 2503.
21. Goda K., Chu J. W., Kimura T., Schaap A. P. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1973, vol. 52, p. 1300.
22. Gollnick K. — Advanc. Photochem., 1968, vol. 6, p. 1.
23. Grossweiner L. I. — In: Oxygen and Oxy-radicals in Chemistry and Biology. New York, 1981, p. 479.
24. Guiraud H. J., Foote C. S. — J. Amer. chem. Soc., 1976, vol. 98, p. 1984.
25. Jori G., Galiazzo G., Scoffone E. — Int. J. Protein Res., 1969, vol. 1, p. 289.
26. Jori G., Spikes J. D. — In: Oxygen and Oxy-Radicals in Chemistry and Biology / Ed. M. A. J. Rodgers, E. L. Powers. New York, 1981, p. 441.
27. Khan A. U. — Science, 1970, vol. 168, p. 476.
28. Khan A. U. — Photochem. Photobiol., 1978, vol. 28, p. 615.
29. Khan A. U. — J. Amer. chem. Soc., 1981, vol. 103, p. 6516.
30. Klebanoff S. J. — J. Bact., 1968, vol. 95, p. 2131.
31. Klebanoff S. J. — In: The Phagocytic Cell in Host Resistance / Ed. J. A. Bellant, D. H. Dayton. New York, 1975, p. 45.
32. Klebanoff S. J., Clem W. II., Leubke R. G. — Biochim. biophys. Acta, 1968, vol. 156, p. 168.
33. Kobayshi S., Ando W. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1979, vol. 88, p. 676.
34. Krinsky N. I. — Science, 1974, vol. 186, p. 363.
35. Krinsky N. I. — Pure appl. Chem., 1979, vol. 51, p. 649.
36. Lightner D. A., Quistad G. B. — FEBS Lett., 1972, vol. 25, p. 94.
37. Matsuura T., Yoshimura N., Nichinaga A., Saito I. — Tetrahedron, 1972, vol. 28, p. 4933.
38. Maugh T. H. — Science, 1973, vol. 182, p. 44.
39. Mayeda E. A., Bard A. J. — J. Amer. chem. Soc., 1974, vol. 96, p. 4023.
40. McDonagh A. F., Palma L. A., Lightner D. A. — Science, 1980, vol. 208, p. 145.
41. McDonagh A. F., Ramonas L. M. — Ibid., 1978, vol. 201, p. 829.

42. Nilsson R., Kearns D. R. — J. phys. Chem., 1974, vol. 78, p. 1681.
43. Pederson T. C., Aust S. D. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1973, vol. 52, p. 1071.
44. Phototherapy in the Newborn: An Overview / Ed. G. B. Odell et al. Washington, 1972, p. 56.
45. Piatl J. F., Cheema A. S., O'Brien P. J. — FEBS Lett., 1977, vol. 74, p. 251.
46. Poupko R., Rosenthal I. — J. phys. Chem., 1973, vol. 77, p. 1722.
47. Rosem H., Klebanoff S. J. — J. clin. Invest., 1976, vol. 58, p. 50.
48. Ryang H. S., Foote C. S. — J. Amer. chem. Soc., 1979, vol. 101, p. 6683.
49. Saito I., Matsuura T., Nakagawa M., Hino T. — Accounts chem. Res., 1977, vol. 10, p. 346.
50. Savige E. W. — Aust. J. Chem., 1971, vol. 24, p. 1285.
51. Schaap A. P., Zaklika K. A. — In: Singlet Oxygen / Ed. H. H. Wasserman. R. W. Murray. New York, 1979, p. 174.
52. Singh A. — Canad. J. Physiol. Pharmacol., 1982, vol. 60, p. 1330.
53. Singh A., Koppenol W. H. — Photochem. Photobiol., 1978, vol. 28, p. 429.
54. Singh A., Singh H., Kremers W., Kroll G. W. — Bull. Europ. Physiopathol. Resp., 1981, vol. 17, p. 31.
55. Smith L. L., Stroud J. P. — Photochem. Photobiol., 1978, vol. 28, p. 479.
56. Stern R. S., Thibodeau L. A., Kleinerman R. A. et al. — New Engl. J. Med., 1979, vol. 300, p. 809.
57. Sysak P. K., Foote C. S., Ching T. Y. — Photochem. Photobiol., 1977, vol. 26, p. 19.
58. Thomas M. J., Foote C. S. — Ibid., 1978, vol. 27, p. 683.
59. Vickers R. S., Foote C. S. — Boll. Chim. Farm., 1970, vol. 109, p. 599.
60. Wasserman H. H., Lipshitz B. H. — In: Singlet Oxygen / Ed. H. H. Wasserman, R. W. Murray. New York, 1979, p. 430.
61. Yamauchi R., Matsushita S. — Agric. Biol. Chem., 1979, vol. 43, p. 2151.

Поступила 07.03.85

УДК 616-008.93:577.112.853+615.31:577.112.853].038

О. Л. Санина, Н. К. Бердинских

## БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА И ВОЗМОЖНОСТИ ЕГО КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

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

Церулоплазмин — ЦП (КФ.1.16.3.1), медьсодержащая оксидаза крови человека, интенсивно изучается во многих аспектах: исследуются его молекулярные и биологические свойства, механизм действия, физиологическое значение, возможности клинического применения.

Известные биологические свойства этого белка — участие в транспорте и утилизации меди, нейроэндокринной регуляции, кроветворении, а также в неспецифической защите организма при многих патологических процессах — вызывают огромный интерес к его изучению.

ЦП, медьсодержащий белок  $\alpha_2$ -глобулиновой фракции крови человека и животных, впервые был выделен в чистом виде и описан в 1948 г. [34]. Величина молекулярной массы ЦП, полученная различными авторами, колеблется от 130 до 160 кД [7, 53, 61]. По последним данным, основанным на использовании новых методов исследования, молекулярная масса ЦП равна 130—135 кД [20, 39, 46].

Ранее считалось, что ЦП имеет субъединичную структуру [37]. В настоящее время доказано, что человеческий ЦП представлен одной полипеп-

тидной цепью, состоящей более чем из 1000 аминокислотных остатков [39]. В молекуле ЦП имеется по крайней мере 5 пептидных связей, особенно чувствительных к протеолитическому расщеплению. В результате разрыва этих связей из молекулы ЦП могут освобождаться несколько пептидных фрагментов, которые, очевидно, ошибочно принимались за субъединицы. Ряд авторов [38, 50, 59] показали, что при выделении ЦП из очень свежей крови с добавлением ингибиторов протеаз (20 мМ 6-аминогексаноат) число фрагментов незначительно. Возможно, что колебания в величинах молекулярной массы ЦП объясняются его частичной денатурацией. Имеются сведения о генетическом полиморфизме ЦП. Сообщалось о различных электрофоретических вариантах человеческого ЦП в ряде этнических групп населения [51]. Недавно были обнаружены два новых электрофоретических варианта ЦП, которые встречаются среди населения штата Мичиган (США) [49].

ЦП является типичным сывороточным гликопротеином. Углеводный компонент ЦП, на долю которого приходится 2—8 % массы молекулы,

представлен 9 олигосахаридными цепями, содержащими глюкозамин, галактозу, мальтозу, фукозу и сиаловые кислоты. По данным Ryden [63], углеводороды в молекуле ЦП находятся в следующих количествах: глюкозамин — 15,7—19,2 %, маниоза — 14,2 %, галактоза — 12,3 %, фукоза — 1,6 %, сиаловые кислоты — 8,6 %. Убедительных данных о роли углеводной части в функционировании ЦП в литературе нет. Предполагается, что на физиологические свойства ЦП оказывают существенное влияние концевые сиаловые кислоты. Отщепление их от молекулы ЦП нейроминидазой приводит к изменению электрофоретических свойств белка, но не отражается на оксидазной активности или абсорбции при 610 нм [15].

Очень важную роль в структуре ЦП играет медь, составляющая 0,27—0,32 % от всей массы белка [42].

В последнее время методами атомной абсорбционной и ЭПР-спектроскопии установлено, что молекула ЦП содержит 6 атомов меди, различающихся по спектральным свойствам [22, 25, 66]. Обнаруживаемые методом ЭПР атомы меди (часть ионов меди, входящей в ЦП, не обнаруживается ЭПР-спектроскопией) представлены двумя типами: 1-й тип — так называемые «синие» ионы  $\text{Cu}^{2+}$  с полосой поглощения при 610 нм, ответственные за интенсивный голубой цвет ЦП и других медных белков таких, как лакказа, азурен, пластоцианин и др., 2-й тип — «не синие» ионы  $\text{Cu}^{2+}$ , по спектрам поглощения сходные с простейшими комплексами  $\text{Cu}^{2+}$  [30]. Предполагается, что только 4 из 6 атомов меди необходимы для активного центра ЦП [63].

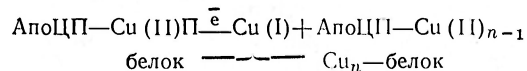
О структуре активного центра ЦП в литературе известно мало. Показано, что лигандами меди в активном центре являются SH-группы цистеина, а также атомы азота, гистидина и остатки метионина [12, 63]. Остатки метионина в качестве лиганда входят в активный центр и других медьсодержащих белков — пластоцианина и азурина. Высказывается мнение о возможной структурной общности активных центров ЦП и простых мельпротейдов, к которым относятся азурин и пластоцианин [63].

Подобно другим медьсодержащим белкам ЦП способен участвовать в

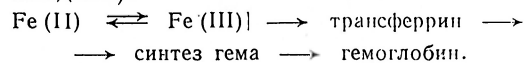
окислительно-восстановительных реакциях. Показано [24], что общая оксидазная активность ЦП слабее активности других оксидаз, например лакказы растительного происхождения, но сильнее, чем у простых солей и комплексов меди, которые являются токсичными соединениями. Установлено, что оксидазная активность ингибируется неорганическими анионами  $\text{CN}^-$ ,  $\text{N}_3^-$ ,  $\text{NCO}^-$ ,  $\text{NCS}$ . Fe (II) также сильно стимулирует оксидазную активность ЦП. В то же время высокие концентрации Cu (II) и Fe (II), а также ионов Co (II), Ni (II), Mn (II) и Zn (II) могут ингибировать ее. Но концентрации, требуемые для ингибирования, намного выше, чем физиологические концентрации ионов свободных металлов, поэтому *in vivo* ионы металлов вызывают, по-видимому, стимулирующий, а не ингибирующий эффект [30]. ЦП окисляет *in vitro* многие субстраты: Fe (II), ароматические амины и фенолы, аскорбиновую кислоту и др. В зависимости от типа окисляемого субстрата его называют феррооксидазой, аминоксидазой и аскорбатоксидазой. Большого внимания заслуживает обнаруженная в последние годы способность ЦП «перехватывать» свободные супероксидные радикалы [31, 32, 71].

Изучению структуры, физико-химических и биохимических свойств ЦП посвящено значительное число работ. Более детально эти вопросы рассмотрены в обзорах и статьях [5, 30, 42, 52]. Как реализуются мультиферментные свойства ЦП в сложной системе *in vivo*, сказать трудно, но очевидно, что ЦА — многофункциональный белок и многие функции ЦП делают его необходимым для жизнедеятельности организма. Известные в настоящее время многообразные функции ЦП могут быть суммированы следующим образом:

#### 1. Транспорт меди:



#### 2. Мобилизация сывороточного железа для кроветворения. ЦП (ферроксидаза):



#### 3. Сывороточный антиоксидант: ингибитор перекисного окисления липи-



дов, «перехватчик» супероксидных радикалов.

#### 4. Реактан «острой фазы».

5. Регулятор уровня биогенных аминов в сыворотке крови: окисление катехоламинов, оксинидолов.

Последняя функция ЦП наименее изучена. По мнению некоторых авторов, ЦП регулирует уровень норадреналина, адреналина, серотонина и др. [18]. Недавно нашли [43], что ЦП присутствует в мозге. Вероятно, ЦП, влияя на время жизни биогенных аминов, может играть определенную роль в регуляции химии мозга.

Одной из важных функций ЦП является транспорт меди. В состав ЦП входит 90—93 % всей меди, содержащейся в плазме крови [28]. Из-за короткой полужизни изотопов меди прямых доказательств функции ЦП в ее транспорте нет. Как медиатор транспорта меди ЦП обеспечивает поддержание уровня меди в тканях, особенно в печени. Вготан [19] одним из первых подчеркивал роль ЦП как специфического переносчика ионов меди от печени к клеткам других тканей организма.

Предполагается, что синтезируемый в печени ЦП потоком крови разносится по тканям организма и транспортирует ионы меди в клетки. Лишенный меди апоЦП диффундирует обратно в плазму крови. В печени к апоЦП присоединяются ионы меди, и цикл повторяется. Медь, переносимая ЦП, используется для синтеза медьсодержащих ферментов. Считают, что ЦП переносит медь к определенным группам цитохром-С-редуктазы. С помощью радиоактивной метки установлено, что медь ЦП тесно связана с цитохром-С-редуктазой митохондрий сердца [47]. При содержании крыс на диете с дефицитом Си было обнаружено сильное снижение активности цитохромоксидазы в большинстве тканей. Введение крысам ЦП способствовало быстрому восстановлению активности этого фермента, в то время как только медь или ее комплексы с альбумином или гистидином были менее эффективными [35].

При исследовании роли ЦП в метаболизме железа было установлено, что ЦП участвует в окислении железа в плазме крови человека, представляя собой ферроксидазу [29]. Субстратом

ЦП является двухвалентное железо, которое он окисляет до трехвалентного. Образующееся трехвалентное железо встраивается в молекулу апотрансферрина. Таким образом, ферроксидазная активность ЦП обеспечивает насыщение железом трансферрина, который транспортирует железо в костный мозг, где происходит синтез гемма. Следовательно, ЦП принимает участие в утилизации железа, способствуя кроветворению.

В опытах *in vitro* показано [54], что ЦП ускоряет окисление двухвалентного железа и образование трансферрина более чем в 10 раз. Присутствие альбумина в количестве 0,6—1,2 мМ, обычно тормозящего окисление  $Fe^{2+}$ , не оказывает влияния на катализируемое ЦП окисление  $Fe^{2+}$ .

Недавно было обнаружено, что ЦП обладает антиокислительной активностью [26]. Известно, что сыворотка крови человека содержит ингибитор липидного перекисления. Показано, что основным антиоксидантом в сыворотке как в норме, так и при патологии является ЦП, ингибирующий и предотвращающий окисление липидов. ЦП ингибирует аутоокисление липидов, стимулируемое аскорбиновой кислотой и неорганическим железом в липосомах и гомогенатах бычьего мозга. АпоЦП (лишенный меди ЦП) не ингибирует аутоокисление липидов. Другие комплексы меди, например  $CuSO_4$ , имеют очень слабую антиокислительную активность. Механизм антиокислительного эффекта ЦП в системе *in vivo* еще не выяснен. Неясно, от какой активности — ферроксидазной, аскорбатоксидазной или  $O_2$ -перехватывающей — зависит его антиокислительная активность [17]. ЦП ингибирует зависимое от НАДФ·Н окисление липидов, стимулируемое АДФ- $Fe^{3+}$  в микросомах печени крыс, причем его ингибирующее действие оказывается более сильным, чем действие супероксиддисмутазы (СОД) [71]. Авторы последней из указанных работ склонны считать, что антиокислительный эффект ЦП зависит от его ферроксидазной активности. Это заключение подтверждает вывод, сделанный на основании исследований окисления липидов липосом, индуцированного  $Fe^{2+}$  [33]. Предполагается, что ЦП играет роль в удалении токсических свободных радикалов суперок-

сиданиона  $O_2^-$  — продукта аэробного метаболизма. Клетки и ткани защищены от повреждения супероксидным радикалом главным образом с помощью медьсодержащей СОД — внутриклеточного фермента, катализирующего дисмутацию свободных радикалов до  $H_2O$  и  $O_2$ . ЦП, вероятно, с помощью пары ионов  $Cu^{2+}$  связывает  $O_2^-$ , осуществляя четырехэлектронное восстановление кислорода до  $H_2O$ . При этом в отличие от действия СОД  $H_2O_2$  не образуется. В работе [31] показано, что ЦП может предохранять липидно-связанные структуры от  $O_2^-$  и что ЦП является «перехватчиком» свободных радикалов, циркулирующих в крови. Для проявления защитных функций организма очень важно, что ЦП циркулирует в крови, в то время как СОД — внутриклеточный фермент.

В исследованиях Погосяна и соавт. [14а] установлено, что ЦП как ингибитор липидной перекиссации примерно на 2 порядка менее эффективен, чем СОД. Однако на основании полученных данных и оценки содержания ЦП в плазме сделан вывод, что ЦП правомерно рассматривать в качестве основного антиоксиданта плазмы.

Содержание ЦП в сыворотке крови взрослого человека в норме составляет 25—45 мг/100 мл. У новорожденных детей содержание ЦП в сыворотке крови ниже — около 10 мг/100 мл, но через 1—2 мес после рождения оно увеличивается до значений, характерных для взрослого человека [28]. В тканях животного организма уровень ЦП относительно низок. Наиболее высокое содержание ЦП обнаруживается в сердечной мышце [43], более низкое — в печени, почках и мозге. Содержание ЦП в крови увеличивается при беременности, стрессах, при введении эстрогенов, что свидетельствует об участии ЦП в эндокринной регуляции [64, 65].

Большого внимания заслуживают свойства ЦП, на основании которых он был классифицирован как «белок острой фазы». Многими исследованиями установлено, что уровень ЦП в сыворотке крови значительно возрастает при различных инфекционных заболеваниях, остром и хроническом воспалительных процессах, сопровождающихся деструктивными и некротическими изменениями в тканях (ин-

фаркт миокарда и др.), а также при злокачественном росте [9, 11, 23, 40, 57, 69]. Очевидно, ЦП участвует в неспецифической защите организма от вредных воздействий. Повышение содержания ЦП в острой фазе заболевания напоминает изменение уровня других  $\alpha$ -глобулинов, который повышается при тканевом повреждении и воспалительных состояниях [32]. ЦП называют эндогенным модулятором воспалительного ответа [30]. Одна из функций ЦП при воспалении — инаktivация свободных радикалов, образованных фагоцитирующими лейкоцитами и поступающими во внеклеточные жидкости, которые не содержат предохранительных ферментов — каталазы и СОД. Существует мнение, что одним из молекулярных участков в воспалительном ответе организма является белок, освобождаемый лейкоцитами, — эндогенный медиатор лейкоцитов (ЭМЛ). ЭМЛ стимулирует синтез и освобождение белковых реактантов активной фазы, включая ЦП [30].

Как было отмечено, содержание ЦП в сыворотке крови изменяется при опухолевом росте [14, 48, 55]. Возрастание уровня ЦП в сыворотке крови наблюдается у крыс при росте различных имплантированных опухолей молочной железы и печени [44], а также карциномы Уокера [55]. Активность ЦП начинает возрастать к 6-му дню после имплантации, когда масса опухоли достигает 0,3 % от массы тела. Имплантация нормальной ткани не вызывает повышения содержания ЦП.

На экспериментальных моделях, таких, как саркомы М-1 и МТ-х крыс [13], а также карцинома Брауна — Пирс и карцинома кроликов Vx-2 [13, 67], установлено также значительное (в 4—5 раз по сравнению с нормой) повышение уровня ЦП в сыворотке крови животных. Авторы утверждают, что содержание ЦП увеличивается в такой же степени у беременных крольчих, но только в ранний период (3-я неделя). Впоследствии уровень ЦП у животных с раковыми опухолями намного выше, чем у беременных. Благодаря удачному выбору модели (карцинома Vx-2 кроликов) можно было наблюдать изменения уровня ЦП при развитии или регрессии раковой опухоли. Результаты этих исследований



дали возможность авторам назвать ЦП одним из «маркеров неопластической активности» [67]. Высказано мнение, что изменение концентрации ЦП и железа трансферрина в крови отражает метаболический стресс опухолевой болезни [28].

Исследования ферментативной и антигенной активности ЦП у больных раком легкого, молочной железы, а также желудочно-кишечного тракта показали, что при всех 3 видах рака уровень ЦП в сыворотке крови повышается и степень этого повышения соответствует стадии заболевания. При лечении уровень ЦП возвращается к норме. Полагают, что в ряде случаев (при длительном наблюдении) определение содержания ЦП может быть использовано для диагностики и прогноза злокачественных заболеваний [45].

Аналогичные результаты получены при определении концентрации ЦП у больных раком до и после радио- и химиотерапии. Концентрация ЦП перестает увеличиваться и постепенно снижается у больных после операции и повышается у больных, которым операцию не проводили [21]. Отмечено повышение содержания ЦП у больных с эстрогензависимыми раками (молочной железы, вульвы, шейки матки) [65].

Механизм повышения уровня ЦП в сыворотке крови при злокачественном росте неизвестен. Предполагают, что это результат либо усиления синтеза ЦП, либо снижения его распада.

Высказано предположение [27], что повышенное содержание ЦП при опухолевом росте связано с изменением его катаболизма. При нормальном катаболизме ЦП в печени происходит его деасилирование с помощью нейраминидазы до асиало-ЦП, который удаляется из печени. Малигнизированные клетки имеют более высокую активность трансфераз сиаловых кислот [68]. Поэтому ЦП может реасилироваться на поверхности раковых клеток или в периферической крови. В малигнизированных клетках менее эффективна десилизация (из-за снижения активности нейраминидазы). Таким образом, распад ЦП при злокачественном росте снижен, что может являться одной из причин повышения его содержания в сыворотке крови.

Сравнительно редко отмечают снижение содержания ЦП в крови. Это в основном наблюдается при недостатке или отсутствии синтеза ЦП (некроз печени, болезнь Вильсона) либо при увеличении его выведения (нефроз, наследственная тирозинемия). Снижение уровня ЦП в плазме крови при диффузном гломерулонефрите у детей сопровождается увеличением его количества в моче [16]. Вероятно, снижение уровня ЦП в этом случае происходит за счет потери ЦП вместе с другими белками сыворотки крови. Пониженный уровень ЦП является одним из ранних симптомов болезни Вильсона. Дефект синтеза ЦП, сопровождающийся накоплением меди в мозге и печени, вызывает тяжелую клиническую картину: поражение нервной системы, симптомы цирроза печени и другие изменения. Отмечено, что у больных гепатолентикулярной дегенерацией (болезнь Вильсона) удельная оксидазная активность ЦП на 20 % ниже нормы, а концентрация ЦП в сыворотке крови составляет 4,7—25,4 вместо 30 мг/100 мл в норме наряду с повышенным выделением меди с мочой (116—900 вместо  $50 \pm 10$  мкг/сут в норме) [56].

Из печени животных выделена гомогенная мРНК, кодирующая ЦП, которая может быть использована для молекулярно-биологического анализа дефекта синтеза этого белка при гепатолентикулярной дегенерации [6].

Установлено, что ЦП синтезируется в печени на мембранно-связанных полисомах. У большинства носителей вильсоновской мутации растущие цепи ЦП обнаруживаются преимущественно во фракции свободных полирибосом, что коррелирует с появлением в сыворотке крови больных иммунореактивного предшественника ЦП с молярной массой 8400 Д, не обнаруживаемого в крови у контрольных больных [15].

Именно при болезни Вильсона была сделана первая попытка применить ЦП с лечебной целью. Внутривенное введение больным ЦП, полученного из сыворотки крови здоровых людей, в дозе 10 мг/кг вызывало нормализацию его содержания в крови, но не давало желаемого клинического эффекта при уже развившейся гепатолентикулярной дегенерации [58]. Вероятно, коррекция экзогенным ЦП транспорта меди при врожденном дефиците ЦП может

иметь существенное значение лишь на ранней стадии заболевания.

К настоящему времени накопилось достаточно данных, являющихся обоснованием для применения ЦП в лечебных целях. В экспериментальных работах [70] и клинических наблюдениях [61] отмечено гемостимулирующее действие ЦП на кроветворение. Введение ЦП кроликам в комбинации с фолиевой кислотой вызывает появление эритропоэтина в плазме крови и возрастание количества ретикулоцитов, эритроцитов и гемоглобина в периферической крови [70]. У собак и кроликов с постгеморрагической анемией при введении человеческого ЦП наступает более быстрое восстановление картины периферической крови [10]. Есть сообщения о клинических результатах применений ЦП при лечении больных с апластической анемией; приблизительно у 50 % больных ЦП вызывал стимуляцию эритропоэза, что позволяло сократить большое количество переливания крови, необходимое этим больным в связи с резким снижением гемопоэтической функции [66].

Экзогенный ЦП оказывает противовоспалительное действие [10, 41]. Введение крысам и мышам ЦП в дозе 30 мг/кг при воспалении нормализует гематологические показатели и способствует улучшению морфологической картины ткани в очаге воспаления [10]. Отмечены положительные результаты применения ЦП при лечении больных инфекционным неспецифическим полиартритом [8].

Установлено, что ЦП обладает противоопухолевой и токсогормонейтрализующей активностью. Токсогормон — основной белок, выделяемый из клеток асцитного рака Эрлиха. При введении животным он, подобно растущей опухоли, снижает активность каталазы в печени и уровень железа в сыворотке крови, а также оказывает прямое цитотоксическое действие в отношении нормальных мышинных лимфоцитов и макрофагов. В опытах на мышах LCK с саркомой 180 показано, что введение ЦП (40 мг/кг) вызывает 40 % торможение роста опухоли [36]. ЦП восстанавливает сниженную гиперчувствительность замедленного типа у мышей с саркомой 180 и активность Т-клеток-хелперов у мышей после введения

токсогормона. Следовательно, ЦП увеличивает *in vivo* генерацию аллореактивных цитотоксических клеток, которые состоят из цитотоксических Т-лимфоцитов, цитотоксических макрофагов и К-клеток [36].

Нами совместно с сотрудниками Киевского предприятия по производству бактериальных препаратов Минздрава СССР (канд. мед. наук Ю. В. Волощенко, канд. биол. наук И. Н. Гавриш) в течение ряда лет проводились работы по получению ЦП из ретроплацентарной крови человека (отходы производства  $\gamma$ -глобулина) и изучению действия его на организм животных [2]. Установлено, что ЦП практически нетоксичен, в дозе 5 г/кг он не вызывает гибели мышей и крыс. Длительное (2 мес) ежедневное введение ЦП не оказывает вредного влияния на функции жизненно важных систем и органов. ЦП не обладает алергизирующей и тератогенной активностью. Отмечено стимулирующее влияние ЦП на гемопоэз, выражающееся в увеличении содержания ретикулоцитов, эритроцитов и гемоглобина в крови крыс и кроликов, которым длительно вводили ЦП в дозе 10 мг/кг [2].

Нами впервые обнаружено радиозащитное действие ЦП [3]. Показано, что ЦП повышает резистентность организма к рентгеновскому облучению. Однократное введение ЦП в разных дозах до и после радиационного воздействия при LD<sub>40</sub> и LK<sub>100</sub> увеличивает выживаемость крыс. При этом улучшаются отдельные показатели гемограмм и миелограмм на ранних этапах после лучевого воздействия и отмечается более высокий уровень ЦП в сыворотке крови животных. Радиозащитное действие ЦП обусловлено, по-видимому, его антиоксидантными свойствами, способностью обезвреживать радиотоксины, в том числе супероксидные радикалы, образующиеся в ранний период лучевой болезни.

Изучено влияние экзогенного ЦП на рост экспериментальных опухолей [4]. В большинстве экспериментов на животных с различными перевивными опухолями (карцинома Герена, лейкоз Швеца, лимфома NKLy, саркома 180 и лейкоз L 1210) при введении небольших доз ЦП (1—10 мг/кг) обнаружен умеренно выраженный противоопухолевый эффект (торможения

роста на 25—50 %). При изучении влияния препарата ЦП на кинетику роста нормальных и опухолевых клеток человека и животных в культуре установлено, что ЦП в различных дозах не оказывает существенного влияния на пролиферацию нормальных фибробластов эмбрионов человека и крысы, а также опухолевых клеток. В то же время при культивировании в присутствии ЦП быстроделющихся опухолевых клеток животных, особенно лейкозных клеток крыс, отмечено ингибирующее рост влияние препаратов ЦП. Обнаруженный эффект был дозозависимым и не сопровождался токсическим действием препарата на клетку.

Представляют интерес результаты исследования действия ЦП на иммунологический статус организма-опухоленосителя. На модели карциномы легкого Льюиса у мышей линии С57В1 показано менее выраженное снижение уровня бластной трансформации лимфоцитов, вызванное фитогемагглютинином, в группе животных с введением ЦП по сравнению с контрольными животными (введение альбумина) [1]. Эти данные могут свидетельствовать о том, что ЦП ослабляет иммунодепрессию, вызванную ростом опухоли.

Полученные в последние годы данные подтверждают представление о том, что ЦП является одним из факторов естественной защиты организма. Как лечебный препарат он может быть получен из отходов крови человека, образующихся при производственном получении  $\gamma$ -глобулина, и рекомендован для применения при анемиях, воспалительных заболеваниях, в комплексной терапии злокачественных опухолей и при лучевых осложнениях в качестве средства, стимулирующего гемопоэз и вызывающего детоксицирующий эффект.

Дальнейшее изучение свойств ЦП и механизмов его действия, поиск новых подходов к использованию его в клинике представляют, на наш взгляд, большой научный и практический интерес.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Антоненко С. Г., Бердинских Н. К., Шишко Е. Д., Околот Е. Н. // Вопр. онкол. — 1985. — № 5. — С. 11—15.
2. Бердинских Н. К., Волощенко Ю. В., Гавриш И. Н. и др. // Ферменты, металлы, металлоферменты в диагностике и лечении. — Ивано-Франковск, 1982. — С. 33—34.
3. Бердинских Н. К., Антоненко С. Г., Волощенко Ю. В. и др. // Радиобиология. — 1984. — Т. 24. — С. 199—203.
4. Бердинских Н. К., Волощенко Ю. В., Лившиц В. И. и др. // Экспер. онкол. — 1984. — № 3. — С. 63—66.
5. Василец И. М. // Успехи биол. химии. — 1973. — Т. 14. — С. 172—201.
6. Вахорловский В. Г., Мошков К. А., Шавловский М. М. и др. // Докл. АН СССР. — 1975. — Т. 22. — С. 716—719.
7. Захирова Е. Т., Васильев В. Б., Горбунова В. П. и др. // Биохимия. — 1983. — Т. 48. — С. 1709—1720.
8. Качаровский Б. В., Повосад М. А. // Ферменты, металлы, металлоферменты в диагностике и лечении. — Ивано-Франковск, 1982. — С. 104—105.
9. Кикоть В. А. // Клин. хир. — 1969. — № 11. — С. 58—60.
10. Криворучко Р. А., Миндюк М. В., Басилия Л. И. // Ферменты, металлы, металлоферменты в диагностике и лечении. — Ивано-Франковск, 1982. — С. 116.
11. Микунис Р. И., Серкова В. К. // Врач. дело. — 1981. — № 9. — С. 42—45.
12. Мошков К. А., Яковлев А. С., Маслов В. Г. // Биоган. химия. — 1980. — Т. 6. — № 3. — С. 413—425.
13. Непорадный Д. Д., Гайнацкий М. Н., Сабат Б. Д. // Микроэлементы в медицине. — Киев, 1974. — Т. 5. — С. 32—34.
14. Нурагдыев С. К., Довбас Р. // Здравоохр. Туркменистана. — 1980. — № 1. — С. 14—16.
- 14а. Погосян Г. Г., Налбандян Р. М. // Биохимия. — 1983. — Т. 48. — С. 1129—1134.
15. Пучкова Л. В., Гайцхоки В. С., Вахорловский В. Г. и др. // Генетика. — 1982. — Т. 18. — С. 703—712.
16. Чеснокова С. М., Чижова А. И. // Вопросы нефрологии. — М. — 1968. — С. 36—40.
17. Al-Timimi D. I., Dormandy T. L. // Biochem. J. — 1977. — Vol. 168. — P. 283—288.
18. Barras B. C., Coult D. B., Rich P. et al. // Biochem. Pharmacol. — 1974. — Vol. 23. — P. 47—51.
19. Broman L. — Цит. по Laurie S. H., Mohammed E. S. // Goord. Chem. Rev. — 1980. — Vol. 33. — P. 279—312.
20. Calabrese L., Malatesta F., Barra D. // Biochem. J. — 1981. — Vol. 199. — P. 667—673.
21. Chakraborty P. K., Gosh A., Chowdhury J. R. // Acta med. Okayama. — 1984. — Vol. 38. — P. 315—320.
22. Chappuis P., Henry Y., Laroche M. et al. // C. R. Soc. Biol. (Paris). — 1981. — Vol. 175. — P. 169—176.
23. Conforti A., Franco L., Milanino R. et al. // Agents a. Actions. — 1982. — Vol. 12. — P. 303—307.
24. Dawson C. R., Strothkamp K. G., Krul K. G. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1975. — Vol. 258. — P. 209—220.
25. Dooley D. M., Cote C. E., Coolbaugh T. S. et al. // FEBS Lett. — 1981. — Vol. 131. — P. 363—365.
26. Dormandy T. L. // Lancet. — 1978. — Vol. 1. — P. 647—650.
27. Fisher G. L., Shifrine M. // Oncology. — 1978. — Vol. 35. — P. 22—25.
28. Foster M. A., Pocklington T., Dawson A. A. In: // Metal. Ions in Biological Systems. /

- Ed. H. Sigel. — Basel, 1979. — Vol. 10. — P. 129—166.
29. *Frieden E., Osaki S.* Protein-Metal Interactions. / Ed. M. Frieden. — New York, 1974. — P. 235—265.
  30. *Frieden E.* In: // Metal. Ions in Biological System. — New York, 1981. — Vol. 13. — P. 117—142.
  31. *Goldstein J. M., Kaplan H. B., Edelson H. S.* et al. // J. biol. Chem. — 1979. — Vol. 254. — P. 4040—4045.
  32. *Gutteridge I. M. C.* // Ann. Clin. Biochem. — 1978. — Vol. 15. — P. 293.
  33. *Cutleridge I. M. C., Richmand R., Halliwell B.* // FEBS Lett. — 1980. — Vol. 112. — P. 269—272.
  34. *Holmberg C. G., Laurell C. B.* // Acta chem. scand. — 1948. — Vol. 2. — P. 550.
  35. *Hsieh H. S., Frieden E.* // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1975. — Vol. 67. — P. 1326—1331.
  36. *Itoh O., Torokoi T., Satoh M.* et al. // Gann. — 1981. — Vol. 72. — P. 370—376.
  37. *Kasper C. B., Deutsch H. F.* // J. biol. Chem. — 1963. — Vol. 238. — P. 2325—2330.
  38. *Kingston I. B., Kingston B. L., Putman F. W.* // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1977. — Vol. 74. — P. 5377—5381.
  39. *Kingston I. B., Kingston B. L., Putman F. M.* // J. biol. Chem. — 1980. — Vol. 255. — P. 2886—2896.
  40. *Koprivova H., Dienstlir Z., Samal M.* et al. // Neoplasma. — 1982. — Vol. 29. — P. 333—340.
  41. *Laroch M. I.* // Пат. 7104295. Франция.
  42. *Laurie S. H., Mohammed E. S.* // Coord. Chem. Rev. — 1980. — Vol. 33. — P. 279—312.
  43. *Linder M. C., Moor I. R.* // Biochim. biophys. Acta. — 1977. — Vol. 499 — P. 329—331.
  44. *Linder M. C., Bryant R. R., Lim S.* et al. // Enzyme. — 1979. — Vol. 24. — P. 85—95.
  45. *Linder M. C., Moor I. R., Wright K.* // J. nat. Cancer Inst. — 1981. — Vol. 67. — P. 263—275.
  46. *Manolis A., Cox D. W.* // Prep. Biochem. — 1980. — Vol. 10. — P. 121—132.
  47. *Marceau N., Aspin N.* // Biochim. biophys. Acta — 1973. — Vol. 293. — P. 338—343.
  48. *Martin M. C., Bustamante B. I., Font A. I.* // Biomed. Express. — 1979. — Vol. 31. — P. 66—68.
  49. *Mohrenweiser H. W., Decker R. S.* // Hum. Hered. — 1982. — Vol. 32. — P. 369—373.
  50. *Moshkov K. A., Lakatos S., Hajdu I.* et al. // Europ. J. Biochem. — 1979. — Vol. 94. — P. 127—134.
  51. *Neel I. V.* // Amer. J. hum. Genet. — 1979. — Vol. 30. — P. 465—490.
  52. *Neifakh S. A., Gaitshoki V. S., Klimov N. A.* et al. // Molec. Biol. Resp. — 1977. — Vol. 3. — P. 235—242.
  53. *Noyer M., Dwolet F. F., Hao J. Z.* et al. // Analyt. Biochem. — 1980. — Vol. 102. — P. 450—458.
  54. *Osaki S., Johnson D. A., Frieden E.* // J. biol. Chem. — 1966. — Vol. 241. — P. 2746—2751.
  55. *Owen C. A.* // Biol. Trace Elem. Res. — 1981. — Vol. 3. — P. 217—224.
  56. *Rasin M. A.* // Lancet. — 1956. — Vol. 1. — P. 726—730.
  57. *Ritland S., Skede S., Johansen O.* // Scand. J. Gastroent. — 1982. — Vol. 17. — P. 545—551.
  58. *Rickel H., Schultze H., Grüter W.* et al. // Klin. Wschr. — 1956. — Bd 34. — S. 351—360.
  59. *Ryden L.* // FEBS Lett. — 1971. — Vol. 18. — P. 321—325.
  60. *Ryden L.* // J. Protein Res. — 1971. — Vol. 3. — P. 191—196.
  61. *Ryden L.* // Europ. J. Biochem. — 1972. — Vol. 26. — P. 380—386.
  62. *Ryden L., Björk J.* // Biochemistry (Wash.). — 1976. — Vol. 15. — P. 3411—3417.
  63. *Ryden L.* // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1982. — Vol. 79. — P. 6767—6771.
  64. *Schreiber V., Pribyl T., Jahadova J.* // Endokrinologic. — 1980. — Bd 76. — S. 129—136.
  65. *Schreiber V., Pribyl T.* Hormones, Adaptation and Evolution. — Tokyo, 1980. — P. 157—164.
  66. *Shimisu M.* // Transfusion. — 1979. — Vol. 19. — P. 742—748.
  67. *Ungar-Waron H., Gluckman A., Eliahu S.* et al. // Cancer Res. — 1978. — Vol. 38. — P. 1296—1299.
  68. *Van Beek W. P., Smets L. A., Emmelot P.* // Ibid. — 1973. — Vol. 33. — P. 2913—2920.
  69. *Waron M., Lafra S., Ungar-Waron H.* // J. clin. Chem. clin. Biochem. — 1981. — Vol. 19. — P. 870.
  70. *Yamamoto M.* // Acta haemat. Jap. — 1969. — Vol. 32. — P. 366—376.
  71. *Yamashoji S., Kajimoto G.* // FEBS Lett. — 1983. — Vol. 152. — P. 168—170.

Поступила 17.04.85

УДК 612.015.1:577.152.199]-08

П. И. Лукиенко, М. И. Бушма

## БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ МОНООКСИГЕНАЗ И ПУТИ УПРАВЛЕНИЯ ИХ АКТИВНОСТЬЮ

Отдел регуляции обмена веществ АН БССР, Гродно

*Оксигеназы* — ферменты, активирующие молекулярный кислород и катализирующие включение одного (монооксигеназы) или двух (диоксигеназы) атомов кислорода в молекулу субстрата. Оксигеназы требуют присутствия

доноров электронов (Д), в качестве которых используют обычно НАДФ·Н, реже НАД·Н, тетрагидрофолиевую или аскорбиновую кислоты. Монооксигеназная реакция происходит по уравнению:  $R + O_2 + ДН \rightarrow ROH + H_2O + Д$ .

При этом один атом кислорода включается в молекулу субстрата, другой восстанавливается до  $H_2O$ , т. е. фермент выполняет не только оксигеназную, но и оксидазную функцию. Поэтому монооксигеназы иногда называют оксидазами со смешанной функцией. Поскольку при окислении такого типа в молекуле субстрата образуется в конечном итоге  $OH$ , монооксигеназную систему называют также гидроксилирующей системой, а реакцию окисления — окислительным гидроксилированием.

В данной статье предметом рассмотрения является монооксигеназная система, которая широко распространена в различных биологических объектах (у животных, насекомых, в микроорганизмах, растениях, дрожжах и т. д.).

У животных эта ферментная система локализована преимущественно в мембранах эндоплазматического ретикула клеток различных органов и тканей, но наиболее активна она в печени. Моноксигеназы, ответственные за синтез кортикостероидов, локализованы в мембранах митохондрий клеток надпочечников.

Моноксигеназная система эндоплазматического ретикула гепатоцитов образует НАДФ·Н- и НАДН-зависимую редокс-цепь [1]. Более подробно изучена первая из них, с функционированием которой и связано главным образом окислительное гидроксилирование субстратов. НАДФ·Н-зависимой редокс-цепи в этом процессе отводится второстепенная роль.

НАДФ·Н-зависимая цепь состоит по крайней мере из двух ферментов — НАДФ·Н-специфического флавопротеида (НАДФ·Н-цитохром Р-450-редуктаза, НАДФ·Н-цитохром с-редуктаза, НАДФ·Н-феррицитохром с-оксидоредуктаза, КФ 1.6.2.4) и цитохрома Р-450 (КФ 1.14.14.1).

НАДФ·Н-специфический флавопротеид синтезируется на рибосомах эндоплазматического ретикула. Молекула его содержит 1 моль ФАД и 1 моль флавиномононуклеотида на 1 полипептидную цепь массой 69 000 Д [66]. Оба флавина являются центрами, акцептирующими электроны от НАДФ·Н. Главная функция НАДФ·Н-специфического флавопротеида состоит в переносе электронов от НАДФ·Н к цитохрому Р-450. Кроме того, фермент обладает способностью самостоятельно ка-

тализировать некоторые оксигеназные и редуктазные реакции, участвовать в реакциях перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот [1, 14].

Цитохром Р-450 — гемопротейд, обладающий свойством взаимодействовать с субстратом окисления, активировать кислород и внедрять его в субстрат. Именно на цитохроме Р-450 происходят реакции гидроксилирования [1]. Обнаружено множество форм этого фермента, чем и объясняется возможность его связываться с многочисленными субстратами и участвовать в их метаболизме. Эта множественность фермента носит групповой характер, т. е. одна изоформа цитохрома Р-450 взаимодействует не с одним субстратом, а с группой веществ. В группу могут входить различные по химическому строению и происхождению вещества. Например, эндогенные и экзогенные вещества могут взаимодействовать с одной изоформой цитохрома [9].

В функции гидроксилирующей системы важную роль выполняют фосфолипиды мембран эндоплазматического ретикула [14]. Фосфолипиды причастны практически ко всем стадиям гидроксилирования. Они необходимы для взаимодействия цитохрома Р-450 с субстратами, НАДФ·Х·ХН-специфическим флавопротеидом и кислородом, а также для переноса электронов от НАДФ·Н к цитохрому. Влияние фосфолипидов на активность гидроксилирующей системы эндоплазматического ретикула, вероятно, связано с физическим, а не с химическим воздействием. Их влияние может сводиться к изменению и стабилизации конформации цитохрома Р-450 [4], к изменению спинового состояния железа гемопротейда [3], а также вязкости липидного матрикса мембран эндоплазматического ретикула [1, 9, 14].

Гидроксилирующая система печени играет важную роль в жизнедеятельности организма. Она выполняет прежде всего пластическую функцию, участвуя в биосинтезе и деградации холестерина, в метаболизме стероидных гормонов, желчных кислот и других эндогенных веществ.

Аэробная фаза биосинтеза холестерина, начиная с превращения сквалена, происходит в мембранах эндоплазматического ретикула печени с участием НАДФ·Н-специфического фла-



вопротеида [57] и цитохрома Р-450 [9]. Сквален превращается в ланостерин, а ланостерин — в холестерин. По сути гидроксилирующая система эндоплазматического ретикулула клеток печени заканчивает биосинтез холестерина. В то же время эта система осуществляет и первые реакции окисления (деградации) холестерина в желчные кислоты. При этом с участием холестерина 7 $\alpha$ - и 12 $\alpha$ -гидроксилаз, типичных представителей семейства цитохрома Р-450 [53], происходит гидроксилирование его в 7-м и 12-м положениях.

Вполне вероятно, что от функционального состояния гидроксилаз может зависеть содержание холестерина в организме как в норме, так и при развитии атеросклероза [9].

Гидроксилазам эндоплазматического ретикулула печени принадлежит важная роль также в трансформации стероидных гормонов [23], которые превращаются в печени в более полярные соединения и выводятся из организма. В печени млекопитающих найдено несколько изоформ цитохрома Р-450, способных окислять половые гормоны и кортикостероиды в различных положениях.

Эстрадиол — в 2 $\alpha$ , 15 $\alpha$ , 16 $\alpha$ , 6 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 7 $\alpha$  [35]; прегненолон — в 2 $\alpha$ , 2 $\beta$ , 7 $\alpha$ , 7 $\beta$ , 16 $\alpha$  [28]; прогестерон — в 2 $\alpha$ , 6 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 7 $\alpha$ , 15 $\beta$ , 16 $\alpha$  [35]; тестостерон — в 1 $\beta$ , 2 $\beta$ , 6 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 7 $\alpha$ , 15 $\beta$ , 16 $\alpha$ , 18 $\alpha$  [35]; андростендион — в 6 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 7 $\alpha$ , 16 $\alpha$ , 18 $\alpha$  [35]; кортизол — в 2 $\alpha$ , 6 $\beta$  [35].

Процессы биотрансформации стероидных гормонов в эндоплазматическом ретикулуле клеток печени, по-видимому, могут играть важную роль в поддержании определенного уровня стероидов и, следовательно, в физиологическом статусе организма, а также в лечебном действии введенных гормонов.

Цитохром Р-450-зависимая гидроксилирующая система эндоплазматического ретикулула печени принимает участие в  $\omega$ -окислении природных насыщенных жирных кислот с образованием соответствующих  $\omega$ -оксикислот. Наиболее подробно исследовано окисление лауриновой кислоты в оксилауриновую [59].

Важную роль играет эта ферментная система в перекисном окислении липидов [1, 12, 14]. В реакции участвует как НАДФ·Н-специфический флавопротеид, так и цитохром Р-450 [1]. Поскольку перекисное окисление липи-

дов играет большую роль в развитии многих патологических состояний, старении и гибели клеток, то этой функции гидроксилазной системы в настоящее время уделяется значительное внимание [12].

Гидроксилазы могут катализировать распад целого ряда гидроперекисей: 17 $\alpha$ -гидроперекиси прогестерона, 17 $\alpha$ -гидроперекиси линолевой кислоты, гидроперекиси кумила, 7 $\beta$ - и 25-гидроперекисей холестерина, гидроперекиси жирных кислот [45].

Большую роль гидроксилирующая система выполняет в процессах активации витамина D (эргокальциферола, D<sub>2</sub> и холекальциферола, D<sub>3</sub>). В мембранах эндоплазматического ретикулула печени при участии витамина D<sub>3</sub>-25-гидроксилазы холекальциферол гидроксилируется по C<sub>25</sub> [44] с образованием 25-оксихолекальциферола, который является обязательным промежуточным продуктом для синтеза активной формы витамина — 1,25-диоксихолекальциферола, происходящего в клетках почек.

Наряду с участием в метаболизме упомянутых эндогенных веществ гидроксилирующая система эндоплазматического ретикулула печени выполняет защитную функцию, участвуя в биотрансформации чужеродных веществ (ксенобиотиков), в том числе большого класса лекарственных веществ, инсектицидов, пестицидов, канцерогенов и других экзогенных веществ.

Основными вариантами гидроксилирования ксенобиотиков являются следующие: ароматическое гидроксилирование —  $C_6H_5X \xrightarrow{[O]} HO-C_6H_4X$ ; алифатическое гидроксилирование —  $RCH_3 \xrightarrow{[O]} RCH_2-OH$ ; О-деалкилирование —  $ROCH_3 \xrightarrow{[O]} RCH_3-OH \rightarrow ROH + HCHO$ ; ; N-деалкилирование —  $RNHCH_3 \xrightarrow{[O]} RNHCH_2OH \rightarrow RNH_2 + HCHO$ ; дезаминирование —  $R_2CHNH_2 \xrightarrow{[O]} R_2C(OH)NH_2 \rightarrow R_2CO + NH_3$ ; сульфокисление —  $RSR \xrightarrow{[O]} [RS + (OH)R'] \rightarrow RSOR' + H^+$  [18].

В результате гидроксилирования вещества превращаются в более полярные, водорастворимые соединения, легко выводимые из организма. Как правило, эти продукты гидроксилирования имеют меньшую фармакологическую активность и токсичность.

Наряду с этим в процессе метаболизма ксенобиотиков могут образовываться активные продукты (эпоксиды, N-, S-оксиды, радикалы), которые способны взаимодействовать с макромолекулами и повреждать их. Они стимулируют реакции мутагенеза, тератогенеза, канцерогенеза, могут быть причиной лекарственной и другого рода аллергии, оказывать токсическое действие на клетки [2].

Учитывая важную роль гидроксилирования в физиологии и патологии организма, возможность познания и управления им следует отнести к одной из основных задач современной фармакологии и медицины.

К настоящему времени обнаружено большое число лекарственных веществ и других ксенобиотиков, обладающих свойством увеличивать (индуцировать) или тормозить ферментную активность различных гидроксилаз [8, 13].

К числу стимуляторов гидроксилирующей системы печени могут быть отнесены следующие широко известные фармакологические вещества: фенобарбитал, ноксирон, галонеперидол, мепротан, аминазин, диазепам, элениум, амидопирин, бутадии, дифенин, фенацетин, резерпин, рифампицин, гризеофульвин, кортизон, прогестерон, триамцинолон, бутамид и др. Индуцирующее действие этих веществ обычно проявляется при многократном введении. В основе индукции лежит увеличение синтеза ферментного белка или торможение его распада [13].

В результате индукции микросомальных ферментов может возрасти скорость трансформации как самих индукторов, так и других ксенобиотиков, а также некоторых эндогенных веществ. Например, после многократного введения фенобарбитала, бутадии и дифенина обнаружено увеличение метаболизма стероидных гормонов и холестерина [8].

Сделана попытка применения производного ДДТ, а также дифенилгидантоина для лечения больных с болезнью Иценко — Кушинга [69].

Выраженное увеличение экскреции с мочой 6-β-гидрооксикортизола наблюдали после назначения этим больным фенилбутазона и фенобарбитала [30]. У больных с отравлением фенобарбиталом назначение ДДТ (внутри) по 5 г масляного раствора приводило к исчезновению признаков интоксикации [62].

Большой интерес представляет возможность фармакологического контроля деградации холестерина, поскольку это дало бы хорошие возможности для лечения гиперхолестеринемии.

В этом плане интересные результаты получены Р. И. Салгаником и соавт. [21], показавшими усиление гидроксилирования холестерина в печени крыс в результате индукции фенобарбиталом, 3-ацетат-16-изотиоцианопрегненолоном, 16-дегидропрегненолоном и прегненолон-16-карбонилнитрином холестерин-7α-гидроксилазы, лимитирующей синтез желчных кислот из холестерина. Однако у кроликов фенобарбитал такого действия не оказывал [10].

Поиски специфических индукторов холестерин-7α-гидроксилазы продолжаются. Полагают [49], что их следует искать среди производных метилхолантрена и бензофлавона.

Кроме терапевтического, индукция может иметь и нежелательный эффект. При участии гидроксилаз эндоплазматического ретикула печени метилдофа, хлороформ, галотан (фторотан), кокаин, фурсемид и парацетамол превращаются в высокотоксичные метаболиты, которые могут вызвать тяжелые поражения печени [29, 32, 33, 39, 51, 52]. Комбинация вышеуказанных лекарств с индукторами микросомальных ферментов приводит к усилению их гепатотоксичности.

В эксперименте на животных, а также при клиническом исследовании на больных наряду с индукторами микросомальных гидроксилаз обнаружен целый ряд их репрессоров. К ним, в частности, можно отнести такие фармакологические препараты, как фторотан, этаперазин, парацетамол, сультам, меридил, метандростенолон, клофибрат, тетурам, левомецетин, изониазид, параминосалициловая кислота (ПАСК), ряд рентгеноконтрастных веществ и др. [8, 22].

По характеру действия ингибиторы цитохрома Р-450 подразделяются на следующие группы [64]:

1) прямые обратимые (СО, NO, изотианиды, анионы, спирты, эфиры, лактоны, окисленные стероиды, фенолы, хиноны, производные пиридина, производные амидазола и других пятичленных гетероциклов, эллиптицины, бензофлавоны);

2) не прямые обратимые, воздействующие на цитохром своими метаболита-

ми, которые образуют с ним комплекс (производные метилendioксибензола, арилалкиламины и алкиламины, SKF-525 A и сходные соединения, ароматические амины, N-оксисоединения и гидразины);

3) обратимые (ингибирование субстратом);

4) необратимые, вызывающие деструкцию цитохрома Р-450 (полигалоалканы, олифены, алиены, производные ацетиленов, циклопропиламины, тиоловые и серосодержащие соединения и др.);

5) ингибиторы, нарушающие синтез и (или) деградацию Р-450 (ионы металлов, органические вещества, нарушающие метаболизм гема).

Наиболее активным и специфичным ингибитором цитохрома Р-450, вызывающим угнетение метаболизма многих ксенобиотиков, является 2-диэтиламиноэтиловый эфир 2,2-дифенилвалериановой кислоты (SKF-525 A), который способен значительно усиливать действие ряда лекарственных веществ, в частности снотворное действие барбитуратов [48].

Дикумарол, сульфазен, диоксикумарин, левомецитин, фенилбутазон, сульфизоксазол снижают метаболизм толбутамида, хлорпропамида (хлорцикламид) и ацетогексамида и усиливают их гипогликемическое действие.

Сультам, дикумарин, изониазид, хлорамфеникол, сульфаметизол, ПАСК, галотан, метилфенидат, фенирамидол, дисульфирам и бензодиазепины тормозят метаболизм дифенилгидантоина; метилфенидат уменьшает биотрансформацию примидона, а дикумарол, изониазид и метилфенидат — фенотербита [40—42, 46, 47, 54, 55].

Левомецитин, фенирамидол, метилфенидат, дисульфирам, ацетаминифен, оксифенбутазон, фенилбутазон, метандростенолон, клофибрат и атромид угнетают активность ферментов печени, разрушающих антикоагулянты, и, следовательно, потенцируют их действие [26, 31, 34, 36—38, 56, 58, 61, 63, 65, 67].

Значительно ингибируют ферменты лекарственного метаболизма актиномицин D, пурамицин, четыреххлористый углерод — вещества, тормозящие синтез ДНК и РНК [16].

Из гормональных препаратов репрессирующее действие на окислительные ферменты микросом оказывает метандростенолон. Показано [68], что одно-

временное назначение его с оксифенбутазоном приводит к увеличению в крови уровня последнего более чем на 30 %. Преднизон подобного действия не оказывает.

Из приведенных литературных данных следует, что как индукция, так и репрессия микросомальных ферментов гидроксидирующей системы эндоплазматического ретикулаума печени может оказать существенное влияние на фармакологическую активность и токсичность лекарственных веществ. Знания о действии веществ на ферменты печени, метаболизирующие ксенобиотики, позволят в ряде случаев избежать тяжелых побочных действий лекарств на организм.

Применение химических индукторов и ингибиторов в качестве регуляторов функции монооксигеназной системы, по-видимому, может иметь ограниченное значение вследствие широкого спектра их фармакологического действия. Кроме того, как чужеродные вещества они безразличны для организма.

Более физиологический путь управления этой системой — воздействие через общие метаболические процессы, обеспечивающие ее необходимыми для функции кофакторами. К таким воздействиям относятся, в частности, пищевые факторы, в том числе витамины.

Ряд витаминов имеет прямое или косвенное отношение к образованию и функции тех или иных компонентов гидроксидирующей системы. Для реакций гидроксидирования необходим в качестве источника электронов НАДФ·Н, основным поставщиком которого является пентозофосфатный цикл расщепления углеводов [15]. Если учесть, что в его функционировании важную роль играет тиаминдифосфат — зависящая транскетотлаза, то можно полагать, что тиамин имеет важное значение в обеспечении гидроксидирующей системы НАДФ·Н. Для синтеза НАДФ·Н и НАДН-специфических флавопротеидов, переносящих электроны к цитохрому, необходим рибофлавин [27].

В синтезе гемовой части цитохрома Р-450 может принимать участие целый ряд витаминов. Исходными соединениями в биосинтезе гема являются сукцинил-КоА и глицин. Сукцинил-КоА как промежуточный продукт цикла Кребса образуется, как известно, из



α-кетоглутаровой кислоты и CoA-SH. Этот процесс катализируется ферментным α-кетоглутаратдегидрогеназным комплексом, в функции которого важную роль играют тиамин в виде тиаминдифосфата, липоевая кислота и флавинадениндинуклеотид [15]. Сукцинил-CoA может синтезироваться также из пропионил-CoA при участии биотин- и витамин B<sub>12</sub>-зависимых ферментов (пропионил-CoA-карбоксилазы и метилмалонил-CoA-мутаза соответственно).

Глицин образуется преимущественно из серина под действием сериноксиметилтрансферазы, коферментом которой является пиридоксальфосфат (ПАЛФ); в этой реакции принимает участие и тетрагидрофолиевая кислота [7].

Сукцинил-CoA и глицин взаимодействуют в реакции, катализируемой митохондриальным ферментом — синтазой 5-аминолевулиновой кислоты, коферментом которой является ПАЛФ [7]. В результате образуется 5-аминолевулиновая кислота, являющаяся лимитирующим субстратом в синтезе гема. Таким образом, к синтезу гемовой части цитохрома P-450 причастны витамины B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, фолиевая и липоевая кислоты, B<sub>12</sub>, а также пантотеновая кислота (при образовании CoA).

Поскольку в образовании предшественников белков принимают участие тиамин [17], фолиевая кислота [24], витамин B<sub>12</sub> [19] и другие витамины, можно полагать, что изменение их фонда может отразиться на биосинтезе и ферментного белка.

Зависимость функции гидроксилаз от содержания в мембранах эндоплазматического ретикула фосфолипидов и холестерина [2, 14] открывает еще один путь регуляции этой оксигеназной системой.

Поскольку в синтезе фосфолипидов, а также холестерина ведущая роль принадлежит ацетил-CoA, то обеспеченность организма витаминами, участвующими в биосинтезе последнего, а именно пантотеновой и липоевой кислотами, тиамин, рибофлавин и ниацин, имеет важное значение для регуляции содержания в мембранах фосфолипидов и холестерина [50].

На липидный компонент мембран могут оказывать влияние также витамины с анти- и прооксидантным действием (витамины A, C, D, E).

Данные о влиянии витаминов на активность этой ферментной системы животных и тем более человека малочисленны. Они рассмотрены в ряде обзоров [6, 25] и монографии [8].

Показано, что при недостаточности витамина A [8], B<sub>2</sub> [6], C [70] и E [43] снижается активность ферментов микросомального окисления. Введение животным витаминов при соответствующем гиповитаминозе нормализует их функцию.

Введение здоровым животным витаминов K<sub>3</sub> [5], PP [11] и биотина [20] приводит к увеличению активности ферментов микросомального окисления.

Накопление данных о роли монооксигеназной системы в физиологии и патологии клетки и путях регуляции функции этой ферментной системы имеет не только теоретическое, но и важное практическое значение, так как способствует решению ряда задач, связанных с разработкой средств профилактики и терапии заболеваний, обусловленных, например, накоплением холестерина в организме, охраной внутренней среды организма от повреждающего действия экзогенных химических веществ, а также задач, связанных с разработкой более рациональной комбинированной химиотерапии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. М., 1975.
2. Арчаков А. И. Оксигеназы биологических мембран. М., 1983.
3. Ахрем А. А., Киселев П. А., Кисель М. А. и др. — Докл. АН СССР, 1979, т. 245, № 3, с. 234—238.
4. Ахрем А. А., Кисель М. А., Усанов С. А. и др. — Докл. АН БССР, 1979, т. 23, с. 276—279.
5. Бушма М. И., Лукиенко П. И. — Фармакол. и токсикол., 1983, № 1, с. 65—67.
6. Коньшев В. А., Нестерин М. Ф. — Там же, 1980, № 2, с. 238—244.
7. Крю Ж. Биохимия. Медицинские и биологические аспекты: Пер. с франц. М., 1979, с. 428—429; 459—464.
8. Лакин К. М., Крылов Ю. Ф. Биотрансформация лекарственных веществ. М., 1981.
9. Лопухин Ю. М., Арчаков А. И., Владимиров Ю. А., Коган Э. М. Холестериноз. М., 1983, с. 154—167.
10. Лопухин Ю. М., Арчаков А. И., Халилов Э. М. и др. — Кардиология, 1980, № 8, с. 111—116.
11. Лукиенко П. И., Бушма М. И. — Фармакол. и токсикол., 1982, № 2, с. 78—81.
12. Лукьянова Л. Д., Балмуханов Б. С., Уголев А. Т. Кислородзависимые процессы в клетке и ее функциональное состояние. М., 1982, с. 117—194.

13. Ляхович В. В., Цырлов И. Б. Индукция ферментов метаболизма ксенобиотиков. Новосибирск, 1981.
14. Ляхович В. В., Цырлов И. Б. Структурные аспекты биохимии монооксигеназ. Новосибирск, 1978.
15. Малер Г., Кордес Ю. Основы биологической химии: Пер. с англ. М., 1970.
16. Муравьев И. А., Козьмин В. Д., Кудрин А. И. Несовместимость лекарственных веществ. М., 1978.
17. Островский Ю. М. — В кн.: Витамины / Под ред. М. И. Смирнова. М., 1974, с. 195—199.
18. Парк Д. В. Биохимия чужеродных соединений: Пер. с англ. М., 1973, с. 44—65.
19. Познанская А. А. — В кн.: Витамины / Под ред. М. И. Смирнова. М., 1974, с. 278—281.
20. Покровский А. А. Метаболические аспекты фармакологии и токсикологии пищи. М., 1979, с. 108.
21. Салганик Р. И., Манакова Н. М., Семенова Л. А. — Вopr. мед. химии, 1977, № 4, с. 468—478.
22. Сергеев П. В., Большев В. Н., Халилов Э. М. — Фармакол. и токсикология, 1977, № 4, с. 445—447.
23. Сергеев П. В., Ведерникова Н. Н., Майский А. И. и др. — Там же, 1973, № 3, с. 363—371.
24. Степанова Е. И. — В кн.: Витамины / Под ред. М. И. Смирнова. М., 1974, с. 315—320.
25. Сушко Л. И., Лукиенко П. И. — Фармакол. и токсикол., 1979, № 5, с. 567—570.
26. Aggeler P. M., O'Reilly R. A., Leong L. et al. — New Engl. J. Med., 1967, vol. 276, p. 496—501.
27. Baggit J. P., Langdon R. G. — J. biol. Chem., 1970, vol. 245, p. 5888—5896.
28. Breuer H., Nocke L., Pangels G. — Acta endocr. (Kbh.), 1960, vol. 34, p. 359—367.
29. Brodie B. — In: Pharmacology and Future Man. Basel, 1973, vol. 2, p. 58—59.
30. Burstein S., Klaiber E. L. — J. clin. Endocr., 1965, vol. 25, p. 293—296.
31. Carter S. A. — New Engl. J. Med., 1965, vol. 273, p. 423—426.
32. Cousins M. J., Gourlay G. K., Sharp J. H. — Lancet, 1978, vol. 2, p. 1197—1201.
33. Diday M. — J. Med. Lyon, 1980, vol. 61, p. 383—384, 387—388.
34. Dollery C. T., George C. F., Orme M. L. E. — In: Clinical Effect of Interaction Between Drugs. New York, 1974, p. 117—151.
35. Dorfman R. I., Ungar F. Metabolism of Steroids Hormones. New York, 1965.
36. Eisen M. J. — Casl Lek. cesk., 1978, vol. 17, p. 533—534.
37. Eisen M. J. — J. A. M. A., 1964, vol. 189, p. 64—65.
38. Fox S. L. — Ibid., vol. 188, p. 320—321.
39. Freeman R. W., Harbison R. D. — In: Biological Oxidation of Nitrogen. Amsterdam, 1978, p. 341—351.
40. Gerrellson L. K., Perel J. M., Dayton P. G. — J. A. M. A., 1969, vol. 207, p. 2053—2056.
41. Hansen J. M., Kristensen M., Skovsted L. — Epilepsia, 1968, vol. 9, p. 17—22.
42. Hansen J. M., Kristensen M., Skovsted L. et al. — Lancet, 1966, vol. 2, p. 265—266.
43. Horn L. R., Machlin L. J., Barker M. O. et al. — Arch. Biochem., 1976, vol. 172, p. 270—277.
44. Horsting M., De Luca H. F. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1969, vol. 36, p. 251—256.
45. Kato R. — Biochem. J., 1960, vol. 16, p. 221—223.
46. Kiorboe E. — Epilepsia, 1966, vol. 7, p. 246—249.
47. Kull H., Winters W., McDowell F. H. — Neurology (Minneapolis), 1966, vol. 16, p. 594—602.
48. Longshaw R. N. — Drug Intell., 1973, vol. 7, p. 263—270.
49. Lu A. Y. H., Wes S. R. — Pharmacol. Rev., 1980, vol. 31, p. 277—295.
50. Mahboobs S. — Nutr. a Metab., 1975, vol. 19, p. 91—95.
51. Mitchel J. R., Jollow D. J. — Israel J. med. Sci., 1974, vol. 10, p. 312—318.
52. Mitchel J. R., Thorgerirsson S. S., Potter W. Z. et al. — Clin. Pharmacol. Ther., 1974, vol. 16, p. 676—684.
53. Milton J. R., Scholan N. A., Boyd G. S. — Europ. J. Biochem., 1971, vol. 20, p. 569—579.
54. Murray F. J. — Amer. Rev. resp. Dis., 1962, vol. 86, p. 729—732.
55. Olesen O. V. — Acta pharmacol. (Kbh.), 1966, vol. 24, p. 317—322.
56. Oliver M. F., Roberts S. D., Hayes D. et al. — Lancet, 1963, vol. 1, p. 143—144.
57. Ono T., Bloch K. — J. molec. Chem., 1975, vol. 250, p. 1571—1579.
58. O'Reilly R. A. — Clin. Res., 1970, vol. 18, p. 177—179.
59. Orrenius S., Thor H. — Europ. J. Biochem., 1969, vol. 9, p. 415—418.
60. Patel J. M., Pawar S. S. — Biochem. Pharmacol., 1974, vol. 23, p. 1467—1477.
61. Pyorala K., Kekki M. — Scand. J. clin. Lab. Invest., 1963, vol. 15, p. 367—374.
62. Rappolt R. T. — Industr. med. Surg., 1970, vol. 39, p. 319—323.
63. Solomon H. M., Schrogie J. J. — Metabolism, 1967, vol. 16, p. 1029—1033.
64. Testa B., Jenner P. — Drug. Metabol. Rev., 1981, vol. 12, p. 1—117.
65. Udall J. A. — Amer. J. Cardiol., 1969, vol. 23, p. 143—149.
66. Vermillion J. L., Coon M. J. — J. biol. Chem., 1979, vol. 253, p. 2694—2704.
67. Weiner M., Siddigui A. A., Bostanci N. et al. — Fed. Proc., 1965, vol. 24, p. 153—157.
68. Weiner M., Siddigui A. A., Shahani R. T. et al. — Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1967, vol. 124, p. 1170—1173.
69. Werk E. E., Sholiton L. J., Olinger C. P. — In: International Congress of Hormonal Steroids. New York, 1966, Ser. 3, p. 301—303.
70. Zannoni V. G., Lunch M. M. — Drug Metabol. Rev., 1973, vol. 2, p. 57—59.

К. В. Фомиченко, В. Ф. Ермаков

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЭССЕНЦИАЛЕ И ВИТОГЕПАТА КАК СТАБИЛИЗАТОРОВ МЕМБРАН ЛИЗОСОМ ПЕЧЕНИ

Институт физиологии АН БССР, Минск

В позднем онтогенезе развиваются функциональные, обменные и морфологические изменения во всех системах организма и в значительной мере снижаются его адаптационно-компенсаторные резервы. Среди причин, провоцирующих возрастные нарушения, выделяются в основном две главные: 1) «груз» ошибок в генетически важных молекулах; 2) накопление в клетках и затруднение эвакуации из них продуктов распада тех веществ, которые не являются чужеродными при нормальном функционировании органа, а присутствуют там в качестве обычных ингредиентов, участвуют в реакциях метаболизма и лишь тогда становятся токсичными, когда накапливаются в количествах, превышающих определенный предел.

В процессах разрушения отработавших свой лимит времени молекул биополимеров ведущее место занимают лизосомальные ферменты [1], и поэтому их значимость в биохимическом гомеостазе префинальной и финальной стадий постнатального онтогенеза чрезвычайно велика. Если к тому же учесть, что названные ферменты осуществляют и деструкцию синтезированных с ошибками молекул, становится очевидным, что в старости их функциональная роль приобретает превалирующее значение. В силу того, что ферменты катаболизма сосредоточены главным образом в лизосомах и лишены доступа к субстрату из-за мембранной «преграды», их активность во многом зависит от структурной целостности мембран [2].

Ранее мы установили, что активность кислой РНКазы, ДНКазы и других деполимераз в лизосомах, выделенных из печени старых крыс, как правило, оказывается повышенной по сравнению с активностью ферментов аналогичных субклеточных структур из печени зрелых животных, причем одним из факторов, провоцирующих такое изменение активности деполимераз, является лабилизация лизосомальных мембран [3]. С учетом всего изложенного выше

не лишена оснований попытка увеличить устойчивость мембран, воздействуя на организм корригирующими гериатрическими препаратами, проявляющими достаточно выраженную мембранотропность.

В качестве подобных препаратов были избраны эссенциале («Bosnaliek», СФРЮ) и витогепат (Минское производственное объединение «Медпрепараты»), близкий по входящим в него ингредиентам к известному в гериатрии ампевиту, но в отличие от последнего вызывающий несколько лучший лечебный эффект [4].

Эссенциале содержит в своем составе диглицеридный эфир холинфосфорной кислоты природного происхождения в комбинации с ненасыщенными жирными кислотами — линолевой (70 %), линоленовой и олеиновой, а также пиридоксинхлорид, цианкобаламин, пантотенат и никотинамид. Именно наличие в составе эссенциале большого количества липидных компонентов заставляет предполагать возможность его направленного влияния на лизосомальные мембраны. Примерно такого же действия следует ожидать и от получаемого из свежей печени крупного рогатого скота витогепата. Использование такого рода препаратов в гериатрической практике оправдано, поскольку в них содержатся в оптимальных сочетаниях необходимые для организма жирные кислоты, витамины, аминокислоты и другие вещества [5, 6].

### Методика

Опыты проводили на белых крысах-самцах линии Вистар стадного разведения, находившихся на стандартном рационе вивария. Согласно общепринятой классификации [7], животных разделили на зрелых (14—16 мес) и старых (26—28 мес).

Для получения высокоочищенной фракции лизосом применяли метод пагрузки их железом путем введения крысам внутримышечно в течение 3 нед препарата коллоидного железа феррум лек (ЛЕК, СФРЮ). Препарат содержит полиизомальтозу, являющуюся носителем  $Fe^{3+}$ . Каждое животное получало 500 мг  $Fe^{3+}$  в виде 15 инъекций при разовой дозе 33,3 мг  $Fe^{3+}$  на 1 кг массы. Вследствие

аккумуляции гранул железа во вторичных лизосомах печени их плавучая плотность увеличивается до 1,28 г/см<sup>3</sup>, что позволяет легко выделить их высокоочищенную фракцию с помощью ультрацентрифугирования в линейном градиенте плотности сахарозы [8], отделив от митохондрий и пероксисом.

С этой целью навеску печени гомогенизировали на холоде в 0,25 М сахарозе, приготовленной на трис-буфере pH 7,4 с добавлением ЭДТА в соотношении 1:9. Гомогенат центрифугировали 10 мин при 600 g. Осадок ресуспендировали в 0,25 М сахарозе и вновь центрифугировали 10 мин при 600 g. Оба надосадка соединяли и центрифугировали 7,5 мин при 6000 g. Полученный осадок ресуспендировали в 0,25 М сахарозе из расчета 0,5 г печени в 1 мл, насливали на линейный градиент сахарозы 1,4—2,24 М [12] и центрифугировали 120 мин при 100 000 g на центрифуге ВАК-601. Полученный осадок лизосом ресуспендировали 0,25 М сахарозой и использовали для аналитических процедур.

Животные были распределены на 4 группы: 1-ю и 2-ю группы составили соответственно зрелые и старые крысы, которым вводили только коллоидное железо, в 3-ю группу входили старые животные, которым наряду с коллоидным железом в те же сроки вводили эссенциале, крысам 4-й группы, аналогичной по составу 3-й, инъекцировали витогенат и коллоидное железо.

Дозу эссенциале стандартизировали по цианкобаламину, при этом однократная доза содержала 0,286 мкг цианкобаламина на 1 кг массы животного. Перед внутримышечной инъекцией препарат разводили в 5 % глюкозе в соотношении 1:1. Введение осуществляли в течение 21 сут с перерывом 2 сут после каждых 5 инъекций.

Внутримышечное введение витогената тоже стандартизировали по содержанию цианкобаламина. Разовая доза содержала 0,27 мкг цианкобаламина на 1 кг массы животного. Введение осуществляли по схеме, принятой для эссенциале.

В лизосомах печени подопытных и контр-

рольных крыс изучали общую и неседиментируемую активность кислой РНКазы (КФ 3.1.4.23), кислой ДНКазы (КФ 3.1.4.6), кислой фосфатазы (КФ 3.1.3.2), катепсина D (КФ 3.4.23.5), гиалуронидазы (гиалуронат-эндоглюкозаминидазы, КФ 3.2.1.35), по описанным методам [9, 10—12, 19]. Общую активность ферментов определяли после преинкубации лизосом с тритоном X-100 в конечной концентрации 0,1 % при 25 °C в течение 15 мин [2]. Для определения неседиментируемой активности свежесыведенную суспензию лизосом инкубировали 15 мин при 25 °C в среде выделения, центрифугировали 30 мин при 100 000 g и полученный надосадок использовали для анализа. Неседиментируемую активность выражали в процентах от общей, что служит качественным критерием сохранности субклеточных структур [2, 14].

Белок определяли по методу Лоури [13].

## Результаты и обсуждение

Полученные данные о действии витогената и эссенциале на общую активность лизосомальных ферментов представлены в табл. 1, а на неседиментируемую активность — в табл. 2.

У старых крыс 3-й группы, которым вводили эссенциале, наблюдается статистически значимое уменьшение общей активности всех изученных ферментов, кроме кислой РНКазы. Максимальное снижение активности найдено в случае гиалуронидазы — почти на 60 % по сравнению с ее активностью в лизосомах печени старых животных, не получавших эссенциале. Снижение активности кислой ДНКазы, кислой фосфатазы и катепсина D также хорошо выражено и колеблется в пределах 47—51 % (см. табл. 1).

Таблица 1

Общая активность ферментов в лизосомах печени зрелых и старых крыс (в нкаталах на 1 мг белка

Фермент	Зрелые интактные крысы	Старые интактные крысы (контроль)	Старые крысы, которым вводили эссенциале	Старые крысы, которым вводили витогенат
Кислая РНКазы	0,0019±0,00045 (79,1) P < 0,001	0,0243±0,0010 (100)	0,0209±0,0017 (85,7) 0,1 > P > 0,05	0,0258±0,00265 (106) > 0,1
Кислая ДНКазы	0,0049±0,0002 (76,5) P < 0,001	0,0064±0,00028 (100)	0,0031±0,00009 (49,1) P < 0,001	0,0039±0,00057 (59,9) P < 0,001
Кислая фосфатаза	14,21±0,860 (85,4) P < 0,05	16,64±0,430 (100)	9,50±1,110 (57,0) P < 0,001	11,97±0,880 (71,9) P < 0,001
Катепсин D	3,850±0,140 (54,6) P < 0,001	7,050±0,160 (100)	3,780±0,240 (53,6) P < 0,001	3,960±0,130 (56,2) P < 0,001
Гиалуронидаза	0,095±0,0028 (82,6) P < 0,01	0,115±0,0067 (100)	0,050±0,008 (41,3) P < 0,001	0,108±0,007 (91,7) P > 0,1

Примечание. В скобках активность ферментов (в % к контролю) у крыс 2-й группы. Величина P приводится также по сравнению со 2-й группой старых крыс, не получавшей препаратов.

Таблица 2

Неседиментируемая активность (в % от общей) в лизосомах печени зрелых и старых крыс

Фермент	Зрелые intactные крысы	Старые intactные крысы (контроль)	Старые крысы, которым вводили эссенциале	Старые крысы, которым вводили витогепат
Кислая РНКаза P	6,84 <0,001	10,6	10,0 0,1 > P > 0,05	10,2 >0,1
Кислая ДНКаза P	9,8 <0,001	16,4	10,6 <0,001	11,9 <0,001
Кислая фосфатаза P	9,5 <0,001	15,0	10,8 <0,001	12,8 <0,01
Катепсин D P	5,1 <0,001	9,5	6,7 <0,001	6,6 <0,001
Гиалуронидаза P	3,7 <0,001	5,87	4,5 <0,001	5,6 >0,1

При введении витогепата в печени старых животных также происходит достоверное снижение общей активности кислой ДНКазы (на 40 %), кислой фосфатазы (на 28 %) и катепсина D (на 43 %), в связи с чем активность этих ферментов приближается к уровню, отмеченному у крыс зрелого возраста.

Анализ данных табл. 2 показывает, что неседиментируемая активность в лизосомах, полученных из печени старых животных, нарастает по сравнению с выявленной у взрослых особей. При введении эссенциале прослеживается уменьшение неседиментируемой активности. Аналогичные изменения наблюдаются при действии витогепата, хотя степень снижения неседиментируемой активности кислой ДНКазы и кислой фосфатазы в этом случае несколько меньше, чем при воздействии эссенциале, а для гиалуронидазы и кислой РНКазы изменений активности не выявлено. Это свидетельствует о большем влиянии эссенциале на изменения активности изученных ферментов. При этом следует отметить, что снижение неседиментируемой активности ферментов является признаком, указывающим на увеличение стабильности лизосомальных мембран.

Выявленные эффекты объясняются скорее всего общим действием указанных лекарственных препаратов, в особенности тем, что витогепат нормализу-

ет функцию печени, оказывает положительное влияние на процессы регенерации гепатоцитов [6]. При действии эссенциале наблюдается снижение содержания холестерина, липопротеидов, триглицеридов, стабилизируется уровень ненасыщенных жирных кислот в плазме крови [15]. Следует также иметь в виду, что содержащиеся в эссенциале богатые полиеновыми кислотами холинфосфолипиды являются важнейшими компонентами мембран клеток и субклеточных органелл [16], необходимыми для поддержания их стабильности и нормального метаболизма.

Как было показано, введение старым животным обоих препаратов сопровождается снижением в той или иной степени общей и неседиментируемой активности лизосомальных ферментов, в результате чего их активность приближается к таковой у взрослых животных. Иными словами, интенсивность и направленность функционирования всего конгломерата лизосомальных ферментов в период старости под действием этих препаратов как бы возвращается в предшествующий возрастной период. Роль стабилизации мембран здесь несомненна, однако отнести все это за счет «упрочения» мембран, видимо, нельзя, поскольку латентность или активация лизосомальных ферментов не является результирующей только этих процессов. Известно, что названные параметры зависят и от ряда факторов, регулирующих транспорт субстратов в органеллы, наличия активирующих ионов и многого другого, что так или иначе может повлиять на активность ферментов [17].

В отношении применявшихся препаратов, на наш взгляд, допустим следующий комплекс вариантов их оптимизирующего действия: проникновение внутрь лизосом, встраивание в мембрану и, вследствие этого, изменение ее проницаемости, создание более адекватных условий для функционирования ферментов, модификация структуры мембран, влияние на мембраны лизосом путем модуляции действия посредников, выполняющих медиаторную роль [18] и др.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Glaumann H., Ahlberg J., Marzella L. // Europ. J. Cell Biol. — 1980. — Vol. 22. — P. 200—205.



2. Покровский А. А., Тутельян В. А. Лизосомы. — М., 1976.
3. Фомиченко К. В., Ермаков В. Ф. // Белорусское о-во геронтологов и гернатов. Съезд, 1-й: Тезисы докладов. — Минск, 1983. — С. 186.
4. Западнюк В. И. Гернаторическая фармакология. — Киев, 1977.
5. Западнюк Б. В. // Современные проблемы лечения и реабилитации. — Киев, 1979. — С. 178—179.
6. Амбалов Ю. М. // Труды Ростов н/Д. мед. ин-та. — 1975. — Т. 72. — С. 75—80.
7. Западнюк В. И. // Геронтология и гернатория. Ежегодник 1969—1970. — Киев, 1970. — С. 433—438.
8. Arborg B., Ericsson L., Glaumann H. // FEBS Lett. — 1973. — Vol. 32. — P. 190—194.
9. Кравченко Л. В. // Некоторые проблемы медицинской энзимологии. — М., 1971. — С. 31—33.
10. Vaes G., Jacobs P. // Biochem. J. — 1965. — Vol. 97. — P. 389—392.
11. Vaes G., Jacobs P. // Ibid. — P. 380—388.
12. Arborg B., Glaumann H., Ericsson L. // Lab. Invest. — 1974. — Vol. 30. — P. 664—673.
13. Lowry A., Rosebrough N., Farr A., Randall R. // J. biol. Chem. 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
14. Рысин С. А., Пенкратова Н. Н. // Вопр. мед. химии. — 1980. — № 6. — С. 752—755.
15. Потекаева С. А. // Оптимизация ведения больных и вопросы клинической фармакологии. — М., 1978. — С. 167—169.
16. Погромов А. П., Ольбинская Л. И., Антоненко И. И. и др. // Клин. мед. — 1978. — № 10. — С. 97—101.
17. Hosteller K., Matsuzawa Y. // Biochem. Pharmacol. — 1981. — Vol. 30. — P. 1121—1126.
18. Ницого В. Д., Дунаев В. Г. // Фармакол. и токсикол. — 1978. — № 6. — С. 730—750.
19. Лизосомы. Методы исследования / Под ред. Дж. Дингла: Пер. с англ. — М., 1980.

Поступила 25.05.85

# EFFICIENCY OF ESSENTIALE AND VITO- HEPATUM AS STABILIZERS OF LIVER TIS- SUE LYSOSOMAL MEMBRANES

K. V. Fomichenko, V. F. Ermakov

Institute of Physiology, Academy of Sciences  
of the Byelorussian SSR, Minsk

Essentiale or vitohepatum were administered into 26-28 months old Wistar rats to stabilize the lysosomal membranes. Administration of essentiale (cyanocobalamine standardization at a dose of 0.286  $\mu\text{g/kg}$ ) within 21 days led to a decrease in total activity of acid DNAase, acid phosphatase, cathepsin D, hyaluronidase without distinct changes in acid RNAase activity. Vitohepatum administered similarly (cyanocobalamine standardization at a dose of 0.27  $\mu\text{g/kg}$ ) caused a decrease in total activity of lysosomal enzymes acid DNAase acid phosphatase, cathepsin D, did not affect hyaluronidase and acid RNAase activities. The administration of the both drugs was also accompanied by a decrease in non-sedimented activity of the enzymes studied.

УДК 616.379-008.64-085.357.631:577.175.62]-036.8-07:616.36-081.1

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

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ЭКДИСТЕРОНА, ТУРКЕСТЕРОНА И НЕРОБОЛА НА ФУНКЦИИ МИТОХОНДРИИ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДИАБЕТЕ

Институт химии растительных веществ АН Узбекской ССР, НИИ краевой медицины  
Минздрава Узбекской ССР, Ташкент

В настоящее время большой интерес привлекает к себе возможность использования при инсулинзависимом диабете анаболически активных веществ из классов фитоэкдистероидов и стероидных анаболических препаратов — синтетических аналогов мужских половых гормонов [11, 21]. Эти соединения за счет стимуляции белоксинтезирующих процессов в организме [8] повышают активность ряда ферментов, участвующих в углеводном обмене [10, 11], увеличивают число клеток инсулярного аппарата поджелудочной железы и повышают образование инсулина [14, 18]. Все это в конечном итоге приводит к значительному гипогликемическому эффекту [5, 9, 21]. Однако неизучен-

ным остается вопрос о влиянии фитоэкдистероидов и стераноболов на биоэнергетику клеток в этих условиях, хотя известно, что митохондрии часто являются первичной мишенью для некоторых диабетогенных агентов [15].

В связи с вышеуказанным мы изучали действие фитоэкдистероидов — экдистерона и туркестерона, а также стероидного анаболического препарата — неробола на процессы окислительного фосфорилирования, транспорт ионов кальция и функционирование полиферментных систем в митохондриях печени крыс с развившимся экспериментальным диабетом. Выбор соответствующего тест-объекта обусловлен тем, что именно в печени при диабете наблюда-

ются глубокие нарушения [1, 13], отражающиеся на всех обменных процессах в организме [3].

### Методика

Экдистерон и туркестерон были выделены из местного растительного сырья [4, 12]. Опыты проводили на крысах-самцах массой 150—200 г. Экспериментальный диабет у них вызывали подкожным введением аллоксана («Чешпарол», Чехословакия) в дозе 15 мг на 100 г массы тела. Введение крысам экдистерона и туркестерона производили в дозе 5 мг/кг, неробола — 10 мг/кг орально начиная через неделю после инъекции аллоксана с развитием у них стойкой гипергликемии. В каждую группу отбирали по 8—10 животных, сахар крови которых составлял 280—320 мг% (определяли ортотолуидиновым методом). Через 15 дней введения препаратов животных декапитировали, печень немедленно извлекали и использовали для выделения митохондрий [20]. Методы измерения скорости дыхания и параметров сопряжения митохондрий описаны ранее [1]. Поглощение кальция митохондриями изучали полярографическим методом [19]. Белок определяли по Лоури. Часть митохондрий замораживали и после оттаивания измеряли активность НАД·Н-дегидрогеназы (НАД·Н-ДГ) и сукцинатдегидрогеназы (СДГ), которую выражали в микромолях 2,6-дихлорфенолиндифенола на 1 мг белка митохондрий в 1 мин [17]. Действие фосфолипазы  $A_2$  (0,074 мкг на 1 мг белка) и трипсина (150 мкг на 1 мг белка) на активность флавопротеидных ферментов мембран митохондрий изучали при 20 °С в среде, содержащей 0,01 М трис-НСl pH 7,4 и 0,25 М сахарозу. При определении активности НАД·Н-ДГ в кювету спектрофотометра добавляли 2 мкмоль НАД·Н, для измерения активности СДГ — 10 мкмоль сукцината. Цифровой материал обрабатывали статистически.

### Результаты и обсуждение

Оценивая эффект исследуемых соединений, следует прежде всего отметить те изменения функционального состояния митохондрий печени, которые выявлены при аллоксановом диабете в условиях нашего эксперимента. Так, через 1 нед после введения аллоксана скорость дыхания митохондрий печени у подопытных животных существенно повышается, особенно значительно в состоянии  $V_4$ , что приводит к снижению величины коэффициентов ДК и АДФ/О (рис. 1). Одновременно происходит резкое увеличение кальцевой емкости митохондрий (рис. 2). Существенно сказался дефицит инсулина в организме и на активности исследуемых флавопротеидных ферментов дыхательной цепи митохондрий. Активность НАД·Н-ДГ оказалась сниженной на 25% ( $P <$

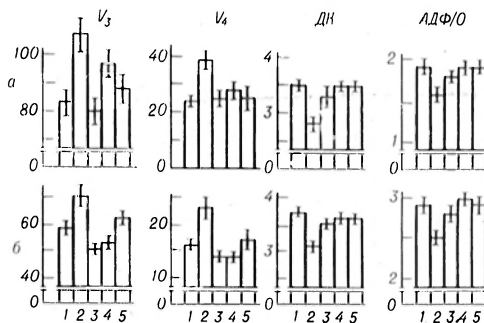


Рис. 1. Влияние фитоэкдистероидов и неробола на дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий печени при диабете.

Здесь и на рис. 3 и 4: а — сукцинат (10 мМ); б —  $\alpha$ -кетоглутарат (10 мМ). 1 — интактные животные; 2 — контрольные крысы; 3—5 — животные, получавшие экдистерон, туркестерон и неробол соответственно. Скорость дыхания в состояниях 3 и 4 выражали в наноатомах кислорода на 1 мг белка митохондрий в 1 мин. Отношение АДФ/О и ДК белка митохондрий в 1 мин. Здесь и на рис. 2: состав сред измерения был следующим: сахароза 0,15 М, KCl 12 мМ,  $KH_2PO_4$  5 мМ, трис-буфер 5 мМ pH 7,4, АДФ 200 мкМ.

$<0,05$ ), при этом активность СДГ возрастала на 42% ( $P < 0,05$ ). Одновременно ухудшились и качественные характеристики этих ферментов. Данные, представленные на рис. 3, свидетельствуют о том, что по мере инкубирования митохондрий из печени крыс с аллоксановым диабетом при 36 °С, фаза активации ферментов, наблюдающаяся при инкубации митохондрий печени интактных животных в течение 5 ч, довольно быстро сменялась их термодегградацией. Известно, что одной из причин пониженной стабильности ферментов дыхательной цепи митохондрий к действию тепла являются нарушения в структурном сопряжении между фосфолипидами и белками мембран, что обычно выражается в их большей доступности энзиматической атаке фосфолипаз и протеаз [2]. Это положение полностью подтверждается и в наших опытах. Так, активность НАД·Н-ДГ и СДГ при инкубации «разобщенных» митохондрий (рис. 4) из печени диабетических крыс с фосфолипазой  $A_2$  за одно и то же время снижается больше, чем в норме. Аналогичный вывод следует и из представленных на рис. 4 данных с действием трипсина на активность соответствующих ферментов.

Введение аллоксан-диабетическим крысам фитоэкдистероидов или неробола в течение 15 дней приводит к восстановлению окислительного фосфорилирования и кальций-транспортирующей

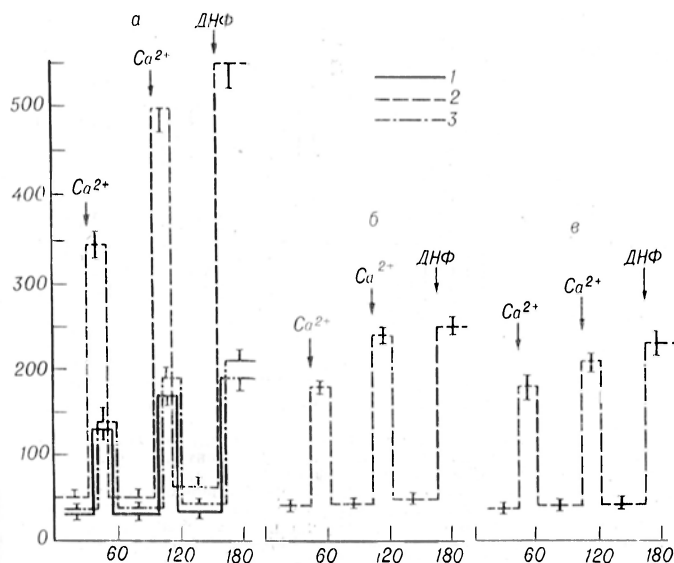


Рис. 2. Влияние экидистерона (а), туркестерона (б) и неробола (в) на транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  митохондрий печени при диабете.

По оси абсцисс — время инкубации (в с), по оси ординат — скорость дыхания (в натам кислорода на 1 мг белка в 1 мин). 1 — интактные животные; 2 и 3 — крысы до и после лечения диабета соответственно. Добавки  $\text{Ca}^{2+}$  200 мкМ и ДНФ  $5 \cdot 10^{-5}$  М.

щей функции митохондрий печени. Под их влиянием снижается дыхание митохондрий в состоянии  $V_4$  в пробах как с

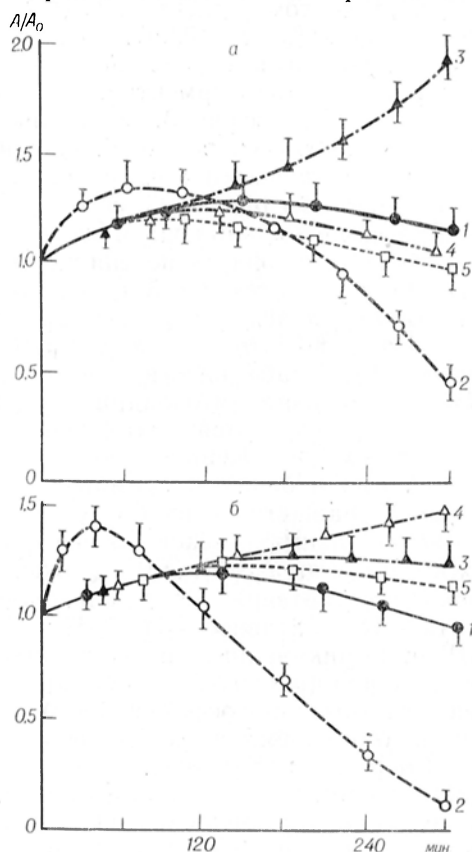


Рис. 3. Изменение термостабильности НАД·Н-ДГ (а) и СДГ (б) митохондрий печени диабетических крыс при введении им фитоэкидистероидов и неробола.

$A_0$  и  $A$  — активность ферментов соответственно до инкубации и в процессе теплового воздействия ( $36^\circ\text{C}$ ).  $A/A_0$  — относительная активность.

$\alpha$ -кетоглутаратом, так и сукцинатом, используемых в качестве субстратов, нормализуется скорость фосфорилирующего окисления (состояние  $V_3$ ). В результате заметно увеличивается величина коэффициента ДК и АДФ/О (см. рис. 1). Кроме того, митохондрии, выделенные из печени крыс, получавших исследуемые препараты, имели сниженную способность связывать кальций и приближались по этому показателю к норме (см. рис. 2). Под действием фитоэкидстероидов и неробола отмечены также позитивные сдвиги в активности флавопротеидных ферментов в «разобщенных» митохондриях из печени крыс, что наиболее наглядно проявлялось в опытах с СДГ, активность которой почти полностью нормализовалась. Наряду с этим значительно возросла и термостабильность ферментов (см. рис. 3). Восстановление термостабильности мембранно-связанных ферментов дыхательной цепи митохондрий печени аллоксандиабетических животных, получавших фитоэкидстероиды и стероидный анаболический препарат неробол, по-видимому, связано с улучшением сопряженности между фосфолипидами и белками мембран митохондрий [2, 6, 7]. Результаты экспериментов, представленные на рис. 4, показывают, что фосфолипиды и белки внутренней мембраны митохондрий печени диабетических животных, леченных исследуемыми препаратами, становятся более устойчивыми к действию фосфолипазы  $A_2$  и трипсина. При этом НАД·Н-ДГ митохондрий печени лече-



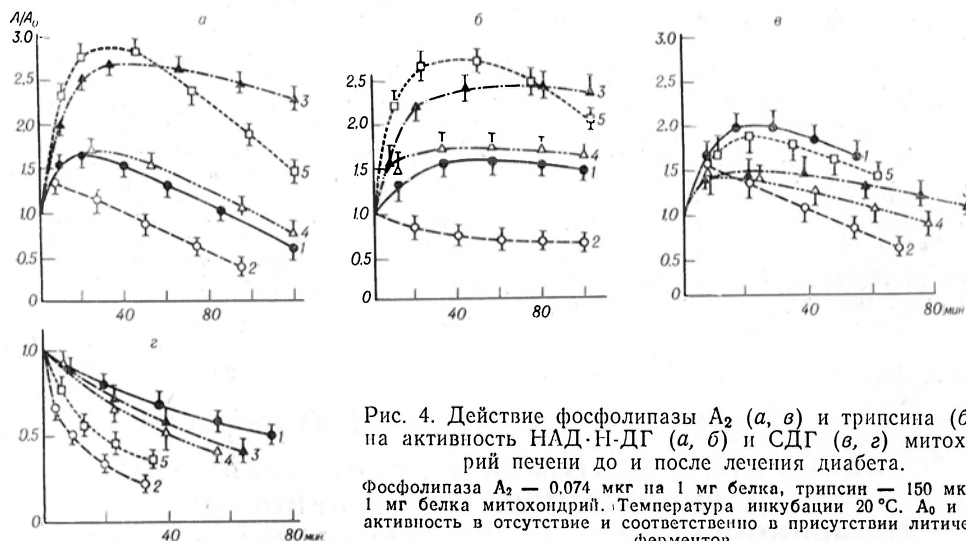


Рис. 4. Действие фосфолипазы  $A_2$  (а, в) и трипсина (б, г) на активность НАД·Н-ДГ (а, б) и СДГ (в, г) митохондрий печени до и после лечения диабета.

Фосфолипаза  $A_2$  — 0,074 мкг на 1 мг белка, трипсин — 150 мкг на 1 мг белка митохондрий. Температура инкубации 20 °С.  $A_0$  и  $A$  — активность в отсутствие и соответственно в присутствии литических ферментов.

ных животных более устойчива к действию экзогенных фосфолипаз и протеаз даже по отношению к интактному контролю. Аналогичным был характер изменения ферментативной активности СДГ при действии литических ферментов, хотя она и более существенно зависит от природы препаратов, введенных в организм животных. Так, если к действию фосфолипазы  $A_2$  более устойчива СДГ митохондрий печени диабетических животных, получавших нероболом, то при действии трипсина более стабильной становится СДГ митохондрий печени крыс, леченных фитоэкдистероидами.

Таким образом, введение крысам с экспериментальным диабетом фитоэкдистероидов (экдистерон и туркестерон) или анаболического стероидного препарата неробола нормализует процессы окислительного фосфорилирования и  $Ca^{+2}$ -транспортирующую функцию митохондрий печени. Эти препараты оказывают корригирующее влияние на активность НАД·Н-ДГ и СДГ дыхательной цепи митохондрий, заметно повышая их стабильность к действию факторов, приводящих к деградации митохондрий (нагревание, литические ферменты). Выявленные эффекты фитоэкдистероидов и неробола, по-видимому, имеют существенное значение в проявлении их лечебного действия при диабетической патологии.

#### 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. Изучение деградации полиферментных систем внутренней мембраны митохондрий в норме и патологии и их стабилизация. Дис. канд. биол. наук. — Ташкент, 1978.
3. Генес С. Г. Сахарный диабет. — М., 1963.
4. Горюшиц М. Б. Исследование растительных стероидов и синтеза на их основе фармакологически активных соединений: Автореф. дис. докт. наук. — Ташкент, 1977.
5. Лаптева Н. Н., Савина Г. Д. // *Пробл. эндокринол.* — 1966. — № 6. — С. 62—66.
6. Лузиков В. П. // *Успехи совр. биол.* — 1976. — Т. 81, № 1. — С. 8—20.
7. Рахимов М. М., Алматов К. Т. // *Биохимия.* — 1977. — Т. 42. — № 10. — С. 1852—1863.
8. Сыров В. Н., Курмуков А. Г., Сахибов А. Д. // *Вопр. мед. химии.* — 1978. — № 4. — С. 456—460.
9. Ташмухамедова М. А., Абзалова М. Х., Сыров В. Н., Султанов М. Б. // *Докл. УзССР.* — 1983. — № 2. — С. 33—34.
10. Ташмухамедова М. П., Фабрина Л. Г., Хушбакова З. А. и др. // *Там же.* — 1982. — № 2. — С. 30—32.
11. Узбекова Д. Г. // *Фармакол. и токсикол.* — 1974. — № 4. — С. 484—490.
12. Усманов Б. З., Горюшиц М. Б., Абубакиров Н. К. // *Химия природ. соедин.* — 1975. — № 4. — С. 466—470.
13. Чещевик А. Б. // *Вопр. мед. химии.* — 1982. — № 2. — С. 66—70.
14. Шевчук И. А., Дьякова Т. Е., Зажаява В. В., Мардарь А. И. // *Пробл. эндокринол.* — 1978. — № 1. — С. 112—119.
15. Boquist L., Nelson L. // *Upsala J. med. Sci.* — 1981. — Vol. 86. — P. 183—188.
16. Chance B., Williams G. // *J. biol. Chem.* — 1955. — Vol. 217. — P. 383—393.
17. King T. // *Meth. Enzymol.* — 1967. — Vol. 10. — P. 322—331.
18. Minetti L., Melloni G. F., Cova N. // *Arch. Stud. Fisiopat. Ricambio.* — 1958. — Vol. 22. — P. 424—428.
19. Rossi C. S., Lehninger A. // *Biochem. Z.* — 1963. — Bd 338. — S. 698—713.
20. Schneider W. C., Hogeboom G. H. // *Cancer Res.* — 1951. — Vol. 11. — P. 1—22.

EFFECT OF ECDISTERONE, TURKESTERONE AND NEROBOL ON THE FUNCTIONS OF RAT LIVER MITOCHONDRIA IN EXPERIMENTAL DIABETES

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

Institute of Phytochemistry, Academy of Sciences of the Uzbek SSR, Institute of Regional

Oxidative phosphorylation and  $\text{Ca}^{2+}$ -transport functions of liver mitochondria were normalized in rats with alloxane diabetes after peroral administration of phytoecdisteroids — ecdisterone and turkesterone (5 mg/kg) or nerobol (10 mg/kg) within 15 days. These drugs normalized the activity of NADH dehydrogenase and succinate dehydrogenase in respiratory chain of mitochondria, increased distinctly stability of the enzymes to the effect of such factors as heating, effect of phospholipase  $\text{A}_2$  or trypsin.

УДК 617-089-07:616.151.55

В. Е. Пасторова, Т. Е. Табакина, А. Ю. Иванов

НЕЙТРАЛИЗАЦИЯ ТРОМБИНА АНТИТРОМБИНОМ III  
В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИНТЕНСИВНОСТИ  
ТРОМБИНООБРАЗОВАНИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ  
И КЛИНИЧЕСКИХ ХИРУРГИЧЕСКИХ ВМЕШАТЕЛЬСТВАХ

Лаборатория физиологии и биохимии свертывания крови МГУ им. М. В. Ломоносова

Ранее было показано, что при лавинообразном интенсивном образовании тромбина в кровотоке после внутривенной инъекции животным тканевого тромбопластина генерированный свертывающий фермент быстро нейтрализуется антитромбином III [4]. При этом активность как фермента, так и его ингибитора значительно снижается в процессе нейтрализации тромбина.

В то же время при некоторых экспериментальных и клинических состояниях, характеризующихся медленным и длительным образованием микроколичеств тромбина в крови у старых животных [5], у крыс с экспериментальным атеросклерозом [6] в начальной стадии и у молодых людей с ишемической болезнью сердца (ИБС) [3] в доклинический период активность антитромбина III достоверно и значительно увеличивается. Это указывает на то, что длительная циркуляция микроколичеств тромбина в кровотоке вызывает компенсаторную реакцию, повышающую содержание антитромбина III, и свидетельствует о напряженном функционировании этого ингибитора.

Целью настоящего исследования явилось изучение динамики тромбогенеза и нейтрализации образующегося свертывающего фермента антитромбином III в ходе хирургических вмешательств, сопровождающихся выделением и поступлением из рассеченных тканей в кровоток тромбопластических

компонентов как в эксперименте, так и в клинике. Нейтрализацию тромбина антитромбином III оценивали в зависимости от интенсивности тромбогенеза при этих вмешательствах.

Методика

В экспериментах были использованы 63 крысы-самцы массой тела 170—180 г. Все животные были разделены на 4 группы. У животных 1-й группы осуществляли кожный разрез, лапаротомию и повреждение ткани печени (три стандартных прокола-разреза передней ее доли длиной 5 мм), у крыс 2-й — кожный разрез и лапаротомию. Подобное хирургическое вмешательство, осуществляемое под эфирным наркозом, сопровождается незначительной кровопотерей (0,2—0,3 мл) при разрезе кожи и брюшной стенки и проколе-разрезе ткани печени и обеспечивает выделение тромбопластических агентов из этих тканей в кровоток в относительно незначительном количестве. Животные 3-й группы служили обычным контролем и не подвергались никаким воздействиям, 4-й группы — контролем на наркоз без оперативного вмешательства.

Кровь на анализ у животных брали с цитратом натрия из v. jugularis до операции, в конце операции и через 2—3, 5—6 и 8 сут после песс. В плазме крови определяли активность антитромбина III [7], тромбина [8], суммарный и неферментативный фибринолиз по методу Кудряшова и Ляпиной [2], фибринолитическую активность эуглобулиновой фракции плазмы на фибриновых пластинах [9].

Для клинических наблюдений была взята группа детей (11 человек) в возрасте 4—12 лет с хронической пневмонией на фоне врожденной легочной патологии (бронхоэктазия, эмфизема и деформирующий бронхит).

Активность тромбина (в с) в плазме крови крыс во время и после хирургического вмешательства на печени

Группа животных	Время после операции, сут			
	в конце операции	2—3	5—6	8
1-я (20)	337 ± 12 $P < 0,01$	261 ± 10 $P < 0,001$	312 ± 11 $P < 0,01$	320 ± 21 $P < 0,05$
2-я (16)	320 ± 11 $P < 0,01$	272 ± 10 $P < 0,001$	322 ± 18 $P < 0,01$	370 ± 15 $P > 0,5$
3-я (18)	422 ± 16	421 ± 12	430 ± 11	401 ± 18
4-я (12)	387 ± 14 $P \leq 0,05$	360 ± 14 $P < 0,01$	397 ± 12 $P > 0,5$	385 ± 12 $P > 0,5$

Примечание. Здесь и в табл. 2 в скобках указано число животных.

Все больные подвергались после нейролептанальгезии значительному хирургическому вмешательству — удалению доли или сегмента легкого, в ткани которого, как известно, содержится значительное количество весьма активных тромбопластических компонентов. В качестве контроля служила группа относительно здоровых детей (5 человек) без заболевания легких и оперируемых по поводу острого аппендицита.

Кровь на анализ брали с цитратом натрия из локтевой вены до операции, во время получения наркоза (перед разрезом тканей), во время операции (до переливания крови), на 2—3, 5—6 и 8-е сутки после операции. В крови больных определяли активность тромбина, антитромбина III, ферментативную и неферментативную фибринолитическую активность, толерантность плазмы к гепарину по Гермсену [9], показатели R и K тромбозастрограммы в 0,26 мл цитратной плазмы с добавлением 0,1 мл 0,29 % раствора  $\text{CaCl}_2$ .

### Результаты и обсуждение

В экспериментах на животных было выявлено усиление процесса тромбообразования уже сразу после операции в результате поступления тромбопластических веществ в кровотоки. Однако активность тромбина была максимальной лишь на 2—3-и сутки после операции. Время появления в реакционной смеси глыбок фибрина укорачивалось в 1,5 раза по сравнению с нормой

(табл. 1; 1-я группа животных), что соответствует активности тромбина, равной  $5 \cdot 10^{-3}$ — $5 \cdot 10^{-4}$  NIH/мл. Эти изменения активности тромбина свидетельствуют о постепенном характере развития тромбогенеза и о его умеренном характере.

Как видно из данных, представленных в табл. 1, увеличение активности тромбина имело место и у животных 2-й группы. Максимальная степень тромбогенеза у животных этой группы развилась также на 2—3-и сутки после операции, но она была ниже, чем у животных 1-й группы. В последующие сроки наблюдения активность тромбина у крыс как 1-й, так и 2-й группы уменьшалась. Увеличение активности тромбина у животных 4-й группы было наименьшим и имело достоверный характер лишь через 2—3 сут после воздействия.

Активность антитромбина III у животных 1-й и 2-й групп, как отмечено в ходе исследования, была повышена в период максимального развития тромбоцитарной активности на 20—25 % по сравнению с таковой у животных 3-й группы. Наибольшее ее значение было у животных 1-й группы через 2—3 дня и на 5—6-е сутки после операции (табл. 2). В последующие сроки опыта

Таблица 2

Активность антитромбина III (в %) в плазме крови крыс во время и после хирургического вмешательства на печени

Группа животных	Время после операции, сут			
	в конце операции	2—3	5—6	8
1-я (25)	112 ± 7,5 $P > 0,5$	130 ± 6,5 $P < 0,05$	131 ± 6,7 $P < 0,05$	95 ± 5,5 $P > 0,5$
2-я (20)	110 ± 5,0 $P > 0,5$	124 ± 5,1 $P < 0,05$	123 ± 5,5 $P > 0,5$	111 ± 8,0 $P > 0,5$
3-я (18)	110 ± 8,0	108 ± 5,0	112 ± 5,0	102 ± 5,4
4-я (12)	113 ± 3,5 $P > 0,5$	126 ± 6,0 $P < 0,05$	119 ± 6,7 $P > 0,5$	101 ± 5,4 $P > 0,5$

Активность тромбина, антитромбина III (АТ III), неферментативного фибринолиза (НФ), фибринолитическая активность (ФА) зуглобулиновой фракции плазмы и толерантность плазмы к гепарину (ТПГ) у больных детей после хирургического вмешательства на легких

Исследуемый показатель	Контроль	Срок исследования				
		до операции	по время наркоза до разреза	в течение операции	2—3 сут после операции	7—8 сут после операции
Время образования тромбина, с	455±24	411±21 $P>0,05$	400±22 $P>0,05$	303±20 $P_1<0,01$	234±17 $P_1<0,01$	325±18 $P_1<0,01$
АТ III, %	112±5,3	72±8,1 $P<0,05$	73±8,5 $P<0,05$	52±3,8 $P_1<0,01$	75±6,3 $P_1>0,5$	92±4,3 $P_1>0,5$
НФ, мм <sup>2</sup>	43±4,0	35±4,1 $P>0,05$	30±3,9 $P<0,05$	45±3,8 $P_1<0,05$	54±5,1 $P_1<0,05$	43±3,5 $P_1>0,5$
ФА, мм <sup>2</sup>	58±7,0	40±6,0 $P<0,05$	—	61±8,0 $P_1<0,01$	37±5,5 $P_1>0,05$	36±4,9 $P_1>0,5$
ТПГ, с	1380±68	960±49 $P<0,05$	820±51 $P<0,05$	1140±52 $P_1<0,05$	1020±45 $P_1>0,05$	720±31 $P_1<0,01$

Примечание. Статистический показатель  $P$  рассчитан по сравнению с контролем,  $P_1$ —по сравнению с данными «до операции».

активность антитромбина III возвращалась к контрольному уровню. У животных 4-й группы активность этого ингибитора была достоверно увеличена на 2—3-и сутки после получения наркоза.

Одновременно с этим в крови животных 1-й группы с наибольшей степенью тромбогенеза в результате операции было отмечено усиление неферментативного фибринолиза (в 1,3—1,5 раза по сравнению с таковым у животных 3-й группы) в период максимального развития тромбоиновой и антитромбиновой активности, в то время как степень ферментативного фибринолиза у них не изменялась или была незначительно снижена.

Изменения в показателях свертывающей и противосвертывающей систем у животных 1, 2 и 4-й групп свидетельствуют о том, что длительная и медленно развивающаяся активация системы свертывания с появлением микроколичеств тромбина в указанной концентрации вызывает напряженное функционирование его ингибитора и ведет к усилению неферментативного фибринолиза. Повышение активности антитромбина III вследствие относительно длительного нарастания активности тромбина в крови подопытных животных, возможно, обусловлено как временным увеличением синтеза этого ингибитора, так и повышением его нейтрализующей ингибиторной активности за счет каталитического усиливающего

влияния циркулирующего в крови гепарина в период появления в кровотоке свертывающего фермента и его нейтрализации [11]. Увеличение степени неферментативного фибринолиза у животных 1-й группы может быть также результатом действия образующегося комплекса генерированного тромбина с циркулирующим гепарином. Образование подобного комплекса в условиях как *in vitro*, так и *in vivo* при небольшой концентрации гепарина было показано ранее [12].

При исследовании тех же показателей свертывающей и противосвертывающей систем крови при клинических хирургических вмешательствах на легких у детей были выявлены иные закономерности.

Активность тромбина, как показали проведенные измерения, была значительно повышена уже во время операции и достигала  $5 \cdot 10^{-4}$  НИИ/мл. Время образования тромбина было укорочено в 1,3 раза по сравнению с контролем. Максимальное содержание в крови тромбина наблюдалось через 2—3 сут после операции и превышало активность тромбина, наблюдаемую в этот же период после операции у животных с меньшей степенью повреждения тканей. Это свидетельствует не о постепенном характере тромбогенеза, а о лавинообразном и более быстром образовании свертывающего фермента в результате обширного поступления тромбопластических веществ

в кровотоки из рассеченных тканей легкого (табл. 3).

Максимальное повышение содержания в крови тромбина имело место через 2—3 сут после операции, затем последовало его снижение.

Характер изменения активности антитромбина III при данном типе тромбогенеза (лавинообразная генерация) также был иным, чем в случае постепенного и менее выраженного тромбообразования, наблюдаемого в эксперименте: в крови прооперированных детей активность антитромбина III значительно снижалась уже в течение операции, иногда до 25—30 % нормального уровня. В последующие сроки наблюдения (7—8-е сутки) отмечено восстановление активности ингибитора до исходного уровня, характерного для предоперационного периода. В большинстве случаев активность антитромбина III через 7—8 сут и более после операции превышала предоперационный уровень и достигала значений, наблюдаемых у здоровых детей.

Одновременно с изменениями активности тромбина и антитромбина III в крови обследуемых детей в течение операции и через 2—3 сут после нее отмечалось значительное повышение как ферментативного, так и неферментативного фибринолиза, происходило некоторое достоверное снижение толерантности плазмы к гепарину (см. табл. 3).

Важно отметить, что у больных детей перед операцией наблюдались некоторые признаки депрессии функции противосвертывающей системы — снижение активности антитромбина III, фибринолитической активности эуглобулиновой фракции плазмы и повышение толерантности плазмы к гепарину, что свидетельствует о снижении его уровня (см. табл. 3). В послеоперационный период, как указывают данные, представленные в табл. 3, характер изменений ферментативной и неферментативной фибринолитической активности и толерантности плазмы к гепарину, а также дальнейшее снижение уровня антитромбина III четко указывают на активацию функции второй противосвертывающей системы в результате операционного вмешательства у детей. В экспериментах на животных после внутривенного введения тканевого тромбопластина и при лавино-

образной генерации тромбина в кровотоке неоднократно получены результаты, свидетельствующие об активации функции противосвертывающей системы [1]. Развитие полноценной реакции противосвертывающей системы способствует нейтрализации тромбина.

Экспериментальные и клинические наблюдения свидетельствуют о том, что низкий уровень тромбогенеза и постепенное, длительное его развитие вызывают компенсаторную фазу увеличения активности антитромбина III, в то время как высокая степень тромбообразования лавинообразного характера приводит к значительному потреблению и снижению активности антитромбина III. Отмеченные случаи значительного временного снижения активности антитромбина III до 25—30 % от исходного значения в ходе операции и через 2—3 сут после нее при одновременной полноценной активации противосвертывающей системы у детей не сопровождались какими-либо тромбоцистическими осложнениями. Это свидетельствует о том, что относительно кратковременное снижение активности антитромбина III, очевидно, не влечет повышения тромбоопасности в организме на фоне активации функции противосвертывающей системы. Диагностическая оценка уровня антитромбина III должна рассматриваться в совокупности с другими показателями противосвертывающей системы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Кудряшов Б. А. Биологические проблемы регуляции жидкого состояния крови и ее свертывания. — М., 1975.
2. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А. // Лаб. дело. — 1971. — № 6. — С. 326.
3. Панченко В. М., Пасторова В. Е., Мурашко В. В. и др. // Там же. — 1979. — № 10. — С. 579.
4. Пасторова В. Е. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. биол. почвоведение. — 1980. — № 1. — С. 18.
5. Пасторова В. Е., Базазьян Г. Г., Ляпина Л. А. // Бюл. экспер. биол. — 1984. — № 11. — С. 560.
6. Пасторова В. Е., Базазьян Г. Г., Романовский А. А. // Кардиология. — 1980. — № 4. — С. 80.
7. Kaulla E. von, Kaulla N. von // Amer. J. clin. Path. — 1967. — Vol. 48. — P. 69.
8. Glüeck E. // J. appl. Physiol. — 1954. — Vol. 6. — P. 650.
9. Astrup T., Müllertz S. T. // Arch. Biochem. — 1952. — Vol. 40. — P. 346.
10. Görmesen J. // Brit. J. Haemat. — 1959. — Vol. 5. — P. 257.
11. Marciniak E. // Thrombos. Haemostas. — 1977. — Vol. 38. — P. 486.



12. Smith G. F., Sandboom J. // *Thrombos. Res.* — 1981. — Vol. 22. — P. 115.

Поступила 05.11.85

# NEUTRALIZATION OF THROMBIN BY MEANS OF ANTITHROMBIN III DEPENDING ON THE RATE OF THROMBOFORMATION IN EXPERIMENTAL AND CLINIC SURGICAL OPERATIONS

V. E. Pastorova, T. E. Tabakina, A. Yu. Ivanov

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

Low rate of thrombinogenesis, its gradual and prolonged development in animal circula-

tion after small-scale surgical operations was accompanied by a compensatory increase in the activity of antithrombin III. After surgical operations of lung in children thrombinoformation at the high rate led to distinct short-term consumption and to decrease in activity of the inhibitor during the operation period and within 2-3 days after the operation simultaneously with activation of enzymatic and nonenzymatic fibrinolysis. At the same time, any postoperational thrombotic complications were not observed in the children.

УДК 612.111.1.015.1:577.152.1+612.111.1.015.3:547.455.623].014.46:615.281.873.21

П. Г. Сторожук, В. А. Скляр, С. П. Корочанская, Ю. В. Гонтмахер

## УТИЛИЗАЦИЯ ГЛЮКОЗЫ И АКТИВНОСТЬ ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ, ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ И МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ЭРИТРОЦИТОВ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ ТУБЕРКУЛОСТАТИЧЕСКИМИ ПРЕПАРАТАМИ

Кафедра биоорганической и биологической химии Кубанского медицинского института им. Красной Армии, Краснодар

Известно, что утилизация глюкозы в тканях и органах зависит от многих факторов. Одним из них является активность ферментов, участвующих в окислении глюкозы как по основному гликолитическому пути, так и по альтернативному — пентозному. В связи с этим известный интерес представляет изучение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ; КФ.1.1.1.49) и ферментов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) — изоцитратдегидрогеназы (ИЦДГ; КФ.1.1.1.42) и малатдегидрогеназы (МДГ; КФ.1.1.1.37), тонко реагирующих на увеличение концентрации продуктов расщепления глюкозы (пирувата и др.), образующихся при гликолизе. Различные физические, химические и биологические факторы [1, 10, 11, 14—16], а также некоторые тяжелые патологические процессы [5, 12] способны вызывать существенные изменения активности Г-6-ФДГ, ИЦДГ и МДГ как в органах, так и в эритроцитах. Ранее было показано, что на скорость утилизации глюкозы оказывают влияние антибиотики тетрациклинового ряда [7].

В настоящей работе предполагалось проверить, существует ли зависимость между активностью изучаемых фер-

ментов и содержанием глюкозы при воздействии туберкулостатических препаратов.

### Методика

Эксперименты поставлены на 100 крысах-самцах с массой тела 180—200 г, получавших одинаковый рацион. Туберкулостатические препараты вводили в течение 10—14 дней в желудок через зонд в следующих дозах: изониазид — 7,5 мг на 100 г массы, протионамид — 10, рифадин — 7,5, пара-аминosalicyловую кислоту (ПАСК) — 100, метазид — 15, фтивазид — 15, ларусан — 15, этамбутол — 10. Проведено 2 серии экспериментов, в каждой из которых исследовали действие 4 препаратов. В каждой из серий одна группа служила самостоятельным контролем.

Кровь для определения содержания в ней глюкозы брали из хвостовой вены через 24 ч после прекращения кормления животных (при свободном доступе к воде): первый раз — натощак, но не ранее чем через 2 ч после последнего введения в желудок туберкулостатических препаратов, затем после внутрижелудочного введения 2 мл 40 % раствора глюкозы (800 мг) — через каждые 30 мин в течение 150 мин. В пробах определяли содержание глюкозы ферментативным методом [4], используя набор реактивов БиоТест фирмы «Лахема» (ЧССР).

После окончания опыта животных декапитировали и брали кровь из шейных сосудов для определения активности оксидоредуктаз в эритроцитах. Полученную кровь смешивали в равных объемах с 3,8 % раствором цитрата. Эритроциты отмывали 0,9 %

охлажденным NaCl и осаждали центрифугированием при 3000 g и гемолизировали. При определении активности Г-6-ФДГ эритроциты гемолизировали путем добавления 1 % раствора дигитонина, а при определении МДГ и ИЦДГ — 0,05 М фосфатного буфера pH 7,4. Об активности Г-6-ФДГ судили по скорости восстановления НАДФ [13], об активности ИЦДГ и МДГ — по количеству восстановленного НАД [6].

## Результаты и обсуждение

Воздействие на организм крысы в течение 10—14 дней туберкулостатическими препаратами влияет на скорость утилизации глюкозы крови. Так, под действием фтивазида, метазида и ларусана отмечено повышение на 9—15 % исходного уровня глюкозы крови (рис. 1).

После сахарной нагрузки концентрация глюкозы в крови у этих животных увеличивается параллельно нарастанию ее содержания у контрольных животных и достигает максимума к 60-й минуте опыта, затем постепенно снижается. На 30-й минуте опыта различия составляют 7—12 %, на 60-й минуте — 9—11 % от контрольного уровня ( $P < 0,02$ ). Наибольшие различия, достигающие 15—24 % ( $P < 0,01$ ), наблюдаются на 90-й минуте. В конце эксперимента (на 150-й минуте) концентрация глюкозы остается достоверно увеличенной на 18 %. Только у животных, получавших ПАСК, характер сахарной кривой мало отличается от кривой контрольной группы.

При сравнительном анализе результатов исследования активности ферментов (табл. 1) можно видеть, что под влиянием ПАСК, метазида, фтивазида и ларусана активность Г-6-ФДГ статистически достоверно снижается на 13—

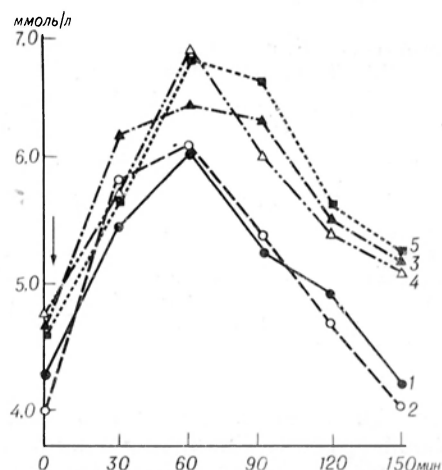


Рис. 1. Изменение содержания глюкозы в крови крыс при нагрузке глюкозой после введения в течение 10—14 дней туберкулостатических препаратов.

1 — контроль; 2 — ПАСК; 3 — метазид; 4 — фтивазид; 5 — ларусан. Здесь и на рис. 2 стрелкой указано введение глюкозы.

19 %, под влиянием ИЦДГ — на 6—22 %, МДГ — на 14—33 %.

Из сопоставления данных табл. 1 и рис. 1 следует, что имеется обратная зависимость между активностью Г-6-ФДГ, ИЦДГ и МДГ эритроцитов, с одной стороны, и концентрацией глюкозы в крови — с другой.

Систематическое введение крысам в течение 10—14 дней изониазида и этамбутола приводит к снижению содержания глюкозы в крови, взятой натощак, на 9—14 % (рис. 2). У животных, получавших протионамид и рифадин, исходный уровень глюкозы не отличался от такового у крыс контрольной группы.

После нагрузки глюкозой характер сахарных кривых у всех животных ока-

Таблица 1

Активность Г-6-ФДГ (в мкмольях НАДФ·Н на  $1 \cdot 10^9$  эритроцитов в 1 мин), ИЦДГ и МДГ (в мкмольях НАД·Н на  $5 \cdot 10^6$  эритроцитов в 1 мин) у крыс, получавших ПАСК, метазид, фтивазид и ларусан ( $M \pm m$ )

Препарат	Г-6-ФДГ	ИЦДГ	МДГ
Контроль	228 ± 10,8 (100)	2600 ± 83,6 (100)	2925 ± 94,7 (100)
ПАСК	197 ± 8,4 (86)	2025 ± 68,7 (78)	2250 ± 64,2 (77)
Метазид	191 ± 7,3 (84)	2300 ± 84,2 (88)	2325 ± 65,4 (79)
Фтивазид	195 ± 9,1 (86)	2450 ± 63,6 (94)*	2000 ± 80,3 (68)
Ларусан	185 ± 8,0 (81)	2100 ± 62,7 (81)	2200 ± 79,4 (75)

Примечание. Здесь и в табл. 2 звездочкой отмечено  $P > 0,05$ , в каждой группе было по 10 животных; в остальных случаях  $P < 0,05$ . В скобках — % от контроля.

Активность Г-6-ФДГ (в мкмольх НАДФ·Н на  $1 \cdot 10^9$  эритроцитов в 1 мин), ИЦДГ и МДГ (в мкмольх НАДФ·Н на  $5 \cdot 10^6$  эритроцитов в 1 мин) у крыс, получавших изониазид, протионамид, этамбутол и рифадин ( $M \pm m$ )

Препарат	Г-6-ФДГ	ИЦДГ	МДГ
Контроль	235 $\pm$ 11,4 (100)	2575 $\pm$ 55,4 (100)	2750 $\pm$ 55,4 (100)
Изониазид	203 $\pm$ 8,4 (87)	2000 $\pm$ 54,6 (77)	2045 $\pm$ 68,7 (76)
Протионамид	179 $\pm$ 9,6 (77)	2175 $\pm$ 63,4 (84)	1765 $\pm$ 46,3 (64)
Рифадин	159 $\pm$ 7,8 (68)	2100 $\pm$ 61,4 (81)	1855 $\pm$ 47,6 (67)
Этамбутол	303 $\pm$ 10,6 (129)	2950 $\pm$ 119,1 (113)	3355 $\pm$ 122,1 (122)

зался однотипен с кривой крыс контрольной группы. Различия в нарастании концентрации глюкозы в крови были выраженными в основном на 30-й минуте опыта, где они составили 8—9 % у животных, получавших изониазид и протионамид. Исключение составляет этамбутол. У животных, получавших этот препарат, содержание глюкозы в крови на протяжении всего опыта было ниже контрольного уровня на 10—20 % ( $P < 0,05$ ).

Рифадин, как метагид, ларусан и фтивазид, способствует увеличению концентрации глюкозы в крови после нагрузки, но только в первые 60 мин.

Сопоставление кривых, представленных на рис. 2, и данных, приведенных в табл. 2, свидетельствует о том, что эти препараты приводят во всех случаях к угнетению активности ферментов на 13—56 %. При этом кривые, отражающие изменения содержания глюкозы в крови, у крыс, получавших эти препараты, мало отличаются от таковой контрольной группы. Этамбутол является исключением. Это единствен-

ный препарат (из 8 исследуемых), который вызывает повышение активности Г-6-ФДГ на 29 %, МДГ на 22 % и ИЦДГ на 13 %, вследствие чего у крыс, получавших этот препарат, наблюдается самая низкая концентрация глюкозы в крови после сахарной нагрузки.

Проведенные эксперименты позволили выявить различную степень утилизации глюкозы из крови в зависимости от вида применяемого туберкулостатического препарата. Весьма важная роль в этом процессе принадлежит ферментам эритроцитов. Четко прослеживается зависимость скорости утилизации глюкозы от активности Г-6-ФДГ: чем ниже активность этого фермента, тем медленнее происходит снижение концентрации глюкозы в крови при сахарной нагрузке. Примерно такая же зависимость наблюдается при изменении активности ИЦДГ и МДГ.

Известно, что ИЦДГ и МДГ — ферменты ЦТК, которые функционируют в ретикулоцитах. Активность этих ферментов определяется на довольно высоком уровне и в зрелых эритроцитах, хотя функционирование ЦТК в них и ставится под сомнение [9]. Вместе с тем определение активности ИЦДГ и МДГ в эритроцитах используется как надежный тест в дифференциальной диагностике кардиологических заболеваний [8].

Из полученных данных видно, что если активность изучаемых ферментов угнетена (метагидом, фтивазидом, ларусаном, рифадином), то содержание глюкозы в крови после сахарной нагрузки остается на более высоком уровне, чем в контроле, и наоборот, если ферменты активированы (этамбутолом), то глюкоза утилизируется из крови быстрее. Протионамид, изониазид и ПАСК, хотя и несколько угнета-

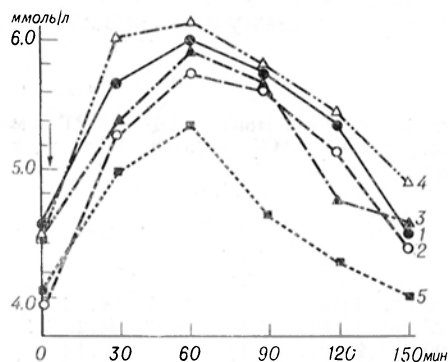


Рис. 2. Изменение содержания глюкозы в крови крыс при нагрузке глюкозой после введения в течение 10—14 дней туберкулостатических препаратов.

1 — контроль, 2 — изониазид, 3 — протионамид, 4 — рифадин, 5 — этамбутол.



ют активность изучаемых ферментов, но на утилизацию глюкозы существенно не влияют.

Таким образом, установлено, что эритроцитарные оксидоредуктазы (Г-6-ФДГ, ИЦДГ и МДГ) весьма чувствительны к туберкулостатическим препаратам. Все изучаемые препараты (за исключением этамбутола) прежде всего угнетают активность Г-6-ФДГ, что, несомненно, отражается на процессах превращения НАДФ в НАДФ·Н, который необходим для восстановления глутатиона и нормального функционирования перекисной системы. Кроме того, эти препараты угнетают активность ИЦДГ и МДГ — оксидоредуктаз, обеспечивающих превращение НАД в НАД·Н, являющийся кофактором энзимов начального звена дыхательной цепи, причастных к окислительному фосфорилированию АДФ. Следовательно, можно полагать, что туберкулостатические препараты снижают в эритроцитах ресинтез АТФ, необходимой для метаболических функций в этой клетке.

Из приведенного выше следует, что туберкулостатические препараты (кроме этамбутола) вызывают нарушения в метаболизме эритроцитов, которые выражаются не только угнетением активности оксидоредуктаз, но и снижением скорости потребления ими глюкозы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Горошинская И. А., Анонян А. А., Броновицкая З. Г., Шугай В. С. // *Вопр. мед. химии*. — 1984. — № 1. — С. 60—64.
2. Каминский Л. С. Статистическая обработка лабораторных и клинических данных. — Л., 1964.
3. Кендыш И. И. Регуляция углеводного обмена. — М., 1985.
4. Лукомская Н. С., Городецкий В. К. // *Биохимия*. — 1961. — № 3. — С. 477—482.
5. Лысый Л. П. // *Пат. физиол.* — 1984. — № 3. — С. 16—20.
6. Путилина Ф. Е., Ещенко Н. Д. // *Вестн. Ленинград. ун-та: Серия биол.* — 1969. — № 21. — Вып. 4. — С. 112—116.
7. Сторожук П. Г., Шамсудинова В. В. //

*Пробл. эндокринологии*. — 1976. — № 6. — С. 106—110.

8. Терентьев В. П. Клинико-функциональные, биохимические, гемодинамические корреляции и их информативность у больных ишемической болезнью сердца: Автореф. дис. канд. мед. наук. — Краснодар, 1980.
9. Уайт Л., Хендлер Ф., Смит Э. и др. // *Основы биохимии*: Пер. с англ. — М., 1981. — Т. 3. — С. 1267—1296.
10. Brzezwicka E. A., Chmielnicka J., Wejchietz-Herma L. // *J. appl. Toxicol.* — 1983. — Vol. 3. — P. 180—184.
11. Drake R. L., Parks W. C., Thompson E. D. // *J. biol. Chem.* — 1983. — Vol. 258. — P. 6008—6010.
12. Goldberg D. M., Neraek-Dominguez M. W., Wilcock A. K. // *Select. Topic on Clinical Enzymol.* — Berlin, 1983. — P. 315—331.
13. Motulsky A. G., Campbell J. // *Цит. по книге: Биохимические методы исследования в клинике* / Под ред. А. А. Покровского. — М., 1969. — С. 153—156.
14. Jellinck P. H., Affleck A., Newcombe A. M. // *Canad. J. Biochem.* — 1983. — Vol. 61. — P. 779—783.
15. Vincenzini M. T., Fanilli F., Treves C. et al. // *Int. J. Biochem.* — 1983. — Vol. 15. — P. 1283—1286.
16. Watanabe Ahinaru, Nagashima nideo // *Acta med. Okayama*. — 1983. — Vol. 37. — P. 463—470.

Поступила 07.03.85

#### CONSUMPTION OF GLUCOSE AND ACTIVITIES OF GLUCOSE-6-PHOSPHATE-, ISOCITRATE- AND MALATE DEHYDROGENASES IN ERYTHROCYTES OF RATS TREATED WITH TUBERCULOSTATIC PREPARATIONS

P. G. Storozhuk, V. A. Sklyar, S. P. Korochanskaya, Yu. V. Gonimakh

Chair of Bioorganic and Biological Chemistry, Cuban Medical School, Krasnodar

Metazamide, phthivazid, larusan and rifamycin were shown to inhibit activities of glucose-6-phosphate-, isocitrate- and malate dehydrogenases in male rats within 10-14 days by 14-32 %; as a result of this, the rate of glucose consumption was decreased in blood, as shown by the shape of sugar plots after loading with 300 mg of glucose. Administration of these drugs led to elevation of sugar curves by 11-18 % as compared with controls. p-Aminosalicylic acid, isoniazid and protonamide inhibited the enzymatic activity but affected the rate of glucose consumption only slightly. Ethambutal activated these enzymes by 13-29 %; the highest rate of glucose consumption was observed in presence of the drug.

Р. И. Якубовская, М. Д. Коростелева, С. К. Александер, Г. И. Авдеев

## ВЫДЕЛЕНИЕ МЕМБРАННЫХ АНТИГЕНОВ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ИЗ МЕМБРАН ЖИРОВЫХ ГЛОБУЛ ЖЕНСКОГО МОЛОКА

Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П. А. Герцена

Мембраны жировых глобул (МЖГ) молока млекопитающих и, в частности, человека являются производными плазматических мембран эпителиальных клеток молочной железы [15]. Эти данные наряду с относительной простотой получения МЖГ позволяют использовать их в качестве удобного объекта при поиске органоспецифических антигенов (АГ) молочной железы. Изучение таких АГ открывает возможности для выявления определенных взаимосвязей между состоянием поверхности клетки и процессом малигнизации, а также для усовершенствования и расширения методов иммунодиагностики рака.

Ранее нами с помощью иммунных сывороток к нативным МЖГ был обнаружен ряд АГ и показано наличие некоторых из них в нормальных и опухолевых клетках молочной железы [1].

Настоящее исследование является продолжением изучения мембранных АГ молочной железы и посвящено разработке метода их выделения из МЖГ путем последовательной обработки мембранного матрикса солями и детергентами.

### Методика

Операционный материал получали не позже чем через 1 ч после операции, тотчас помещали в лед, освобождали от жира, замораживали в жидком азоте и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$  до получения мембранных фракций. Аутопсийный материал получали через 12—24 ч после смерти и использовали аналогично операционному.

Для получения иммунных сывороток кроликов-самок породы шиншилла (массой 2—2,5 кг) иммунизировали фракциями, полученными солюбилизацией МЖГ, по схеме: первая инъекция внутривенная в 6 точек спины (от 0,5 до 1 мл препарата), вторая — внутривенная (те же количества антигена) через 28 дней. Кровь брали на 7-й день после второй инъекции, реиммунизацию проводили внутривенно через 2 нед и более. Антисыворотки получали под контролем иммунодиффузии, применяя АГ, иммобилизованные на ВгСН-сефарозе 4В, а также препараты мембранных фракций из ткани почки и селезен-

ки, полученных дифференциальным центрифугированием. ВгСН и ВгСН-сефарозу 4В получали описанным ранее методом [2].

Концентрацию белка определяли методом Лоури [14] или по поглощению света при 280 нм, условно принимая  $K_{280}^{1\%} = 10$ .

Иммунодиффузию в агаре проводили как описано ранее [6], а также в 1,5 % агаре, содержащем 2,5 % NaCl, в присутствии 1 % тритона X-100, используя стандартные тест-системы [6]. После отмывки непреципитирующих компонентов физиологическим раствором полосы преципитации окрашивали кумасси бриллиантовым G-250 и суданом черным Б.

Электрофорез мембранных компонентов осуществляли в 7,5 % ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) [16]. Образцы для электрофореза готовили, инкубируя антигенный материал (100 мг) в 8 М растворе мочевины, содержащем 1 % ДСН и 2 %  $\beta$ -меркаптоэтанол ( $\beta$ -МЭ), при  $100^{\circ}\text{C}$  в течение 5 мин. Разделение компонентов проводили при силе тока 5 мА на трубочку в течение 3 ч при  $20^{\circ}\text{C}$ . После электрофореза столбики геля окрашивали 0,25 % раствором кумасси бриллиантового G-250 в 7,5 % уксусной кислоте в течение 5 мин при  $100^{\circ}\text{C}$  и отмывали 7,5 % уксусной кислотой. Липопroteиды окрашивали суданом черным Б [5].

Для определения молекулярных масс антигенов использовали стандартные метки фирмы "Serva" (ФРГ).

По современным представлениям, поверхность мембраны клетки состоит из липидного бислоя, с которым ассоциированы различные белки. Последние условно можно разделить на 3 группы: адсорбированные белковые молекулы, периферические компоненты мембран и внутренние структуры мембран (интегральные белки).

Основываясь на этих представлениях и проводя аналогию между МЖГ и поверхностными мембранами клетки, мы проводили извлечение АГ из МЖГ путем поэтапной обработки последних солибилизирующими агентами с увеличивающейся экстрагирующей активностью: изотоническим раствором, хаотропным агентом (1 М  $\text{MgCl}_2$ ), неионным детергентом, неионным детергентом при обработке ультразвуком.

Для сохранения адсорбированных на МЖГ белковых молекул выделение жировых глобул (ЖГ) проводили в мягких условиях, взяв за основу метод [9].

Свежее молоко доставляли из родильных домов через 1—2 ч после лактации, немедленно отделяли молочную плазму от жира центрифугированием при 20 000 г и  $4^{\circ}\text{C}$ . Флотирующий материал, представляющий собой ЖГ, собирали и промывали, суспендируя в 0,01 н. трис-HCl-буфере pH 7,2, содержащем ингибиторы протеолитических ферментов:

0,5 %  $\epsilon$ -аминокапроновую кислоту ( $\epsilon$ -АМК) и контрикал в дозе 200 ИЕ/мл (буфер А) с последующим центрифугированием при 20 000 g и 4 °С. Для суспендирования ЖГ, МЖГ и их фрагментов использовали гомогенизатор Поттера. Процедуру отмывки повторяли до исчезновения белка в промывных водах. Отмытый жир замораживали при —70 °С и хранили при —20 °С.

Во избежание фрагментации мембран их получали однократным размораживанием ЖГ в изотоническом растворе. Для этого ЖГ, собранные из 3,5—4 л женского молока, размораживали, суспендировали в 55 мл буфера А и центрифугировали 1 ч при 105 000 g и 4 °С, получая 3 компонента: осадок МЖГ, надосадок — раствор адсорбированных мембранных белков в буфере А (фракция I-1), флотат — жир из глобул. Жир отбрасывали, фракцию I-1 диализовали против дистиллированной воды 20 ч при 4 °С, лиофильно высушивали и использовали для дальнейшей работы. МЖГ контрастировали уранилацетатом и исследовали в электронном микроскопе [4].

Как видно на рис. 1 (см. вклейку) МЖГ представляют собой округлые замкнутые линии, напоминающие поверхностные мембраны клеток, препарат гомогенен и не содержит примеси капелек жира или других структур.

Солюбилизацию компонентов МЖГ проводили следующим образом. На первом этапе МЖГ промывали дважды рабочим буфером А порциями по 9 мл с последующим центрифугированием при 105 000 g и 4 °С в течение 1 ч. Промывные воды, обозначенные как фракции I-2 и I-3, использовали аналогично фракции I-1. Осадок суспендировали в 9 мл буфера А, содержащего 1 М MgCl<sub>2</sub>, выдерживали 20 ч при 4 °С, центрифугировали 1 ч при 105 000 g и 4 °С, собирали надосадочную жидкость, условно обозначали ее как фракция II-1. Осадок суспендировали в той же среде и через 1 ч центрифугировали в тех же условиях, получая фракцию II-2 и осадок.

Последний после промывания дистиллированной водой дважды суспендировали в 9 мл 1 % раствора тритона X-100 в буфере А по 1 ч при 4 °С, солюбилизованные компоненты отделяли центрифугированием в тех же условиях, фракции обозначали II-1 и III-2. Завершали процесс солюбилизации компонентов МЖГ озвучиванием осадка в 1 % растворе тритона X-100 в буфере А 4 раза по 15 с на ледяной бане (ультразвуковой генератор MSE) с последующим центрифугированием. Эту процедуру повторяли дважды и получали надосадки, обозначенные как фракции IV-1 и IV-2.

Фракции диализовали 24 ч против буфера А, разливали порциями, замораживали при —70 °С и хранили при —20 °С.

МЖГ из молока коров получали и фракционировали так же, как МЖГ молока женщин.

Полученные фракции анализировали на содержание белка, наличие полипептидных, липидных и липопротеидных компонентов, а также на содержание выявленных нами ранее АГ [1].

## Результаты и обсуждение

Данные о содержании белка во фракциях и распределении в них мембранных АГ представлены в табл. 1, где для сравнения приведены и результаты иммунохимического анализа плазмы женского молока и мембранных фракций ЖГ молока коров.

На рис. 2 (см. вклейку) представлены результаты электрофореза мембранных компонентов из фракций I—IV в ПААГ в присутствии ДСН с последующим специфическим выявлением белков кумасси G-250 (см. рис. 2, а),

Таблица 1

Распределение мембранных АГ по фракциям женского и коровьего молока (данные 12 опытов)

Материал	Количество белка, мг/мл	Объем фракции, мл	Наличие АГ (обратный титр)										
			АГ1	АГ2	АГ3	АГ4	АГ5	АГ13	АГ14				
Женское молоко													
Молочная плазма	Не исследовали	—	+	(512)	+	(2)	—	—	+	(1024)	—	+	(32)
Фракция МЖГ:													
I-1	25	55	+	(8)	+	(8)	±	—	+	(64)	—	+	(4)
I-2	5	9	+	(2)	+	(4)	—	—	—	—	—	—	—
I-3	0,2	9	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
II-1	15	9	+	(2—4)	+	(8)	—	—	—	—	—	+	(8)
II-2	2	9	+	(1)	+	(2)	—	—	—	—	—	+	(8)
III-1	0,9	9	—	—	—	+	(8)	—	—	—	—	—	—
III-2	0,1	9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
IV-1	0,6	9	—	—	—	—	+	(4—8)	—	—	—	—	—
IV-2	0,2	9	—	—	—	—	+	(1—2)	—	—	+	(1)	—
Коровье молоко													
МЖГ (фракции I, II, III и IV)	Не исследовали	по 9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

липопротеидов и липидов суданом черным Б (см. рис. 2, б), а также приведена шкала молекулярных масс, построенная по данным электрофореза в ПААГ стандартных метчиков в присутствии ДСН.

Как видно из табл. 1, МЖГ человека в целом содержат большое количество белков, что согласуется с данными других авторов о высоком содержании белка в МЖГ млекопитающих [7, 13]. Распределение белка по фракциям неравномерно: наибольшее его количество содержит фракция I-1, несколько меньшее — фракции II-1 и I-2, существенно ниже концентрация белка во фракциях I-3, II-2, III-1, 2 и IV-1, 2. Очень высокое содержание белка во фракции I-1 обусловлено, по-видимому, наличием в ней растворимых АГ молочной плазмы, вторично адсорбированных на мембранах жировых глобул.

Количественные данные о распределении белка коррелируют с картиной электрофоретического разделения компонентов в полученных фракциях (см. рис. 2, а): наибольшим числом полос характеризуется фракция I-1, богатый полипептидный спектр присущ также фракциям I-2 и II-1. На электрофореграммах фракций III-1 и IV-1 полос существенно меньше. Малая концентрация белков во фракциях III-2 и IV-2 не позволила выявить их электрофорезом в ПААГ.

При сравнении электрофореграмм, представленных на рис. 2, а, видно, что для адсорбированных и периферических компонентов МЖГ характерны как низко-, так и высокомолекулярные полипептиды, в то время как интегральные структуры мембраны содержат в основном высокомолекулярные белковые компоненты.

Как видно на рис. 2, б, фракции III и IV содержат липопротеидные и липидные компоненты при отсутствии таковых во фракциях I и II, причем при озвучивании мембранного матрикса в детергенте в раствор (фракция IV) переходит значительно большее количество липидных компонентов, чем при обычной обработке детергентом (фракция III), что может свидетельствовать о более глубокой деградации мембранного матрикса. Фракция IV характеризуется наличием высокомолекулярного (250 000 Д) липопротеида, не выявляемого окрашиванием на белки.

Иммунодиффузный анализ фракций показал, что в них в разных количественных соотношениях присутствуют лактоферрин (АГ1),  $\alpha$ -лактальбумин (АГ5), АГ2, АГ3, АГ4 и АГ13 (см. табл. 1). Фракции I-1, 2, 3 и II-1, 2 содержат ряд АГ, солюбилизаты III-1, 2 и IV-1 содержат соответственно только АГ3 и АГ4, во фракции IV-2 найдены небольшие количества АГ4 и АГ13.

В отличие от мембран молочной плазмы не содержит АГ3 и АГ4, АГ2 присутствует в ней в небольших количествах, в то время как лактоферрин и  $\alpha$ -лактальбумин определяются в высоких концентрациях.

Плазма молока коров, а также отдельные фракции из его МЖГ не содержат указанные АГ. Характер распределения АГ в полученных фракциях свидетельствует о принадлежности лактоферрина и  $\alpha$ -лактальбумина к адсорбированным молекулам, АГ2 и АГ14 — к периферическим структурам бислоя, а АГ3, АГ4 и АГ13 — к интегральным антигенам МЖГ.

Соотношение концентраций лактоферрина и  $\alpha$ -лактальбумина в молочной плазме и во фракциях I и II отражает их секреторную природу, однако наличие АГ1 не только во фракции I, но и во фракции II является доказательством прочной сорбции этого гликопротеида на периферических белках МЖГ, что обусловлено, по-видимому, сильными электростатическими взаимодействиями  $\text{Fe}^{2+}$ , присутствующего в молекуле этого АГ [8].

Корреляция между высокой концентрацией АГ4 во фракции IV-1 с наличием в ней высокомолекулярного липопротеида дала основание предполагать липопротеидную природу этого АГ. Положительная окраска полосы преципитации в иммунодиффузионном тесте специфическим реагентом на липопротеиды суданом черным Б подтвердила это предположение. Слабое окрашивание наблюдалось также для тест-системы АГ3, что также, по-видимому, может служить косвенным доказательством наличия небольшой липидной составляющей в его молекуле.

Таким образом, разработанный метод последовательной дезинтеграции МЖГ солями и детергентами позволил выявить на мембране ряд соединений с антигенными свойствами, погруженных в бислой на различную глубину, а также разделить мембранные АГ2,

## Характеристика полученных АС

Иммунизационный материал (фракция)	Наличие АТ к АГ							
	АГ1	АГ2	АГ3	АГ4	АГ5	АГ11	АГ13	АГ14
I-1	+	+	—	—	+	—	—	+
II-1	+	+	—	—	—	—	—	+
III-1	—	—	+	—	—	+	—	—
IV-1	—	—	—	+	—	+	—	—
IV-2	—	—	—	+	—	+	+	—

АГ3, АГ4 и АГ13 между собой и отделить их от секреторных компонентов молока: лактоферрина и  $\alpha$ -лактальбумина.

В результате такого разделения получены фракции III и IV, гомогенные в антигенном отношении и содержащие индивидуальные АГ соответственно 3 и 4.

Мембранные фракции были использованы для получения антисывороток — АС (табл. 2).

Как видно из табл. 2, АС к фракциям I-1 и II-1 не являются моноспецифическими, они выявляют антитела (АТ) к АГ2, лактоферрину, а также межорганному АГ14, не обнаруживаемому нами ранее, АС к фракциям III-1 и IV-1 характеризуются наличием специфических АТ соответственно к АГ3 и АГ4. При иммунизации кроликов фракцией IV-2 получены АС как к АГ4, так и АГ13. Часть иммунных сывороток к фракциям III-1 и IV-1, 2 содержала примесные АТ к межорганному мембранному АГ11 [1], легко удаляемые адсорбцией мембранами клеток почки или селезенки.

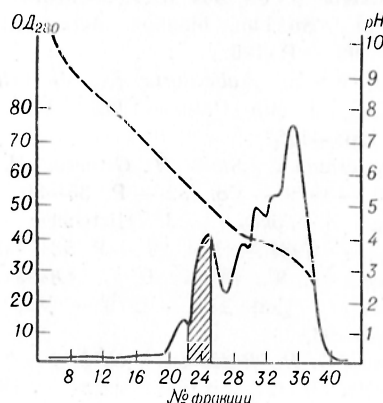


Рис. 3. Выделение АГ14 препаративным изoeлектрофокусированием.

Сплошная линия — профиль элюции белков с колонки; пунктирная — градиент pH; заштрихованная часть — иммунохимическая активность АГ14. Объем колонки 110 мл; градиент pH 3,0–5,0; градиент сахарозы 50–4 % (4 °C, 44 ч).

Освобождение АС к АГ2 от примесных АТ проводили в два этапа: вначале удаляли АТ к лактоферрину, затем к АГ14. Последний был получен в высокоочищенном состоянии препаративным изoeлектрофокусированием фракции I-1 [3] (рис. 3) и применен для приготовления иммуносорбента.

Моноспецифические АС к АГ2, АГ3 и АГ4 использовали наряду с соответ-

Таблица 3

Распределение АГ2, АГ3 и АГ4 в мембранных фракциях различных тканей и биологических жидкостях (данные иммунодиффузионного анализа)

Исследуемый материал	Наличие АГ (обратный титр)		
	АГ2	АГ3	АГ4
Нормальные ткани молочной железы (МЖ)	0	1	1
Другие ткани (n = 24)	0	0	0
Опухолевые ткани			
Рак молочной железы	0	1	2
Метастазы рака молочной железы в лимфатические узлы	0	1	1–2
Рак яичника	0	0	1–2
Рак легкого	0	0	0–1
Рак желудка	0	0	±–1
Другие опухоли (n = 9)	0	0	0
Плевральная и асцитическая жидкость больных раком молочной железы	0	0	1–2
Сыворотка крови онкологических больных	0	0	0
Сыворотка крови здоровых лиц	0	0	0

Примечание. Другие ткани — головной мозг, мозжечок, язык, миндалина, пищевод, желудок, толстая и тонкая кишки, печень, предстательная и слюнная железы, мочевой пузырь, почка, селезенка, мочеточник, сосуды, поперечнополосатая и гладкая мышцы, бронхи, поджелудочная железа, яичник и матка. Другие опухоли — рак толстой кишки, пищевода, матки, околоушной железы, подчелюстной железы, кожи, меланома, лимфогранулематоз.



ствующими антигенными фракциями в стандартных тест-системах при изучении специфичности АГ методом иммунодиффузии. Обнаружение указанных АГ проводили, используя гомогенаты различных нормальных и опухолевых тканей, а также солюбилизаты из их мембранных фракций (табл. 3).

Мембранные фракции из нормальных и опухолевых тканей получали дифференциальным центрифугированием гомогенатов тканей, обработанных в мягких условиях. Для этого нормальные и опухолевые ткани мелко порезали, добавляли 0,01 М Na-фосфатный буфер pH 7,4, содержащий 0,5 %  $\epsilon$ -АМК и 200 ИЕ/мл контрикала (буфер Б) из расчета 1:2 (масса ткани: объем буфера) и гомогенизировали при 10 000 об/мин 3 раза по 30 с на ледяной бане. Гомогенаты тканей последовательно центрифугировали при 1500 и 6000 g, осаждая обрывки ткани и клеточные ядра. Мембранную фракцию осаждали при 105 000 g и 4 °C в течение 30 мин. Полученные осадки мембран промывали буфером Б, центрифугировали снова в тех же условиях, повторяя отмывку до исчезновения белка в промывке. Мембраны лиофильно высушивали.

Солюбилизацию компонентов клеточных мембран проводили следующим образом: мембраны суспендировали в буфере А, содержащем 1 % тритон X-100 из расчета 10 мг в 1 мл, выдерживали 1 ч при 25 °C, оставляли на 20 ч при 4 °C и отделяли надосадочную фракцию М-1 при 105 000 g и 4 °C в течение 1 ч. Осадок ресуспендировали в том же буфере, содержащем 1 % тритон X-100, озвучивали 30 с (установка MSE) на льду, выдерживали 1 ч при 25 °C и центрифугировали 1 ч при 105 000 g и 4 °C. Надосадочную фракцию обозначили как М-2.

Как видно из табл. 1 и 3, АГ2 присущ МЖГ, но не выявляется в мембранах клеток МЖ, АГ3 и АГ4 присутствуют в нормальной молочной железе и сохраняются при малигнизации этого органа, АГ4 обнаружен также в опухолях других органов. Отсутствие исследованных АГ в МЖГ коров может указывать на их видоспецифический характер.

К настоящему моменту в литературе описано несколько антигенов МЖГ, присутствующих в нормальной и опухолевой тканях МЖ [8, 10—12]. Од-

нако сравнение этих АГ между собой и с АГ, выделенными нами, не представляется возможным из-за отсутствия их физико-химических характеристик. Косвенное сопоставление АГ по распределению в органах и тканях также весьма затруднительно, так как подавляющее большинство исследований по антигенам МЖГ выполнено с применением гетерологичных сывороток [11, 12] или моноклональных АТ [10] к нефракционированным, обезжиренным органическими растворителями МЖГ, что не позволяет с уверенностью судить о нативности выявляемых АГ.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Авдеев Г. И., Якубовская Р. И., Александр С. К. и др. // *Вопр. онкол.* — 1983. — № 11. — С. 33—37.
2. Партикова В. Ф., Оглоблина О. Г., Якубовская Р. И. и др. // *Современные методы в биохимии.* — М., 1977. — С. 192—204.
3. Остерман Л. А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. — М., 1983. — С. 67—74.
4. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих: Пер. с англ. — М., 1975. — С. 96.
5. Фримель Х. // *Иммунологические методы:* Пер. с нем. — М., 1979. — С. 66.
6. Храмова Н. И., Абелев Г. И. // *Бюл. exper. биол.* — 1961. — № 12. — С. 107—109.
7. Basch J. J., Harold M., Farrell J. et al. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1976. — Vol. 448. — P. 589—598.
8. Bullen J. J., Rogers H. J., Leigh L. // *Brit. med. J.* — 1972. — Vol. 1. — P. 69—81.
9. Emmelot P. C., Bos E. J., Beneditti E. L. et al. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1964. — Vol. 90. — P. 126.
10. Gaff K. C., Labdulariz K., Beverley P. et al. // *J. clin. Path.* — 1982. — Vol. 35. — P. 1253—1262.
11. Heyderman E., Steele H., Ormerod M. G. // *Ibid.* — 1979. — Vol. 32. — P. 35—39.
12. Inam A., Tokes J. // *J. Histochem. Cytochem.* — 1981. — Vol. 29. — P. 581—584.
13. Keenan T. W., Morre D. J., Olson D. E. et al. // *J. Cell. Biol.* — 1970. — Vol. 44. — P. 80—93.
14. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // *J. biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
15. Patton S., Fowles F. U. // *J. theor. Biol.* — 1967. — Vol. 15. — P. 274.
16. Weber K., Osbaorn H. // *J. biol. Chem.* — 1969. — Vol. 244. — P. 4406—4412.

Поступила 11.03.85

# ISOLATION OF MEMBRANE ANTIGENS OF MAMMARY GLAND EPITHELIAL CELLS FROM MEMBRANES OF FATTY GLOBULES OF HUMAN MILK

R. I. Yakubovskaya, M. D. Korosteleva,  
S. K. Alexander, G. I. Avdeev

Research Institute of Oncology, Moscow

Seven antigens, belonging to various structures of bilayer: Ar1 (lactoferrin) and Ar5 ( $\alpha$ -lactalbumin) — adsorbed proteins; Ar2 and Ar14 — peripheral components; Ar3, Ar4 and Ar13 — integral structures, were found after

treatment of fatty globule membranes from human milk using the agents with improved extracting activity (isotonic solution, 1 M  $MgCl_2$ , 1% Triton X-100, combined effect of 1% Triton X-100 and sonication). The procedure developed enabled to separate these antigens and to isolate them from the main milk secretory proteins lactoferrin and  $\alpha$ -lactalbumin. Towards highly purified preparations of the membrane antigens 3 and 4 monospecific antisera were raised, which allowed to identify these components among tissue-specific antigens of mammary gland capable to be maintained in malignization of the tissue. Ar4 was also found in tumoral tissues of ovary, lung and stomach.

УДК 616.127-002-022.7+616.12-002.77]-092.9-07:616-008.939.15-074

Г. С. Козлов, С. М. Носков

## ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ И АНТИОКСИДАНТНЫЕ СИСТЕМЫ ОРГАНИЗМА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ СТРЕПТОКОККОВОМ МИОКАРДИТЕ И РЕВМОКАРДИТЕ

Ярославский медицинский институт

Перекисному окислению липидов (ПОЛ) отводится важная роль в развитии патологических реакций в миокарде. Усиление ПОЛ мембран миоцитов, уменьшение содержания антиоксидантов и активности антиоксидантных ферментных систем отмечены при ишемической болезни сердца и на модели острой ишемии сердечной мышцы в эксперименте [1, 6, 7]. Интенсификация ПОЛ обнаружена при адреналиновом миокардите [8]. Полагают, что усиление ПОЛ может происходить в клетке только при дефиците природных антиоксидантов (токоферол) и ферментных антиоксидантных систем (супероксиддисмутаза, глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза, каталаза) [5, 17]. Процессы ПОЛ и антиоксидантной защиты при воспалительных заболеваниях миокарда изучены недостаточно. Целью настоящего исследования было определение интенсивности ПОЛ, содержания токоферола и активности глутатионредуктазы у крыс с экспериментальным стрептококковым миокардитом и у больных ревмокардитом.

### Методика

Экспериментальный стрептококковый миокардит у 26 самок белых крыс массой тела 80–90 г воспроизводили путем 5-кратного введения животным культуры  $\beta$ -гемолитического стрептококка группы А штамм 2432 в дозе 3–4 млрд. микробных тел на 100 г

массы внутрибрюшинно и паратонзиллярно [11]. Согласно применяемому методу, для моделирования стрептококкового миокардита пригодны только молодые, растущие крысы. Исследование проводили на 15, 30 и 45-е сутки от начала эксперимента, рассматривая эти сроки как соответственно острый, подострый и склеротический периоды. При этом у подопытных крыс развивается отчетливо выраженный миокардит, морфологически характеризующийся в острой стадии альтерацией миокарда (зернистая дистрофия, некроз и некроз миоцитов, полнокровие и отек миокарда), а в склеротической — кардиосклерозом [11]. Контролем служили 12 животных, которым вводили убитую культуру стрептококка.

Клиническую группу составили 27 больных ревматизмом (20 женщин и 7 мужчин) в возрасте  $41,6 \pm 1,7$  года, у 15 из них зарегистрирован ревматизм в неактивной фазе. У 12 больных с минимальной степенью активности ревматического процесса, обследованных при поступлении на стационарное лечение в клинику кафедры госпитальной терапии, диагностирован с использованием критериев А. И. Нестерова [9] слабо выраженный ревмокардит. Больные активным ревматизмом обследованы повторно после тридцатидневного курса обычной противоревматической терапии. Основу комплекса лекарственных средств составили нестероидные противовоспалительные препараты (аспирин, индометацин, вольтарен, бруфен, ибупрофен) и антибиотики (пенициллин, эритромицин). По показаниям назначали сердечные гликозиды и мочегонные. У всех пациентов констатирован порок сердца: митральный — 18, аортальный — 3, комбинированный митрально-аортальный — 6 случаев. Для исключения влияния недостаточности кровообращения на изучаемые показатели обследовали больных с недостаточностью кровообращения не выше II стадии. Контролем служили 16 здоровых доноров (11 женщин и 5 мужчин) в возрасте  $38,2 \pm 2,4$  года.

Интенсивность ПОЛ и активность антиоксидантных систем у крыс с экспериментальным стрептококковым миокардитом ( $M \pm m$ )

Показатель	Объект исследования	Контроль (n=12)	Острая фаза (n=10)	Подострая фаза (n=8)	Склеротическая фаза (n=8)
Перекисное окисление липидов, $E_{233}$ /на 1 г липидов	Миокард Эритроциты	113,7 $\pm$ 7,1 54,7 $\pm$ 2,2	147,2 $\pm$ 6,3* 93,3 $\pm$ 5,8*	120,6 $\pm$ 8,7 107,5 $\pm$ 6,6*	101,6 $\pm$ 9,9 54,7 $\pm$ 1,9
Токоферол, мг/л	Плазма	2,19 $\pm$ 0,13	1,50 $\pm$ 0,16*	1,91 $\pm$ 0,12**	2,51 $\pm$ 0,17**
Глутатионредуктаза, мкмоль/мин/г	Миокард Эритроциты	1,11 $\pm$ 0,09 0,76 $\pm$ 0,04	1,64 $\pm$ 0,10* 1,16 $\pm$ 0,09*	1,31 $\pm$ 0,09** 1,17 $\pm$ 0,08*	0,97 $\pm$ 0,05** 0,66 $\pm$ 0,03**

\* Достоверные по сравнению с нормой изменения ( $P < 0,05$ ), выявляемые при сравнении выборочных средних.

\*\* Достоверные по сравнению с нормой изменения ( $P < 0,05$ ), выявляемые при сравнении выборочных долей.

Животных забивали декапитацией под эфирным наркозом. Кровь у больных и допоров брали из вены после 12-часового голодания. Интенсивность ПОЛ в миокарде и эритроцитарных мембранах животных, в эритроцитарных мембранах больных характеризовали по содержанию диеновых конъюгатов (ДК), концентрацию которых выражали в  $E_{233}$  на 1 г липидов [12]. Токоферол в плазме определяли по реакции с 2,2-дипиридиллом [14]. Липиды экстрагировали ранее описанным способом [16]. Активность глутатионредуктазы в миокарде и эритроцитах определяли спектрофотометрически [13, 18]. Активность фермента выражали количеством микромолей НАДФ·Н<sub>2</sub>, окисленного за 1 мин в расчете на 1 г белка или гемоглобина. Определяли содержание общих липидов [15], общего белка [19] и гемоглобина гемоглобинцианидным методом. Статистическую обработку материала осуществляли путем сравнения выборочных средних и выборочных долей с использованием  $t$ -критерия Стьюдента.

### Результаты

Результаты экспериментальной части представлены в табл. 1. В острый период воспалительного процесса наблюдается достоверное усиление ПОЛ, увеличение активности глутатионредуктазы и уменьшение содержания то-

коферола. В подострый период ПОЛ в миокарде снижается до уровня контроля. Сохраняется достоверное повышение ПОЛ и глутатионредуктазы эритроцитов; у большинства животных (сравнение выборочных долей) повышена активность глутатионредуктазы в миокарде и понижена концентрация токоферола в плазме. В склеротической фазе все изучаемые показатели снижаются до уровня контрольных цифр. Более того, при сравнении выборочных долей отмечается достоверное снижение активности глутатионредуктазы и повышение содержания токоферола по сравнению с показателями в норме.

Результаты клинической части представлены в табл. 2. Не выявлено зависимости исследуемых показателей от возраста и пола больных. У больных ревмокардитом по сравнению с группами больных неактивным ревматизмом и здоровых людей повышено содержание диеновых конъюгатов в эритроцитарных мембранах на 50 %, увеличена активность глутатионредукта-

Таблица 2

Интенсивность ПОЛ и активность антиоксидантных систем у больных ревмокардитом ( $M \pm m$ )

Показатели	Норма (n=16)	Неактивная фаза ревматизма (n=15)	Ревмокардит	
			до лечения (n=12)	после лечения (n=12)
Перекисное окисление липидов эритроцитов, $E_{233}$ /на 1 г липидов	146 $\pm$ 9	165 $\pm$ 6	247 $\pm$ 19*	174 $\pm$ 16
Токоферол плазмы, мг/л	8,95 $\pm$ 0,75	8,70 $\pm$ 0,45	6,70 $\pm$ 0,40*	8,85 $\pm$ 0,65
Глутатионредуктаза эритроцитов, мкмоль/мин/г	2,83 $\pm$ 0,07	3,12 $\pm$ 0,12	3,85 $\pm$ 0,16*	3,38 $\pm$ 0,23*

\* Отмечены достоверные ( $P < 0,05$ ) по сравнению с показателями неактивной фазы изменения.

зы в эритроцитах на 24 %, снижено содержание токоферола в плазме на 23 %. После лечения нормализуется ПОЛ и концентрация токоферола, активность глутатионредуктазы остается повышенной.

### Обсуждение

В острой фазе воспалительного процесса в миокарде и эритроцитах подопытных животных отмечается накопление первичных продуктов ПОЛ на фоне повышения активности глутатионредуктазы и уменьшения концентрации токоферола. У подопытных крыс вместе с уменьшением выраженности альтеративно-экссудативных изменений в миокарде наблюдается нормализация ПОЛ и активности антиоксидантных систем как в миокарде, так и в эритроцитах.

У больных ревмокардитом отмечается усиление ПОЛ эритроцитарных мембран, сопровождаемое увеличением активности глутатионредуктазы эритроцитов и уменьшением содержания токоферола в плазме. Вместе с улучшением клинической картины заболевания нормализуется ПОЛ и антиоксидантная защита. Эти данные согласуются с результатами аналогичных клинических работ, в которых при активном ревматизме выявлено накопление конечных продуктов ПОЛ (малонового диальдегида) и снижение концентрации токоферола в плазме [2, 10].

В миокарде и эритроцитах крыс с экспериментальным стрептококковым миокардитом в острый период наблюдаются идентичные изменения интенсивности ПОЛ. Коэффициент корреляции между содержанием диеновых конъюгатов эритроцитарных мембран и миокарде  $r = +0,78$  ( $P < 0,01$ ). Можно предположить, что при экспериментальном миокардите усиление перекисления липидов в эритроцитах до некоторой степени характеризует ПОЛ в миокарде.

Обусловленное дефицитом антиоксидантной системы повышение содержания токсичных продуктов ПОЛ вызывает изменение состава липидов, липидно-белковых взаимоотношений и соответственно изменение функциональной активности мембраносвязанных ферментов. В таких условиях могут возникать весьма серьезные нару-

шения в системе транспорта кальция в миоцитах [3]. Перекиси липидов вызывают усиленный распад АТФ [20], что может нарушать энергетический обмен при воспалительных поражениях миокарда [4]. Дефицит кальция и АТФ в свою очередь рассматриваются при миокардитах различной этиологии как основные причины падения сократительной способности миокарда. Таким образом, интенсификация ПОЛ мембран миоцитов может играть существенную роль в патогенезе ревмокардита.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Бурлакова Е. Б. // Кардиология. — 1980. — № 8. — С. 42.
2. Виткинд Ю. Э., Иванова Е. А. // Ревматизм у детей. — Л., 1959. — Вып. 1. — С. 321.
3. Коган В. Е., Архипенко А. П. и др. // Биохимия. — 1983. — № 4. — С. 1141.
4. Карсанов Н. В., Хухашвили З. Г. // Кардиология. — 1984. — № 1. — С. 96.
5. Ланкин В. З. // Биохимия липидов и их роль в обмене веществ. — М., 1981. — С. 75.
6. Ланкин В. З., Коган А. Х. и др. // Бюл. экспер. биол. — 1982. — № 5. — С. 58.
7. Меерсон Ф. З., Диденко В. В. // Там же. — 1984. — № 10. — С. 398.
8. Мильчаков В. И., Демуров Е. А. // Там же. — 1982. — № 10. — С. 28.
9. Нестеров А. И., Повиков Ю. И. // Вопр. ревмат. — 1978. — № 2. — С. 9.
10. Потапова Е. М., Козлов Г. С. // Новые методы диагностики и лечения недостаточности кровообращения. — Кострома, 1983. — С. 182.
11. Сементовская Т. В. Аритмогенная готовность миокарда при экспериментальной стрептококковой инфекции и фармакодинамика ацетилсалициловой кислоты: Автореф. дис. канд. мед. наук. — Ярославль, 1983.
12. Стальная И. Д. // Современные методы в биохимии. — М., 1977. — С. 63.
13. Beutler E. // Science. — 1969. — Vol. 165. — P. 613.
14. Biery J., Teels L. // Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.). — 1964. — Vol. 117. — P. 131.
15. Bragdon J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 190. — P. 513.
16. Folch J., Lees M., Stanley G. // Ibid. — 1957. — Vol. 226. — P. 497.
17. Galli C., Socini A. // Acta vitaminol. enzymol. — 1982. — Vol. 4. — P. 245.
18. Hern H., Bruns F. // Biol. Z. — 1958. — Bd 64. — S. 315.
19. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265.
20. Rentball W. T., Tappel A. // Biochim. biophys. Acta. — 1967. — Vol. 136. — P. 402.

Поступила 26.03.85

# LIPID PEROXIDATION AND THE ANTIOXIDANT SYSTEMS OF A BODY IN EXPERIMENTAL STREPTOCOCCAL MYOCARDITIS AND RHEUMATIC CARDITIS

G. S. Kozlov, S. M. Noskov

Medical School, Yaroslavl

Lipid peroxidation rate and activity of glutathione and tocopherol antioxidant systems were studied in rats with experimental streptococcal myocarditis and in patients with rheu-

matic carditis. During the acute period of inflammation content of diene conjugates and activity of glutathione reductase were increased in myocardium and erythrocytes of rats simultaneously with a decrease in tocopherol concentration in blood plasma. In the patients with rheumatic carditis activation of lipid peroxidation and the glutathione reductase was found in erythrocytes as well as a decrease of the tocopherol content—in blood plasma. Interrelationship between alterations in these patterns and their functions in rheumatic carditis pathogenesis are discussed.

УДК 616.71-001.5-003.9-07:616.71-008.934.771-074

Б. Я. Власов, А. М. Хрущелевская

## МЕТАБОЛИЗМ ЦИТРАТА В ДИНАМИКЕ КОНСОЛИДАЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПЕРЕЛОМА

Лаборатория биохимии НИИ травматологии и ортопедии, Иркутск

Как известно [4], содержание цитрата в зрелой костной ткани в 100—200 раз превышает его концентрацию в других органах. Кроме того что цитрат является участником трикарбонового цикла и аллостерическим эффектором ряда ключевых ферментов [9], в минерализованных тканях он связан с метаболизмом неорганической матрицы [18]. Такая функциональная гетерогенность лимонной кислоты может обеспечить тонкую регуляцию и взаимодействие обмена основных компонентов костной ткани [2].

Исходя из этих представлений, можно полагать, что при повреждении кости метаболизм цитрата должен играть важную роль в формировании органического матрикса регенерата и его кальцификации. Имеющиеся по этому вопросу данные литературы [15] весьма немногочисленны и касаются главным образом изучения содержания цитрата без анализа основных путей его превращения в ходе многостадийного репаративного процесса.

Целью настоящей работы явилось изучение в эксперименте содержания цитрата в костной ткани и крови в зависимости от характера фиксации отломков и стадии формирования регенерата. Кроме того, были исследованы основные ферментативные механизмы, ответственные за изменение концентрации лимонной кислоты в костном регенерате и крови в процессе репарации.

### Методика

В работе было использовано 365 белых крыс обоего пола массой тела 180—220 г,

находившихся в условиях штатного вивария и получавших установленный пищевой рацион.

Животным под эфирным наркозом создавали закрытый перелом диафиза средней трети правой бедренной кости. У одних крыс отломки фиксировали металлическим интрамедуллярным штифтом, у других фиксацию отломков не проводили.

Спустя различное время после перелома животных по 4—8 особей в каждый срок декапитировали, а кровь, костную мозоль и пень использовали для дальнейшего исследования.

В связи с тем что минерализованные органы содержат относительно мало клеточных элементов, даже незначительное загрязнение их компонентами других тканей (кровь, костный мозг) резко изменяет не только количественные, но и качественные параметры метаболизма, что может привести к ложным теоретическим обобщениям. С целью полного освобождения кости и ее регенерата от сопутствующих тканей мы применяли методику центрифугирования цельных проб, разработанную в нашей лаборатории (А. с. № 1175481. Способ получения растворимой фракции костных клеток. Авторы: Б. Я. Власов, П. Ф. Переслыцких, Л. А. Сысоев).

Подготовленную таким образом пробу в холодильной камере (около 0°C) растирали в течение 2 мин со стеклянным песком в 5% растворе метафосфорной кислоты (определение цитрата; 1 мл на 25 мг ткани; применять только кристаллический препарат метафосфорной кислоты) или в 0,25 М растворе забуференной сахарозы (определение ферментов; 1 мл на 50 мг ткани; pH 7,40). Метафосфорный экстракт оставляли на 2 ч, периодически встряхивая для полного извлечения цитрата, содержание которого определяли флуориметрически [12] в 0,5 мл пробы.

Активность ферментов определяли в цельном сахарозном гомогенате (0,2—0,5 мл) сразу после оседания частиц песка. Важно отметить, что, согласно нашим наблюдениям, при растирании минерализованных тканей может происходить существенное защелачивание среды. Учитывая ограниченный объем материала, pH гомогената и содержимого кюветы спектрофотометра, контролировали прецизион-



ным рН-метром от аппарата «микроАструп» («Радиометр», Дания).

Активность цитратсинтазы (КФ 4.1.3.7) и АТФ-цитратлиазы (КФ 4.1.3.8) определяли соответственно по нарастанию [17] и убыли цитрата [13] в инкубационной среде, содержащей все необходимые компоненты.

Об активности НАД-зависимой изоцитрат-дегидрогеназы (КФ 1.1.1.4) судили по приросту поглощения света при 340 нм [16]. Митохондрии печени выделяли общепринятым методом [5]. Содержание белка определяли по Лоури [14].

Результаты исследования обработаны статистически [11]; различие средних признавали достоверным при  $P \leq 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Как видно из табл. 1, при заживлении экспериментального перелома с фиксацией отломков в костной мозоли наряду с общей тенденцией к увеличению содержания цитрата отмечается волнообразное изменение этого показателя с двумя достоверными подъемами на 3-й и 6-й неделях. Необходимо подчеркнуть, что даже при длительных сроках наблюдения (20 нед) содержание лимонной кислоты в мозоли все еще остается достоверно ниже, чем в интактном диафизе бедренной кости.

Анализируя полученные данные, можно отметить, что два обнаруженных подъема концентрации лимонной кислоты совпадают по времени соответственно с завершением биосинтеза органического матрикса и интенсивной кальцификацией мозоли [6].

Хорошо известно [7], что непрочная фиксация отломков в поврежденной кости приводит к нарушению остеогенеза с более медленным образованием органической основы мозоли и задержкой ее оссификации. Таким образом, если отмеченные подъемы концентрации цитрата отражают фазы остеогенеза, то при переломе без фиксации отломков эти подъемы должны быть сдвинуты в сторону более длительных сроков. Действительно, как можно видеть из табл. 1, достоверное повышение концентрации лимонной кислоты в этих опытах приходится на 4-й и 8-й недели.

При сопоставлении изменений содержания цитрата в поздние сроки консолидации (6 нед и больше) в зависимости от характера остеогенеза выявлено (см. табл. 1), что концентрация лимонной кислоты в регенерате при переломе без фиксации отлом-

Таблица 1

Содержание цитрата в костной мозоли (нмоль на 1 г сухой массы) и крови (нмоль/мл) в процессе консолидации экспериментального перелома

Время после перелома, нед	Фиксация отломков	Костная мозоль	Кровь
Интактные животные		20,9±0,4 (8) (диафиз бедра)	108±6
1	+	4,55±0,44 (6)	155±5 (5)
	—	3,19±0,28 (6)	155±9
2	+	3,29±0,22 (5)	213±7 (5)
	—	4,13±0,55 (5)	162±9
3	+	8,00±0,47 (6)	133±6 (6)
	—	4,25±0,40 (6)	189±11
4	+	6,20±0,30 (6)	147±7 (6)
	—	6,38±0,52 (5)	200±11
6	+	9,72±0,62 (6)	186±13 (4)
	—	4,55±0,27 (6)	146±6
8	+	11,46±0,47 (5)	146±12
	—	6,64±0,44 (4)	193±8
10	+	13,05±0,63 (5)	100±4 (4)
	—	8,00±0,40 (5)	162±8
15	+	14,95±0,39 (6)	92±7 (5)
	—	9,29±0,39 (5)	109±8
20	+	16,64±0,38 (5)	97±7 (5)
	—	13,53±0,50 (5)	114±7

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3: в скобках—число животных.

ков достоверно ниже, чем в аналогичных опытах с фиксацией. Эти результаты могут служить хорошим подтверждением представлений М. Ф. Гулого и соавт. [3] о цитрате как факторе, отражающем зрелость костной мозоли и кости.

Изменение содержания цитрата в крови животных в процессе репарации кости также зависит от характера фиксации отломков (см. табл. 1), но в отличие от данных исследования мозоли первый подъем концентрации метаболита при фиксации отломков и без нее наблюдается соответственно на 2-й и 3—4-й неделях опыта. Важно отметить, что концентрация цитрата в крови у животных с фиксацией отломков не отличается от уровня интактных крыс к 10-й неделе после перелома, в то время как в опытах без фиксации в этот период содержание лимонной кислоты превышает исходный показатель на 50 % ( $P \leq 0,001$ ). Этот факт, вероятно, отражает более длительную перестройку костной мозоли в условиях нарушения репаративного процесса и в связи с доступностью

Таблице 2

Активность цитратсинтазы, АТФ-цитратлиазы и НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы (нмоль/мин на 1 мг белка) в костной мозоли при консолидации экспериментального перелома

Срок после перелома, нед	Цитратсинтаза	АТФ-цитратлиаза	НАД-зависимая изоцитратдегидрогеназа
Несоврежденный диафиз бедра	$3,72 \pm 0,38$ (10)	Не определяется (6)	$11,29 \pm 1,08$ (7)
1	$2,21 \pm 0,32$ (6)	$2,34 \pm 0,38$ (4)	$14,25 \pm 0,73$ (4)
2	$3,11 \pm 0,51$ (4)	$4,56 \pm 0,83$ (5)	$14,34 \pm 1,17$ (5)
3	$2,42 \pm 0,20$ (5)	$3,66 \pm 0,47$ (4)	$17,96 \pm 1,78$ (5)
4	$3,98 \pm 0,36$ (6)	—	$26,79 \pm 2,80$ (5)
6	$8,57 \pm 0,63$ (6)	$0,91 \pm 0,28$ (6)	$43,36 \pm 3,59$ (5)
8	$6,35 \pm 0,55$ (5)	Не определяется (4)	$40,18 \pm 3,73$ (5)
10	$5,27 \pm 0,64$ (5)	—	$23,16 \pm 1,36$ (5)
15	$4,41 \pm 0,30$ (5)	—	$18,26 \pm 1,39$ (4)

крови для анализа может представить клинический интерес.

Для того чтобы выяснить механизм выявленных изменений уровня цитрата в костной мозоли и крови при переломе с неосложненным течением остеогенеза, было проведено изучение активности ферментов, участвующих в метаболизме лимонной кислоты. Установлено (табл. 2), что в интактной кости и регенерате на поздних этапах его формирования активность цитратсинтазы, лимитирующего фермента трикарбонового цикла, превышает соответствующий показатель в других органах в 1,5—2 раза [10]. Это еще раз свидетельствует об исключительной роли лимонной кислоты в метаболизме минерализованных тканей.

Наибольшее повышение активности цитратсинтазы отмечается на 6-й неделе после перелома, что соответствует второму подъему цитрата в костной мозоли (см. табл. 1). Повышение активности цитратсинтазы в этот период может обеспечить более интенсивное

использование цитрата через НАД-зависимую изоцитратдегидрогеназную реакцию (см. табл. 2) и отмеченное повышение этого метаболита в крови. Кроме того, в этой фазе повышению уровня цитрата в исследованных тканях способствует снижение утилизации субстрата за счет АТФ-цитратлиазы (см. табл. 2).

Однако первый подъем содержания цитрата в костной мозоли и крови не удается объяснить, если исходить из данных об активности цитратсинтазы, которая в начальный период формирования регенерата даже ниже, чем у интактных животных (см. табл. 2). Более того, низкая активность цитратсинтазы не согласуется с высокой активностью АТФ-цитратлиазы и через 1—3 нед после перелома, т. е. в период, когда в костной мозоли наблюдается интенсивный липогенез [11].

Анализируя отмеченные противоречия, а также возможность связывания костью экстраоссального цитрата [8], мы пришли к выводу, что для ре-

Таблица 3

Активность цитратсинтазы (нмоль/мин на 1 мг белка) митохондрий печени в динамике заживления экспериментального перелома

Срок после перелома, нед	С фиксацией отломков	Без фиксации отломков
Интактные животные	$2,75 \pm 0,33$ (5)	$2,85 \pm 0,18$ (6)
1	$2,75 \pm 0,17$ (5)	$2,63 \pm 0,32$ (5)
2	$3,99 \pm 0,27$ (5)	$2,93 \pm 0,33$ (5)
3	$3,85 \pm 0,30$ (6)	$4,14 \pm 0,17$ (5)
4	$2,56 \pm 0,21$ (5)	$4,44 \pm 0,20$ (5)
6	$3,05 \pm 0,19$ (5)	$2,67 \pm 0,19$ (5)
8	$2,68 \pm 0,17$ (5)	$2,74 \pm 0,26$ (5)
10	$2,44 \pm 0,17$ (4)	$2,88 \pm 0,18$ (4)
15	$2,65 \pm 0,29$ (4)	$3,10 \pm 0,18$ (4)

Л. Л. Горняк, К. Д. Краснопольская, О. Н. Одиноква,  
С. П. Феценко, С. С. Шишкин

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ С ПОЛОЖИТЕЛЬНО ЗАРЯЖЕННЫМИ ФЛЮОРОКРАСИТЕЛЯМИ

Институт медицинской генетики АМН СССР, Москва

Гликозаминогликаны (ГАГ) входят в состав протеогликановых комплексов, которые наряду с коллагеном и структурными гликопротеидами являются основными макромолекулярными структурами экстраклеточного матрикса. Расшифровка первичной структуры ГАГ и интерес к их макромолекулярной организации и функциям были обусловлены открытием наследственных дефектов обмена — мукополисахаридозов (МПС), характеризующихся внутриклеточным накоплением и гиперэкскрецией этих соединений у больных [1]. Несмотря на большое внимание к изучению ГАГ и протеогликанов, применяемые методы являются либо очень трудоемкими, либо недостаточно информативными. Поэтому в ходе разработки программы биохимической диагностики МПС и других наследственных форм поражения скелета [2] мы ставили своей целью поиск новых методов исследования ГАГ в биологическом материале больных. Большинство биологически значимых ГАГ — сульфатированные линейные гетерополимеры с высокой плотностью отрицательных зарядов [3]. Структурное сходство ГАГ с нуклеиновыми кислотами, для исследования которых широко используются катионные флюорокрасители (ФК), послужило основанием для применения этих веществ при исследовании ГАГ [4, 5]. В указанных работах использовали акридиновый, оранжевый (АО), 4,6-диамидино-2-фенилиндол  $\times$  HCl (ДАФИ) и «Hoechst 33258»; первый — для флюориметрического титрования экскретируемых ГАГ, второй и третий — для качественной оценки ГАГ, входящих в состав капсулы микроорганизмов.

В данной работе исследован механизм взаимодействия ГАГ с положительно заряженными ФК и изучены возможности использования этого взаимодействия для исследования ГАГ в биологическом материале больных.

### Методика

Биологический материал для исследования был представлен образцами нативной и диализованной против воды (20 ч, 4°C) мочи здоровых и больных МПС людей, а также протеогликановыми мономерами, выделенными из хряща новорожденных, погибших от асфиксий и летальных костных дисплазий, по ранее описанной методике [6]. В работе использовали стандарты ГАГ: хондроитин-4-сульфат (Х-4-С), хондроитин-6-сульфат (Х-6-С), дерматансульфат (ДС) фирмы "Seikagaku Kogyo Co." (Япония), гиалуроновую кислоту (ГК) фирмы "Miles" (Англия), хондроитинсульфат (ХС) фирмы "Serva" (ФРГ), гепарин (ГП) фирмы "Sprofa" (ЧССР), кератансульфат (КС), любезно предоставленный д-ром А. Cifonelly (Чикаго, США). Стандарт гепарансульфата (ГС) был получен из мочи больных МПС III А с гиперэкскрецией ГС после выделения суммарной фракции ГАГ с помощью преципитации 0,1 % раствором цетилпиридинийхлорида, перерастворения в 2 М NaCl, последующего осаждения ГАГ абсолютным этанолом и перерастворения хондроитиназой ABC ("Seikagaku Kogyo Co."). Препарат диализовали против воды (20 ч), лиофилизировали и перерастворили в воде. Десульфатированные препараты ХС получали путем перевода натриевой соли ХС в пиридиниевую [7] с последующей инкубацией раствора последней в 50 мл 90 % водного раствора диметилсульфоксида при 80°C в течение различных интервалов времени (10, 20, 40, 80, 160 и 300 мин) [8]. Диализованные против воды и лиофилизированные препараты использовали в виде растворов в концентрации 0,1 мг/мл. Электрофоретическое разделение ГАГ осуществляли на ацетат-целлюлозных пленках ("Cellogel", "Serva") в 0,1 М HCl ( $I=5$  мА,  $U=20$  В) в течение 2 ч. Пленки окрашивали 0,1 % раствором алцианового синего в 2,5 % уксусной кислоте в течение 30 мин с последующей отмывкой в 10 % уксусной кислоте до получения светло-голубого фона. Концентрацию ГАГ определяли стандартными методами по содержанию уроновых кислот [9] и гексозамина [10]. Концентрацию креатинина в моче определяли стандартным спектрофотометрическим методом. Флюоресценцию свободных ФК и комплексов ГАГ — флюорохром измеряли на спектрофлюориметрах "Hitachi MPF-2A" и "Hitachi-850" (Япония) в кварцевых кюветах сечением  $1 \times 1$  см ( $\lambda_{возб}=355$  нм,  $\lambda_{флюор}=450$  нм). Флюориметрическое титрование проводили в кювете, содержащей 2 мл раствора ФК в воде, pH 5,6—6,0 или 0,005 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 2,0 с рабочей концентрацией  $5 \cdot 10^{-6}$  М, внося микрошприцем по 5—10 мкл исследуемого раствора и тщательно перемешивая. Исходную флюоресценцию свободного

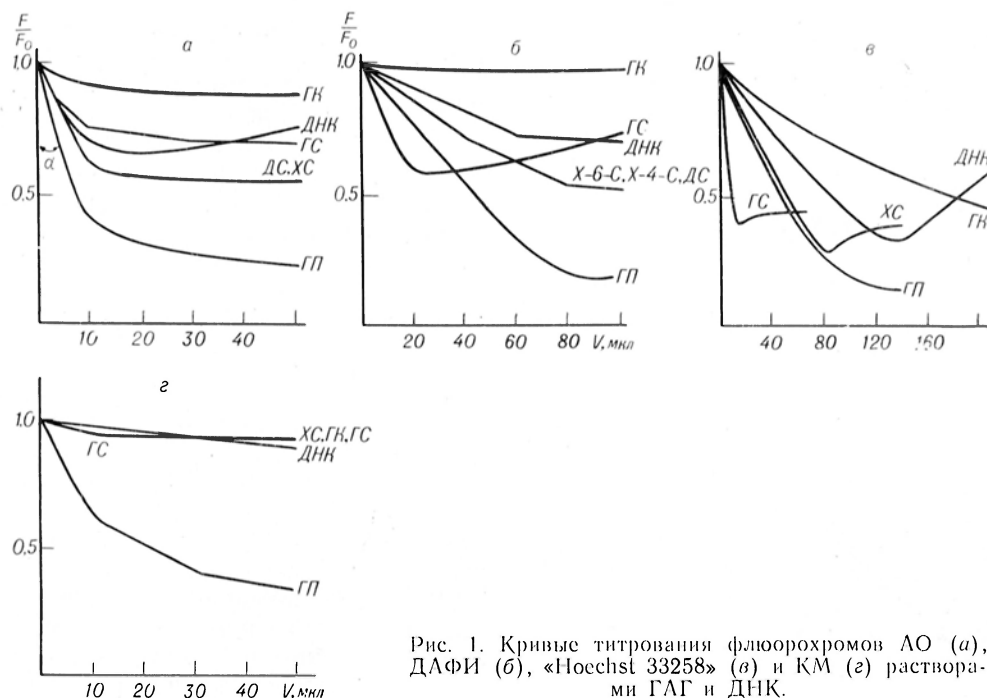


Рис. 1. Кривые титрования флюорохромов АО (а), ДАФИ (б), «Hoechst 33258» (в) и КМ (г) растворами ГАГ и ДНК.

ФК принимали за 100 %. Результаты выражали графически.

**Реактивы.** В работе использовали высокополимерную ДНК из эритроцитов цыплят ("Reanal", ВНР) и бычий сывороточный альбумин ("Koch Light", Англия). Флюорохромы: АО, ДАФИ, квинакрин мустард (КМ) ("Serva") и "Hoechst 33258" ("Calbiochem", FRG).

## Результаты и обсуждение

Учитывая данные о структуре ГАГ и результаты работы Гроссгебауэра [4], показавшего принципиальную возможность взаимодействия ГАГ с ДНК-связывающими флюорохромами, мы исследовали спектры возбуждения и флюоресценции последних при взаимодействии со стандартами ГАГ. На рис. 1 показаны кривые титрования ФК водными растворами (рН 5, 6) ГК, ГП, ДС, X-6-C, X-4-C и ДНК в концентрации 0,1 мг/мл и ГС в концентрации 0,45 мг/мл. Кривые титрования оценивали по выраженности перегиба и углу наклона линейной части кривой к оси ординат ( $\text{tg}\alpha$ ). Анализ кривых титрования позволяет предположить, что механизм взаимодействия ГАГ с ДАФИ и «Hoechst 33258» практически одинаков, но отличается от такового для АО и КМ. Очевидно также, что наиболее информативным для характеристики индивидуальных ГАГ является взаимодейст-

вие ДАФИ с различными типами ГАГ.

Для выяснения механизма взаимодействия ДАФИ с ГАГ, который, судя по их химической структуре, должен носить электростатический характер, использовали метод ступенчатого десульфатирования ХС, удаляющий сульфогруппы и не вызывающий разрушения макромолекул [8]. Степень десульфатирования контролировали по изменению электрофоретической подвижности в 0,1 М НСl. В растворе 0,1 М НСl все анионные группы, кроме сульфатной, находятся в недиссоциированном состоянии и электрофоретическая подвижность пропорциональна процентному содержанию сульфатных групп в ХС [11]. Подвиж-

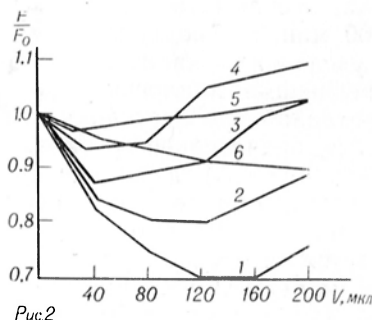


Рис. 2. Флюориметрическое титрование ДАФИ десульфатированными ХС.

1, 2, 3, 4, 5, 6 — продолжительность десульфатирования соответственно 10, 20, 40, 80, 160 и 300 мин ( $\text{H}_2\text{O}$ ).

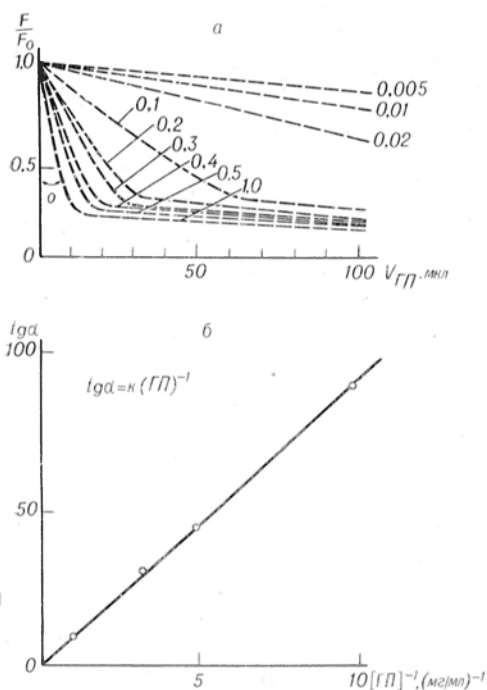


Рис. 3. Титрование ДАФИ водным раствором ГП (а) и график зависимости  $\operatorname{tg} \alpha$  от концентрации ГП (б).

Цифры у кривых титрования — концентрация раствора ГП, мг/мл.

ность ХС, десульфатированного в течение 300 мин, приближается к подвижности ГК, не содержащей сульфатных групп. При флуориметрическом титровании десульфатированных препаратов ХС происходит смещение точки перегиба (эквивалентности) влево по мере уменьшения содержания сульфата (рис. 2) [12]. Это связано, по-видимому, с увеличением расстояния между центрами связывания ДАФИ и ограничением возможности взаимодействия между ними. При использовании образца, десульфатированного в течение 160 мин, наблюдается только эффект увеличения квантового выхода флуоресценции, аналогичный увеличению исходной флуоресценции раствора после значительного повышения концентрации ГАГ в этом же растворе. В последнем случае расстояние между молекулами флуорохрома увеличивается за счет перераспределения ДАФИ на центрах ГАГ. Кривая титрования образцом, десульфатированным в течение 300 мин, не отличается от таковой для воды, т. е. взаимодействия ХС с флуорохромом не наблюдается. Таким образом, именно сульфатные группы ГАГ принимают участие в свя-

зывании с ДАФИ. Это взаимодействие носит, вероятно, электростатический характер, что подтверждается специфическим влиянием ионной силы на образование комплекса ДАФИ — ГАГ. При концентрации NaCl выше 0,02 М комплекс ХС — ДАФИ разрушается и флуоресценция возвращается к уровню, характерному для чистого раствора ДАФИ.

На рис. 3 приведены кривые титрования водного раствора ДАФИ (рН 5, 6) разными концентрациями ГП (от 0,005 до 1 мг/мл). Тангенс угла наклона начального участка кривой линейно зависит от обратной концентрации ГАГ, что позволяет определять его концентрацию в растворе по формуле  $\operatorname{tg} \alpha = K \cdot (\text{ГП})^{-1}$ . Существенно, что флуориметрическое титрование ДАФИ позволяет определять 0,025 мкг ГП, что в 40 раз превышает разрешающую способность карбазолового метода для измерения концентрации ГАГ по урановым кислотам. Все биологически значимые сульфатированные ГАГ (Х-4-С, Х-6-С, ДС, ГС) в одинаковой концентрации имеют одинаковый угол  $\alpha$ , что доказывает возможность определения их суммарной концентрации в биологическом материале при рН 5,6 по калибровочной кривой, построенной для ХС.

Исходя из предположения о том, что диссоциация всех анионных групп (за исключением сульфатной) в кислой среде подавляется, проводили титрование ДАФИ различными типами ГАГ в 0,005 М  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , полагая, что это позволит дифференцированно определять содержание отдельных ГАГ в смеси благодаря различиям в стереометрии распределения сульфатных групп. При рН 2,0 флуоресценция раствора ДАФИ не зависит от внесенного количества ГК, ХС и ДС, кривая титрования ГП аналогична таковой при рН 5,6, а для ГС и КС наблюдается усиление флуоресценции, пропорциональное количеству внесенного ГАГ (рис. 4). Последний факт обуславливает возможность построения калибровочной кривой для количественного определения этих ГАГ в растворе. Форма кривых титрования на рис. 4 может быть объяснена как необходимостью близкого расположения двух анионных групп для связывания одной молекулы ДАФИ. При рН 2,0 это условие не выполняется для ГК, ДС и ХС,



Результаты флюориметрического титрования экскретируемых ГС при различных формах МПС III

Группа обследованных	Число обследованных	Изменение относительной флюоресценции на 1 мкг уроновых кислот
Больные:		
МПС III А	9	$2,03 \pm 0,07$
МПС III В	3	$0,91 \pm 0,16$
Здоровые (норма)	10	$0,06 \pm 0,02$

МПС III В (дефект N-ацетилглюкозаминидазы), выраженные в единицах изменения относительной флюоресценции на 1 мкг уроновых кислот. Достоверные различия между двумя типами гиперэкскретируемых ГАГ свидетельствуют о том, что данный метод может быть использован для характеристики экскретируемых и внутриклеточных ГАГ.

Возможности использования метода флюориметрического титрования для исследования тканевых ГАГ были изучены на примере лиофилизированных препаратов протеогликановых мономеров из гиалинового хряща новорожденных. Форма кривых титрования, полученных в этом эксперименте, не отличалась от таковых для ХС, что хорошо коррелирует с данными литературы о преимущественном содержании ХС (94 %) в протеогликановых мономерах хряща новорожденных.

Таким образом, в ходе данного исследования выявлены характерные метакрохроматические изменения спектра флюоресценции ДАФИ и «Hoechst 33258» при их связывании с ГАГ, что ранее не было показано для этих флюорохромов. Этот феномен был использован для количественного определения и анализа ГАГ и ГАГ-содержащих макромолекул экстракционно-го матрикса, исследование структуры и метаболизма которых является одной из важнейших проблем современной медицинской биохимической генетики. Флюориметрическое титрование позволяет оценивать содержание ГАГ в биологическом материале количественно, по составу и заряду (для молекул ГАГ, принадлежащих к одному классу). Простота и высокая чувстви-

тельность данного метода определяют возможность его практического применения, в частности в медицинской биохимии для пре- и постнатальной диагностики наследственных МПС и других заболеваний, характеризующихся гиперэкскрецией ГАГ.

# ЛИТЕРАТУРА

1. Краснополяская К. Д. // Вестн. АМН СССР. — 1982. — № 6. — С. 70—76.
2. Одиноква О. Н., Бялик М. А., Краснополяская К. Д. и др. // Вопр. мед. химии. — 1985. — № 1. — С. 87.
3. Hardingham T. // Biochem. Soc. Trans. — 1981. — Vol. 1. — P. 489—497.
4. Grossgebauer K., Kupper D. // Klin. Wschr. — 1981. — Bd 59. — S. 1065—1066.
5. Diakun G. P., Edwards H. E., Allen E. C. et al. // Biochem. J. — 1978. — Vol. 175. — P. 573—577.
6. Феценко С. П., Краснополяская К. Д., Шлишкин С. С. // Биохимия. — 1984. — Т. 49, № 10. — С. 1679—1685.
7. Inoue Y., Nagasawa K. // Carbohydr. Res. — 1976. — Vol. 46. — P. 87—95.
8. Nagasawa K., Inoue Y., Kamata T. // Ibid. — 1983. — Vol. 111. — P. 273—281.
9. Bitter T., Muir H. M. // Analyt. Biochem. — 1962. — Vol. 4. — P. 330—334.
10. Antonopoulos C. A., Gardel S., Szirma J. A. et al. // Biochim. biophys. Acta. — 1964. — Vol. 83. — P. 1—19.
11. Poulsen J. H. // Scand. J. clin. Lab. Invest. — 1983. — Vol. 43. — P. 157—162.
12. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флюоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. — М., 1980.
13. Pennock C. A. // J. clin. Path. — 1969. — Vol. 22. — P. 111—123.

Поступила 12.05.85

## INTERACTION OF GLYCOSAMINOGLYCANS WITH CATIONIC FLUOROCHROMES

L. L. Horniak, X. D. Krasnopolskaya, O. N. Odionokova, S. P. Feschenko, S. S. Shishkin

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

Interaction of glycosaminoglycans (GAG) with cationic fluorochromes, which are used for binding with DNA, was studied in biological material (urine, extract from hyaline cartilage) obtained from patients with hereditary mucopolysaccharidoses and from healthy persons. Among the four fluorochromes studied in the reactions with standard GAG's, DAPI proved to be the most suitable fluorochrome. Quantitative fluorimetric technique enabled to estimate the GAG concentration and to evaluate the individual content of heparan-SO<sub>4</sub> and keratan-SO<sub>4</sub> in biological sources. Interaction of DAPI with GAG was electrostatic and depended on stereometry of DAPI-binding sites on the GAG molecule.

Б. Ш. Зурашвили

## ВЛИЯНИЕ АСКОРУТИНА НА ОБЕСПЕЧЕННОСТЬ ОРГАНИЗМА ТИАМИНОМ И ОБМЕН АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ У КРЫС ПРИ ФИЗИЧЕСКИХ НАГРУЗКАХ РАЗЛИЧНОЙ ТЯЖЕСТИ

Кафедра гигиены Тбилисского медицинского института

Известно, что физическая нагрузка сопровождается возрастанием потребности организма в витаминах, так как при выполнении тяжелой физической работы усиливаются внутриклеточный обмен и окислительно-восстановительные процессы, повышаются функции всех органов и тканей. В этих обменных процессах важную роль играют витамины, особенно аскорбиновая кислота и витамин В<sub>1</sub>.

Рядом авторов показано, что тяжелые физические нагрузки вызывают серьезные нарушения в капиллярной системе с появлением на коже множественных петехий и кровоизлияний [2—4, 12]. Если учесть, что в капиллярах осуществляется основная функция системы кровообращения [20], становится необходимым предупредить возможные нарушения функционального состояния капиллярной системы путем применения различных защитных средств, в частности витамина Р.

В литературе имеются данные о метаболическом синергизме между витаминами С и Р и на основании этой взаимосвязи был синтезирован комплексный препарат галаскорбин [1, 7, 17, 19, 22, 24, 28, 29, 31]. Многие авторы отмечали благоприятное действие галаскорбина при тяжелых физических нагрузках [9, 10, 15]. Этот комплексный препарат положительно действует на энергетический обмен и интенсивность окислительных процессов, тем самым создает предпосылки для повышения работоспособности и выносливости организма. Галаскорбин нашел широкое применение как средство дополнительной витаминизации организма при тяжелых физических нагрузках, особенно при спортивных соревнованиях.

Изучение физиологических и фармакологических эффектов биофлавоноидов, обладающих Р-витаминными свойствами, выявило, что они оказывают антигистаминовое действие [27]. В трудах ряда авторов [8, 16, 21] по-

казано, что между комплексом витаминов С и Р и тиамином существуют антагонистические взаимоотношения, в частности введение тиамина на фоне приема комплекса витаминов С и Р снимает положительное действие последнего.

В связи с тем, что комплексы аскорбиновой кислоты и витамина Р рекомендуются при тяжелых физических нагрузках, особенно во время спортивных соревнований, и что между витаминами Р и В<sub>1</sub> существует антагонистическая взаимосвязь, мы ставили целью изучить влияние массивных доз наиболее распространенного комплексного препарата витаминов С и Р — аскорутин на обеспеченность организма витамином В<sub>1</sub> и обмен аскорбиновой кислоты при физических нагрузках различной тяжести.

### Методика

Эксперимент был проведен на 150 крысах — самцах Вистар с массой тела 200—220 г. Животных содержали на полноценном полусинтетическом рационе, разработанном в Институте питания АМН СССР. Он включал 22 % казенна, 60,5 % крахмала, 5 % ярда, 5 % подсолнечного масла, 4 % солевой смеси [25], 0,2 % цистенна, 0,2 % холинхлорида, 0,1 % смеси витаминов [30] и 3 % фильтровальной бумаги. Животных в период наблюдения содержали в железных индивидуальных клетках.

Животные были разделены на три группы — две опытные, подвергавшиеся физической нагрузке, и контрольную — находившуюся в обычных условиях вивария. Крысы 1-й опытной группы получали ежедневно per os аскорутин 4,25 мг на 100 г массы тела, животные 2-й опытной группы аскорутин не получали. По продолжительности физической нагрузки животные 1-й и 2-й группы были разделены на три подгруппы: с 10-, 15- и 20-дневной нагрузкой.

В качестве физической нагрузки использовали плавание 2 раза в день при температуре воды 39 °С. На хвосте животных подвешивали груз, составляющий 10 % массы тела, и заставляли животных плавать до первого погружения [11]. В конце опыта (через 10, 15 и 20 дней) для изучения показателей обменных процессов у животных брали кровь из сердца, а после декапитации — извлекали внутренние органы — печень и надпочечники.

В целях изучения обмена тиамин определяли его содержание в крови и печени флуорометрическим методом [5]. Об обеспеченности организма тиамин судили также по активности транскетолазы и величине ТДФ-эффекта [13]. Содержание аскорбиновой кислоты в крови и надпочечниках определяли титрованием 2,6-дихлорфенолиндофенолом [18]. Цифровые данные обрабатывали методом вариационной статистики и выражали в системе Си.

## Результаты и обсуждение

Результаты исследования содержания тиамин в крови и печени крыс в зависимости от продолжительности физической нагрузки на фоне приема аскорутин представлены в табл. 1.

Приведенные данные показывают, что с увеличением продолжительности физической нагрузки содержание тиамин в крови и печени снижается. Эти изменения в крови во всех трех подгруппах были статистически достоверны ( $P < 0,001$ ) и колебались от 11 до 40 % по сравнению с контролем. Содержание тиамин в печени снижалось менее значительно: на 10-й день опыта эти изменения были статистически недостоверными ( $P > 0,5$ ), а на 15-й и 20-й дни составляли соответственно 13 и 19 % по сравнению с контролем.

Таблица 1

Содержание тиамин в крови (в мкмоль/л) и печени (в мкмоль/кг) крысы в зависимости от продолжительности физической нагрузки на фоне аскорутин ( $M \pm m$ )

Группа животных	Продолжительность физической нагрузки, дни	Кровь	Печень
Контрольная: 1-я	10	$0,67 \pm 0,01$ $0,54 \pm 0,03$ $P_1 < 0,001$	$12,17 \pm 0,28$ $11,27 \pm 0,18$ $P_1 < 0,01$
2-я		$0,60 \pm 0,02$ $P_1 < 0,001$	$11,68 \pm 0,25$ $P_1 > 0,5$
Контрольная: 1-я	15	$0,66 \pm 0,01$ $0,45 \pm 0,02$ $P_1 < 0,001$	$12,74 \pm 0,24$ $9,80 \pm 0,37$ $P_1 < 0,001$
2-я		$0,50 \pm 0,02$ $P < 0,001$	$11,10 \pm 0,26$ $P_1 < 0,001$
Контрольная: 1-я	20	$0,69 \pm 0,02$ $0,32 \pm 0,01$ $P_2 < 0,001$	$12,44 \pm 0,22$ $8,71 \pm 0,32$ $P_2 < 0,001$
2-я		$0,42 \pm 0,01$ $P_1 < 0,001$	$10,04 \pm 0,22$ $P_1 < 0,001$

Примечание. Здесь и в табл. 2  $P_1$  — по сравнению с контролем,  $P_2$  — по сравнению с показателями 2-й группы.

Таблица 2

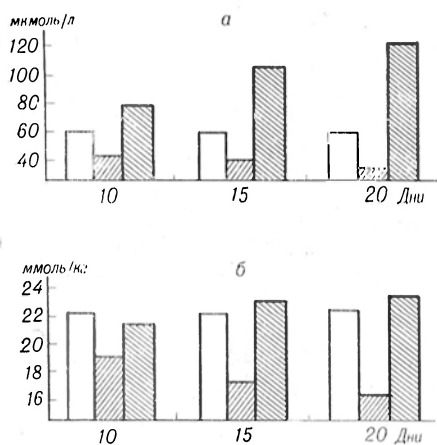
Изменение активности транскетолазы (в ммоль/ч·л) и величины ТДФ-эффекта (в %) в гемолизате крови у крыс в зависимости от продолжительности физической нагрузки на фоне аскорутин ( $M \pm m$ )

Группа животных	Продолжительность физической нагрузки	Транскетолаза	ТДФ-эффект
Контрольная: 1-я	10 дней	$27,6 \pm 1,23$ $20,4 \pm 0,66$ $P_1 < 0,001$	$9,9 \pm 0,73$ $15,2 \pm 0,64$ $P_1 < 0,001$
2-я		$22,2 \pm 0,86$ $P_1 < 0,001$	$13,4 \pm 0,59$ $P_1 < 0,001$
Контрольная: 1-я	15 дней	$27,8 \pm 1,20$ $14,7 \pm 1,17$ $P_1 < 0,001$	$9,9 \pm 0,72$ $19,5 \pm 0,66$ $P_1 < 0,001$
2-я		$19,9 \pm 0,80$ $P_1 < 0,001$	$16,2 \pm 0,41$ $P_1 < 0,001$
Контрольная: 1-я	20 дней	$28,9 \pm 1,01$ $10,2 \pm 0,26$ $P_2 < 0,001$	$10,2 \pm 0,93$ $14,8 \pm 0,54$ $P_2 < 0,001$
2-я		$14,8 \pm 0,81$ $P_1 < 0,001$	$20,9 \pm 0,93$ $P_1 < 0,001$

Как видно из табл. 1, на фоне дополнительной витаминизации аскорутин, при тяжелых физических нагрузках содержание тиамин в крови и печени животных еще более снижалось. Этот эффект аскорутин был особенно выражен при увеличении длительности физической нагрузки. Так, на 20-й день опыта содержание тиамин в крови у крыс 2-й группы снижалось до  $0,42 \pm 0,01$  мкмоль/л, а у животных 1-й группы — до  $0,32 \pm 0,009$  мкмоль/л, в печени содержание тиамин снижалось соответственно до  $10,04 \pm 0,22$  и  $8,71 \pm 0,32$  мкмоль/кг (различие было статистически достоверно  $P < 0,001$ ).

Изучение активности транскетолазы и величины ТДФ-эффекта показало, что активность этого фермента при увеличении физической нагрузки также снижается. Это снижение было более выраженным при приеме аскорутин и было более выражено на 20-й день опыта (табл. 2). ТДФ-эффект на 10-й день опыта находился в пределах нормы (0—15 %), а на 15-й и 20-й дни показывал умеренный дефицит тиамин (15—25 %).

Изучение обеспеченности организма аскорбиновой кислотой в зависимости от продолжительности физической на-



Влияние физической нагрузки на содержание аскорбиновой кислоты в крови (а) и надпочечниках (б) крыс на фоне аскорутина.

По оси абсцисс — продолжительность нагрузки (в днях); по оси ординат — содержание аскорбиновой кислоты в мкмоль/л (а) или ммоль/кг (б). Светлые столбики — контроль; заштрихованные горизонтально — 1-я группа, вертикально — 2-я группа.

грузки, на фоне высоких доз аскорутина, показало, что при увеличении физической нагрузки содержание аскорбиновой кислоты в плазме крови и надпочечниках крыс 2-й опытной группы постепенно снижается (см. рисунок). На 20-й день опыта содержание этого витамина в крови снизилось на 40 %, а в надпочечниках — на 30 %. Введение аскорутина крысам, подвергавшимся физической нагрузке, полностью предотвращало снижение ее содержания в надпочечниках и приводило к повышению этого показателя в крови до уровня, превышающего контрольный.

Из изложенного можно заключить, что при нарастании физической нагрузки содержание тиамин в крови и печени снижается. Эти изменения обусловлены тем, что при тяжелых физических нагрузках в организме усиливаются обменные процессы, особенно превращения углеводов, являющихся основным источником энергии. В этом обмене особая роль принадлежит тиамину, который в виде тиаминдифосфата входит в состав ряда ферментов, участвующих в превращениях углеводов. Такими ферментами являются пируватдегидрогеназа,  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназа и транскетолаза. Первые два фермента участвуют в окислительном декарбоксилировании пирувиноградной и  $\alpha$ -кетоглутаровой кислот с освобождением больших коли-

честв энергии. Кроме того, под действием пируватдегидрогеназы пирувиноградная кислота, взаимодействуя с ТДФ, подвергается декарбоксилированию и образует связанный с тиаминном активный ацетальдегидрид, переносимый далее на кофермент А с образованием ацетил — КоА, играющего важную роль в пластическом обеспечении процессов жизнедеятельности. Фермент транскетолаза, в состав которого входит ТДФ, является важнейшим ферментом пентозофосфатного пути расщепления углеводов, играющего исключительную роль в пластических, синтетических и энергетических процессах [14, 26].

При тяжелых физических нагрузках, на фоне больших доз аскорутин дефицит тиамин в крови и печени увеличивается. Это может объясняться тем, что комплексный препарат витаминов С и Р, активизируя окислительно-восстановительные процессы в организме, способствует увеличению потребности в тиамине [9, 15]. Кроме того, по данным ряда авторов, между витаминами Р и В<sub>1</sub> существует антагонистическая взаимосвязь, приводящая к снижению содержания витамина В<sub>1</sub> в организме [6, 8, 16, 17, 27].

Как показали результаты исследования, при тяжелых физических нагрузках содержание аскорбиновой кислоты в крови и надпочечниках снижается, причем тем значительнее, чем длительнее физическая нагрузка. Как известно, аскорбиновая кислота является катализатором внутриклеточного обмена, стимулирует окислительно-восстановительные процессы и функции отдельных органов и тканей, которые усиливаются при тяжелых физических нагрузках, что и может приводить к повышенному расходу этого витамина.

Известно, что в организме белых крыс аскорбиновая кислота синтезируется в печени из углеводов, утилизация которых при физической нагрузке усиливается. Видимо, этот фактор также отрицательно действует на синтезе аскорбиновой кислоты, что также приводит к снижению ее содержания в организме.

Следует также иметь в виду, что длительное плавание с грузом является экстремальным фактором, приводящим организм к стрессовому состоянию, при котором усиливается белково-углеводный обмен и повышается

содержание адреналина и адреналин-подобных веществ, способствующих снижению содержания витаминов в организме.

При физической нагрузке аскорутин постепенно нормализовал содержание аскорбиновой кислоты в надпочечниках, а в крови его содержание удваивалось, по-видимому, вследствие того, что при тяжелых физических нагрузках потребность в аскорбиновой кислоте увеличивается и ее депонирования в надпочечниках не происходит.

Полученные данные свидетельствуют о том, что дополнительное введение комплекса витаминов С и Р при повышенных физических нагрузках, зарекомендовавшее себя в спортивной практике, предотвращает снижение содержания аскорбиновой кислоты в крови и надпочечниках крыс. Одновременно с этим введение аскорутина в больших дозах усиливает вызываемый физической нагрузкой дефицит тиамин в организме. В связи с этим возникает вопрос о целесообразности сочетанного применения аскорутина с компенсирующими дозами тиамин, что является предметом дальнейшего исследования.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Березовская Н. Н. и др. — *Вопр. питания*, 1962, № 5, с. 29.
2. Борисов И. М. и др. — *Теор. и практ. физ. культуры*, 1973, № 9, с. 57.
3. Борисов И. М. — *Вопр. питания*, 1980, № 1, с. 35.
4. Веленский Д. Н. — *Теор. и практ. физ. культуры*, 1967, № 6, с. 56.
5. Елисеева Г. Д. — В кн.: *Витамины*. Киев, 1953, вып. 1, с. 38.
6. Зурашвили Б. Ш. — В кн.: *Грузинская респ. науч. конф. молодых медиков. Тезисы докладов*. Тбилиси, 1984, с. 8.
7. Краснянский Л. М. — *Вопр. питания*, 1958, № 5, с. 92.
8. Лосицкая В. М. — В кн.: *К проблеме взаимодействия витаминов С и Р*. Киев, 1962, с. 28.
9. Моногаров В. Д. и др. — *Теор. и практ. физ. культуры*, 1974, № 4, с. 26.
10. Никонова В. А. — В кн.: *К проблеме взаимодействия витаминов С и Р*. Киев, 1962, с. 137.
11. Румянцев Г. И. и др. — В кн.: *Руководство к лабораторным занятиям по общей гигиене*. М., 1980, с. 236.
12. Слука П. П., Борисов И. М., Остроух Я. Н. — В кн.: *Физическое воспитание и спорт*. Рига, 1972, вып. 1, с. 82—88.
13. Спиричев В. Б. и др. — *Вопр. питания*, 1973, № 6, с. 6.

14. Спиричев В. Б. — В кн.: *Молекулярные основы патологии* / Под ред. В. Н. Ореховича. М., 1966, с. 220.
15. Строева А. Н., Селезнева А. К. — В кн.: *Актуальные проблемы витаминологии*. М., 1978, т. 2, с. 39.
16. Хмелевский Ю. В., Липкан Г. Н. — В кн.: *К проблеме взаимодействия витаминов С и Р*. Киев, 1962, с. 29.
17. Шамрай Е. Ф., Фетисова Т. В. — *Бюл. exper. биол.*, 1960, № 1, с. 70.
18. *Экспериментальная витаминология* / Под ред. Ю. М. Островского. Минск, 1979, с. 481.
19. Beiler J. M., Martin G. J. — *J. biol. Chem.*, 1947, vol. 171, p. 507.
20. Boyd T. E. — *Clin. Med.*, 1945, vol. 23, p. 157.
21. Chamrai E. — *J. Physiol.*, 1969, p. 61.
22. Cotereau H., Gabe M., Gero E., Parrot J. L. — *Nature*, 1948, vol. 161, p. 557.
23. Derot M. — *Cah. Med.*, 1970, vol. 11, p. 165.
24. Gube M., Parrot J. L. — *J. Physiol. (Paris)*, 1948, vol. 49, p. 63.
25. Jones J. H., Foster C. — *J. Nutr.*, 1942, vol. 24, p. 245.
26. Metzler D. E. — In: *The Enzymes*, 2nd. Ed. 1960, vol. 2, p. 295.
27. Panijpan B., Ratanubaldal K. — *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 1980, vol. 50, p. 3.
28. Parrot J. L., Lavollau J. — *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 1944, vol. 138, p. 82.
29. Parrot J. L., Gazave J. M., Cotereau H. — *J. Physiol. (Paris)*, 1953, vol. 45, p. 209.
30. Suda T., De Luca H. F., Tanaka Y. — *J. Nutr.*, 1970, vol. 100, p. 1049.
31. Szent-Györgyi A. — *Z. physiol. Chem.*, 1938, Bd 126. s. 255.
32. Varkonyi T., Antal A., Gabor M., Benko S. — *Experientia (Basel)*, 1971, vol. 27, p. 8.

Поступила 12.05.85

#### EFFECT OF ASCORUTIN ON THE CONTENT OF THIAMIN AND METABOLISM OF ASCORBIC ACID IN RATS SUBJECTED TO PHYSICAL EXERCISES

B. Sh. Zurashvili

Chair of Hygiene, Medical School, Tbilisi

Content of thiamin and metabolism of ascorbic acid were studied in 150 male rats administered with ascorutin (vitamins C and P complex) after physical exercises within 10, 15 and 20 days. Content of the vitamins studied was decreased depending on duration and severity of the physical exercises. High doses of ascorutin simultaneously with physical exercises normalized the ascorbic acid content in adrenal glands and increased the vitamin concentration in blood. At the same time, ascorutin caused different decrease in content of thiamin in blood and liver tissue accompanied by a marked decrease of the transketolase activity in blood and by an increase in the TDP-effect. The data obtained suggest that ascorutin should be combined with compensatory doses of thiamin.



Б. А. Кудряшов, А. М. Ульянов, Л. А. Ляпина

## ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В СОСТОЯНИИ ИНСУЛЯРНОЙ СИСТЕМЫ У ЖИВОТНЫХ ПОСЛЕ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ ДИАБЕТОГЕННОГО ФАКТОРА

Биологический факультет и лаборатория физиологии и биохимии свертывания крови МГУ им. М. В. Ломоносова

В предшествующих исследованиях было установлено, что плазма крови крыс с экспериментальным диабетом [1, 4], а также плазма крови людей, страдающих сахарным диабетом [2, 4], содержит диабетогенный фактор (ДФФ), который будучи введен в кровоток здоровых крыс, провоцирует гипергликемию, сохраняющуюся в течение 2 нед и более. Доказано, что гипергликемическая активность ДФФ подавляется гепарином [1, 2, 4].

Настоящая работа посвящена дальнейшему изучению механизма действия диабетогенного фактора на инсулярную систему организма.

### Методика

Опыты проводили на беспородных крысах-самцах. Для развития аллоксанового диабета были использованы крысы массой 250—300 г, находившиеся на модифицированной диете, содержащей сбалансированное количество белков, жиров, углеводов, минеральных солей и витаминов [7]. Диабет вызывали внутривенным введением аллоксана (фирма "Spofa", ЧССР) в дозе 40 мг/кг крысам, предварительно голодавшим в течение 24 ч.

Для исследования функционального состояния инсулярной системы были использованы здоровые крысы массой 160—200 г. Крысам внутривенно вводили чистый ДФФ, выделенный из плазмы крови крыс, больных аллоксановым диабетом (3 мг в 1 мл физиологического раствора), или плазму крови больных крыс (1 мл на 200 г массы тела) в течение 3 последующих дней.

Сахар крови определяли модифицированным методом Хagedорна [3]. Иммунореактивный инсулин (ИРИ) в плазме крови определяли с помощью набора "Insulin Riakit" (ВНР). Концентрацию гепарина определяли, как описано в литературе [8].

В работе использовали гепарин фирмы "Hedon Richter" (ВНР) и инсулин для инъекций (СССР).

Взятия крови и внутривенные введения препаратов осуществляли через *v. jugularis*. Кровь для исследования концентрации сахара стабилизировали цитратом натрия (3,8 %) в отношении 9:1. При определении уровня содержания ИРИ к крови добавляли 1 % раствор ЭДТА в том же отношении.

Полученные данные обрабатывали статистически по методу Финнера — Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

Внутривенное введение здоровым крысам плазмы крови, полученной от животных, больных устойчивым аллоксановым диабетом (длительность 2—3 мес, концентрация сахара в крови 300—500 мг%), вызывала возрастание содержания сахара в крови реципиентов в среднем со  $111,8 \pm 7,3$  до  $189,7 \pm 6,4$  мг% ( $P < 0,001$ ) через 1 нед после последнего введения, до  $212,3 \pm 9,3$  мг% ( $P < 0,001$ ) через 2 нед и до  $189,5 \pm 5,1$  мг% ( $P < 0,001$ ) через 3 нед. Концентрация же ИРИ в плазме крови реципиентов в среднем снизилась с  $30,6 \pm 5,6$  мкМЕ/мл до  $22,1 \pm 3,4$  мкМЕ/мл ( $P > 0,2$ ),  $12,7 \pm 2,3$  мкМЕ/мл ( $P < 0,001$ ) и  $12,3 \pm 3,5$  мкМЕ/мл ( $P < 0,02$ ) соответственно (рис. 1).

В контроле внутривенное введение нормальным крысам плазмы крови здоровых животных не вызывало никаких изменений в содержании сахара и инсулина в крови реципиентов.

В следующей серии опытов был использован чистый препарат ДФФ, вы-

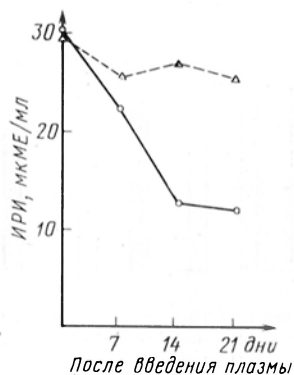


Рис. 1. Концентрация ИРИ в плазме крови крыс-реципиентов после трехкратного внутривенного введения им плазмы крови крыс, больных аллоксановым диабетом.

Линия с кружочками — опыт; линия с треугольниками — контроль (введение плазмы крови здоровых крыс).

Таблица 1

Содержание ИРИ (в мкМЕ/мл) и сахара (в мг%) в крови крыс-реципиентов после трехкратного внутривенного введения им ДГФ

Введенный препарат	Показатель	Исходный уровень	Через 1 нед	Через 2 нед
ДГФ	ИРИ	$30,1 \pm 2,9$ (13)	$10,0 \pm 2,6$ (9) $P < 0,001$	$7,5 \pm 2,5$ (9) $P < 0,001$
	Сахар	$84,5 \pm 4,2$ (13)	$193,0 \pm 10,8$ (9) $P < 0,001$	$198,6 \pm 7,1$ (9) $P < 0,001$
Альбумин плазмы крови здоровых крыс	ИРИ	$24,6 \pm 1,7$ (9)	$29,3 \pm 7,6$ (6)	$25,9 \pm 1,3$ (6)
	Сахар	$89,3 \pm 4,8$ (9)	$90,3 \pm 5,3$ (6)	$97,0 \pm 3,1$ (6)

Примечание. Здесь и в табл. 2  $P$  рассчитано по отношению к исходному уровню, в скобках—число опытов.

деленный из плазмы крови больных аллоксановым диабетом крыс. Препарат ДГФ представляет собой белок с мол. массой 60 000 дальтон. Но нашим данным (табл. 1), препарат ДГФ, введенный внутривенно здоровым животным в течение 3 дней по 3 мг в день (в 1 мл физиологического раствора), вызывает резкое снижение содержания ИРИ в крови реципиентов. Так, средний уровень инсулина через 7 дней после последней инъекции снизился более чем в 3 раза, а через 14 дней — в 4 раза по сравнению с исходным. Одновременно с этим наблюдали повышение концентрации сахара в среднем с 84,5 до 193,4 и 198,6 мг% соответственно. В контроле внутривенное введение альбуминовой фракции, выделенной из плазмы крови здоровых животных, не сопровождалось какими-либо изме-

нениями в содержании ИРИ и сахара в плазме крови реципиентов.

Таким образом, из проведенных опытов следует, что у реципиентов чистого препарата ДГФ происходит резкое снижение концентрации ИРИ в плазме крови, что свидетельствует о блокирующем действии ДГФ на функцию инсулярного аппарата.

Последующие эксперименты показали, что ДГФ повышает также резистентность организма к инсулину (рис. 2). Через 1 сут после трехкратного внутривенного введения здоровым реципиентам плазмы крови больных аллоксановым диабетом животных наблюдали угнетение ответа организма на инсулин, о чем свидетельствовало отсутствие выраженного снижения содержания сахара в плазме крови пос-

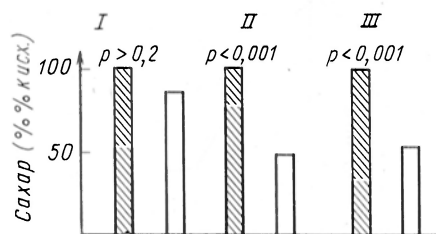


Рис. 2. Влияние трехкратного введения плазмы крови крыс с аллоксановым диабетом, содержащей ДГФ, здоровым животным на проявление гипогликемического действия инсулина (0,3 ЕД/200 г) (через 1 сут после последнего введения плазмы).

Заштрихованные столбики — исходный уровень сахара в крови (принятый за 100 %); светлые столбики — уровень сахара через 30 мин после введения инсулина с физиологическим раствором (опыты I и II) или с гепарином (опыт II). I и II — введение плазмы крови крыс с аллоксановым диабетом; III — введение плазмы крови здоровых крыс.

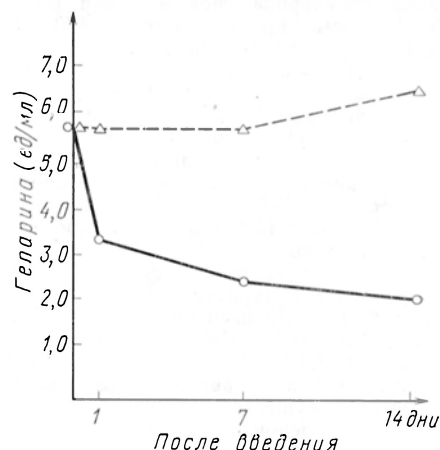


Рис. 3. Изменение содержания гепарина в крови крыс-реципиентов после 3-кратного внутривенного введения им ДГФ.

Линия с кружочками — ДГФ; линия с треугольниками — контроль (альбумин крови здоровых крыс).

Таблица 2

Влияние трехкратного введения плазмы крови крыс, больных аллоксановым диабетом, на проявление гипогликемического действия экзогенного инсулина (0,3 ЕД/200 г) (через 1 нед после последнего введения плазмы)

Введенный материал	Содержание сахара в крови, мг%	
	исходное	через 30 мин после введения инсулина
Плазма с ДГФ, инсулин, физиологический раствор	144,3±5,1 (6)	111,0±3,1 (6) $P<0,001$
Плазма с ДГФ, инсулин, гепарин	143,1±5,1 (7)	74,5±4,0 (7) $P<0,001$
Плазма без ДГФ, инсулин, физиологический раствор	104,5±6,1 (7)	61,3±5,8 (6) $P<0,001$
Плазма без ДГФ, инсулин, гепарин	107,1±8,1 (6)	58,2±3,9 (6) $P<0,001$

ле введения реципиентам экзогенного инсулина. Однако, как видно из данных, представленных на рис. 2, та же доза инсулина (0,3 ЕД на 200 г) вызывала выраженный гипогликемический ответ, если инсулин вводили в организм на фоне предварительной инъекции гепарина (50 МЕ). Через 7 дней после последнего введения содержавшей ДГФ плазмы крови реципиенты еще сохраняли резистентность к экзогенному инсулину, хотя она уже проявлялась в меньшей степени. При внутривенном предварительном введении гепарина полностью восстанавливался ответ на экзогенный инсулин (табл. 2). Возможно, что повышение резистентности к инсулину у реципиентов ДГФ обусловлено достоверным ( $P<0,01$ ) снижением активности гепарина в крови животных после введения ДГФ

(рис. 3). Известно, что инсулин не проявляет своей специфической гормональной активности при недостатке гепарина в организме [5, 6].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что ДГФ не только блокирует функцию инсулярного аппарата, но и вызывает повышение резистентности организма к инсулину.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Баскакова Г. М., Кудряшов Б. А., Пытель Ю. А. — Пробл. эндокринолог., 1981, № 4, с. 42—45.
2. Жуковский М. А., Кудряшов Б. А., Ульянов А. М. и др. — Педиатрия, 1985, № 2, с. 7—9.
3. Канторович Л. С. Способ определения сахара в крови и других биологических жидкостях. — А. с. 158399 (СССР).
4. Кудряшов Б. А., Понасенкова Г. В., Пытель Ю. А. — Пробл. эндокринолог., 1982, № 5, с. 61—64.
5. Кудряшов Б. А., Ульянов А. М., Шапиро Ф. Б. и др. — Бюл. экспер. биол., 1984, № 5, с. 516—518.
6. Кудряшов Б. А., Шапиро Ф. Б., Ульянов А. М., Пытель Ю. А. — Пробл. эндокринолог., 1984, № 1, с. 51—56.
7. Osborn T. B., Mendel L. B. — J. biol. Chem., 1918, vol. 34, p. 4—50.
8. Warren R., Wysocki A. — Surgery, 1958, vol. 44, p. 435—441.

Поступила 12.05.85

#### FUNCTIONAL ALTERATIONS IN THE STATE OF ANIMAL INSULIN SYSTEM AFTER INTRAVENOUS ADMINISTRATION OF DIABETOGENOUS FACTOR

B. A. Kudryashov, A. M. Ulyanov, L. A. Lyapina

Biological Faculty, M. V. Lomonosov State University, Moscow

Natural diabetogenic factor, which is albumin with molecular mass 60,000 Da, occurring in blood plasma of rats impaired with alloxane diabetes, caused a stable hyperglycemia, distinct decrease of insulin in blood and increased the body resistance to insulin in healthy animals. Activity of the diabetogenic factor was neutralized by heparin.

## ВЛИЯНИЕ БРОМКРИПТИНА НА ЗАХВАТ $^3\text{H}$ -ДОФАМИНА СИНАПТОСОМАМИ ГИПОТАЛАМУСА ИНТАКТНЫХ И АДРЕНАЛЭКТОМИРОВАННЫХ КРЫС

НИИ эндокринологии и обмена веществ Минздрава УССР, Киев

Данные экспериментальных исследований показали, что биогенные амины структур головного мозга принимают участие в регуляции секреции и выделения рилизинг-гормонов гипоталамуса и тропных гормонов гипофиза [6, 9]. В связи с этим появились предпосылки для поиска и применения фармакологических веществ, влияющих на обмен аминов или на активность моноаминсодержащих нейронов с целью нормализации гормональных сдвигов центрального происхождения.

К представителям такой группы веществ относится бромкриптин, применение которого начато в комплексной терапии при болезни Иценко — Кушинга для снижения уровня кортикотропина и кортизола в плазме крови [1, 5]. Бромкриптин принадлежит к производным эрголина, являющимся агонистами  $\text{D}_2$ -рецепторов дофамина. Последние локализуются пресинаптически и относятся к ауторецепторам, регулирующим высвобождение дофамина по механизму обратной связи [15]. Предполагается, что для проявления действия бромкриптина необходима стимуляция дофаминергической системы, осуществляемая эндогенным дофамином [12], который в значительном количестве содержится в гипоталамусе [18].

В настоящем сообщении приведены результаты исследования одного из возможных механизмов действия бромкриптина на дофаминергическую систему — захват  $^3\text{H}$ -дофамина синапсоматами гипоталамуса интактных и адреналэктомированных крыс.

### Методика

Эксперименты были выполнены на взрослых белых крысах-самцах Вистар, содержащихся в обычных условиях виварного режима. В опытах применяли бромкриптин в виде препарата парлодел фирмы "Sandoz" (Швейцария). Суспензию препарата, приготовленную на физиологическом растворе, вводили животным внутрь через рот с помощью специального зонда.

Крысы были распределены на 4 группы: животные 1-й группы служили контролем и получали только растворитель; крысы 2-й группы — парлодел (однократно из расчета 5 мг на 1 кг массы тела), затем через 4 ч после введения препарата их декапитировали; животным 3-й и 4-й групп — соответственно интактным и адреналэктомированным — препарат вводили 1 раз в сутки в той же дозе на протяжении 4 дней (адреналэктомированным на 4—7-е сутки после операции), затем через 4 ч после последнего введения их умерщвляли.

Из головного мозга выделяли участки гипоталамической области для получения синапсоматомальной фракции с помощью метода дифференциального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы [14]. Содержание белка в образцах определяли общепринятым методом [16]. Захват  $^3\text{H}$ -дофамина изучали с помощью ранее описанных методов [2, 13]. Для этого пробы синапсом, содержащие 0,1—0,2 мг белка, выдерживали 10 мин в среде Кребса — Рингера при 0°C, инкубировали в течение 10 мин при температуре 37°C в присутствии трансамина (0,09 мМ) и аскорбиновой кислоты (1,23 мМ), затем инкубировали в этих же условиях еще 10 мин после добавления  $2 \cdot 10^{-8}$  М  $^3\text{H}$ -дофамина (удельная радиоактивность 344 ГБк/ммоль, фирма "Amersham", Англия). После инкубации содержимое проб подвергали ультрафильтрации через фильтры «Синпор» (ЧССР) с диаметром пор 0,40 мкм. Фильтры промывали ледяной средой Кребса — Рингера, сушили на воздухе и помещали во флаконы с жидким сцинтиллятором. Радиоактивность проб измеряли в сцинтилляционном счетчике Mark-3 (США). Полученные данные обработаны статистически [7] и представлены в виде скорости захвата дофамина в имоль на 1 мг белка в 1 мин.

### Результаты и обсуждение

Истинный захват меченого дофамина препаратами нервных окончаний гипоталамусов крыс, представляющий собой разницу между количеством  $^3\text{H}$ -дофамина, аккумулированного при 37°C, и количеством  $^3\text{H}$ -дофамина, сорбированного при 0°C, являлся активным процессом, поскольку скорость захвата на 93,1 % тормозилась при 0°C. Как видно из данных, представленных в таблице, для фракции синапсоматом гипоталамусов контрольных крыс, получавших физиологический раствор, захват меченого амина опре-

**Изменение интенсивности захвата дофамина синаптосомами гипоталамусов интактных и адреналэктомированных крыс под влиянием бромкриптина ( $M \pm m$ ;  $n=6$ )**

Группа животных	Захват дофамина		P
	пмоль на 1 мг белка в 1 мин	% от контроля	
Контроль	$2,86 \pm 0,16$	100	
Интактные животные: однократное введение	$3,03 \pm 0,21$	6	$>0,5$
4-дневное введение	$3,49 \pm 0,24$	22	$<0,01$
Адреналэктомированные животные: 4-дневное введение	$3,66 \pm 0,28$	28	$<0,02$

делялся скоростью  $2,86 \pm 0,16$  пмоль на 1 мг белка в 1 мин. В проведенных экспериментах длительность инкубационного периода для проб составляла 10 мин, поскольку ранее было показано, что активный захват моноаминов синаптосомами отделов мозга крыс характеризуется пропорциональным повышением во времени (до 20 мин) при концентрации белка в пробах до  $0,3-0,5$  мг в 1 мл [2—4].

Через 4 ч после однократового введения парлодела в дозе 5 мг на 1 кг массы скорость захвата  $^3\text{H}$ -дофамина препаратами синапсом, выделенными из гипоталамусов интактных крыс, составляла 106 % по сравнению с контрольным уровнем. Ежесуточный прием этой же дозы исследуемого вещества на протяжении 4 дней сопровождался достоверным возрастанием интенсивности захвата в 1,22 раза по отношению к уровню, который наблюдался у крыс, получавших только растворитель. Такая же направленность изменений в поглощении дофамина (увеличение на 28 %) отмечена и при определении его в препаратах синапсом, полученных из гипоталамусов крыс с двусторонней адреналэктомией, которым бромкриптин вводили четырехкратно на 4—7-е сутки после удаления надпочечников.

Таким образом, при изучении одной из сторон действия бромкриптина на дофаминергическую систему гипоталамуса — процесса обратного захвата дофамина пресинаптическими нервными окончаниями — выявлена активация его скорости, которая выражено проявляется после многократного

введения препарата. Причем данный эффект наблюдается как при исследовании синапсом гипоталамусов интактных животных, у которых гормональный статус и содержание аминов до введения бромкриптина был не изменен, так и при исследовании этой же фракции из гипоталамусов крыс с удаленными надпочечниками. У животных последней группы, как известно, отмечается резкое снижение уровня кортикостероидов в крови, повышение кортикотропной функции гипофиза и уменьшение содержания моноаминов в структурах головного мозга [8, 10].

Бромкриптин применяется в основном как средство противопролактинемического действия и как препарат, регулирующий половую функцию [17]. Вместе с тем публикации последних лет свидетельствуют об участии его и в регуляции секреции адренокортикотропного гормона у крыс [11] и кортизола у человека [19]. В связи с этим не исключено, что выявленная в экспериментах стимуляция синапсомального захвата дофамина под влиянием бромкриптина, отражающая основной путь утилизации медиатора в синаптической щели, является одним из возможных механизмов в изменении уровня гипофизарных гормонов в организме животных.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Васюкова Е. А., Зефирова Г. С. — Сов. мед., 1976, № 6, с. 65—69.
2. Ганкина Е. М., Майсов Н. И. — Бюл. eksper. биол., 1983, т. 79, с. 35—37.
3. Давиденко А. В., Васильев А. Н., Кучеренко Н. Е. — Науч. докл. высш. школы. Биол. науки, 1984, № 1, с. 31—34.
4. Майсов Н. И., Толмачева Н. С. — Фармакол. и токсикол., 1980, № 3, с. 302—306.
5. Марова Е. И. — В кн.: Актуальные вопросы экспериментальной и клинической эндокринологии. Киев, 1982, с. 241.
6. Науменко Е. В. Центральная регуляция гипофизарно-надпочечникового комплекса. Л., 1971.
7. Ойвин И. А. — Пат. физиол., 1960, № 4, с. 76—85.
8. Ракицкая В. В., Шаляпина В. Г. — Физиол. журн. СССР, 1973, т. 59, № 9, с. 1337—1340.
9. Шаляпина В. Г., Ракицкая В. В. — Успехи физиол. наук, 1976, т. 7, № 3, с. 145—160.



10. Шедрина Р. И. — Пробл. эндокринол., 1971, № 1, с. 58—64.
11. Berkenbosch F., Vermes I., Tildes F. J. H. — Neurosci. Lett., 1982, Suppl. 10, p. 75.
12. Consolo S., Ladinsky H., Pugnelli P. et al. — Life Sci., 1981, vol. 29, p. 457—465.
13. Cooper D., Carlson U. R. — J. Neurosci. Meth., 1983, vol. 9, p. 157—162.
14. Hajos F. — Brain Res., 1975, vol. 93, p. 485—487.
15. Kehr W. — Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1981, Bd 362, S. 1301—1302.
16. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. — J. biol. Chem., 1951, vol. 193, p. 265—275.
17. Martinet M. — Actual. Pharm., 1983, vol. 196, p. 89—90.
18. Rinne U. K., Sonineu V. — Experientia (Basel), 1968, vol. 24, p. 177—178.
19. Sowers S. R., Beck F. W. J. — Acta endocr., 1983, vol. 102, p. 258—264.

Поступила 12.05.85

## INFLUENCE OF BROMOCRIPTINE ON <sup>3</sup>H-DOPAMINE UPTAKE IN HYPOTHALAMIC SYNAPTOSOMES FROM INTACT AND ADRENALECTOMIZED RATS

M. I. Yatsuk

Institute of Endocrinology and Metabolism,  
Ministry of Public Health of the Ukrainian  
SSR, Kiev

Intensity of <sup>3</sup>H-dopamine uptake in hypothalamic synaptosomes was similar both in intact rats and in the animals which received a single administration of bromocriptine at a dose of 5 mg/kg within 4 hrs. Within 4 days after the drug administration incorporation of the label was increased 1.22-fold and 1.28-fold in intact and adrenalectomized rats, respectively. Alterations in dopamine uptake in hypothalamic synaptosomes caused by bromocriptine appear to be one of dopaminergic-dependent effects of the drug in the animal brain structures.

УДК 616.36-006.04-008.939.22

Л. И. Иванова, Э. М. Халилов, Е. А. Горбатенкова,  
А. И. Арчаков, Ю. М. Лопухин

## ВСТРАИВАНИЕ И ВЫВЕДЕНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА ИЗ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ГЕПАТОЦИТОВ И КЛЕТОК ГЕПАТОМЫ ЗАЙДЕЛЯ

И ММИ им. Н. И. Пирогова, НИИ физико-химической медицины Минздрава РСФСР

Вопрос о роли холестерина в патогенезе злокачественных новообразований в настоящее время привлекает все большее внимание исследователей. Появились клинические и экспериментальные работы, свидетельствующие о большей частоте развития злокачественных новообразований при гипохолестеринемии [8, 15].

При исследовании лейкозных клеток человека и животных показаны снижение содержания холестерина и уменьшение микровязкости липидного бислоя их мембран по сравнению с нормальными лимфоцитами [15]. Результаты, полученные при исследовании других опухолей, противоречивы. Одни авторы обнаруживают повышение содержания холестерина в опухолевых клетках [20, 24], другие выявляют его снижение при канцерогенезе [15]. При определении липидного состава клеточных мембран некоторых гепатом было выявлено повышение молярного отношения холестерин/фосфолипиды (Х/ФЛ-индекс) [12]. Однако в клетках асцитной гепатомы обнаружено снижение молярного отношения хо-

лестерин/фосфолипиды по сравнению с клетками нормальной и регенерирующей печени [11]. Возможно, что свободнорастворимые опухолевые клетки отличаются по этому признаку от клеток солидных опухолей.

Целью настоящей работы явилось сравнительное исследование влияния встраивания и выведения холестерина на микровязкость липидного бислоя и активность ферментов плазматических мембран Na, К-АТФазы (КФ 3.6.1.3) и 5'-нуклотидазы (КФ 3.1.3.5) гепатоцитов крысы и клеток гепатомы Зайделя, а также выяснение возможного цитостатического действия встраивания холестерина в клетки гепатомы Зайделя.

### Методика

Работа выполнена на крысах-самцах массой 180—200 г, содержавшихся на стандартной диете. Для получения клеток асцитной гепатомы Зайделя крысам вводили внутривенно по  $1 \cdot 10^8$  клеток. После развития опухоли животных декапитировали, вскрывали брюшную полость и выделяли опухолевые клетки [10], которые отмывали от асцитной

жидкости при 200 g 3—4 раза на центрифуге "Janetzki" в течение 3 мин бескальциевым раствором Хенкса. Для получения изолированных гепатоцитов использовали «диссоциирующий» метод [1]. Печень перфузировали средой, содержащей 30 mM трис-HCl, 0,22 M сахарозу, 5 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ЭДТА, 1 % бычий сывороточный альбумин pH 7,4. После перфузии печень помещали на 20 мин в рабочую среду при помешивании, затем измельчали, фильтровали через нейлоновую ткань и центрифугировали дважды на ручной центрифуге в течение 1—2 мин. Подсчет клеток проводили в камере Горяева.

Для обогащения плазматических мембран опухолевых и нормальных клеток холестерином их инкубировали с холестерин-фосфатидилхолиновыми липосомами (ХФХЛ) от 1 до 6 ч при температуре 37°C при постоянном помешивании [23]. Для выведения холестерина из мембран нативных и предварительно обогащенных холестерином клеток их инкубировали с фосфатидилхолиновыми липосомами (ФХЛ) при аналогичных условиях. Контрольные клетки инкубировали в бескальциевом растворе Хенкса.

ХФХЛ получали из смеси яичного фосфатидилхолина и холестерина. Полученную смесь упаривали под вакуумом досуха и суспендировали в бескальциевом растворе Хенкса. Для получения однородных по размеру монослойных липосом суспензию облучали на ультразвуковом дезинтеграторе Sonic-300 фирмы "Fisher" (США), затем центрифугировали при 300 000 g при 3°C в течение 70 мин, используя центрифугу "Beckman L5-65" (США) на роторе T-60. В полученной надосадочной жидкости содержались монослойные липосомы с молярным отношением холестерин/фосфолипиды, равным  $2,1 \pm 0,2$  [9]. ФХЛ получали аналогичным образом. Микровязкость липидов мембран опухолевых и нормальных клеток оценивали с помощью флуоресцентного зонда пирена [1] и спинного зонда — нитроксильного производного стеариновой кислоты с парамагнитным фрагментом в пятом (5-NS)-положении относительно карбоксильной жирнокислотной цепи [5].

Активность Na, K-АТФазы и 5'-нуклеотидазы определяли по накоплению неорганического фосфата (Ф<sub>н</sub>) [19]. Для определения активности Na, K-АТФазы использовали среду, содержащую 30 mM трис-HCl, pH 7,4, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 130 mM NaCl, 20 mM KCl, 0,4 mM АТФ. Для определения нечувствительной к уабаину АТФазной активности в среду инкубации добавляли 0,1 mM уабаин. Среда инкубации для определения активности 5'-нуклеотидазы содержала 25 mM HCl pH 7,4, 100 mM KCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM АМФ. Концентрация клеток по белку не превышала 20 мкг. За единицу ферментативной активности принимали такое количество белка, которое катализирует образование 1 наномоля Ф<sub>н</sub> за 1 мин при 37°C. Белок определяли методом Лоури [18]. Степень окисленности яичного фосфатидилхолина оценивали по отношению интенсивностей поглощения при 233 и 215 нм [17]. Для определения липидного состава клеток и липосом их экстрагировали смесью Фолча [13]. Фосфолипиды определяли по количеству Ф<sub>н</sub>, используя цветную реакцию на Ф<sub>н</sub> с молибдатом аммония и эйкононовым восстановительным реагентом [6]. Содержание холестерина в липидных экстрак-

тах клеток и липосом определяли колориметрическим методом в реакции с хлорным железом и серной кислотой [24]. Результаты исследований обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента [2].

## Результаты и обсуждение

При инкубации клеток гепатомы Зайделя и гепатоцитов с ХФХЛ в течение 4 ч наблюдалось увеличение содержания холестерина в расчете на 1 мг белка и 10<sup>6</sup> клеток. Содержание фосфолипидов существенно не изменялось в изученных клетках. Для опухолевых клеток к концу 4-часового периода инкубации с ХФХЛ имело место увеличение молярного отношения холестерин/фосфолипиды на 110 % (с  $0,20 \pm 0,00$  до  $0,42 \pm 0,01$ ;  $P < 0,001$ ). В то же время Х/ФЛ-индекс для гепатоцитов увеличивался на 55 % (от  $0,40 \pm 0,01$  до  $0,62 \pm 0,00$ ;  $P < 0,001$ ). При инкубации опухолевых и нормальных клеток с ФХЛ наблюдалось извлечение холестерина из плазматической мембраны гепатоцитов: показано снижение Х/ФЛ-индекса на 28 % (от  $0,40 \pm 0,01$  до  $0,29 \pm 0,01$ ;  $P < 0,01$ ). Удаления холестерина из мембраны клеток гепатомы не наблюдалось. В противоположность этому эффективность извлечения холестерина из предварительно обогащенных им мембран клеток гепатомы Зайделя и гепатоцитов была практически одинаковой — Х/ФЛ-индекс уменьшался на 50 % как для опухолевых, так и для нормальных клеток (табл. 1).

Результаты опытов по встраиванию и выведению холестерина из плазматической мембраны гепатоцитов и клеток гепатомы Зайделя свидетельствуют о том, что эффективность встраивания и выведения холестерина зависят от величины молярного отношения холестерин/фосфолипиды в мембране. Встраивание холестерина было тем эффективней, чем ниже был Х/ФЛ-индекс. Извлечение холестерина, наоборот, было тем эффективнее, чем выше было исходное соотношение холестерин/фосфолипиды.

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что с помощью ХФХЛ, с одной стороны, и ФХЛ — с другой, можно изменять содержание холестерина в плазматической мембране опухолевых и нормальных клеток и таким образом воздейст-

Изменение молярного отношения холестерин/фосфолипиды в гепатоцитах и в клетках гепатомы Зайделя после инкубации с липосомами

№ серии опыта	Условия опыта	Гепатоциты	Клетки гепатомы Зайделя
1	Исходные клетки	$0,40 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,00$
2	Инкубация с ХФХЛ	$0,62 \pm 0,00$	$0,42 \pm 0,01$
3	Инкубация с ФХЛ	$0,29 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,01$
4	Инкубация с ХФХЛ, а затем с ФХЛ	$0,38 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,02$

Примечание. Приведены средние данные 8 опытов.  $P_{2,1}$ ,  $P_{3,1}$  и  $P_{4,2}$  составляют  $<0,001$ .

зовать на физические свойства их фосфолипидного бислоя.

При встраивании и выведении холестерина из опухолевых и нормальных клеток исследовали микровязкость их мембран с помощью флуоресцентного и спинового зондов. Увеличение Х/ФЛ-индекса вследствие встраивания холестерина в клетки гепатомы Зайделя и гепатоциты сопровождалось снижением эксимеризации флуоресцентного зонда пирена, что свидетельствовало о повышении микровязкости липидного бислоя мембран исследованных клеток (рис. 1). Пирен, используемый в качестве флуоресцентного зонда, может находиться в мембране в виде мономера, флуоресцирующего в области 392 нм, и в виде эксимера (возбужденного димера) с максимумом флуоресценции в области 470 нм. Соотношение интенсивностей флуоресценции эксимеров и мономеров является чувствительным показателем микровяз-

кости липидной фазы мембраны, поскольку в вязкой среде степень эксимеризации снижается [1]. При увеличении Х/ФЛ-индекса в исследованных клетках наблюдалось увеличение параметра упорядоченности спиновой метки, что также свидетельствует о повышении микровязкости липидного бислоя мембран гепатоцитов и клеток гепатомы Зайделя. Параметр упорядоченности спинового зонда 5-NS служит показателем степени ориентации и микроскопической упорядоченности жирнокислотных цепей фосфолипидов мембран. При инкубации нормальных и опухолевых клеток с буферным раствором (бескальциевый раствор Хенкса) не было обнаружено изменений параметров, характеризующих микровязкость мембран исследованных клеток. При выведении холестерина из предварительно обогащенных им мембран гепатоцитов и клеток гепатомы Зайделя было выявлено уменьшение микровязкости липидного бислоя их мембран.

Таким образом, встраивание и выведение холестерина из обогащенных им мембран клеток гепатомы Зайделя и гепатоцитов сопровождается изменением микровязкости фосфолипидного бислоя их мембран. Увеличение микровязкости липидного бислоя может быть причиной нарушения функционирования мембранных ферментных систем. В связи с этим мы исследовали активность характерных для плазматической мембраны ферментов Na, К-АТФазы и 5'-нуклеотидазы в опухолевых и нормальных клетках при встраивании и выведении холестерина. Получены следующие результаты сравнительного анализа активности Na, К-АТФазы и 5'-нуклеотидазы в нормальных и опухолевых клетках (табл. 2).

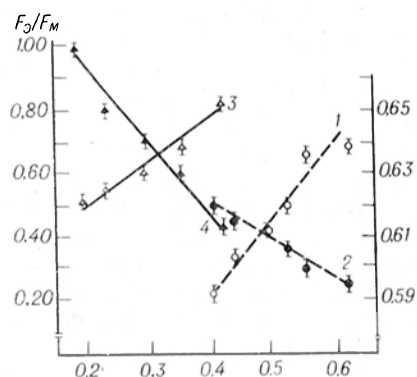


Рис. 1. Зависимость параметра упорядоченности ( $F_3/F_m$ ) жирнокислотного спинового зонда (1, 3) и степени эксимеризации (S) флуоресцентного зонда пирена (2, 4) от содержания холестерина в гепатоцитах (пунктирные линии) и в клетках гепатомы Зайделя (сплошные линии).

Здесь и на рис. 2 по оси абсцисс — молярное отношение холестерин/фосфолипиды.

Рис. 1. МЖГ.  
Суспензия МЖГ нанесена на форм-  
варовую пленку, контрастирование  
2% раствором уранилацетата.  
Ув. 175 000.

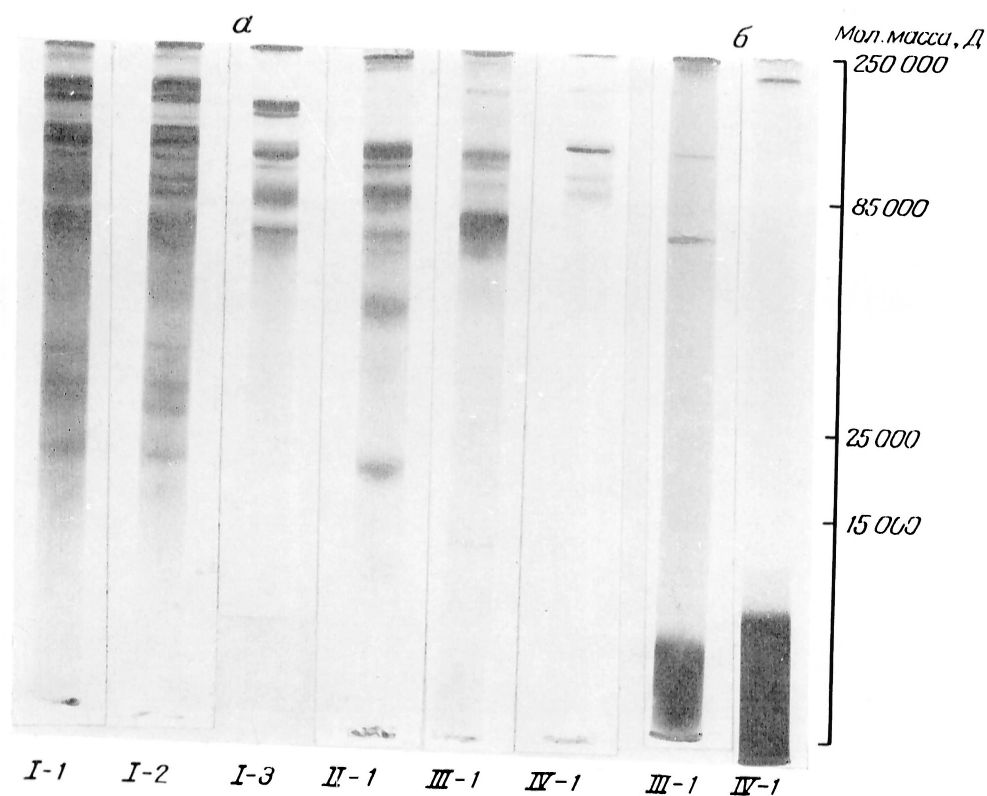
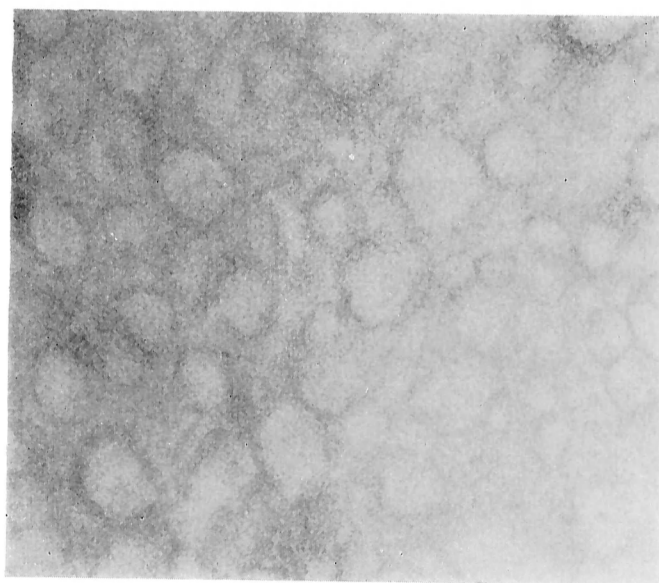


Рис. 2. Электрофореграммы фракций МЖГ.  
а — окраска на белки кумяси G-250, б — окраска на липопротеиды суданом черным Б.

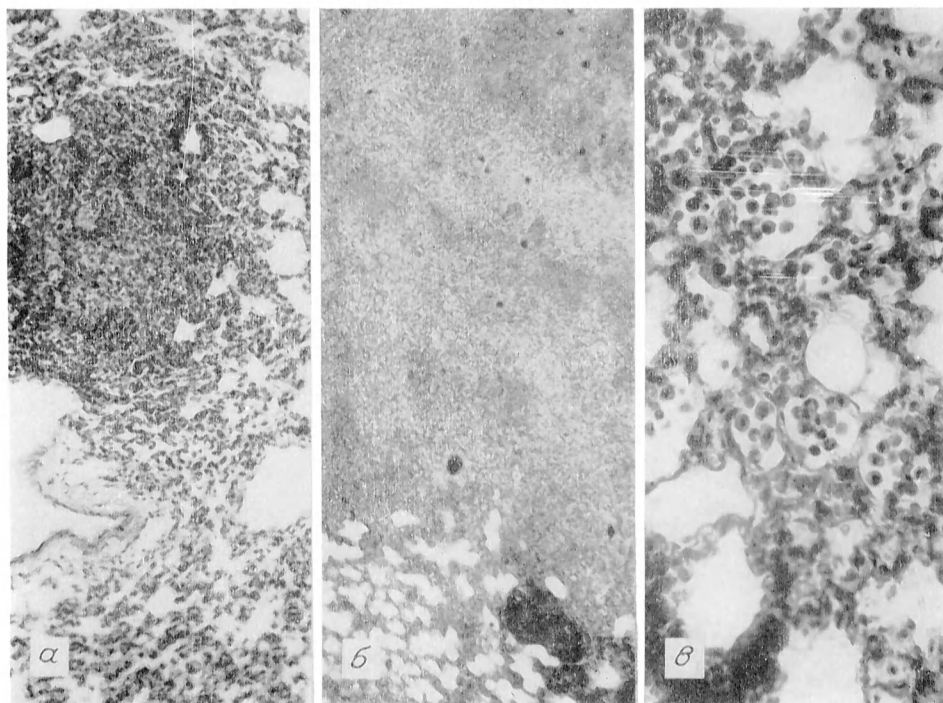


Рис. 1. Легкое морской свинки, зараженной подкожно микобактериями туберкулеза. Окраска гематоксилином и эозином.

*a* — продуктивный очажок через 2 мес после заражения. Ув. 170; *b* — крупный эпителиоидно-клеточный очаг с участками казеоза через 3 мес после заражения. Ув. 140; *v* — легкое животного через 2 мес после заражения и 1 мес лечения антибактериальными препаратами. Повышение проницаемости сосудистых стенок. В просвете альвеол множество альвеолярных макрофагов. Ув. 340.

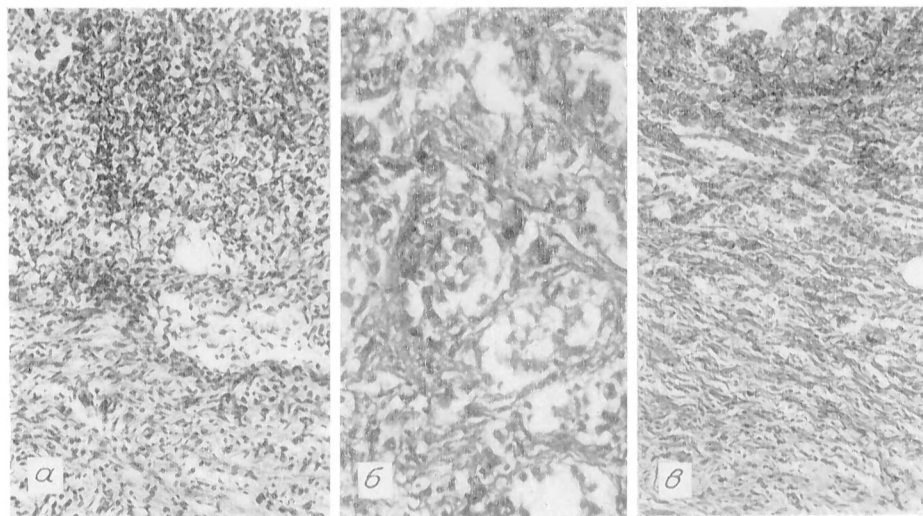


Рис. 2. Легкое морской свинки, зараженной внутрилегочно микобактериями туберкулеза. Окраска гематоксилином и эозином.

*a* — формирующаяся стенка каверны с обильным казеозно-некротическим и рыхлым специфическим грануляционным слоем через 1,5 мес после заражения. Ув. 170; *b* — легкое морской свинки через 3 мес после заражения. Перикавитарная зона. Коллагенизация межальвеолярных перегородок. Ув. 340; *v* — легкое морской свинки через 3 мес после заражения и 1,5 мес антибактериальной терапии. Рыхлый грануляционный слой. Фиброзный слой с четко очерченными коллагеновыми волокнами. Ув. 170.



Тип клеток	Активность ферментов		Молярное отношение холестерин/фосфолипиды моль/моль
	Na, К-АТФаза, наномоль Р <sub>н</sub> на 1 мг ФЛ в 1 мин	5'-нуклеотидаза, нано- моль Р <sub>н</sub> на 1 мг ФЛ в 1 мин	
Гепатоциты	132,8±15,6	324,9±38,1	0,40±0,01
Гепатома Зайделя	84,9±8,5	160,4±17,2	0,20±0,00

Таким образом, активность ферментов плазматической мембраны Na, К-АТФазы и 5'-нуклеотидазы, рассчитанная в наномолях Р<sub>н</sub> на 1 мг ФЛ в 1 мин, в опухолевых клетках в 2—2,5 раза ниже, чем в гепатоцитах. Таким образом, в клетках гепатомы Зайделя наряду со снижением молярного отношения холестерин/фосфолипиды наблюдается и понижение активности мембраносвязанных ферментов Na, К-АТФазы и 5'-нуклеотидазы.

При увеличении молярного отношения холестерин/фосфолипиды вследствие встраивания холестерина в клетки гепатомы и гепатоциты было показано снижение активности мембраносвязанных ферментов (рис. 2). Таким образом, увеличение микровязкости липидной фазы мембран клеток гепатомы и гепатоцитов приводит к снижению активности Na, К-стимулируемой АТФазы и 5'-нуклеотидазы. Наоборот, уменьшение микровязкости мембран вследствие извлечения холестерина из предварительно обогащенных им мембран способствует повышению активности этих ферментов.

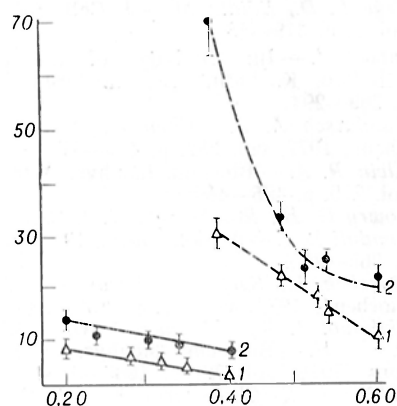


Рис. 2. Изменение активности Na, К-АТФазы (1) и 5'-нуклеотидазы (2) в зависимости от соотношения холестерин/фосфолипиды в гепатоцитах (пунктирные линии) и в клетках гепатомы Зайделя (сплошные линии). По оси ординат — активность (в наномолях Р<sub>н</sub> на 1 мг белка в 1 мин).

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что два фермента плазматических мембран гепатоцитов и гепатомы Зайделя — Na, К-АТФаза и 5'-нуклеотидаза — имеют диффузионно лимитируемые стадии, что подтверждается регуляцией их активности микровязкостью липидного бислоя мембран.

В заключительной части работы мы исследовали влияние изменений физических свойств плазматической мембраны при встраивании холестерина на перевиваемость клеток гепатомы Зайделя. Для этого были проведены эксперименты по перевивке животным опухолевых клеток, обогащенных холестерином. В качестве контролей использовали интактные опухолевые клетки, а также клетки, обработанные ФХЛ, и клетки после соответствующей инкубации в буферном растворе. Подсчет числа выживших животных проводили ежедневно от 5-го дня после перевивки опухолей. При вскрытии трупов обнаруживали большое количество асцитной жидкости; число опухолевых клеток подсчитывали в камере Горяева. К 15—18-му дню все животные погибали при введении интактных клеток гепатомы Зайделя или клеток, инкубированных в буферном растворе. Продолжительность жизни крыс значительно увеличивалась при введении клеток, обработанных ФХЛ (рис. 3). Наиболее выраженное защитное действие оказывала инкубация клеток с ХФХЛ; к 30-му дню погибло менее 50 % животных.

Цитостатический эффект инкубации опухолевых клеток с ФХЛ, по-видимому, обусловлен токсическим действием фосфолипидных перекисей на опухолевые клетки. О прямом ярко выраженном цитостатическом действии встроеного холестерина свидетельствовало существенное различие выживаемости крыс подопытной (после инкубации с ХФХЛ) и контрольной (после инкубации с ФХЛ) групп.

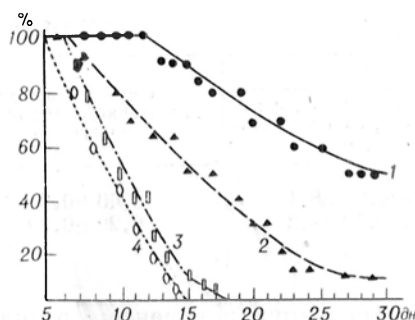


Рис. 3. Продолжительность жизни крыс после перевивки клеток гепатомы Зайделя.

По оси абсцисс — время (в днях), по оси ординат — количество выживших животных (в %). 1—4 — клетки, инкубированные с ХВХЛ, ФХЛ, раствором Хенкса и интактные соответственно. Животным каждой группы перевивали по  $10^6$  жизнеспособных клеток. Каждая кривая представляет усредненные значения для данной группы животных.

Увеличение выживаемости экспериментальных животных при перевивке им клеток гепатомы Зайделя с повышенным молярным отношением холестерина/фосфолипиды является следствием замедления скорости клеточной пролиферации. Это подтверждается уменьшением числа опухолевых клеток в асцитической жидкости у животных подопытной группы по сравнению с контрольными. Необходимо отметить, что продукты окисления холестерина, в частности 25-оксихолестерин, 20-оксихолестерин, также могут оказывать выраженное цитостатическое действие на клетки [16]. В связи с этим цитостатическое действие холестерина может быть обусловлено влиянием его окисленных производных.

Другим возможным механизмом цитостатического действия холестерина на опухолевые клетки может быть увеличение микровязкости их плазматических мембран на митотическую активность.

Такие свойства, как латеральная диффузия белковых рецепторов [14], проницаемость мембран для различных веществ [21] и ионный транспорт определяется в значительной степени микровязкостью липидного бислоя мембран. Изменения этих свойств обусловленные увеличением микровязкости мембраны могут повлечь за собой нарушение функционирования клетки. Увеличение микровязкости липидной фазы мембран и уменьшение активности мембраносвязанных ферментов характерно для процесса старения организма и влечет за собой снижение многих жизненно важных процессов,

в том числе скорости клеточной пролиферации [3, 7].

Следовательно, встраивание холестерина в мембраны опухолевых клеток можно рассматривать как моделирование процесса старения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М., 1980.
2. Глотков Н. В., Животовский Л. А., Хованов Н. В., Хромов-Борисов Н. Н. Биометрия. Л., 1982.
3. Дильман В. Н., Ревской С. Ю. — Физиология человека, 1981, т. 7, № 1, с. 125—129.
4. Канаева И. П., Кирякин А. В., Аленичева Т. В. и др. — Цитология, 1975, т. 17, № 5, с. 545—551.
5. Колотовер В. К. — В кн.: Физические и химические зонды в исследовании биологических мембран. М., 1979, с. 10—100.
6. Леменовская А. Ф., Коен Я. П., Переводчиков К. А. и др. — Биохимия, 1976, т. 41, № 6, с. 1000—1003.
7. Ли В. С., Халилов Э. М., Сабурова В. И. и др. — Вопр. мед. химии, 1982, № 6, с. 66—71.
8. Лопухин Ю. М., Арчаков А. И., Владимиров Ю. А., Когин Э. М. Холестериноз. М., 1983.
9. Barenholtz J., Gibben D., Litman B. et al. — Biochemistry (Wash.), 1977, vol. 16, p. 2806—2810.
10. Bertrand J., Picard J. — Cell. molec. Biol., 1979, vol. 25, p. 273—279.
11. Cheng S., Levy D. — Arch. Biochem., 1979, vol. 196, p. 424—429.
12. Fo Feo, Canute R. A., Garcia R. et al. — Biochim. biophys. Acta, 1975, vol. 413, p. 116—134.
13. Folch J., Lees M., Stanley G. H. S. — J. biol. Chem., 1957, vol. 226, p. 497—509.
14. Frye L. D., Edidin M. — J. Cell. Sci., 1970, vol. 7, p. 319—335.
15. Inbar M. — In: Biology of the Cancer Cell / Ed. K. Letnansky. Amsterdam, 1980, p. 269—294.
16. Kandutsch A. A., Chen H. W. — J. biol. Chem., 1977, vol. 252, p. 409—415.
17. Klein R. A. — Biochim. biophys. Acta, 1980, vol. 210, p. 485—489.
18. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. I. — J. biol. Chem., 1951, vol. 193, p. 265—275.
19. Muszbek L., Szabo T., Fesus L. — Analyt. Biochem., 1977, vol. 77, p. 286—288.
20. Philippot J. R., Cooper A. G., Wallach D. F. H. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1976, vol. 72, p. 1035—1041.
21. Sabine J. R. Cholesterol. New York, 1977.
22. Schmidt-Ullrich R., Wallach D. F. H., Davis F. D. G. — J. nat. Cancer Inst. (Wash.), 1976, vol. 57, p. 1107—1116.
23. Shinitzky M., Inbar M. — Biochim. biophys. Acta, 1976, vol. 433, p. 133—149.
24. Webster D. — Clin. chim. Acta, 1962, vol. 7, p. 277—284.

Поступила 22.05.85

# INTRODUCTION AND LIBERATION OF CHOLESTEROL IN PLASMATIC MEMBRANES OF HEPATOCYTES AND OF ZAIHHELA HEPATOMA CELLS

*L. I. Ivanova, E. M. Khalilov, E. A. Gorbatenkova, A. I. Archakov, Yu. M. Lopukhin*

N. I. Pirogov II Medical School, Institute of Physico-Chemical Medicine, Ministry of Public Health of the RSFSR, Moscow

Molar ratio of cholesterol/phospholipids was decreased in Zaidhela hepatoma cell membranes

as compared with rat normal hepatocytes. Microviscosity of lipid bilayer was increased in membranes of normal and malignant cells, while the activity of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase and 5'-nucleotidase was decreased during introduction of cholesterol into the cell membranes. As compared with control groups the duration of life was increased in the group of animals implanted with Zaidhela hepatoma cells modified by cholesterol. The data obtained suggest that an increase in microviscosity of membranes in tumoral cells, enriched with cholesterol, might inhibit their mitotic divisions.

УДК 616.12-008.318-092:616.127-008.931:577.152.361]-02:613.863

*Ф. З. Меерсон, Т. Г. Сазонтова, Ю. В. Архипенко, В. Е. Каган*

## АНАЛИЗ ТЕРМОДЕНАТУРАЦИИ $\text{Na}$ , $\text{K}$ -АТФазы САРКОЛЕММЫ МИОКАРДА КРЫС ПРИ СТРЕССЕ И ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ ПОВРЕЖДЕНИЯ ЭТОГО ФЕРМЕНТА В ПАТОГЕНЕЗЕ АРИТМИЙ

НИИ общей патологии и патологической физиологии АМН СССР, Москва, Институт физиологии Болгарии, АН, София, НРБ

Известно, что при стрессе и ишемии в миокарде реализуется так называемая липидная триада повреждения биомембран, состоящая из активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) [6], фосфолипаз [13] и detergentного действия лизофосфолипидов и жирных кислот [11]. В результате при стрессе увеличивается проницаемость сарколеммы, что обнаруживается по выходу креатинфосфокиназы и лактатдегидрогеназы в коронарный проток, а также по накоплению в миокарде технеция [4, 17]. Одновременно происходит снижение активности основных мембранно-связанных ферментов и прежде всего  $\text{Na}$ ,  $\text{K}$ -АТФазы [7, 8], играющей ключевую роль в поддержании трансмембранного потенциала кардиомиоцитов и следовательно, в сохранении электрической стабильности сердца.

Эти данные дают основание предполагать, что нарушения активности  $\text{Na}$ ,  $\text{K}$ -АТФазы могут играть существенную роль в возникновении наблюдаемого при стрессе у животных и людей снижения электрической стабильности сердца и возникновении фибрилляции желудочков [5, 14]. Однако по существу этот вопрос остается открытым, так как информация о состоянии  $\text{Na}$ ,  $\text{K}$ -АТФазы при стрессе сводится к факту, что скорость гидролиза АТФ

этим ферментом у животных, перенесших стресс, уменьшается. Это не позволяет оценить тонких конформационных изменений в молекуле, которые *in vivo* могут сказаться на устойчивости фермента к внешним воздействиям, его кооперативных, регуляторных и других свойствах. Простым способом, позволяющим выявить эти изменения, является анализ кинетики термоденатурации фермента. Термоденатурация является принятым методом оценки конформационной стабильности растворимых и мембранно-связанных белков.

Цель данной работы — выяснение влияния стресса на термостабильность  $\text{Na}$ ,  $\text{K}$ -АТФазы, оценка роли ПОЛ в повреждении фермента и возможности предупреждения этих нарушений с помощью антиоксидантов, а также предварительной адаптации животных к коротким стрессорным воздействиям.

### Методика

Работа проведена на крысах-самцах Вистар массой 180—200 г, у которых вызывали эмоционально-болевой стресс (ЭБС) в форме невроза тревоги по методу Десидерато [10] в течение 6 ч. Животных декапитировали через 2 ч после окончания стресса. Ионол вводили внутривентриально за 5, 3 и 1 сут до ЭБС, а также в день проведения ЭБС по 20 мг на 1 кг массы тела. Предварительную адаптацию к стрессу осуществляли в виде 7 одно-

часовых сеансов, проводимых через день (последний сеанс — за 2 сут до 6-часового стресса).

Фракцию сарколеммы выделяли по разработанному нами методу с учетом работ Mansier и соавт. [16]. Извлеченные сердца промывали в охлажденном физиологическом растворе, освобождали от соединительной ткани, предсердий, сосудов и жира и измельчали гомогенизатором типа «Политрон» 2 раза по 7 с в 10-кратном объеме среды, содержащей 20 мМ имидазол, 20 мМ пиррофосфат натрия и 1 мМ ЭДТА (рН 7,8 при 4°C). Гомогенат фильтровали через 2 слоя марли и центрифугировали 10 мин при 1300 g. Осадок суспендировали в гомогенизаторе тефлон — стекло в 10 объемах среды гомогенизирования и осаждали в тех же условиях. Эту операцию проводили дважды. Полученный осадок суспендировали в 20 объемах среды гомогенизирования, содержащей 1 М KCl. Суспензию инкубировали при 4°C с постоянным перемешиванием в течение 4 ч и центрифугировали 10 мин при 2300 g. Осадок промывали 20 мМ имидазолом (рН 7,2 при 4°C) с повторным переосаждением и суспендировали в среде хранения, содержащей 20 мМ имидазол, 1 мМ ЭДТА, 25 % глицерина. Полученная таким образом фракция тяжелой сарколеммы обладала активностью Na, K-АТФазы порядка 15 мкмоль  $\Phi_n$  на 1 мг белка в 1 ч при соотношении активностей Mg-АТФазы/Na, K-АТФазы не более 1/0,8. Суспензию мембран сразу использовали в эксперименте или хранили при температуре жидкого азота.

Активность АТФаз определяли по накоплению  $\Phi_n$  [19] после инкубации мембранной суспензии в среде, содержащей 3 мМ АТФ, 3 мМ  $MgCl_2$ , 120 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 30 мМ имидазол (рН 7,4 при 37°C) в присутствии 1 мМ убаина и без него. Концентрацию белка определяли по Лоури и соавт. [15].

ПОЛ инициировали в суспензии везикул сарколеммы (1 мг белка в 1 мл) в среде 20 мМ трис-HCl (рН 7,0 при 25°C) системой  $Fe^{2+}$  — аскорбат в концентрациях 0,1 и 0,2 мМ соответственно. Реакцию останавливали добавлением ионола в концентрации 10 ммоль на 1 мг белка и быстрым охлаждением. Степень окисления мембран контролировали по накоплению малонового диальдегида [18].

Термоденатурацию проводили в интервале температур 50—60°C при термостатировании с точностью  $\pm 0,1^\circ$ . Исследование кинетики термоденатурации и расчет термодинамических параметров проводили, как описано ранее [12]. Несмотря на сложность структуры молекулы Na, K-АТФазы, термодинамический анализ процесса ее температурной инактивации может быть проведен аналогично анализу простых белков [1].

## Результаты и обсуждение

ЭБС приводит к снижению активности Na, K-АТФазы сарколеммы миокарда на 20 %. Вместе с тем наблюдается резкое увеличение скорости термоинактивации фермента в мембранах, выделенных из крыс, перенесших ЭБС. На рис. 1, а представлена кинетика

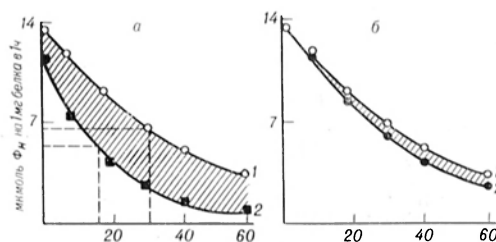


Рис. 1. Термоинактивация Na, K-АТФазы в сарколемме миокарда крыс при 55°C в контроле (1) и после ЭБС (2) в обычных условиях эксперимента (а) и при предварительном введении ионола (б).

Здесь и на рис. 4: по оси абсцисс — время инкубации (в мин), по оси ординат — активность фермента (в мкмоль  $\Phi_n$  на 1 мг белка в 1 ч). Пунктиром обозначено время полумаксимального ингибирования фермента.

тика ингибирования Na, K-АТФазы в процессе термоденатурации. Как видно, время полумаксимального ингибирования фермента после стресса в 2 раза меньше (при 55°C), чем в контроле.

Представляя кинетические данные термоинактивации Na, K-АТФазы в виде полулогарифмической зависимости степени ингибирования фермента от времени термоденатурации, можно получить значения констант скорости термоденатурации, пропорциональные тангенсу угла наклона прямых в этих координатах. Во всех исследованных случаях процесс термоденатурации Na, K-АТФазы следует кинетике реакций первого порядка. Как видно из рис. 2, с повышением температуры значительно увеличивается скорость термоинактивации фермента и соответственно константа скорости этого процесса. При этом важно, что ско-

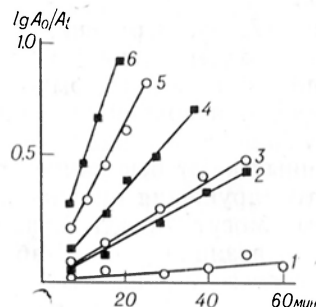


Рис. 2. Изменение константы скорости термоденатурации Na, K-АТФазы сарколеммы миокарда ( $K_{Td} = 2,303 \cdot \lg \alpha$ ) в зависимости от температуры.

$A_0$  и  $A_i$  — активность фермента соответственно в начальный момент времени и в момент времени  $t$ . 1, 3, 5 — контроль при 52, 55 и 58°C соответственно; 2, 4, 6 — ЭБС при тех же температурах.

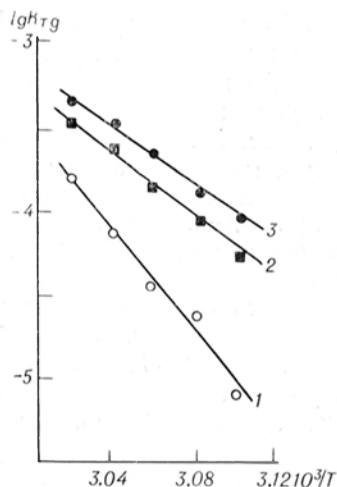


Рис. 3. Температурная зависимость  $K_{TL}$  Na, K-АТФазы сарколеммы миокарда в контроле (1), после стресса (2) и после окисления нативных мембран системой Fe — аскорбат (3).

рость терминиактивации Na, K-АТФазы при каждой конкретной температуре после стресса существенно выше, чем в контроле.

После проведения термоденатурации Na, K-АТФазы сарколеммы миокарда при различных температурах полученные данные были представлены в координатах  $\lg K$  от  $1/T$ , где  $K$  — константа скорости термоденатурации при определенной температуре,  $T$  — абсолютная температура (рис. 3). Анализ этих зависимостей позволяет рассчитать термодинамические параметры процесса термоденатурации. В таблице представлены значения энергии активации ( $E_a$ ), изменения энтальпии ( $\Delta H^*$ ), энтропии ( $\Delta S^*$ ) и свободной энергии ( $\Delta F^*$ ). В результате стрессорного воздействия существенно уменьшается величина  $E_a$  и соответственно снижаются  $\Delta H^*$  и  $\Delta S^*$  термоденатурации по сравнению с контролем при практически неизменной величине  $\Delta F^*$ . Это свидетельствует

о том, что после перенесенного стресса конформация белка резко отличается от нативной, в результате чего существенно облегчены переходы к функционально неактивным конформационным состояниям, т. е. к денатурированным состояниям.

Опираясь на измеренные нами в эксперименте константы скорости термоденатурации Na, K-АТФазы (в интервале 50—60°C), путем экстраполяции можно определить скорость термоденатурации в диапазоне температур 37—40°C, реально существующем в организме млекопитающих. Оказалось, что в контроле время полумаксимального ингибирования фермента составило 126,3 ч, а после стресса уменьшилось до 10,5 ч. Это позволяет предположить, что в результате перенесенного стресса время жизни фермента существенно уменьшается. Разумеется, нет оснований переоценивать значение этих экстраполированных величин, однако они позволяют предположить, что стресс в той или иной мере ускоряет процесс инактивации фермента в физиологических условиях, что может играть роль в снижении активности фермента вследствие стрессового воздействия.

Одним из важнейших факторов, определяющих структуру и стабильность глобулярных белков, являются гидрофобные взаимодействия. Если в растворимых белках они реализуются главным образом во внутреннем гидрофобном ядре молекулы, то для мембранно-связанных белков существенное значение имеют взаимодействия неполярных аминокислотных остатков с гидрофобными углеводородными цепями липидной матрицы. В результате ЭБС, как было показано ранее [6], в сердце активируется процесс ПОЛ, что должно приводить к появлению полярных продуктов ПОЛ в липидном

Термодинамические параметры термоденатурации Na, K-АТФазы сарколеммы миокарда в контроле после перенесенного стресса и после индукции ПОЛ in vivo

Параметр	Контроль	Стресс	ПОЛ
$E_a$ , ккал/моль	$75,6 \pm 2,3$	$60,7 \pm 2,0^*$	$59,2 \pm 1,9^*$
$\Delta H^*$ , ккал/моль	$75,0 \pm 2,3$	$60,1 \pm 2,0^*$	$58,6 \pm 1,9^*$
$\Delta S^*$ , кал/(моль · град)	$156,8 \pm 0,6$	$111,3 \pm 3,6^{**}$	$104,6 \pm 1,2^{**}$
$\Delta F^*$ , ккал/моль	$24,4 \pm 1,5$	$23,7 \pm 1,9$	$23,4 \pm 2,1$

\*  $P < 0,05$ .

\*\*  $P < 0,001$ .



бислое и микроокружении Na, К-АТФазы. Можно предположить, что именно этот процесс приведет к снижению термостабильности фермента. Подтверждением этого является ранее доказанный факт детергентного действия гидрофильных продуктов ПОЛ [9] и их способности увеличивать разупорядоченность липидного бислоя. Эти процессы в свою очередь вызывают увеличение подвижности полипептидных цепей мембранно-связанных белков. Высокая полярность кислородсодержащих группировок (гидроперкисных, гидроксильных, карбонильных), появляющихся в результате индукции ПОЛ в полиеновых ацилах фосфолипидов мембраны, нарушает гидрофобные липид-белковые взаимодействия в сарколемме. Отсюда становится ясным, что вероятность перехода липопротеидных комплексов в неупорядоченное денатурированное состояние должна увеличиваться после стресса и требовать для этого меньшей энергии.

Обращает на себя внимание одновременно и тот факт, что ЭБС, а следовательно и индукция ПОЛ в сарколемме приводят к уменьшению величины  $\Delta S^*$  термоденатурации Na, К-АТФазы. Само по себе высокое значение  $\Delta S^*$  в нативном препарате свидетельствует о высокой структурной организации молекулы Na, К-АТФазы. В результате накопления продуктов ПОЛ при стрессе увеличивается энтропия, так как белок частично приближается к денатурированному состоянию и, следовательно, полностью денатурированное состояние будет достигнуто при меньшем изменении энтропии ( $\Delta S^*$ ).

В целях моделирования *in vitro* процессов, ответственных за повреждение Na, К-АТФазы при ЭБС, нативные мембраны были частично окислены системой Fe — аскорбат в течение 6 мин, что привело к снижению активности ферментов на 20 %, соответствующему степени ингибирования Na, К-АТФазы при стрессе. За это время произошло накопление 3,5 нмоль малонового диальдегида на 1 мг белка. Затем окисленные и нативные мембраны подвергли термоденатурации при различных температурах, после чего рассчитывали термодинамические параметры этого процесса. Оказалось, что  $E_a$  термоденатурации, пропорцио-

нальная  $\lg \alpha$  в координатах  $\lg K_{td}$  от  $1/T$ , окисленных мембран значительно меньше, чем у нативных мембран, что соответствует изменению  $E_a$  после ЭБС (см. рис. 3). Очень важным, на наш взгляд, является не только качественное, но и количественное совпадение параметров термоденатурации Na, К-АТФазы при ЭБС и при ПОЛ (см. таблицы). Это свидетельствует о возможном сходстве механизмов повреждения Na, К-АТФазы в изученных моделях и, следовательно, о возможном участии ПОЛ в стрессорном повреждении Na, К-АТФазы миокарда.

Такой вывод послужил основанием для попытки предотвратить повреждающее действие ЭБС на Na, К-АТФазу предварительным введением животным синтетического антиоксиданта 4-метил-2,6-дитрет-бутилфенола (ионола). Как видно из данных, представленных на рис. 1, б, ионол полностью предотвращал не только снижение активности Na, К-АТФазы при ЭБС, но и увеличение скорости ее термоденатурации: время полумаксимального ингибирования после стресса, проведенного на фоне ионола, не отличается от такового в контроле.

Как было показано ранее, стрессорные повреждения сердца могут быть предотвращены не только экзогенными фармакологическими факторами, но и путем использования адаптационных возможностей организма [3]. В целях предупреждения снижения термостабильности Na, К-АТФазы была использована предварительная адаптация к коротким стрессовым воздействиям. При этом было обнаружено, что у животных, подвергшихся

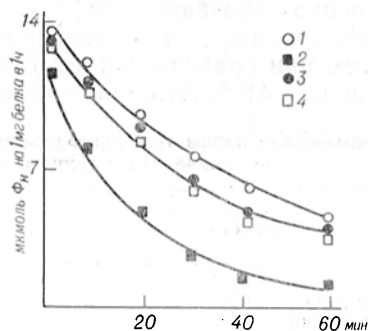


Рис. 4. Влияние предварительной адаптации к коротким стрессовым воздействиям на кинетику термоинактивации Na, К-АТФазы миокарда. 1 — контроль; 2 — ЭБС; 3 — адаптация к коротким стрессам; 4 — ЭБС у крыс, адаптированных к коротким стрессам.

стрессу после их адаптации к этому воздействию, кинетика термoinактивации Na, K-АТФазы сарколеммы мало отличается от таковой у адаптированных животных, не подвергавшихся длительному ЭБС (рис. 4).

В целом полученные результаты свидетельствуют о том, что изучение кинетики термoinактивации Na, K-АТФазы позволяет выявить существенные изменения внутримолекулярных свойств фермента даже при незначительных снижениях его гидролитической активности. Этим способом при стрессе обнаружены глубокие изменения в молекуле Na, K-АТФазы сарколеммы миокарда. Наиболее вероятной причиной этих повреждений является активация ПОЛ, наблюдаемая в сердце при стрессе. Антиоксидант ионол и предварительная адаптация к коротким стрессорным воздействиям предотвращает повреждения Na, K-АТФазы.

Оценивая эти данные, следует иметь в виду установленный недавно факт, что использованный нами антиоксидант ионол предупреждает возникающее под влиянием стресса снижение электрического порога фибрилляции сердца, а предварительная адаптация к коротким стрессорным воздействиям не только имеет аналогичный эффект [5], но также увеличивает резистентность сердца к аритмогенному действию химического индуктора ПОЛ [2].

Таким образом, факторы, ограничивающие ПОЛ и предотвращающие нарушения в системе Na, K-АТФазы при стрессе, одновременно предупреждают стрессорное снижение электрической стабильности сердца. Это согласуется с предположением о роли ПОЛ и повреждения системы Na, K-АТФазы в аритмогенном действии стресса.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Малеев В. Я. // Биофизика. — 1984. — Т. 29. — С. 45—47.
2. Манухина Е. Б., Каткова Л. С., Меерсон Ф. З. // Бюл. exper. биол. — 1985. — № 8. — С. 151—153.
3. Меерсон Ф. З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. — М., 1984.
4. Меерсон Ф. З., Абдикалиев Н. А., Голубева Л. Ю. // Бюл. exper. биол. — 1981. — № 9. — С. 281—283.
5. Меерсон Ф. З., Белкина Л. М., Дюсенов С. С. и др. // Кардиология. — 1985. — № 10. — С. 36—44.
6. Меерсон Ф. З., Каган В. Е., Прилипко Л. Л. и др. // Бюл. exper. биол. — 1979. —

- № 10. — С. 404—406.
7. Меерсон Ф. З., Медведев Л. Н., Голубева Л. Ю. и др. // Там же. — 1982. — № 2. — С. 61—62.
8. Меерсон Ф. З., Сазонтова Т. Г., Каган В. Е. и др. // Там же. — 1983. — № 12. — С. 42—44.
9. Новиков К. П., Каган В. Е., Шведова А. А. и др. // Биофизика. — 1975. — Т. 20. — С. 1039—1042.
10. Desiderato O., Testa M. // Physiol. Behav. — 1976. — Vol. 16. — P. 67—73.
11. Hatefi Y., Hanstein W. G. // Arch. Biochem. — 1970. — Vol. 136. — P. 73—86.
12. Johnson F. H., Eyring H., Stover B. I. The Theory of Rate Processes in Biology and Medicine. — New York, 1974.
13. Katz A., Messineo F. // Circulat. Res. — 1981. — Vol. 48. — P. 1—16.
14. Lown B. // Amer. J. Med. — 1982. — Vol. 72. — P. 177—180.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. I. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
16. Mansier P., Charlemagne D., Rossi B. et al. // Ibid. — 1983. — Vol. 258. — P. 6628—6635.
17. Miller D. G., Malov S. // Pharmacol. Biochem. Behav. — 1977. — Vol. 7. — P. 139—145.
18. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. // Analyt. Biochem. — 1979. — Vol. 95. — P. 351—358.
19. Ruthbun W. B., Bellach M. W. // Ibid. — 1969. — Vol. 28. — P. 436—444.

Поступила 27.05.85

#### ANALYSIS OF THE Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase THERMODENATURATION IN RAT MYOCARDIUM SARCOLEMM IN STRESS AND POSSIBLE ROLE OF THE ENZYME IMPAIRMENT IN PATHOGENESIS OF ARRHYTHMIAS

F. Z. Meerson, T. G. Sazonlova, Yu. V. Arkhipenko, V. E. Kagan

Institute of Pathology and Pathophysiology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow, Institute of Physiology, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia

Activity of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and kinetics of the enzyme thermodenaturation were estimated in preparations of heavy sarcolemma isolated from rat myocardium. Emotional-painful stress (EPS) decreased the enzymatic activity by 20 %, whereas the rate of the enzyme thermodenaturation was increased 2-3-fold. A thermodynamic analysis enabled to find a decrease in the energy of activation of the process after the stressory effects as well as alterations in enthalpy and entropy under conditions of practically constant changes in free energy; this suggests the possible conformational transformations in the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase molecules in EPS, resembling the state of denaturation. Lipid peroxidation was essential for the decrease in the enzyme thermostability. Activation of lipid peroxidation in the sarcolemma native membranes was accompanied by impairments typical for EPS. Preadministration of an antioxidant ionol before stress protected both the activity and thermostability of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. Adaptation to EPS by means of multiple short-term stressory actions prevented also the enzyme impairment. Mechanisms of the stress arrhythmogenic effect are discussed.

Н. М. Геворкян, Л. А. Локшина, Н. В. Николаева, Б. З. Иткин

# СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ЛИМФОЦИТОВ В НОРМЕ И ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ЛИМФОЛЕЙКОЗЕ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР,  
Институт химической физики АН СССР, Ветеринарная академия им. К. И. Скрябина,  
Москва

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) человека и животных — лимфопролиферативное заболевание, характеризующееся накоплением в организме моноклональных лимфоцитов (чаще В-клеточного происхождения) [20]. При этом лейкозный клон образуют лимфоциты, которые, возможно, блокированы на промежуточных стадиях дифференцировки [27] и характеризуются увеличенным временем жизни [9]. Молекулярные механизмы, лежащие в основе этого заболевания, в настоящее время неясны. С целью их изучения в ряде работ проводились исследования в лимфоцитах активности лизосомных гидролаз [18, 21], ферментов пуринового [10, 19] и нуклеинового обмена [24], а также дипептидиламинопептидазы (ДАП) IV [11] и карбоксипептидазы А [16]. Некоторые из этих ферментов предлагают использовать для дифференциальной диагностики разных форм лейкоза; к ним относятся, в частности, ДАП IV, которая обнаружена только в Т<sub>H</sub>-лимфоцитах [11].

Учитывая имеющиеся в литературе данные об участии протеолитических ферментов в индукции пролиферации [13, 22] и в дифференцировке клеток [14, 17], а также сведения о повышенном уровне их активности в опухолевых клетках [7, 23], мы сочли интересным выяснение возможной роли протеиназ в патогенезе лимфопролиферативных заболеваний, в частности ХЛЛ.

В качестве модели был использован ХЛЛ крупного рогатого скота, являющийся наиболее распространенной формой гемобластозов у этих животных. [2]. Протеолитические ферменты лимфоцитов крупного рогатого скота мало исследованы как в норме, так и при лейкозах. Только в 1982 г. появилась работа по сравнительному изучению протеолитической активности плазматической мембраны лимфоцитов периферической крови и лимфоуз-

лов в норме и при энзоотическом бычьим лейкозе [6].

Настоящая работа представляет собой первую попытку дать сравнительную характеристику, оценку общей протеолитической активности и спектра протеолитических ферментов в лимфоцитах периферической крови крупного рогатого скота в норме и при ХЛЛ.

## Методика

Лимфоциты из периферической крови крупного рогатого скота выделяли, пропуская гепаринизированную кровь через термостатируемую колонку с хлопковым волокном 9078И для удаления гранулоцитов [3]. Гемолиз эритроцитов проводили в 0,83 % растворе  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , содержащем гепарин. Затем лимфоциты осаждали центрифугированием (30 мин, 800 g) и трижды отмывали фосфатным буфером ( $\text{NaCl}$  — 8 г/л,  $\text{KCl}$  — 0,2 г/л,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 0,2 г/л,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  — 1 г/л,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  — 0,15 г/л; pH 7,2). Полученный осадок лимфоцитов суспендировали в 0,1 М фосфатном буфере pH 7,4, содержащем 1 М  $\text{KCl}$  и 0,1 % тритон X-100 ( $10^7$  клеток/мл). Затем проводили трехкратное замораживание и оттаивание клеточной суспензии. Прозрачный лизат использовали для определения концентрации белка по методу Лоури и для изучения протеолитической активности.

В качестве субстратов для определения активности протеиназ при pH 7,4 и 4,0 использовали соответственно ацетилированные  $^3\text{H}$ -уксусным ангидридом казеин [15] и гемоглобин [1]. Удельная радиоактивность полученных препаратов составляла 2000 имп/мин/мкг. Пробу объемом 0,5 мл, содержащую 0,1 мл лизата ( $5 \cdot 10^5$ — $10^6$  лимфоцитов), 0,1 М фосфатный буфер pH 7,4 (или 0,1 М ацетатный буфер pH 4,0) и 5 мкл радиоактивного субстрата ( $\sim 20\,000$  имп), инкубировали 2 ч при 37 °C. При изучении действия активаторов и ингибиторов лизат преинкубировали с соответствующим реагентом 5—10 мин при комнатной температуре. Объем пробы при этом составлял 0,5 мл; была использована конечная концентрация дитиотрейтола (ДТТ) и ЭДТА  $5 \cdot 10^{-4}$ — $10^{-3}$  М, пара-хлормеркурибензоата (п-ХМБ)  $2 \cdot 10^{-4}$  М, фенилметилонийсульфанилфторида (ФМСФ)  $5 \cdot 10^{-4}$  М, пепстатина 2—4 мкг/мл. Действие трех первых веществ исследовали при pH 7,4 и 4,0, ФМСФ — при pH 7,4, а пепстатина — при pH 4,0. После добавления 5 мкл соответствующего радиоактивного субстрата и последующей 2-часовой инкуба-

ции в каждую пробу вносили по 0,1 мл 3 % раствора сывоточного альбумина в 0,1 М фосфатном буфере рН 7,4 и проводили осаждение равным объемом 20 % трихлоруксусной кислотой (ТХУ). Пробы оставляли на ночь при 4 °С и после центрифугирования (20 мин, 2500 g) в надосадочной жидкости определяли радиоактивность растворимых в ТХУ продуктов. Протеолитическую активность выражали в импульсах в 1 мин, обнаруживаемых в ТХУ-фильтратах за 1 ч гидролиза в пересчете на клетку и на 1 мг белка.

## Результаты и обсуждение

Исследована протеолитическая активность в лизатах лимфоцитов 24 животных: 14 здоровых и 10 больных ХЛЛ. На рис. 1 приведены значения удельной активности ферментов в нейтральной и кислой среде (гидролиз казеина при рН 7,4 и гемоглобина при рН 4,0) в норме и при ХЛЛ. Обращает на себя внимание большой разброс величин активности ферментов как в нейтральной, так и в кислой среде в обеих группах исследованных животных. Тем не менее на фоне существующих индивидуальных колебаний при расчете на клетку (см. рис. 1, а, средние значения) при ХЛЛ отмечается некоторая тенденция к снижению протеолитической активности. Однако при расчете активности на 1 мг белка (см. рис. 1, б) тенденция изменяется:

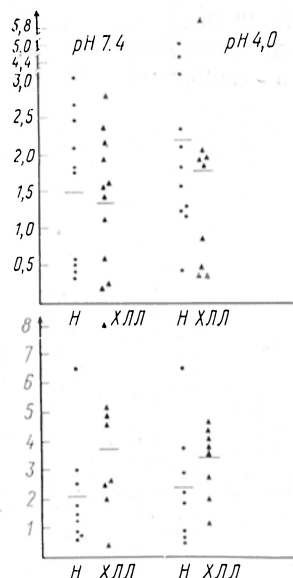


Рис. 1. Удельная протеолитическая активность при рН 7,4 и 4,0 в лизатах лимфоцитов периферической крови животных в норме (Н) и при ХЛЛ.

а — в расчете на  $10^6$  клеток; б — в расчете на 1 мг белка. Круги — норма; треугольники — ХЛЛ; горизонтальные линии — средние значения активности.

## Содержание белка в лизатах лимфоцитов ( $10^7$ клеток/мл) периферической крови крупного рогатого скота в норме и при ХЛЛ

№ животного	Лейкоциты в 1 мкл	Белок, мкг/мл
<b>Норма</b>		
1	7 400	860
2	9 000	—
3	7 750	—
4	8 150	—
5	8 600	890
6	7 000	450
7	6 750	—
8	5 250	650
9	3 800	600
10	7 670	520
11	6 400	825
12	7 200	700
13	6 500	750
14	15 700	—
Среднее . . .		$694 \pm 123$
<b>ХЛЛ</b>		
15	42 400	—
16	156 800	150
17	20 000	340
18	22 000	300
19	29 000	390
20	53 000	105
21	123 000	170
21а	166 000	270
21б	181 600	290
22	34 125	450
23	42 430	300
24	65 500	430
Среднее . . .		$290 \pm 85$

наблюдается повышение в среднем удельной протеолитической активности при ХЛЛ по сравнению с нормой.

Это может быть связано с разным содержанием белка в лимфоцитах в норме и при ХЛЛ. Действительно, нами обнаружены значительные различия в содержании белка в лизатах лимфоцитов здоровых ( $694 \pm \pm 123$  мкг/ $10^7$  клеток) и больных ХЛЛ ( $290 \pm 85$  мкг/ $10^7$  клеток) животных (см. таблицу). Таким образом, в лизатах лимфоцитов здоровых животных содержится в среднем в 2,4 раза больше белка, чем в лимфоцитах больных ХЛЛ. Эти различия статистически достоверны ( $P < 0,005$ ). Обнаруженные различия в содержании белка могли быть связаны с загрязнением полученной нами фракции лимфоцитов другими типами клеток либо клеточными фрагментами (что более вероятно при исследовании здоровых, где лейкоци-

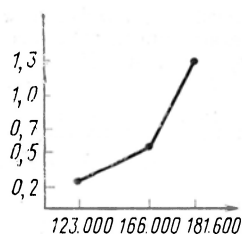


Рис. 2. Протеолитическая активность лимфоцитов при pH 7,4 в динамике развития ХЛЛ у одного и того же животного.

По оси ординат — удельная активность в расчете на 10<sup>6</sup> клеток; по оси абсцисс — количество лимфоцитов в 1 мкл периферической крови.

тарная фракция более гетерогенна). С целью проверки такой возможности мы провели контрольные эксперименты: определили содержание белка в лимфоцитах, выделенных другим методом (с использованием системы изопак — фиколл [4]), а также во фракциях клеток, полученных методом дифференциального центрифугирования (от 400 до 200 g) клеточной суспензии после гемолиза эритроцитов. Однако содержание белка во всех случаях в норме было значительно выше, чем при ХЛЛ. Таким образом, обнаруженное сниженное содержание белка в лизатах лимфоцитов при ХЛЛ, по-видимому, не является артефактом; скорее всего оно может иметь отношение к природе этих клеток при ХЛЛ.

В связи с наличием существенных различий в содержании белка мы считаем необходимым выражать активность ферментов как на клетку, так и на 1 кг белка (см. 1, а и б). Эти два способа выражения ферментативной активности, используемые также и в некоторых других работах [12, 21, 26], могут взаимно дополнять друг друга и свидетельствовать о некоторых специфических изменениях метаболизма в клетках. Это особенно важно при сравнительной оценке активности различных ферментов в норме и при патологии [12].

Корреляцию между активностью исследуемых ферментов, содержанием белка в клетках и лейкоцитозом в крови животных выявить не удалось. То, что это скорее всего связано именно с индивидуальными колебаниями в уровнях активности у разных животных, подтверждающих опыты, проведенные на одном и том же животном. Так, у животного № 21 в развернутой стадии болезни брали кровь три раза с интервалом 1,5—2 мес и в лимфоцитах определяли протеолитическую активность. Результаты исследования приведены на рис. 2. В этом случае наблюдается явный рост казеинолити-

ческой активности при pH 7,4 по мере нарастания лейкоцитоза в крови (от 123 000 до 181 000). Этот результат свидетельствует о важности исследований такого рода, когда нивелируются индивидуальные различия в уровнях активности ферментов и выявляется эффект, характеризующий развитие самого патологического процесса. Надо отметить, что и в ряде других случаев ХЛЛ высокий лейкоцитоз сопровождался высокими величинами протеолитической активности. В частности, максимальное значение активности при pH 4,0 наблюдалось у животного № 16 с лейкоцитозом 156 800.

Для выявления спектра протеолитических ферментов, представленных в лизатах лимфоцитов в норме и при ХЛЛ, исследовали влияние на протеолитическую активность лизатов ряда активаторов и ингибиторов различных классов протеиназ (рис. 3). Обнаружено, что пепстатин — специфический ингибитор карбоксильных протеназ — полностью подавляет протеолитическую активность при pH 4,0 в лизатах лейкоцитов здоровых животных (из 6 изученных исключение составляет только одно животное, у которого при нормальном уровне лейкоцитов в крови обнаруживалась 26 % активность, не ингибируемая пепстатином, — животное № 7). При ХЛЛ, наоборот, во всех опытах (n=6), кроме одного (животное № 24), обнаруживалось неполное (на 50—80 %)

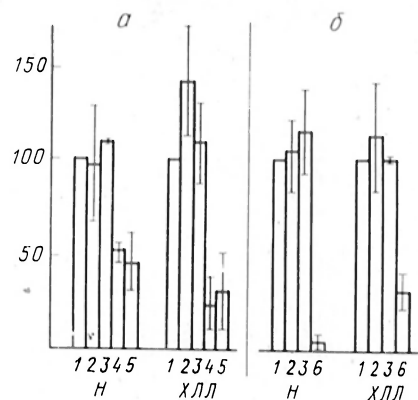


Рис. 3. Влияние активаторов и ингибиторов на активность протеназ в лизатах лимфоцитов в норме (Н) и при ХЛЛ.

а — pH 7,4; б — pH 4,0. 1 — без добавок (исходная активность); 2 — ДТТ+ЭДТА; 3 — ЭДТА; 4 — ФМСФ; 5 — п-ХМБ; 6 — пепстатин. Вертикальными отрезками обозначена стандартная ошибка средней арифметической.



торможение пепстатином активности в кислой среде.

Присутствие ДТТ и ЭДТА, вызывающих активацию тиоловых протеиназ, практически не сказывалось на протеолитической активности в кислой среде лизатов лимфоцитов в норме. При ХЛЛ в 7 случаях активация также не наблюдалась (80—90 % исходной активности), а у 4 животных активность возрастала до 125, 147, 154 и 163 % исходной (животные № 16, 21, 19 и 20 соответственно). Три из этих случаев сопровождались высоким лейкоцитозом. К этому можно добавить, что остаточная активность при ХЛЛ, не тормозимая пепстатином, полностью ингибируется п-ХМБ — ингибитором тиоловых протеиназ (2 опыта).

Полученные данные указывают, что в норме практически вся активность при pH 4,0 обусловлена катепсином D, тогда как при ХЛЛ в лимфоцитах проявляется активность тиоловых протеиназ.

При ХЛЛ активирующее влияние ДТТ и ЭДТА оказалось гораздо более выраженным при исследовании активности в нейтральной среде (pH 7,4): активация имела место во всех опытах и достигала в некоторых случаях 200 % и более. В тех же условиях в норме были выделены 2 группы животных, в одной из которых ( $n=7$ ) действие ДТТ и ЭДТА сводилось к некоторой инактивации протеиназ (80—96 % исходной активности, в двух опытах до 50 %), а в другой ( $n=3$ ) — к активации до 133, 152 и 164 % исходной (животные № 1, 2 и 4). Следует отметить, что при ХЛЛ особенно сильная активация ферментов ДТТ и ЭДТА при pH 7,4 отмечена у тех же животных, у которых происходит активация и при pH 4,0. Это может свидетельствовать о присутствии при ХЛЛ тиоловой протеиназы, активность которой выявляется как в кислой, так и в нейтральной среде.

При действии на лизаты ФМСФ, угнетающего активность протеиназ серинового типа, и п-ХМБ, тормозящего тиоловые протеиназы, обнаружено (см. рис. 3), что в норме эти ингибиторы вызывают соответственно 50—60 и 30—70 % торможение активности при pH 7,4.

При ХЛЛ как ФМСФ, так и п-ХМБ угнетают протеолитическую актив-

ность в лизатах лимфоцитов (pH 7,4) в большей степени, чем в норме, и под действием каждого из них в ряде опытов достигается 60—100 % торможение. Это позволяет заключить, что при ХЛЛ в лимфоцитах содержится фермент (или ферменты), чувствительный к действию как ФМСФ, так и п-ХМБ.

Полученные данные о характере влияния активаторов и ингибиторов на активность протеолитических ферментов указывают на существование заметных различий как в активности, так и в наборе ферментов в лимфоцитах в норме и при ХЛЛ. В частности, отмечается повышенная активность тиоловых протеиназ при ХЛЛ. Обусловлено ли регистрируемое увеличение активности протеиназ повышенным синтезом какого-то определенного фермента (или ферментов) или оно связано с нарушением баланса между ингибитором и протеиназой, пока не известно, и для выяснения этого вопроса нужны дальнейшие исследования.

В связи с полученными данными следует отметить, что в трансформированных онкогенными вирусами клетках и во многих видах опухолей синтезируются и секретируются в среду некоторые протеиназы, отсутствующие в норме [8, 23, 26]. Среди таких ферментов отмечается и тиоловая протеиназа, подобная катепсину В [23, 26]. Такого рода фермент может быть ответственным и за обнаруженное нами увеличение тиолзависимой протеолитической активности.

Отмеченные различия в спектре протеолитических ферментов в лимфоцитах в норме и при ХЛЛ могут быть обусловлены как различным составом популяции лимфоцитов, так и измененными характеристиками процессов обмена В-клеток при ХЛЛ [10, 18, 21]. С этими же двумя факторами могут быть связаны и обнаруженные различия в содержании белка в лимфоцитах здоровых и больных ХЛЛ животных. В пользу первого свидетельствует существенное различие в содержании белка в Т- и В-лимфоцитах у человека [21]. Что касается особенностей В-клеток при ХЛЛ, то у больных ХЛЛ выявлено снижение как содержания рибосом в лимфоцитах (в среднем в 2 раза), так и скорости синтеза белка [5]. При этом скорость деградации суммарного белка в лимфоцитах человека при ХЛЛ практиче-

ски не отличается от таковой в норме [25].

В связи с вышесказанным представляется важным провести определение белка и активности протеолитических ферментов отдельно во фракциях Т- и В-лимфоцитов. Это даст возможность ответить на вопрос о количественных и качественных изменениях в спектре протеолитических ферментов в В-клетках при ХЛЛ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Баррет А. Д., Хит М. Ф. — В кн.: Лизосомы. Методы исследования / Под ред. Д. Дингл. Пер. с англ. М., 1980, с. 25.
2. Бергольц В. М., Румянцев Н. В. Сравнительная патология и этнология лейкоза человека и животных. М., 1966.
3. Кузнецова Н. В., Алещенко А. В., Семенова Л. П. и др. — Сельхоз. биол., 1976, т. 11, с. 126—130.
4. Лимфоциты: выделение, фракционирование и характеристика / Под ред. Дж. Б. Натвига и др. Пер. с англ. М., 1980, с. 9—12.
5. Морозова Е. О., Блинов М. Н. — Вопр. мед. химии, 1984, № 5, с. 123—127.
6. Böhm F. D., Schmidt H. E., Schön R. — Acta biol. med. germ., 1982.
7. Burnett D., Crocker J., Vaughan A. T. M. — J. Cell. Physiol., 1983, vol. 115, p. 249—254.
8. Danø K., Reich E. — J. exp. Med., 1978, vol. 147, p. 745—747.
9. Dörmer P., Thentl H., Zan B. — Leukemia Res., 1983, vol. 7, p. 1—10.
10. Eng Gan T., Hallam L., Van Der Weyden M. B. — Ibid., 1982, vol. 6, p. 839—844.
11. Feller A., Parwaresch M., Lennert K. — Cancer (Philad.), 1983, vol. 52, p. 1609—1612.
12. Fiszer-Szafarz B., Szafarz D. — Analyt. Biochem., 1984, vol. 138, p. 255—258.
13. Girard J. P., Fernandes B. — Europ. J. clin. Invest., 1976, vol. 6, p. 347—353.
14. Halper J. P., Tolidjian B., Knowles D. M. — Cell. Immunol., 1982, vol. 72, p. 367—374.
15. Hatcher V. B., Wertheim M. S., Rhee C. Y. et al. — Biochim. biophys. Acta, 1976, vol. 451, p. 499—510.
16. Kelly G., Alurphy R., Bridges J., Elmore D. — Clin. chim. Acta, 1984, vol. 139, p. 107—110.
17. Kirschke H., Wood L., Roisen F., Bird J. — Biochem. J., 1983, vol. 214, p. 871—877.
18. Kraaijenhagen R. J., Schipper-Kester G. P. M., Rijkse G. et al. — Clin. chim. Acta, 1982, vol. 118, p. 255—263.
19. van Laarhoven J. P., de Gast G. C., Spierenburg G. T., de Bruyn C. — Leukemia Res., 1983, vol. 7, p. 261—267.
20. Larson R. A., Yachnin S. — J. clin. Invest., 1983, vol. 72, p. 1268—1276.

21. Lombardo A., Goi G., Gambacorti C. et al. — Clin. chim. Acta, 1983, vol. 137, p. 67—75.
22. Pitts J. D., Scott G. K. — Biosci. Rep., 1983, vol. 3, p. 47—53.
23. Poole A. R., Recklies A. D., Mort J. S. — In: Proteinase and Tumor Invasion / Ed. P. Strauli et al. New York, 1980, p. 81—95.
24. Pulkrabek P., Jones R. E., Goldfeder A., Grunberger D. — Cancer Lett., 1980, vol. 11, p. 103—111.
25. Seglen P. O., Munthe-Kaas A. C., Dybedal M. A. S. — Exp. Cell. Res., 1984, vol. 155, p. 121—128.
26. Sloane B. F., Honn K. V. — Cancer Metast. Rev., 1984, vol. 3, p. 249—263.
27. Zipf T. F., Lauzon G. J., Longenecker B. M. — J. Immunol., 1983, vol. 131, p. 3064—3072.

Поступила 27.05.85

#### CHARACTERISTICS OF LYMPHOCYTE PROTEOLYTIC ENZYMES IN NORMAL STATE AND IN CHRONIC LYMPHOLEUKOSIS

N. M. Gevorgyan, L. A. Lokshina, N. V. Nikolaeva, B. Z. Itkin

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

Proteolytic activity was estimated in lymphocyte lysates of cattle in normal state and in chronic lympholeukosis using  $^3\text{H}$ -acetylated casein (pH 7.4) and  $^3\text{H}$ -acetylated hemoglobin (pH 4.0) as substrates. Distinct individual variations in the enzymatic activity were observed either in neutral or slightly-acid media in the animal groups studied. In chronic lympholeukosis specific proteolytic activity, calculated per a cell, was decreased, while it was increased in calculation per a mg of protein. The lower content of protein (about 2.4-fold) was found in lysates of lymphocytes in chronic lympholeukosis as compared with normal state. An increase in proteolytic activity in lymphocyte lysates correlated with elevation of blood leukocytosis if chronic lympholeukosis developed in individual animals. Effects of a number of proteinase inhibitors and activators were studied in the cell lysates; the spectrum of proteinases in chronic lympholeukosis was dissimilar to that of normal state. Pepstatin inhibited quite completely the proteolytic activity at pH 4.0 in lymphocytes of healthy animals and hence cathepsin D was responsible for the activity; in chronic lympholeukosis, except of cathepsin D, thiol-dependent proteinase was also detected. Activity of proteinases at neutral pH value in lymphocytes of healthy and impaired animals was inhibited by phenylmethionine fluorosulfate and p-chloromercuribenzoate, thus suggesting that serine and thiol-dependent proteinases were present; the level of these enzymes was distinctly higher in chronic lympholeukosis as compared with normal state.

О. Э. Волковицкая, П. Г. Бочев, С. Р. Рибаров,  
В. З. Горкин, В. Е. Каган

## ИССЛЕДОВАНИЕ МОНОАМИНОКСИДАЗЫ МИТОХОНДРИЙ ПЛАЦЕНТЫ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва; Медицинский институт Плевен, Высший институт физиологии АН НРБ, София

В настоящее время не вызывает сомнения тот факт, что нарушение обмена биогенных аминов сопровождается многими патологическими процессами у человека, в частности злокачественный карциноид, гипертоническую болезнь, болезнь Паркинсона [2], преждевременное прерывание беременности [1]. Одним из основных ферментов, принимающих участие в обмене биогенных аминов, является митохондриальная моноаминоксидаза [амин: кислород оксидоредуктаза, дезаминирующая, флавиносодержащая КФ.1.4.3.4 (MAO)].

Важность роли MAO в обмене биогенных аминов и возникающая в связи с этим необходимость определения моноаминоксидазной активности в клинике требует наличия в арсенале биохимиков эффективных методов, позволяющих исследовать активность MAO с использованием различных субстратов.

В настоящее время наиболее широко применяют радиометрические методы, позволяющие определить образующийся в ходе моноаминоксидазной реакции альдегид [12]. Эти методы, будучи высокочувствительными, обладают рядом недостатков. Прежде всего они не являются кинетическими, т. е. требуют остановки реакции после инкубации с субстратом перед измерением; во-вторых, необходимо наличие меченых субстратов и приборов для регистрации радиоактивности.

В практике клинко-биохимических исследований часто используются методы регистрации начальной скорости и кинетики реакции окисления аминов [2, 12].

В последние годы для исследования различных оксидазных реакций начали применять методы, основанные на хемилюминесцентном определении перекиси водорода в реакции с люминолом. Эти методы обладают не меньшей чувствительностью, чем радиометрические, но позволяют регистриро-

вать процесс непрерывно, количественно оценивая начальную скорость реакции по образованию перекиси водорода [10].

Целью настоящей работы было исследование возможности использования хемилюминесцентного метода для изучения свойств MAO на примере MAO митохондрий плаценты человека.

### Методика

Исследовали MAO митохондрий плаценты человека. Плаценты получали при нормальных своевременных родах в родильном доме № 6 Москвы и использовали для выделения митохондрий не более чем через 12 ч после родов. Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования 30 % гомогената ткани в изотоническом растворе сахарозы (0,25 М) с ЭДТА ( $5 \cdot 10^{-4}$  М), приготовленном на К-фосфатном буфере pH 7,4 ( $10^{-2}$  М) с последующей двукратной промывкой той же средой.

Активность MAO определяли тремя независимыми методами: колориметрически с реактивом Несслера по основному аммиака в пробах с серотонином, тирамином или 2-фенилэтиламином (2-ФЭА) в качестве субстратов [2, 4] (в ряде опытов в систему вместо субстратов MAO вносили диамины — кадаверин); спектрофотометрически по образованию бензальдегида в пробах с бензиламином в качестве субстрата [3, 9], а также хемилюминесцентным методом с 2-ФЭА, бензиламином или кадаверином [10]. Регистрацию хемилюминесценции осуществляли на хемилюминесцентной установке с фотоэлектронным умножителем 9635 QB EMI в режиме регистрации тока.

Среда для регистрации хемилюминесценции содержала К, Na-фосфатный буфер pH 7,4 ( $10^{-2}$  М), суспензию митохондрий (0,5 мг/мл), пероксидазу из хрена (1,25 ед/мл), люминол ( $10^{-4}$  М), субстрат (концентрации указаны в тексте) и при необходимости ингибиторы MAO (концентрации указаны в тексте); общий объем пробы составлял 3,3 мл.

В работе использовали люминол (5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталязиндион) фирмы "Koch — Light" Laboratories Ltd., пероксидазу из хрена (25 ед/мг) фирмы "Reanal", хлоргидрин был предоставлен фирмой "May & Baker" (Англия), депренил предоставлен проф. Kpoll (Венгрия), все остальные реактивы были отечественного производства.

Белок определяли по Lowry и соавт. [8].

Таблица 1

Субстратная специфичность МАО плаценты человека, определенная колориметрическим (К) и спектрофотометрическим (С) методами

Субстрат	Насыщающая концентрация, мМ	Метод определения	Удельная активность, нмоль продукта на 1 мг в 1 мин
2-ФЭА	0,1	К	8,25
Серотонин	0,1	К	26,99
Тирамин	0,1	К	28,41
Бензиламин	1,0	С	0,79
Кадаверин	Нет	К	0

Примечание. Исследования проводили при pH 8,1.

### Результаты и обсуждение

В тканях млекопитающих МАО является мембраносвязанным ферментом, локализованным в мембране митохондрий. По субстратной специфичности и чувствительности к ацетиленовым ингибиторам (хлоргиллину и депренилу) различают два типа МАО: А и Б [7].

В плаценте человека МАО представлена несколькими множественными формами: в основном типом А и в незначительном количестве типами Б и Б' [5]. Последний тип МАО обладает субстратной специфичностью типа Б, но отличается равной чувствительностью к специфическим ингибиторам обоих типов МАО. Плацентарная МАО типа А в отличие от МАО типа А из других источников обладает высоким сродством к 2-ФЭА —

классическому субстрату МАО типа Б [11].

На первом этапе работы были сопоставлены величины, характеризующие ферментативное окисление 2-ФЭА ( $5 \cdot 10^{-5}$  М), бензиламина ( $10^{-3}$  М), кадаверина ( $10^{-3}$  М) как в сопряженной люминол-пероксидазной системе (рис. 1), так и независимыми методами (табл. 1). Хемилюминесцентный ответ регистрируется в виде кривой с максимумом. Быстрая фаза соответствует начальной скорости реакции, а наличие максимума и снижение интенсивности хемилюминесценции обусловлено расходом  $H_2O_2$  в ходе окисления люминола при участии пероксидазы.

Амплитуда хемилюминесценции при моноаминоксидазном окислении 2-ФЭА значительно выше, чем при дезаминировании бензиламина, и полностью отсутствует в пробах с кадаверином. Это хорошо согласуется с данными табл. 1, где представлены удельные активности МАО при дезаминировании различных субстратов, определенные колориметрическим и спектрофотометрическим методами. Все эти данные также согласуются с литературными [5, 11].

На рис. 2 представлена зависимость интенсивности хемилюминесцентного ответа от pH среды проведения моноаминоксидазной реакции. Как видно, максимальная амплитуда хемилюминесценции получена при pH 8,4. Известно [5], что митохондриальная МАО плаценты человека имеет оптимальный pH 8,1. Несмотря на это, все другие измерения проводили при pH

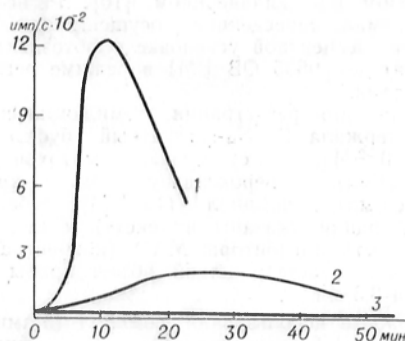


Рис. 1. Типичная кривая хемилюминесцентного ответа при исследовании ферментативного окисления различных субстратов.

Здесь и на рис. 2 по оси абсцисс — время реакции (в мин); по оси ординат — амплитуда хемилюминесценции (в имп/с ·  $10^{-2}$ ). 1 — 2-ФЭА ( $5 \cdot 10^{-5}$  М); 2 — бензиламин ( $10^{-3}$  М); 3 — кадаверин ( $10^{-3}$  М).

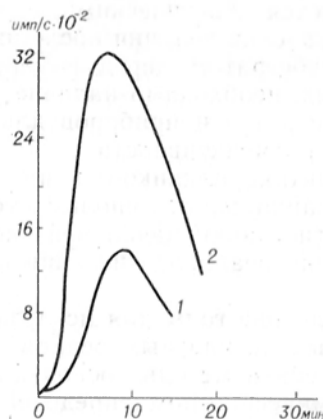


Рис. 2. Зависимость амплитуды хемилюминесценции от pH, субстрат — 2-ФЭА ( $5 \cdot 10^{-5}$  М). 1 — pH 7,4; 2 — pH 8,4.

Таблица 2  
Влияние избирательных ингибиторов МАО типов  
А и Б на дезаминирование 2-ФЭА

Ингибитор	Концентрация ингибитора, мкМ	Ингибирование дезаминирования 2-ФЭА, %
Депренил	10	90
	0,5	49
Хлоргилин	0,1	100
	0,01	46

Примечание. В пробах содержание митохондрий составляло 0,5 мг/мл, конечная концентрация 2-ФЭА —  $5 \cdot 10^{-5}$  М; инкубация с ингибитором 10 мин при 37°C; pH 7,4.

7,4. Это связано с тем, что пероксидаза имеет оптимальный pH в нейтральной области, а квантовый выход свечения люминола возрастает при значительном сдвиге в сторону увеличения pH [6].

В результате определения зависимости скорости моноаминоксидазной реакции от концентрации 2-ФЭА хемилюминесцентным методом установлено, что скорость дезаминирования возрастает при увеличении концентрации субстрата, следуя обычной кинетике Михаэлиса — Ментен; насыщение наступает при концентрации 2-ФЭА выше  $10^{-4}$  М.

Прямая пропорциональность между увеличением начальной скорости реакции окисления 2-ФЭА и содержанием в пробах белка митохондрий была отмечена в интервале от 0,3 до 1 мг/мл.

В табл. 2 представлены данные ингибиторного анализа митохондриальной МАО плаценты человека, полученные хемилюминесцентным методом. Из табл. 2 видно, что плацентарная МАО значительно более чувствительна к хлоргилину — избирательному ингибитору МАО типа А, чем к депренилу — избирательному ингибитору МАО типа Б; концентрация хлоргилина, при которой достигается ингибирование окисления 2-ФЭА на 50 %, в 500 раз меньше, чем концентрация депренила.

Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о возможности определения моноаминоксидазной активности в сопряженной люминол-пероксидазной системе хемилюминесцентным методом. Метод позволяет регистрировать кинетику процесса, а также с высокой точностью (ошибка не превышает 3 %) и чувствительностью (не менее  $10^{-9}$  М  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) изме-

рять начальную скорость окисления аминов. Недостатком метода является тот факт, что некоторые субстраты и продукты моноаминоксидазной реакции могут влиять на развитие хемилюминесцентного ответа, выступая в качестве тушителей или активаторов люминесценции. В условиях наших опытов, однако, данные, полученные хемилюминесцентным методом, были полностью адекватны результатам исследований с применением других методов определения моноаминоксидазной активности.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Булиенко С. Д., Степанковская Г. К., Фогел П. И. Недонашивание и перенашивание беременности. Киев, 1982.
2. Горкин В. З. Амниоксидазы и их значение в медицине. М., 1981.
3. Киркель А. З., Романюк Ю. П., Давыдова Г. А. и др. — *Вопр. мед. химии*, 1985, № 6, с. 123.
4. Львов Н. П. — В кн.: Методы современной биохимии / Под ред. В. Л. Кретович, К. Ф. Шольц. М., 1975, с. 58.
5. Пеккель В. А., Киркель А. З. — *Биохимия*, 1985, № 2, с. 289.
6. Freeman T. M., Seitz W. R. — *Analyt. Chem.*, 1978, vol. 50, p. 1242.
7. Johnston J. P. — *Biochem. Pharmacol.*, 1968, vol. 17, p. 1285.
8. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. — *J. biol. Chem.*, 1951, vol. 193, p. 265.
9. McEwen C. M., Cohen J. O. — *J. Lab. clin. Med.*, 1963, vol. 62, p. 766.
10. Ribarov S. R., Bochev P. G. — *J. biochem. biophys. Meth.*, 1983, vol. 8, p. 205.
11. Suzuki O., Katsumata Y., Oya M. — In: *Monoamine Oxidase. Basic and Clinical Frontiers* / Ed. K. Kamijo et al. Amsterdam, 1982, p. 74.
12. Tipton K. F., Youdim M. B. H. — In: *Methods in Biogenic Amine Research* / Ed. S. Parvez et al. Amsterdam, 1983, p. 441.

Поступила 29.05.85

#### STUDIES ON MONOAMINE OXIDASE FROM HUMAN PLACENTA MITOCHONDRIA USING THE CHEMILUMINESCENCE TECHNIQUE

O. E. Volkovitskaya, P. G. Bochev, S. R. Ribarov, V. Z. Gorkin, V. E. Kagan

The activity of monoamine oxidase from human placenta mitochondria was determined with 2-phenylethylamine and benzylamine as substrates by the generation of hydrogen peroxide in a conjugated luminol-peroxidase system, using the chemiluminescence method. The monoamine oxidase was found to oxidize at a high rate MAO substrates and revealed high sensitivity to clorgyline, a specific inhibitor of monoamine oxidase type A. It was shown that the use of the chemiluminescence technique for determining the monoamine oxidase activity gives the results that are fully consistent with those obtained by other methods.



Н. Л. Жукова, Л. Е. Гедымин, В. И. Голышевская

# СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АКТИВНОСТИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ И ИХ ИНГИБИТОРОВ В ЛЕГОЧНОЙ ТКАНИ МОРСКИХ СВИНОК ПРИ РАЗВИТИИ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОГО И ДЕСТРУКТИВНОГО ТУБЕРКУЛЕЗА

Центральный НИИ туберкулеза Минздрава СССР, Москва

На любое повреждение тканей организм отвечает комплексом гуморальных и клеточных реакций, важным компонентом которых является высвобождение лизосомальных ферментов и прежде всего протеиназ из активированных фагоцитирующих клеток. Протеиназы полиморфно-ядерных лейкоцитов (ПЯЛ) и альвеолярных макрофагов (АМ) в легких обеспечивают внутриклеточное переваривание фагоцитированного материала, в том числе патогенных микроорганизмов. Вместе с тем активированные ПЯЛ и АМ высвобождают протеиназы во внеклеточную среду, где эти ферменты индуцируют физиологические реакции ограниченного протеолиза, но при отсутствии контроля способны обусловить деструкцию всех основных структурных компонентов легочной ткани [1, 5, 6].

Фагоцитирующие клетки содержат полный набор протеолитических ферментов [8, 9]. При попадании во внеклеточное пространство наибольшую активность обнаруживают нейтральные протеиназы и прежде всего эластаза, которая разрушает эластический каркас легкого и оказывает выраженное повреждающее действие на коллаген, протеогликаны, базальные мембраны, апопротейн сурфактанта [5, 9]. Высокой агрессивностью обладает катепсин D-лизосомальная кислая карбоксипроотеиназа, разрушающая протеогликаны [12].

Физиологический контроль активности лизосомных протеиназ обеспечивается системой их ингибиторов, из которых главными являются  $\alpha_1$ -протеиназный ингибитор ( $\alpha_1$ -ПИ) и  $\alpha_2$ -макроглобулин ( $\alpha_2$ -МГ).

$\alpha_1$ -ПИ является главным ингибитором сериновых протеиназ, а  $\alpha_2$ -МГ блокирует активность всех классов протеолитических ферментов [6, 9, 11]. Баланс между активностью протеолитических ферментов и эффективностью их ингибиторов в конечном итоге оп-

ределяет развитие и исход локального патологического процесса.

## Методика

Для решения задач, связанных с оценкой роли протеолитических ферментов и их ингибиторов в легочной ткани при развитии туберкулезного воспаления, было поставлено 2 серии экспериментов.

В 1 серии создавали модель генерализованного туберкулеза подкожным введением 0,0001 мг 3-недельной культуры микобактерии туберкулеза (МБТ) H<sub>37</sub>RV. В эксперименте было использовано 36 самок морских свинок массой 150—180 г, которые были разделены на 3 группы. 1-ю группу составили 14 животных со спонтанным развитием экспериментального туберкулеза, 2-ю — 10 животных, которых через месяц после заражения начинали лечить рифампицином (10 мг/кг) и изониазидом (10 мг/кг). Препараты вводили *per os* ежедневно, кроме суббот и воскресений. В 3-ю группу вошло 12 контрольных животных. Животных умерщвляли через 1 мес после заражения (1-я и 3-я группы) и через 2 и 3 мес (1—3-я группы).

Во II серии создавали модель деструктивного туберкулеза легких [3]. Животным проводили вакцинацию подкожным введением культуры БЦЖ в дозе 0,1 мг. Через 1,5 мес после проведения туберкулиновой пробы (внутрикожное введение 0,01 мл альтотуберкулина в разведении 1:10) и получения положительной реакции в виде папулы 15—17 мм в нижнюю долю правого легкого вводили 1 мг 3-недельной культуры МБТ H<sub>37</sub>RV в 0,3 мл вазелин-лаволиновой взвеси. В эксперименте было использовано 30 животных. Эксперимент проводили летом. Морские свинки были значительно крупнее, чем в первом опыте (500—700 г) и контрольные показатели у них отличались от вышеописанных. Все животные были разделены на 3 группы: 1-ю группу составили 9 морских свинок со спонтанным течением деструктивного туберкулеза, 2-ю — 6 животных, которых через 1,5 мес после заражения начинали лечить тубазидом и рифампицином по вышеприведенной схеме, 3-ю — 15 здоровых особей (контроль).

Животных умерщвляли через 1,5 мес (1-я и 3-я группы) и через 3 мес после заражения (1—3-я группы). Для морских свинок 2-й группы этот срок соответствовал 1,5 мес лечения.

В обеих сериях экспериментов материал для исследования получали под тиопентал-натриевым наркозом (50 мг внутривенно). После наступления анестезии вскрывали грудную клетку, перерезали брюшную аорту



и проводили перфузию легкого подогретым до 37°C физиологическим раствором через правый желудочек под давлением. Левое легкое выделяли *in situ* и немедленно замораживали в жидком азоте. Правое легкое использовали для гистологического исследования. Замороженную ткань легкого растирали в фарфоровой ступке и переносили в предварительно взвешенные пробирки. Экстракцию проводили физиологическим раствором в соотношении 0,25 г ткани на 1 мл физиологического раствора в течение 18—20 ч при 4°C. Пробы центрифугировали 20 мин при 7000 об/мин, для исследований использовали надосадочную жидкость.

Общее содержание белка определяли по Лоури, эластолитическую активность (ЭА) — с использованием в качестве субстрата паранитрофенилового эфира N-терт-бутилоксикарбонил-L-аланина [12], активность катепсина D измеряли по расщеплению гемоглобина в присутствии пепстатина [11], активность катепсина В — по отношению к синтетическому субстрату N- $\alpha$ -бензоил-DL-аргинина пара-нитроанилиду [4], антитриптическую активность (АТА) — по способности экстракта тормозить N- $\alpha$ -бензоил-L-аргинина этиловый эфир (БАЭЭ) — эстеразную активность трипсина [2]. Результаты пересчитывали на 1 г влажной ткани.

## Результаты и обсуждение

В I серии у животных со спонтанным течением туберкулеза (1-я группа) через месяц после заражения гистологически обнаруживали изменения неспецифического характера: вокруг сосудов и бронхов имелись лимфоидные скопления и инфильтраты, капиллярная сеть была полнокровной, меж-

альвеолярные перегородки утолщены за счет лимфоидной инфильтрации. В большом количестве выявляли гистиоцитарные элементы, образующие сплошные безвоздушные участки. Специфических изменений к этому сроку не было, что можно, по-видимому, объяснить недостаточной вирулентностью использованной культуры. Через 2 мес после заражения в легочной ткани появились туберкулезные очаги, состоявшие из эпителиоидных клеток и лимфоидных элементов (рис. 1, см, вклейку). К исходу 3-го месяца они становились более многочисленными, крупными и местами приобретали сплошной характер. В центре таких очагов появлялся казеозный некроз, обнаруживалось множество распадающихся нейтрофилов. В межальвеолярных перегородках определялась нейтрофильная инфильтрация.

При постепенном развитии туберкулезных изменений в легких отмечали значительное увеличение содержания растворимого белка (табл. 1), что, очевидно, обусловлено повышением сосудистой проницаемости и переходом альбумина в ткани. Одновременно происходило перемещение в легкие и  $\alpha_1$ -ПИ, обладающего близкой молекулярной массой, за счет чего возрастала и АТА. Вероятно, высоким уровнем АТА можно объяснить отсутствие повышения ЭА при наличии ней-

Таблица 1

Активность протеолитических ферментов в гомогенатах обескровленной легочной ткани морских свинок на разных этапах развития генерализованного туберкулеза и при лечении рифампицином в комбинации с изониазидом

Группа животных	Число животных	Белок, мг на 1 г влажной ткани	ЭА, нмоль на 1 г влажной ткани	Катепсин D ед. опт. пл. на 1 г влажной ткани	Катепсин В, нмоль на 1 г влажной ткани	АТА	
						МИЕ на 1 г влажной ткани	МИЕ на 1 мг белка
Контроль	12	16,92 $\pm$ 1,08	364,0 $\pm$ 60,9	10,3 $\pm$ 0,84	8,9 $\pm$ 1,0	1089 $\pm$ 160	60,7 $\pm$ 7,3
Животные со спонтанным течением туберкулеза:							
1 мес	6	25,6 $\pm$ 2,16 $P < 0,01$	230,1 $\pm$ 34,7	11,4 $\pm$ 1,88	8,2 $\pm$ 0,5	1301 $\pm$ 144	50,8 $\pm$ 4,1
2 мес	5	26,5 $\pm$ 3,8 $P < 0,05$	269,1 $\pm$ 24,0	23,0 $\pm$ 1,79 $P < 0,01$	8,5 $\pm$ 0,5	2607 $\pm$ 64,5 $P < 0,01$	107,5 $\pm$ 22,0 $P < 0,1$
3 мес	3	32,3 $\pm$ 5,7 $P < 0,05$	451,3 $\pm$ 224,6	18,3 $\pm$ 2,98 $P < 0,05$	8,8 $\pm$ 0,96	4077 $\pm$ 1643	156,2 $\pm$ 90,4
Животные, получавшие лечение:							
2 мес	5	26,9 $\pm$ 5,56	290,0 $\pm$ 58,4	23,5 $\pm$ 2,9 $P < 0,01$	9,1 $\pm$ 0,9	2430 $\pm$ 469 $P < 0,02$	108,6 $\pm$ 14,4 $P < 0,01$
3 мес	5	30,9 $\pm$ 3,88 $P < 0,01$	431,6 $\pm$ 110	13,7 $\pm$ 2,58	9,18 $\pm$ 1,22	3909 $\pm$ 607 $P < 0,01$	133,4 $\pm$ 9,2 $P < 0,01$

Примечание. Сроки указаны с момента заражения. 1 МИЕ тормозит гидролиз 1 нмоля субстрата.  $P$  — достоверность различий по сравнению с контролем.

трофильной инфильтрации и большого числа распадающихся нейтрофилов, поскольку  $\alpha_1$ -ПИ является мощным ингибитором нейтрофильной эластазы. Развитию туберкулезного воспаления с последующей деструкцией сопутствовало закономерное увеличение активности катепсина D, по отношению к которому  $\alpha_1$ -ПИ малоактивен. Тенденция к увеличению активности эластазы на 3-м месяце течения туберкулеза, возможно, была обусловлена увеличением активности макрофагального фермента, на который не действует  $\alpha_1$ -ПИ.

При лечении животных антибактериальными препаратами (2-я группа) уже через месяц сформированные туберкулезные очаги в легочной ткани не определялись, нейтрофильная реакция отсутствовала. Легочная ткань была воздушна, но значительная часть альвеолярных перегородок инфильтрирована лимфоидными элементами. В просвете альвеол обнаруживалось большое число АМ (см. рис. 1). Капиллярная сеть была расширена, а проницаемость сосудов оказалась выше, чем у нелеченых животных (при данном сроке наблюдения). Сходная гистологическая картина выявлялась и по истечении 2 мес терапии. Однако АМ по размерам были несколько меньше, чем при предыдущем сроке исследования. Несмотря на отчетливый положительный эффект антибактериальной терапии, биохимические сдвиги соответствовали таковым у нелеченых животных. Содержание растворимого белка в легочной ткани было повышено (см. табл. 1). Соответственно более чем вдвое возрастал показатель АТА. Сохранялась высокая активность катепсина D, что можно объяснить выраженной активацией АМ с высвобождением ими большого числа лизосомальных ферментов.

Через 2 мес терапии активность катепсина D нормализовалась, что сочеталось с уменьшением размеров и, по-видимому, степени активации АМ. Гистологически регистрируемому повышению сосудистой проницаемости соответствовали высокое содержание растворимого белка в тканях и высокий уровень антипротеолитической защиты.

Во II серии на модели деструктивного туберкулеза развитие процесса характеризовалось значительно более

бурным течением. Через 1,5 мес после заражения у всех животных в правом легком сформировался крупный очаг казеозного поражения, у некоторых из них с распадом. Стенки каверны плохо сформированные были представлены широкой зоной грануляционной ткани с обильной нейтрофильной инфильтрацией (рис. 2, см. вклейку). В зоне специфического воспаления многие сосуды облитерировались за счет продуктивного васкулита, а в окружности фокуса сосудистая сеть была расширенной и полнокровной. Коллагеновые волокна, выявляемые в участках формирования фиброза, были тонкими, располагались рыхло. Между ними обнаруживалось множество лимфоидных скоплений и участков специфического воспаления, большое количество фибробластов и фиброцитов. Через 3 мес после заражения отмечалось отграничение участка специфической пневмонии. Казеозный фокус становился значительно крупнее, с хорошо сформированными стенками каверн, однако на внутренней поверхности каверны выявлялись массивные казеозно-некротические массы, пропитанные распадающимися нейтрофилами. Грануляционный слой стал тоньше (частично за счет казеификации). По периферии фокуса отмечались массивные, компактные, четко очерченные пучки коллагеновых волокон. Межальвеолярные перегородки значительно утолщались за счет коллагенизации и лимфоидной инфильтрации.

Результаты биохимических исследований (табл. 2) показывают, что значительная часть изменений (увеличение содержания растворимого белка, абсолютной и удельной величины АТА, активности катепсина D) повторяла динамику аналогичных явлений при генерализованном туберкулезе через 2 мес после заражения. Принципиальным отличием в группе с деструктивным туберкулезом являлось двукратное увеличение ЭА. Через 3 мес после заражения на фоне аналогичных изменений достоверно возросла и активность катепсина В. Учитывая, что это явление не было характерно для генерализованного прогрессирующего туберкулеза и что катепсин В обладает свойствами разрушать спиральную структуру коллагена, можно полагать, что увеличение активности катепсина В, являясь мар-

Активность протеолитических ферментов в гомогенатах обескровленной легочной ткани морских свинок на разных этапах развития деструктивного туберкулеза и при лечении сочетанием рифампицина с изониазидом

Группа животных	Число животных	Белок, мг на 1 г влажной ткани	ЭА, нмоль на 1 г влажной ткани	Катепсин D, ед. опт. пл. на 1 г влажной ткани	Катепсин В, нмоль на 1 г влажной ткани	Сумма тноловых протеиназ, ед. опт. пл. на 1 г влажной ткани	АТА	
							МИЕ на 1 г влажной ткани	МИЕ на 1 мг белка
Контроль	15	39,2 ± 2,5	387,9 ± 37,6	18,6 ± 1,2	5,96 ± 0,75	17,3 ± 0,66	2371 ± 294	60,5 ± 7,5
Спонтанное течение туберкулеза:								
1,5 мес	4	48,4 ± 2,3 $P_1 < 0,02$	775,2 ± 95,0 $P_1 < 0,01$	29,4 ± 2,83 $P_1 < 0,01$	6,5 ± 0,87	18,2 ± 1,1	6716 ± 372 $P_1 < 0,01$	138,8 ± 7,7 $P_1 < 0,01$
3 мес	5	56,0 ± 3,5 $P_1 < 0,01$	545,0 ± 59,1 $P_1 < 0,01$	33,9 ± 2,62 $P_1 < 0,01$	8,86 ± 1,12 $P_1 < 0,05$	19,3 ± 2,5	4368 ± 488 $P_1 < 0,01$ $P_2 < 0,01$	78,0 ± 8,7 $P_2 < 0,01$
Лечение	6	60,0 ± 2,2 $P_1 < 0,01$	605,7 ± 42,2 $P_1 < 0,01$	32,1 ± 1,22 $P_1 < 0,01$	9,55 ± 1,38 $P_1 < 0,01$	18,8 ± 1,4	4150 ± 433 $P_1 < 0,01$	69,2 ± 7,2

Примечание.  $P_1$  — достоверность различия между группами через 1,5 мес после заражения,  $P_2$  — достоверность различий при спонтанном течении заболевания через 1,5 и 2 мес после заражения.

кером интенсивного фиброзирующего процесса, отражало наличие защитной ограничительной реакции. С другой стороны, АТА ткани по сравнению с предыдущим сроком достоверно снижалась, а удельная активность АТА практически нормализовалась, что, по-видимому, являлось следствием отграничения очага протеолитического разрушения тканей.

Антибактериальная терапия в течение 1,5 мес обусловила значительное рассасывание перифокального воспаления. Участок поражения становился более отграниченным. У всех животных определялся крупный казеозный очаг с распадом, но стенки каверны становились более узкими. Грануляционный слой характеризовался большим количеством полнокровных сосудов. Соединительная ткань в толще грануляционного слоя по периферии каверны, а также в межалвеолярных перегородках в отдаленных участках легких отличалась четкой очерченностью пучков коллагеновых волокон (см. рис. 2), малым количеством фибробластов и большим числом лимфоцитов. Эпителиоидных клеток стало намного меньше, но появились гигантские клетки и значительное количество макрофагов. Тем не менее на границе с казеозом грануляционный слой был еще в значительной степени инфильтрирован нейтрофилами.

Таким образом, антибактериальная терапия, начатая на этапе уже сформировавшейся каверны, оказалась гораздо менее эффективной, чем при генерализованном туберкулезе, и приво-

дила лишь к частичному рассасыванию и усилению процессов фиброзирования. В соответствии с относительно малым эффектом лечения и в биохимических показателях в легочной ткани между двумя сравниваемыми группами (спонтанное течение и лечение антибактериальными препаратами) существенных различий не выявлялось.

Результаты обеих серий исследований позволяют сделать вывод, что при развитии туберкулезного воспаления параллельно повышению сосудистой проницаемости резко нарастает антипротеолитический потенциал легочной ткани за счет перемещения в нее сывороточного  $\alpha_1$ -ПИ. Благодаря этому обстоятельству на длительное время эффективно блокируется нейтрофильная эластаза, а главным фактором тканевой деструкции выступает катепсин D. При деструктивном туберкулезе нарастает активность всех классов протеолитических ферментов, что, по-видимому, в значительной мере предопределяет характер морфологических реакций.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Локшина Л. А. — В кн.: Тканевые протеолитические ферменты в норме и при патологии. М., 1977, с. 11—13.
2. Оглобина О. Г., Платонова Л. В., Мясникова Л. В. и др. — Вopr. мед. химии, 1980, № 3, с. 387—392.
3. Хоменко А. Г., Голышевская В. И. — Бюл. exper. биол., 1981, № 11, с. 627—629.
4. Barrett A. J. — In: Lysosomes. Amsterdam, 1972, p. 46—135.
5. Barrett A. J. — Fed. Proc., 1980, vol. 39, p. 9—14.

6. Cohen A. B. — Ibid., 1979, vol. 38, p. 2644—2647.
7. Eriksson S. — Acta med. scand., 1978, vol. 203, p. 449—455.
8. Gordon S. — Fed. Proc., 1977, vol. 36, p. 2707—2711.
9. Janoff A., White R., Carp H. et al. — Amer. J. Path., 1979, vol. 97, p. 111—136.
10. James K. — TYBS, 1980, vol. 5, N 2, p. 43—47.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. I. — J. biol. Chem., 1951, vol. 193, p. 265—275.
12. Visser L., Blout E. R. — Biochim. biophys. Acta, 1972, vol. 268, p. 257—260.

Поступила 17.05.85

#### ACTIVITY OF PROTEOLYTIC ENZYMES AND OF THEIR INHIBITORS IN LUNG TISSUE OF GUINEA PIGS WITH GENERALIZED AND DESTRUCTIVE FORMS OF TUBERCULOSIS

N. L. Zhukova, L. E. Gedymin, V. I. Golyshevs-kaya

Central Institute of Tuberculosis, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

Two series of experiments were carried out using 66 guinea pigs infected with tuberculosis.

In the first experiment generalized tuberculosis was simulated by means of subcutaneous administration of *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>RV strain at a dose of 0.0001 mg. In the second experiment destructive form of tuberculosis was developed after intrapulmonary administration of the bacteria (1 mg) followed by VCG vaccination. In both experiments the animals were divided into groups with spontaneous form of the infection and the group of animals treated with rifampycin and isoniazid. Total protein, elastolytic activity, cathepsins B and D, free antitryptic activity were estimated in lung homogenates. Generalized and destructive forms of tuberculosis were shown to induce an increase in content of soluble protein as well as in cathepsin D, elastolytic and antitryptic activities in tissues. Destructive form of tuberculosis was characterized by more than 4-fold increase in elastolytic activity and by a distinct activation of cathepsin B. The antibacterial drugs used affected only slightly the biochemical patterns studied in lung tissue.

УДК 612.015.11-06:612.592

В. И. Кулинский, А. И. Медведев, А. К. Кунцевич

#### СТИМУЛЯЦИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ МИТОХОНДРИЙ ПРИ ОСТРОМ ОХЛАЖДЕНИИ И ЕЕ КАТЕХОЛАМИНОВЫЕ МЕХАНИЗМЫ

Красноярский медицинский институт

Среди регуляторных механизмов, определяющих срочные метаболические реакции организма на острое охлаждение, ведущая роль принадлежит симпатико-адреналовой системе [9, 14]. Под влиянием холодового стимула происходит мобилизация депонированных катехоламинов, с действием которых связаны различные метаболические ответы [9, 10, 14, 15]. Вопрос о роли катехоламинов в регуляции активности окислительных ферментов митохондрий при остром охлаждении стал изучаться только в последнее время [5, 6]. Между тем уже известно существование катехоламиновой цАМФ-зависимой стимуляции дыхания митохондрий [5], активности ключевых ферментов цикла трикарбоновых кислот: НАД<sup>+</sup>-зависимой изоцитратдегидрогеназы (НАД<sup>+</sup>-ИПДГ) [5, 17] сукцинатдегидрогеназы (СДГ) [6], а также НАДФ<sup>+</sup>-трансгидрогеназы (ТГ) в

направлении переноса гидрид-иона НАДФ·Н→НАД<sup>+</sup> [7, 17]. Все это и определило наш интерес к исследованию влияния острого охлаждения организма на активность окислительных ферментов митохондрий.

#### Методика

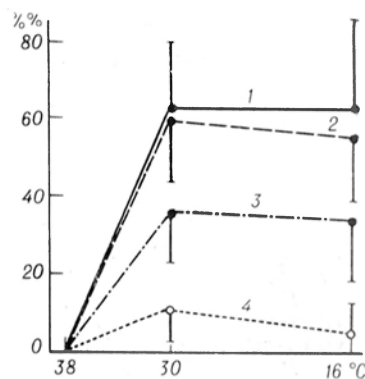
Работа проведена на 150 крысах Вистар массой 150—250 г. Животных охлаждали в малогабаритной климатической камере МКК-3 при —17—20 °С в индивидуальных клетках с сохранением двигательной активности [9]. О степени гипотермии судили по температуре в ободочной кишке, которую определяли электротермометром ТПЭМ-1. Антагонист β-адренорецепторов анаприлин (пропранолол) вводили в дозе 34 мкмоль/кг за 30 мин до начала охлаждения. Животных деканитировали. Органы и ткани гомогенизировали в средах следующего состава: а) печень — 0,25 М сахараза, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-НСl буфер pH 7,4 (на 1 г ткани 9 мл среды); б) сердце — 0,115 М KCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ трис-НСl буфер pH 7,4

(на 1 г ткани 10 мл среды); в) скелетные мышцы — 0,1 М КСl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ трис-НСl буфер рН 7,4 (на 1 г ткани 4 мл среды). Инкубацию клеточных фракций с катехоламинами и цАМФ (10<sup>-6</sup> М) проводили, как описано ранее [5—7]. Митохондрии выделяли дифференциальным центрифугированием гомогенатов печени [5], сердца [18] и скелетных мышц [1]. Активность ферментов определяли спектрофотометрически: НАД<sup>+</sup>-ИЦДГ и НАДФ<sup>+</sup>-ИЦДГ [13, 21] и ТГ [22] — в надосадочной жидкости при 15 000 л в течение 20 мин после обработки 0,1 или 1 % раствором детергента тритон X-100 митохондрий, СДГ — в изолированных митохондриях и их лизатах, содержащих 1 % тритон X-100 [3]. Белок определяли модифицированным методом Лоури [20].

## Результаты

Острое охлаждение крыс стимулирует активности НАД<sup>+</sup>-ИЦДГ, СДГ и ТГ, не влияя на активность НАДФ<sup>+</sup>-ИЦДГ митохондрий печени (см. рисунок). Максимальная стимуляция всех трех ферментов наблюдается при снижении температуры тела до 30 °С, дальнейшее углубление гипотермии вплоть до смерти не изменяет степени активации ферментов. Аналогичные изменения наблюдались в митохондриях сердца и скелетных мышц (табл. 1). Активация ферментов в сердце проявляется при охлаждении наркотизированных животных (тиопентал-натрий, 120 мг/кг внутривенно), у которых отсутствует реакция на боль, но сохранены роговичные рефлексы.

Стимуляция НАД<sup>+</sup>-ИЦДГ, СДГ и ТГ при холодовом воздействии количественно близка или совпадает с их активацией при введении экзогенных катехоламинов, действие которых реализуется через β-адренорецепторы, аденилатциклазу и цАМФ [5—7]. Поскольку острое охлаждение вызыва-



Динамика активации ферментов митохондрий печени при остром (–20–25 °С) охлаждении крыс.

По оси абсцисс — температура тела в ободочной кишке (охлаждение до 30 °С развивалось за 1 ч, до 16 °С — за 4 ч); по оси ординат — изменение активности ферментов (в %) по отношению к контролю. 1 — ТГ (направление реакции НАДФ·Н → НАД<sup>+</sup>); 2 — СДГ; 3 — НАД<sup>+</sup>-ИЦДГ; 4 — НАДФ<sup>+</sup>-ИЦДГ. Точками отмечены достоверные различия по сравнению с контролем ( $P < 0,05$ ), кружочками — недостоверные. В сериях проведено по 4–10 опытов.

ет мобилизацию эндогенных катехоламинов [9, 10, 14], представлялось целесообразным проверить участие последних в реализации эффекта охлаждения на активность исследуемых ферментов. С этой целью исследовали влияние антагониста β-адренорецепторов анаприлина (пропранолола) на реакцию НАД<sup>+</sup>-ИЦДГ, СДГ и ТГ при охлаждении. Введение блокатора не влияет на активность исследуемых ферментов у интактных животных в условиях острого охлаждения, но полностью предупреждает стимуляцию ферментов во всех изученных тканях (табл. 2). Это, очевидно, свидетельствует в пользу определяющей роли эндогенных катехоламинов в холодовой стимуляции НАД<sup>+</sup>-ИЦДГ, СДГ и ТГ и опосредовании их эффекта β-адренорецепторами.

Таблица 1

Влияние острого охлаждения на активности НАД<sup>+</sup>-ИЦДГ, НАДФ<sup>+</sup>-ИЦДГ, СДГ и ТГ митохондрий сердца и скелетных мышц крыс

Орган (ткань)	Условия опыта	НАД <sup>+</sup> -ИЦДГ	НАДФ <sup>+</sup> -ИЦДГ	СДГ	ТГ
Сердце	Контроль	38,6±3,2	855±41,8	333±69,1	27,1±2,5
	Охлаждение	54,4±3,0 $P < 0,01$	895±40,8 $P > 0,5$	578±49,4 $P < 0,01$	39,2±2,0 $P < 0,01$
Скелетные мышцы	Контроль	43,1±2,3	181±17,1	29,4±2,1	21,2±1,6
	Охлаждение	58,6±1,7 $P < 0,001$	202±15,7 $P > 0,3$	56,5±9,9 $P < 0,02$	32,7±2,7 $P < 0,01$

Примечание. Активности НАД<sup>+</sup>-ИЦДГ, НАДФ<sup>+</sup>-ИЦДГ и ТГ выражены в наномолях НАДФ·Н на 1 мг белка в 1 мин, активность СДГ — в наномолях окисленного сукцината на 1 мг белка в 1 мин. В сериях по 7–10 опытов.



Таблица 2

Влияние предварительной блокады  $\beta$ -адренорецепторов анаприлином на активирующий эффект острого охлаждения

Орган (ткань)	Условия опыта	НАД <sup>+</sup> -ИЦДГ		СДГ		ТГ	
		—	+	—	+	—	+
Печень	Контроль	6,9±0,6	6,8±0,5	165±13,0	182±17,4	10,6±1,1	12,7±1,5
	Охлаждение <i>P</i>	9,2±0,6 <0,05	6,7±0,6 >0,9	263±28,1 <0,01	202±25,8 >0,1	18,4±2,2 <0,01	11,4±1,0 >0,4
Сердце	Контроль	36,6±3,0	38,7±2,4	383±29,8	490±48,6	22,3±1,5	20,4±1,6
	Охлаждение <i>P</i>	49,4±3,2 <0,02	38,7±2,1 1,0	557±62,3 <0,01	456±51,3 >0,1	31,8±2,0 <0,01	19,4±0,6 >0,8
Мышцы	Контроль	42,0±2,4	45,8±5,6	29,4±1,9	35,2±2,9	42,2±4,5	46,2±6,3
	Охлаждение <i>P</i>	60,8±1,0 <0,001	43,4±6,4 >0,9	57,5±9,1 <0,02	41,2±3,8 >0,4	68,5±5,2 <0,01	46,6±4,3 >0,9

Примечание. Различия в активностях ферментов контрольных животных без анаприлина (—) и при введении анаприлина (+) статистически недостоверны ( $P > 0,3-0,7$ ). В сериях по 7—11 опытов. Активность ферментов выражена в наномолях на 1 мг белка в 1 мин.

На фоне холодовой стимуляции экзогенный норадреналин не влияет на активности НАД<sup>+</sup>-ИЦДГ и СДГ при инкубации с гомогенатами печени (табл. 3; для ТГ подобных экспериментов не проводили). В параллельных экспериментах на гомогенатах печени интактных животных влияние норадреналина проявляется четко (см. табл. 3). Инкубация гомогенатов или изолированных митохондрий печени охлажденных животных с цАМФ так-

же не вызывает дополнительного увеличения активности ни одного из исследуемых ферментов (табл. 4). Очевидно, эффекты острого охлаждения, норадреналина и цАМФ на НАД<sup>+</sup>-ИЦДГ, СДГ и ТГ не суммируются, что свидетельствует об идентичности механизмов их действия. Таким образом, представляется обоснованным следующий механизм стимуляции исследуемых ферментов: холод → катехоламины →  $\beta$ -адренорецепторы → аде-

Таблица 3

Воздействие охлаждения и норадреналина на НАД<sup>+</sup>-ИЦДГ и СДГ митохондрий печени крыс

Фермент	Контроль	Норадреналин, 10 <sup>-6</sup> М	Охлаждение до 30 °С	Охлаждение до 30 °С + норадреналин, 10 <sup>-6</sup> М
НАД <sup>+</sup> -ИЦДГ	10,9±0,8 <i>P</i>	13,9±1,2 <0,02	14,9±1,5 <0,05	15,4±1,6 <0,05
СДГ	157±16,2 <i>P</i>	234±39,7 <0,02	248±31,1 <0,01	242±37,6 <0,02

Примечание. Гомогенаты печени инкубировали с норадреналином 10 мин при 30 °С в присутствии 10<sup>-3</sup> М аскорбата и теофиллина. Различия эффекта суммы (охлаждение + норадреналин) от эффектов охлаждения и норадреналина статистически недостоверны ( $P > 0,4-0,7$ ). В каждой серии 8—10 опытов.

Таблица 4

Воздействие охлаждения и цАМФ на НАД<sup>+</sup>-ИЦДГ, СДГ и ТГ митохондрий печени крыс

Фермент	Контроль	цАМФ, 10 <sup>-6</sup> М	Охлаждение до 30 °С	Охлаждение до 30 °С + цАМФ, 10 <sup>-6</sup> М
НАД <sup>+</sup> -ИЦДГ	11,8±0,8 <i>P</i>	14,6±1,2* <0,001	16,0±1,2 <0,01	15,3±1,4* <0,05
СДГ	149±10,1 <i>P</i>	250±30,9 <0,01	229±32,5 <0,01	209±31,2 <0,05
ТГ	17,1±1,3 <i>P</i>	23,9±2,2 <0,02	25,3±1,6 <0,01	25,5±1,2 <0,001

Примечание. Митохондрии или (отмечено звездочкой) гомогенаты инкубировали с цАМФ 10 мин при 30 °С в присутствии 10<sup>-3</sup> М теофиллина. В каждой серии 7—11 опытов.

пионатциклаза → цАМФ → митохондри → активация ферментов.

### Обсуждение

Острое охлаждение крыс стимулирует активность митохондриальных ферментов НАД<sup>+</sup>-ИЦДГ, СДГ и ТГ, не влияя на НАДФ<sup>+</sup>-ИЦДГ. Активация последних проявляется на начальных этапах гипотермии и сохраняется вплоть до гибели животных. НАД<sup>+</sup>-ИЦДГ, НАДФ<sup>+</sup>-ИЦДГ и ТГ часто объединяют в систему ферментов окисления изоцитрата [19, 23]. В этой системе как катехоламины [7, 17], так и охлаждение активируют именно лимитирующие ферменты обоих путей окисления изоцитрата: НАД<sup>+</sup>-ИЦДГ и ТГ.

Активация НАД<sup>+</sup>-ИЦДГ, СДГ и ТГ позволяет увеличивать поток восстановленных эквивалентов в дыхательную цепь, способствуя повышенной выработке энергии организмом при остром охлаждении. В пользу важности стимуляции ферментов митохондрий при охлаждении свидетельствует и то, что стимуляция НАД<sup>+</sup>-ИЦДГ, СДГ и ТГ обнаружена не только в печени и сердце, но и в скелетных мышцах, внутренних, как известно, основной вклад в теплопродукцию организма [16]. Активация НАД<sup>+</sup>-ИЦДГ, СДГ и ТГ наблюдается при охлаждении как бодрствующих, так и наркотизированных животных. Это позволяет полагать, что эффект острого охлаждения не связан с эмоционально-поведенческими реакциями на холод. Предварительное введение антагониста β-адренорецепторов анприлина полностью предупреждает холодовую активацию ферментов, подчеркивая тем самым определяющую роль эндогенных катехоламинов и β-адренорецепторных механизмов в стимуляции НАД<sup>+</sup>-ИЦДГ, СДГ и ТГ при остром охлаждении.

Хорошо известно, какое значение имеют β-адренорецепторы для устойчивости животных к действию холода [9, 12]. Ранее это связывалось с мобилизацией субстратов [12], однако блокада последней существенно не сказывается на продолжительности жизни животных при остром охлаждении [9]. Судя по нашим данным, активация исследуемых ферментов осуществляется независимо от мобилизации субстратов и не обусловлена ею. В пользу этого свидетельствует преж-

де всего тот факт, что цАМФ действует не только на распад биополимеров, но и на сами митохондрии, что приводит к стимуляции НАД<sup>+</sup>-ИЦДГ, СДГ и ТГ [5—7]. Это подтверждается и выраженной активацией ферментов при насыщающих концентрациях субстратов.

Таким образом, приведенные в настоящей работе результаты показывают важность катехоламиновой цАМФ-зависимой стимуляции окислительных ферментов митохондрий при охлаждении, которая в немалой степени обуславливает существенное значение β-адренергических механизмов для устойчивости к действию холода.

Если в экстремальных состояниях, связанных с неблагоприятным действием холодового фактора, стимуляция окислительного метаболизма, несомненно, полезна, то в практике искусственной гипотермии ее проявление едва ли желательно. Между тем идеология методов искусственной гипотермии, базирующаяся на наркозе в сочетании с глубокой кураризацией [4, 8], совсем не исключает реакции симпатико-адреналовой системы на охлаждение. Давно известна неэффективность фармакотерапии катехоламинами в постгипотермном периоде [2]. Рефрактерность к действию адреналина на окислительный метаболизм, например, может наблюдаться в течение продолжительного времени после гипотермии [11]. С одной стороны, это ограничивает возможности полноценного фармакологического контроля окислительных функций как в ходе гипотермии, так и в постгипотермном периоде, с другой — поднимает вопрос о необходимости фармакологической защиты регуляторных звеньев метаболических процессов при проведении гипотермии. Нами установлено, что при охлаждении наркотизированных животных на фоне предварительной блокады β-адренорецепторов не происходит стимуляции НАД<sup>+</sup>-ИЦДГ, СДГ и ТГ в митохондриях сердца крыс (см. табл. 2 и 5). При этом полностью сохраняется чувствительность ферментов к стимуляции цАМФ в экспериментах *in vitro* (см. табл. 5). Последнее предполагает интактность внутриклеточных звеньев β-адренорецепторного механизма регуляции их активности. Вероятно, целесообразно включение антагонистов β-адренорецепторов в комплекс

Сохранение чувствительности НАД<sup>+</sup>-ИЦДГ, СДГ и ТГ митохондрий сердца и цАМФ при гипотермии наркотизированных животных на фоне предварительной блокады β-адренорецепторов

Условия опыта	НАД <sup>+</sup> -ИЦДГ		СДГ		ТГ	
	базальная активность	+ цАМФ, 10 <sup>-6</sup> М	базальная активность	+ цАМФ, 10 <sup>-6</sup> М	базальная активность	+ цАМФ, 10 <sup>-6</sup> М
Контроль	37,1±3,0	50,6±3,9	383±69,1	—	45,2±6,2	66,6±7,6
Охлаждение	$P<0,001$				$P<0,01$	
	41,2±2,5	53,7±4,2	357±15,3	506±42,1	44,2±4,3	66,0±7,8
	$P<0,001$		$P<0,01$		$P<0,01$	
<i>P</i>	>0,3	>0,6	>0,8		>0,8	>0,9

Примечание. Прочерк — исследования не проводились. В каждой серии 6—7 опытов.

средств, применяемых для искусственной гипотермии.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Агурев А. П., Алтухов Н. Л., Мохова Е. П., Савельев Н. А. — Биохимия, 1981, № 11, с. 1945—1956.
- Акимов Г. А., Алишев Н. В., Бернштейн В. А., Бузов В. А. Общее охлаждение организма. Л., 1977.
- Виноградов А. Д. — В кн.: Реакции живых систем и состояние энергетического обмена. Путило, 1979, с. 98—125.
- Дарбинян Т. М. Современный наркоз и гипотермия в хирургии врожденных пороков сердца. М., 1964.
- Кулинский В. И., Воробьева Л. М., Труфанова Л. В. — В кн.: Циклические нуклеотиды. М., 1979, с. 56—72.
- Кулинский В. И., Кунцевич А. К., Труфанова Л. В. — Бюл. экспер. биол., 1981, № 8, с. 33—34.
- Кулинский В. И., Медведев А. Е., Труфанова Л. В. — Докл. АН СССР, 1982, т. 264, № 4, с. 1002—1004.
- Мешалкин Е. И. — В кн.: Гипотермическая защита в хирургии сердца. Новосибирск, 1981, с. 3—32.
- Плотников Н. Ю., Кулинский В. И. — Вopr. мед. химии, 1983, № 4, с. 122—127.
- Стабровский Е. М., Коровин К. Ф. — Физиол. журн. СССР, 1971, т. 59, № 4, с. 539—546.
- Davidović B. M., Petrovič V. M. — Resuscitation, 1978, vol. 6, p. 59—63.
- Estler C., Ammon H. P. T. — Canad. J. Physiol. Pharmacol., 1969, vol. 47, p. 427—434.
- Goebell H., Klingenberg M. — Biochem. Z., 1964, Bd 340, S. 441—464.
- Himms-Hagen J. — Pharmacol. Rev., 1967, vol. 19, p. 367—461.
- Horwitz B. A. — In: Strategies in Cold: Natural Torpidity and Thermogenesis. New York, 1978, p. 619—655.
- Jansky L. — Biol. Rev., 1973, vol. 48, p. 85—132.
- Kulinsky V. I., Trufanova L. V., Medvedev A. E. — FEBS Lett., 1984, vol. 177, p. 143—145.
- Mela L., Seitz S. — Meth. Enzymol., 1979, vol. 55, Pt F, p. 39—46.
- Nicholls D., Garland P. — Biochem. J., 1969, vol. 114, p. 215—226.
- Ohnishi T., Barr J. K. — Analyt. Biochem., 1978, vol. 86, p. 193—200.
- Plaut G. W. E., Aogaichi T. — J. biol. Chem., 1968, vol. 243, p. 5571—5583.
- Rydström J. — Meth. Enzymol., 1979, vol. 55, Pt F, p. 261—275.
- Smith C., Plaut G. W. E. — Europ. J. Biochem., 1979, vol. 97, p. 283—295.

Поступила 20.06.85

#### CONTRIBUTION OF CATECHOLAMINES TO STIMULATION OF MITOCHONDRIAL OXIDATIVE ENZYMES UNDER CONDITIONS OF ACUTE COOLING

V. I. Kulinsky, A. E. Medvedev, A. K. Kuntsevich

Medical School, Krasnoyarsk

Acute cooling of rats led to stimulation of NAD<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase (ICDH), succinate dehydrogenase (SDH) and NAD(P)<sup>+</sup>-transhydrogenase (TH) but did not affect the NADP<sup>+</sup>-ICDH activity in liver, heart and skeletal muscle mitochondria. After pretreatment of the animals with propranolol the stimulating effect was decreased, thus suggesting that endogenous catecholamines and β-adrenoceptors are of importance in activation of NAD<sup>+</sup>-ICDH, SDH and TH. The effects of cooling, noradrenaline and cAMP did not summarize. Role of catecholamines in stimulation of mitochondrial oxidative enzymes under conditions of cooling is discussed.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АЛЬДОЛАЗЫ ТИПА А В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ИНФАРКТОМ МИОКАРДА

НИИ медицинской энзимологии АМН СССР, Москва

Исследование содержания (активности) в сыворотке крови специфических для мышечной ткани (миокарда) соединений — миоглобина [11], ферментов или характерных для сердечной мышцы изозимов этих ферментов (МВ изозима креатинфосфокиназы — КФК или изозима 1 ЛДГ) имеет наибольшую информационную ценность для диагностики некроза сердечной мышцы, особенно в случае стертых, атипично протекающих форм этого патологического процесса [1, 8, 13, 23]. Следует отметить, что число ферментов, обладающих выраженной тканеспецифичностью для скелетных мышц и миокарда, невелико. В связи с этим разработка и внедрение в клиническую практику методов их определения по-прежнему актуальны.

Ранее было установлено, что процесс образования пентозофосфатов в сердечной мышце из метаболитов гликолиза в анаэробных реакциях пентозофосфатного пути [19] в отличие от путей биосинтеза этих соединений в надпочечниках, лактирующих железах и печени, включает стадию биосинтеза гептулозо-1,7-дифосфата (Гепт-1,7-диФ) из эритрозо-4-фосфата (Э-4-Ф) и диоксиацетонфосфата (ДАФ) [14, 19]. В реакции участвует одна из гетерогенных форм альдолазы (КФ.4.1.2.13) — альдолаза типа А или ее гибридная изоформа. Энзим катализирует реакцию альдольной конденсации и расщепления дифосфомоносахаридов, основными из которых являются Гепт-1,7-диФ и фруктозо-1,6-дифосфат (Ф-1,6-диФ). По первичной структуре полипептидных цепей, электрофоретической подвижности, иммунологическим свойствам, кинетическим характеристикам, в том числе по отношению к субстрату реакции, альдолаза А отличается от других ее молекулярных форм — В и С, локализованных в печени и мозгу соответственно [3, 16, 18]. Придавая большое значение при диагностике заболевания фактору тканеспецифичности, мы сочли возможным разработать способ оп-

ределения альдолазы А в сыворотке крови. Анализ описанных в литературе тестов определения активности альдолаз в сыворотке крови свидетельствует, что наибольшее распространение в клинических лабораториях получил метод Сибли и Ленинджера [20] и его модификации [5, 9]. Применяется в клинике также энзиматический тест Берингера, который, подобно методу Варбурга и Христиана [24], основан на использовании системы 3 сопряженных ферментов, что в значительной степени затрудняет его использование. В перечисленных методах скорость ферментативной реакции определяют в направлении расщепления Ф-1,6-диФ — при измерении активности фермента в сердечной мышце или сыворотке крови при некротических изменениях миокарда и фруктозо-1-фосфата (Ф-1-Ф) — в ткани печени или сыворотке крови при заболеваниях этого органа. Однако при измерении активности фермента этими методами не учитывают его свойств, в частности, направленности протекания реакции в ткани. В связи с этим, для того чтобы измерить активность альдолазы, в инкубационную смесь вносят гидразин, мышьяковую кислоту, цианистый калий, которые, искусственно смещая кажущуюся константу равновесия реакции ( $K_{\text{равн}}$ ) в сторону расщепления фосфосахаров, дают возможность только в этом случае идентифицировать продукт реакции. При этом гидразин оказывает частичное ингибирующее влияние на альдолазу [17]; два других соединения высокотоксичны.

Новизна предлагаемого нами метода определения альдолазы А в сыворотке крови состоит в том, что в основу его положены данные, полученные при изучении свойств этого фермента в миокарде и сыворотке крови при деструктивных повреждениях сердечной мышцы. В работе была исследована основная каталитическая направленность действия фермента и сравнительная скорость образования

# Кинетические параметры альдозазы типа А в миокарде

Альдолазная реакция	Субстрат	K <sub>M</sub> , мМ	Концентрация в ткани, мМ	Активность, мкмоль/час на 1 мг белка	
				насыщающие концентрации субстратов	эндогенные концентрации субстратов
Э-4-Ф+ДАФ $\rightleftharpoons$ гепт-1,7-диФ (I)	Э-4-Ф	1·10 <sup>-2</sup>	1·10 <sup>-3</sup>	22,8	2,28
Гла-3-Ф+ДАФ $\rightleftharpoons$ Ф-1,6-диФ (II)	Гла-3-Ф	1,0	6,8·10 <sup>-3</sup>	1,44	0,01

дифосфомоносахаридов — соединений, являющихся продуктами этой реакции. Подобного рода прием, базирующийся на изучении свойств фермента в ткани, был использован ранее при разработке методов определения активности ЛДГ и КФК в сыворотке крови при патологии [2, 10].

Предлагаемый метод определения альдозазы А отработан по условиям проведения ферментативной реакции в сыворотке крови и химической идентификации продукта реакции — гепт-1,7-диФ (в присутствии Э-4-Ф и ДАФ) орциновым методом в нашей модификации, позволившей повысить чувствительность теста в 3 раза. Тест предполагается использовать с целью диагностики инфаркта миокарда.

## Результаты и обсуждение

Повышение активности фермента в сыворотке крови при патологии в значительной степени обусловлено выбросом его в кровоток из ткани при деструктивных или некротических изменениях последней. В связи с этим более адекватным способом измерения активности фермента в сыворотке при патологии является метод, который учитывает свойства фермента того органа, где локализован данный энзим. Один из этапов работы состоял в определении степени равновесности реакции, катализируемой альдозазой А. Для этого были использованы обычно применяемые с этой целью критерии: определение K<sub>равн</sub>, расчет

величины отношения  $\frac{K_{равн}}{\Gamma}$ , где  $\Gamma$  — отношение действующих масс [4]. Результаты измерения K<sub>равн</sub>, а также расчет значений этой величины из уравнения изменения свободной энергии свидетельствовали о смещении K<sub>равн</sub> реакции: ДАФ + Э-4-Ф  $\rightleftharpoons$  гепт-1,7-диФ (реакция I) в сторону синтеза, а

не расщепления дифосфомоносахарида:

$$\left( K_{равн} = \frac{[ДАФ][Э-4-Ф]}{[гепт-1,7-диФ]} = 8 \times 10^{-5} \text{ М} \right).$$

Определение концентрации метаболитов реакции I в ткани миокарда [ДАФ] = 3·10<sup>-5</sup> М; [Э-4-Ф] = 1×10<sup>-6</sup> М; [гепт-1,7-диФ] = 1—5·10<sup>-5</sup> М [2, 10] (см. таблицу) позволило рассчитать величину:

$$\begin{aligned} \Gamma &= \frac{[ДАФ][Э-4-Ф]}{[гепт-1,7-диФ]} = \\ &= \frac{[3 \cdot 10^{-5} \text{ М}] \cdot [1 \cdot 10^{-6} \text{ М}]}{[1 - 5 \cdot 10^{-5} \text{ М}]} = 3 \cdot 10^{-6} \text{ М}. \end{aligned}$$

Отсюда величина отношения  $\frac{K_{равн}}{\Gamma}$

всегда превышала 21, что свидетельствует о смещении K<sub>равн</sub> реакции [4]. Более точное определение величины этого отношения связано с трудностями измерения концентрации гепт-1,7-диФ в ткани миокарда. Таким образом, полученные данные указывают на преимущественную направленность исследуемой реакции (I) в сторону синтеза, а не расщепления дифосфомоносахарида — гепт-1,7-диФ. Альдолазная реакция: ДАФ+глицеральдегид-3-Ф  $\rightleftharpoons$  Ф-1,6-диФ (реакция II) также характеризуется низкой величиной K<sub>равн</sub>, равной 8,1—9,9·10<sup>-5</sup> М [22]. Результаты исследований послужили основанием для определения активности альдозазы А в предлагаемом методе по скорости биосинтеза дифосфомоносахарида.

Дальнейшие опыты были посвящены сопоставлению скорости образования продуктов данной реакции — дифосфомоносахаридов — гепт-1,7-диФ (реакция I) и Ф-1,6-диФ (реакция II). Исследования показали, что в инкубационной среде, содержащей в оптимальных насыщающих количествах субстраты: Э-4-Ф, фосфотриозы (глицеральдегид-3-Ф, ДАФ) и гиалоплазму сердечной мышцы, скорость образова-



ния гепт-1,7-диФ в 15—16 раз превышала скорость биосинтеза Ф-1,6-диФ [6]. Это в значительной степени объясняется утилизацией глицеральдегид-3-фосфата (Гла-3-Ф) не только в альдолазной, но и в триозофосфатизомеразной реакциях. Активность триозофосфатизомеразы (ТФИ) в миокарде очень высока, а величина  $K_{равн}$  значительно смещена в сторону образования ДАФ. Сыворотка крови животных [9, 21] и людей также содержит ТФИ. Проведенные исследования свидетельствуют, что при некротических изменениях миокарда человека наряду с выбросом в сыворотку крови альдолазы А наблюдается освобождение из ткани и поступление в кровь ТФИ. Поэтому, как показали результаты опытов, в среде, содержащей Э-4-Ф, фосфотриозы и сыворотку крови, биосинтез гепт-1,7-диФ протекает также в 15—16 раз активнее, чем образование Ф-1,6-диФ.

Произведено сравнение результатов этой серии опытов, где в инкубационной среде использовались достаточной высокой концентрации соединений, с данными, характеризующими активность альдолазы А в условиях низкого эндогенного содержания субстратов. Для этого был использован прием сопоставления эндогенных концентраций субстратов с величиной  $K_M$  фермента к этим соединениям (величиной, отражающей количественные взаимоотношения между скоростью реакции и концентрацией субстрата). При анализе данных мы основывались также на общепринятом положении, согласно которому регуляцию активности фермента субстратом рассматривают как потенциальный механизм регуляции любого метаболического пути [4]. В связи с этим, зная  $V_{max}$  и  $K_M$  альдолазы к субстратам реакции, а также содержание этих метаболитов в миокарде, мы сочли возможным рассчитать начальную скорость ( $V_0$ ) альдолазной реакции при  $K_M \gg S$  в условиях низкого содержания субстратов [7]. Из таблицы видно, что скорость биосинтеза гепт-1,7-диФ в этом случае значительно превосходит образование Ф-1,6-диФ. Биосинтез Ф-1,6-диФ лимитируется низким содержанием Гла-3-Ф ( $6,8 \cdot 10^{-3}$  мМ) и сравнительно более высокой величиной  $K_M = 1,0$  фермента к этому соединению, чем к Э-4-Ф. Значение величины  $K_M$  альдо-

лазы типа А к Гла-3-Ф в 147 раз превосходит концентрацию этого соединения в миокарде, в то время как для Э-4-Ф величина  $K_M = 1 \cdot 10^{-2}$  мМ лишь в 10 раз больше его содержания в сердечной мышце ( $1 \cdot 10^{-3}$  мМ). Таким образом, проведенные опыты не только свидетельствовали о преимущественном биосинтезе (а не расщеплении) в миокарде и сыворотке крови дифосфомоносахарида, но и указывали на высокую скорость образования гепт-1,7-диФ по сравнению с Ф-1,6-диФ.

Следующий этап работы состоял в отработке условий определения альдолазной реакции типа А в сыворотке крови. Для этого необходимо было совместить два требования — оптимальные условия проведения ферментативной реакции и химической идентификации продукта реакции — гепт-1,7-диФ в присутствии Э-4-Ф и ДАФ. Гепт-1,7-диФ определяли спектрофотометрическим методом, используя для этой цели орциновый тест [12, 15] в нашей модификации. Оптимальным содержанием субстратов в инкубационной среде является 2,5 мкмоль Э-4-Ф и 2,5 мкмоль ДАФ. Эти величины обеспечивают прямолинейный характер зависимости альдолазной реакции от времени инкубации в течение 60 мин при 37 °С при работе с 0,5 мл нормальной и патологической сыворотки (с учетом максимально возможного повышения активности фермента в 10—15 раз). Содержание в пробе субстратов реакции менее 1,5 мкмоль (в сумме 3 мкмоль) не гарантирует точности определения при повышении активности фермента при патологии более чем в 5 раз. В то же время увеличение содержания в среде инкубации Э-4-Ф и ДАФ более 4 мкмоль (в сумме 8 мкмоль) вызывает торможение развития окраски, которую дает гептосахар с  $FeCl_3$ -орциновым реактивом. Повышение химической чувствительности теста в 3 раза по сравнению с другими описанными в литературе орциновыми методами определения гептосахаров [12, 15] было достигнуто подобранной величиной соотношения орцина и  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ , равной 231:1, использованием в предлагаемом методе хлороформа, который полностью экстрагировал окраску гептулозы в меньший объем, подлежащий колориметрированию. Экстракция окраски хлороформом снимала также побоч-

ный «вклад», который частично оказывают субстраты реакции на оптическую плотность определяемого Гепт-1,7-диФ. Повышение химической чувствительности теста сделало возможным измерение показаний оптической плотности при невысоких ее значениях. Последнее является особенно важным при диагностике мелкоочаговых инфарктов миокарда. Ниже приводится пропись разработанного нами метода определения активности альдолазы типа А по образованию гепт-1,7-диФ в сыворотке крови.

*Получение сыворотки.* Кровь брали из локтевой вены без добавления консервантов, центрифугировали дважды при 3000 g в 1 мин в течение 20 мин. Сыворотка, используемая для анализа, должна быть лишена следов гемолиза. Сыворотка может храниться при 2—4 °C до 4 сут или длительное время при —17 °C (без размораживания).

*Инкубационная смесь* (содержание в одной пробе): сыворотка крови — 0,5 мл; Э-4-Ф — 2,5 мкмоль; ДАФ — 2,5 мкмоль; 270 мкмоль триэтаноламин-HCl буфера pH 7,6, вода до общего объема пробы — 2,7 мл. Инкубацию проводили в водяной бане в течение 1 ч при 37 °C. Реакцию останавливали прибавлением 0,3 мл насыщенного раствора ТХУ. Общий объем пробы 3 мл. В контрольную пробу того же состава ТХУ добавляли ранние вытесненные сыворотки. После центрифугирования ТХУ-фильтрат тщательно сливали в другую пробирку.

*Ход определения.* В пробирку с притертой пробкой отбирали 2 мл ТХУ-фильтрата (критический объем пробы), добавляли 0,4 мл конц. HCl ( $d=1,19$ ). Пробирку помещали в кипящую водяную баню на 80 мин, после чего ее быстро охлаждали под водопроводной водой до комнатной температуры. Прибавляли 0,1 мл 0,052 %  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  на 4 н. HCl и 0,1 мл 12 % спиртового раствора орцина (готовится перед употреблением). Пробу перемешивали и вновь помещали в кипящую водяную баню на 3 мин, охлаждали и прибавляли 1,5 мл хлороформа. Экстракцию окраски хлороформом производили путем встряхивания образца ручным или механическим способом в течение 3—5 с. Содержимое пробирки переливали в обезжиренную, ополоснутую хлороформом спектрофотометрическую кювету на 3 мл ( $d=10$  мм). Окраска развивалась сразу, во времени была устойчивой. Расслоение водной фазы и хлороформа происходило быстро. Измерения проводили при длине волны 660 нм. В связи с небольшим объемом исследуемого образца для измерения использовали прилагасмю к спектрофотометру диафрагму (Ю-73.04.177). Кюветы в кюветодержателе поднимали с помощью подкладки  $1 \times 1 \text{ см}^2$ , изготовленной из тefлона, резиновой пробки или другого материала. Контрольную пробу на реактивы и стандартные образцы, содержащие 5—100 мкг ангидрида гептулозы, обрабатывали также. Доверительная чувствительность метода — 0,05 мкмоль гептулозы в пробе.

*Порядок расчета.* Измеряли оптическую плотность опытной и контрольной проб. По калибровочному графику определяли содержание гептулозы в микрограммах в пробах. Высчитывали

разницу ее содержания между опытными и контрольными пробами ( $\Delta$ , мкг). Для выражения активности в международных единицах — Ед/л [мкмоль/л·мин] использовали следующую формулу:  $\text{Ед/л} = \Delta \text{ мкг} \times 0,26$ , где 0,26 — коэффициент пересчета. Коэффициент пересчета получали следующим способом: полученные данные в микрограммах (разница между опытной и контрольной пробой) умножали на 2000 (для пересчета на 1 л сыворотки), умножали на коэффициент ( $f$ ), который зависит от количества отобранного ТХУ-фильтрата из 3 мл общего объема пробы. При отборе 2 мл коэффициент был равен 1,5, делили на 60 (для выражения активности в 1 мин), делили на 192 — молекулярную массу ангидрида гептулозы — моногидрата (для выражения активности в микромолях). Отсюда:

$$\text{Ед/л} = \frac{\Delta \text{ мкг} \cdot 2000 \cdot 1,5 (f)}{60 \cdot 192}$$

Активность альдолазы типа А в сыворотке крови доноров составляла  $6,02 \pm 0,5$  Ед/л.

Апробация методов в условиях клиники при сопоставлении с данными электрокардиографического и клинико-биохимического обследования больных показала, что активность альдолазы типа А (по определению гепт-1,7-диФ) у больных инфарктом миокарда ( $n=33$ ) различной локализации при осложненном и неосложненном течении этого заболевания статистически достоверно превышает аналогичный показатель сыворотки крови здоровых людей ( $n=35$ ) и больных с хронической коронарной недостаточностью ( $n=13$ ). Статистическая обработка материала свидетельствует о высокой доверительной вероятности теста. Определение альдолазы типа А позволяет диагностировать инфаркт миокарда в более поздние сроки заболевания (до 8 дней), что, несомненно, имеет большое практическое значение. Определение активности альдолазы по предложенной прописи уменьшает число ложноположительных и ложноотрицательных случаев, которые наблюдаются при использовании метода с 2,4-дигидрофенилгидразином.

*Автор работы выражает благодарность доктору биол. наук И. С. Севериной за совет, позволивший повысить химическую чувствительность теста.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Иванов И. И., Коровкин Б. Ф., Маркелов И. М. Введение в клиническую энзимологию. — Л., 1974. — С. 93—98.
2. Ленинджер А. Биохимия: Пер. с англ. М., 1974. — С. 352; 481.

3. Литвиненко Л. Т., Дворникова П. Д. // Укр. біохім. журн. — 1961. — Т. 41. — С. 458—471.
4. Ньюсхолм Э., Старт К. Регуляция метаболизма: Пер. с англ. — М., 1977. — С. 11—50.
5. Покровский А. А., Арчаков А. И., Болтунова Л. Н., Мусина И. И. Биохимические методы исследования в клинике. / Под ред. А. А. Покровского. — М., 1969. — С. 147—149.
6. Северин С. Е., Степанова Н. Г. // Биохимия. — 1973. — Т. 38. — № 3. — С. 583—588.
7. Фершт Э. Структура и механизм действия ферментов: Пер. с англ. М., 1980. — С. 109—117.
8. Филиппов И. К., Титов В. Н., Маслова И. А. и др. // Лаб. дело. — 1981. — № 5. — С. 293—296.
9. Клиническая ферментология. / Под ред. Э. Щеклика. — Варшава, 1966. — С. 158—163.
10. Methods of Enzymatic Analysis. / Ed. H. U. Bergmeyer. — New York, 1972. — Vol. 1. — P. 399—409; Vol. 3. — P. 1193—1195; Vol. 4. — P. 1314—1319; 1777—1779.
11. Bieva C., Bernard R. // Cardiovasc. Dis. — 1980. — Vol. 6. — P. 27—30.
12. Dische Z. // J. biol. Chem. — 1953. — Vol. 204. — P. 983—997.
13. Griffiths J., Handschun G. // Clin. Chem. — 1977. — Vol. 23. — P. 567—570.
14. Horecker B. L., Smyrniotis P. Z., Hiatt H. H. et al. // J. biol. Chem. — 1955. — Vol. 212. — P. 827—836.
15. Horecker B. L. // Meth. Enzymol. — 1957. — Vol. 3. — P. 105—108.
16. Horecker B. L., Tsolas O., Lai C. V. // The Enzymes. / Ed. P. D. Boyer. — New York, 1972. — Vol. 7. — P. 213.
17. Konitzer K., Binding H. // Z. ges. inn. Med. — 1959. — Bd 4. — S. 252—255.
18. Rutter W. J. The Enzymes. / Ed. P. D. Boyer. — New York, 1961. — Vol. 5. — P. 314—366.
19. Severin S. E., Stepanova N. G. // Advanc. Enzyme Regulat. — New York, 1981. — Vol. 19. — P. 235—255.
20. Sibley J. A., Lehninger A. L. // J. biol. Chem. — 1949. — Vol. 177. — P. 859—872.
21. Sieglal A., Bing R. J. // Proc. Soc. exp. Biol a Med. — 1956. — Vol. 91. — P. 604—607.
22. Veech R. L., Krebs H. H. // Biochem. J. — 1969. — Vol. 115. — P. 837—842.
23. Wagner G. S., Roe C. R., Limbird L. E. et al. // Circulation. — 1973. — Vol. 47. — P. 263—269.
24. Warburg O., Christian W. // Biochem. Z. — 1943. — Bd 314. — S. 149—176.

Поступила 03.12.85

# ESTIMATION OF ALDOLASE OF THE TYPE A IN BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH MYOCARDIAL INFARCTION BY MEANS OF THE PROCEDURE BASED ON SPECIFIC PROPERTIES OF THE ENZYME

N. G. Stepanova

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

A procedure is described for estimation of aldolase of the type A—a tissue-specific enzyme of myocardium—in blood serum under conditions of myocardial infarction. The rate of the enzymatic reaction was estimated by monitoring production of heptulose-1,7-diphosphate. Erythrose-4-phosphate and dihydroxyacetone phosphate were used as substrates of the reaction. High rates of the reaction product accumulation was observed if the compounds, shifting the reaction  $K'_{eq}$ , were not added into the experimental samples. Sensitivity of the test was 3-fold increased due to modifications of the original method. Clinical experience with the test showed that activity of aldolase of the type A was distinctly higher in blood serum of patients with myocardium infarction as compared with the healthy donors or with the patients with ischemic heart disease.

УДК 616.155.3-008.939.633.2-02:615.31:547.586.2

А. А. Карелин, А. Г. Глоба, В. С. Демидова, А. И. Марчук

## ОБРАЗОВАНИЕ СИГНАЛЬНОГО АТФ ПЛАЗМАТИЧЕСКИМИ МЕМБРАНАМИ ПОЛИМОРФНО-ЯДЕРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ, АКТИВИРОВАННЫХ ФОРМИЛМЕТИОНИЛЛЕЙЦИЛФЕНИЛАЛАНИНОМ

Лаборатория биохимии и отделение переливания крови Института хирургии им. А. В. Вишневского АМН СССР, Москва

Синтез короткоживущего АТФ, его участие в требующем энергии преобразовании трансмембранного гормонального сигнала подтверждено исследованиями, проведенными ранее для обогащенных плазматическими мембранами частиц (ОПМЧ) различных клеток-мишеней при действии инсулина и родственных регуляторов [1, 2]. Показано, что синтезу мембраносвязанного АТФ

предшествует ряд химиоосмоэлектрических событий, связанных с переносом электронов и протонов, происходящих на плазматической мембране, что согласуется с хемоосмотической концепцией Митчелла [2, 3]. В частности, эксперименты по стимуляции инсулином, проведенные на ОПМЧ адипоцитов и эритроцитов в присутствии карбонилцианид-п-трифторметоксифе-

нилгидразона (п-ТФКФ) и монензина, показали, что образование сигнального АТФ сопряжено с  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обменом, на который рецепция инсулина оказывает активирующее воздействие [3]. Аналогичная активация  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обмена обнаружена рядом исследователей в полиморфно-ядерных лейкоцитах (ПМЯЛ) при действии хемотактических факторов, в частности N-формил-L-метионил-L-лейцил-L-фенилаланина (ФМЛФ), который относится к группе формилированных пептидов [11, 16]. Идентичность ионотранспортных событий, возникающих в ответ на действие хемотактантных пептидов, событиям, протекающим на плазматической мембране клеток-мишеней при рецепции инсулина, позволила предположить возможность аналогичного образования АТФ и его участия в преобразовании хемотактического сигнала по каскадному механизму АТФ-зависимого усиления сигнала. В пользу этого свидетельствует и обнаружение эктопротеинкиназы на плазматической мембране ПМЯЛ [11], которая интенсивно потребляет экзогенный АТФ, а также наблюдение последующего включения  $\gamma$ -фосфата АТФ в мембранные белки.

В настоящем сообщении приведены экспериментальные данные, подтверждающие факт образования сигнального АТФ на плазматической мембране ПМЯЛ при стимуляции их хемотактантным пептидом.

## Методика

**Использованные реактивы:** аденозин-5'-дифосфата натриевая соль (АДФ), НАД, НАД·Н (препараты фирмы «Reanal», Венгрия); D,L-β-оксимасляной кислоты натриевая соль («Loba Chemie», Австрия), ротенон (BDH, Англия), НАДФ, глицил-глицин, d-глюкоза, трис-оксиметиламинометан, бычий сывороточный альбумин (фракция V), цитохром с из сердца лошади, аденил-β, γ-имидодифосфат, антимисин А, нафталин, смола Дауэкс 1×8 (100—200 меш) («Serva», ФРГ), гексокиназа (КФ 2.7.1.1), дифениллоксазол (ППО) («Fluka», Швейцария), карбонилцианид - p - трифторметоксибензилгидразон (п-ТФКФ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (КФ 1.1.49) («Boehringer, Mannheim», ФРГ), N-формил-L-метионил-L-лейцил-L-фенилаланин (ФМЛФ), 5-фторсульфонилбензоил-аденозин (ФСБА), фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ) («Calbiochem-Boehringer Corp.», США), [ $^{14}\text{C}$ ]-АТФ [аденозин-5'-трифосфат —  $^{14}\text{C}$  (U), СССР, удельная радиоактивность 17,02 ГБк/ммоль], хроматографическая бумага Whatman № 1 («WR Balston», Англия), дифениллоксазолилбензол (ПОПОП), сахароза, ди-

метилсульфоксид (ДМСО), цитрат аммония, NaCl,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , KCl,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2$ , ацетон («Союзреактив», квалификация не ниже х. ч.),  $^{32}\text{P}$  (PBS-11, «Amersham», Англия), фиколл 400 («Pharmacia», Швейцария), верографии («СПОФА», СССР), трихлоруксусная кислота (ТХУ, «Союзреактив»).

**Приготовление препарата ОПМЧ из ПМЯЛ.** Интактные ПМЯЛ получали из перитонеальной жидкости морской свинки, как описано ранее [5], фракцию ОПМЧ — по методу, приведенному в работе [17] с некоторыми модификациями. Клетки разрушали в среде 0,01 М трис-HCl буфера 7,4, содержащего 0,001 М ФМСФ с добавлением 0,1 объема 0,25 М сахарозы, многократными движениями пестика в гомогенизаторе Даунса. Далее концентрацию сахарозы в растворе доводили до 0,34 М посредством 38 % сахарозы. Ядра и неразрушенные клетки осаждали при 1000 g в течение 10 мин, фракцию ОПМЧ — при 2000 g в течение 40 мин. Конечный осадок был ресуспендирован в нужном объеме 0,25 М сахарозы и был использован в экспериментах. Все операции осуществляли при температуре 4 °C.

Из периферической крови человека нейтрофилы были изолированы по методу [7]. Разрушение ПМЯЛ и выделение фракции ОПМЧ производили так же, как описано выше для препаратов из ПМЯЛ морской свинки (исключение составил тот факт, что ядра и неразрушенные клетки осаждали при 500 g в течение 10 мин, а осадок ОПМЧ был получен центрифугированием при 27 000 g в течение 30 мин).

**Инкубация и процедура изоляции АТФ.** Полученные препараты ОПМЧ суспендировали в холодном 0,25 М растворе сахарозы и вносили в инкубационную среду, в состав которой кроме компонентов, описанных ранее [1, 2], входил  $10^{-4}$  М  $\text{CaCl}_2$ . Инкубацию начинали после внесения в среду 2,1 мл раствора ФМЛФ (11 мкг/мл), 20 мкл 0,001 М трис-глицинового буфера сразу после 1,5 мл охлажденной на льду суспензии ОПМЧ ПМЯЛ. Инкубацию осуществляли в течение 1 мин при 30 °C в атмосфере 100 %  $\text{O}_2$  при встряхивании. Процесс остановки реакции путем замораживания в жидком азоте, нагревания при 100 °C, выделения АТФ методом одноколоночной хроматографии на бумаге описаны ранее [1—3]. Содержание АТФ в лиофилизатах и элюатах с бумаги определяли по восстановлению НАДФ в присутствии гексокиназы, глюкозы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы спектрофлуориметрическим методом [13]. Стимулирующий эффект ФМЛФ определяли по разности количества АТФ в пробах, инкубированных в присутствии ФМЛФ и без пептида. В опытах по изучению действия ФСБА, последний вводили как в контрольные, так и в подопытные пробы в концентрации  $1 \cdot 10^{-6}$  М. Содержание белка в препаратах ОПМЧ определяли по методу, опубликованному ранее [14]. Радиометрию проб проводили в сцинтилляторе Брся на спектрометре SL-40000 «Roche Bioelectronique» (Франция).

**Включение неорганического фосфата в мембранные белки.** Инкубацию пробы общим объемом 340 мкм (см. примечание к табл. 2) осуществляли в стеклянных пробирках (15 мм вместимостью 5 см<sup>3</sup>). Пробы содержали следующие компоненты (указаны конечные концентрации):  $2,3 \cdot 10^{-3}$  М АДФ,  $5 \cdot 10^{-3}$  М  $\text{MgSO}_4$ ,  $5,8 \cdot 10^{-3}$  М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $10^{-4}$  М  $\text{CaCl}_2$ ,  $10^{-4}$  М НАД·Н,  $10^{-2}$  М натриевую соль, β-оксимасля-

ной кислоты, 200 мкг/мл цитохром *c*, 280 мкг/мл бычий сывороточный альбумин,  $10^{-3}$  М KSCN, 100 мкл суспензии ОПМЧ в 0,25 М сахарозе,  $3 \cdot 10^{-5}$  М глицил-глицин в 0,02 М трис-HCl буфере pH 7,4. В опытные образцы вносили ФМЛФ до конечной концентрации  $2,5 \cdot 10^{-5}$  М, а при исследовании ингибирующего эффекта ФСБА его вносили в контроль, так и в опыт в концентрации  $10^{-6}$  М. Во всех случаях в каждую пробирку вносили по 4 мКи [ $^{32}$ P]-ортофосфата.

Реакцию начинали внесением в среду 100 мкл препарата ОПМЧ и проводили в условиях встряхивания при температуре 37°C в течение 4 мин. Остановку реакции осуществляли добавлением в среду 1 мл 10 % ТХУ, предварительно охлажденной на льду. Пробы выдерживали 20 мин при 4°C, затем осадок белка отделяли центрифугированием в бакетном роторе при 1800 g в течение 40 мин. Полученный осадок дважды промывали 10 % ТХУ (1800 g  $\times$  40 мин), затем растворяли в 5 мл 0,1 М NaOH. Полученный раствор, содержащий смесь радиоактивных пептидов, количественно переносили в сцинтилляционные флаконы. Радиометрию осуществляли на спектрометре SL-4000 в диапазоне максимальной регистрации излучения Черенкова (третий канал). В каждом опыте параллельно осуществляли контроль неспецифической сорбции [ $^{32}$ P]-ортофосфата инкубационной средой. Для этого пробу, содержащую [ $^{32}$ P]-ортофосфат и все компоненты, кроме препарата ОПМЧ, инкубировали в тех же условиях, что и экспериментальные образцы. Неспецифическую сорбцию среды учитывали в расчетах. Включение неорганического фосфата в мембранные белки определяли, исходя из концентрации белка и конечной удельной активности [ $^{32}$ P]-ортофосфата. Эффективность счета составляла 10 %.

**Исследования биосинтеза АТФ в ОПМЧ.** Инкубацию осуществляли в пробах объемом 3,6 мл. Состав среды соответствовал описанному ранее для опытов с адиноцитами [3] с добавлением  $\text{CaCl}_2$  ( $10^{-4}$  М). Реакцию начинали внесением в среду 40 мкг ФМЛФ на сосудник (3,6 мл) в 25 мкл трис-глицинового буфера (0,001 М глицил-глицин в 0,04 М трис-HCl буфере). В опытах с ФСБА его конечная концентрация составляла  $1 \cdot 10^{-6}$  М. Инкубировали в течение 1 мин при 30°C в атмосфере 100 % кислорода. Результаты экспериментов обеих серий опытов обрабатывали различным методом.

## Результаты и обсуждение

Образование АТФ в ответ на стимуляцию хемотактическим пептидом было обнаружено при инкубации в течение 1 мин препаратов ОПМЧ ПМЯЛ в полной инкубационной среде в присутствии  $2,5 \cdot 10^{-5}$  М ФМЛФ (табл. 1).

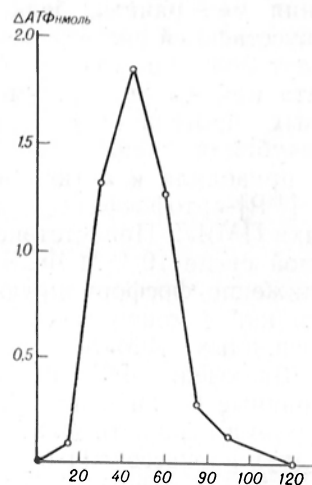
В ходе экспериментов выяснилось, что увеличение времени инкубации приводило к резкому снижению содержания синтезированного АТФ, и при 2-минутной инкубации АТФ в образцах обнаружить практически не удавалось. Исследование временной динамики образования АТФ (см. рисунок)

Т а б л и ц а 1  
Синтез АТФ в ОПМЧ ПМЯЛ, активированных ФМЛФ, в присутствии ФСБА или без него

Исследованный параметр	Контроль (без ФСБА; n=9)	Эксперимент (с ФСБА; n=6)
Синтез АТФ, имоль на 1 мг белка за 1 мин:		
без ФМЛФ	1,04	0,27
с ФМЛФ	1,58	1,80
Стимулирующий эффект ФМЛФ, $\Delta$ АТФ, имоль на 1 мг белка в 1 мин	$0,54 \pm 0,14$	$1,52 \pm 0,087$
P	$<0,01$	$<0,001$

позволило выявить максимум образования АТФ при инкубации в течение 45 с и последующее быстрое исчезновение АТФ из инкубационной среды. Можно предположить, что указанное время (45 с) представляет собой лаг-период между связыванием ФМЛФ с рецептором и активацией некоторых мембранных потребителей АТФ. За 45 с могут происходить векторные химоосмоэлектрические события, с которыми, по-видимому, сопряжен процесс образования сигнального АТФ.

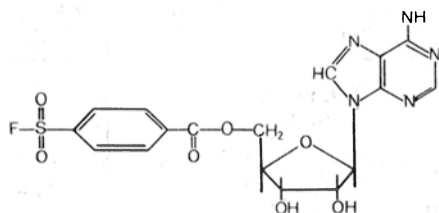
Введение в инкубационную среду  $1 \cdot 10^{-6}$  М ФСБА привело к трехкратному возрастанию количества синтезированного АТФ (см. табл. 1). Одновременно наблюдалось некоторое снижение базального уровня АТФ в неактивированных препаратах ОПМЧ. Эти



Зависимость образования АТФ, обогащенными плазматическими мембранами частицами ПМЯЛ, активированных ФМЛФ, из перитонеальной жидкости морской свинки, от времени инкубации.



явления объясняются действием ФСБА как селективного ингибитора протеинкиназ. Структура ФСБА подобна



структуре АТФ, однако третий фосфат АТФ замещен в боковой цепи сходной по размерам группировкой, содержащей сульфонилфторидную группу в положении соответствующем  $\gamma$ -фосфату [9, 18]. ФСБА благодаря структурному сходству с АТФ имеет сродство к АТФ-связывающему участку активного центра цикло-АМФ-зависимой [18] и цикло-АМФ-независимой (тирозиновой) [12] протеинкиназ, так как модифицирует остатки лизина в молекулах киназ, что вызывает их ингибирование. Таким образом, наблюдаемый прирост синтеза АТФ является следствием ингибирования мембранных киназ, которые потребляют сигнальный АТФ. Падение базального уровня АТФ в неактивированных препаратах ОПМЧ может происходить вследствие ингибирования  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, за счет преходящего обращения которой предположительно синтезируется короткоживущий АТФ [2].

Исследование тотального фосфорилирования мембранных белков в нашей искусственной системе также подтверждает роль сигнального АТФ как субстрата или активатора мембраносвязанных протеинкиназ (табл. 2). Так, инкубация препаратов ОПМЧ с ФМЛФ приводила к активации включения  $[^{32}\text{P}]$ -ортофосфата в мембранные белки ПМЯЛ. Присутствие в инкубационной среде  $10^{-6}$  М ФСБА вызывало снижение фосфорилирующей активности как в контрольных, так и в активированных ФМЛФ препаратах ОПМЧ. Включение  $[^{32}\text{P}]$ -ортофосфата в мембранные белки в нашей модели системы в сущности является следствием двух процессов: 1) образования АТФ из  $[^{32}\text{P}]$ -ортофосфата и АДФ за счет преходящего обращения АТФазной реакции [2, 3]; 2) переброски  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$  на мембранные белки.

Результаты проведенных экспери-

Т а б л и ц а 2

Включение  $^{32}\text{P}$ -ортофосфата в мембранные белки ПМЯЛ, активированных ФМЛФ, в присутствии ФСБА и без него

Исследованный параметр	Контроль (с ФСБА)	Эксперимент (без ФСБА)
Включение фосфата, нмоль/мг белка за 4 мин:		
без ФМЛФ	81,28	33,14
с ФМЛФ	127,50	57,22
Стимулирующий эффект ФМЛФ, $\Delta R_n$ , нмоль на 1 мг белка	$46,21 \pm 12,84$	$24,07 \pm 6,40$
$P$	$<0,02$	$<0,01$

Пр и м е ч а н и е. Приведены результаты двух серий опытов по 8 экспериментов в каждой. Обработка результатов произведена разностным методом.

ментов согласуются с данными других исследователей, которые обнаружили инициированное ФМЛФ включение  $[^{32}\text{P}]$ -ортофосфата в 9 мембранных и цитозольных белков интактных ПМЯЛ, выделенных из периферической крови человека [4]. Данный процесс не зависит от содержания в инкубационной среде реагентов, действующих на аденилатциклазную систему. По-видимому, активация ПМЯЛ является следствием фосфорилирования ключевых регуляторных белков [4].

В последнее время появился ряд сообщений об участии фосфоинозитидов в процессе активации ПМЯЛ под действием хемотактических факторов. Так, в нейтрофилах человека и кролика ФМЛФ стимулировал фосфорилирование фосфатидилинозита, дифосфатидилинозита, а также последующий гидролиз этих осфолипидов [6, 8].

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о возможности существования подобного механизма активации нейтрофилов, так как в начальной стадии этого процесса активируется инозитлипидкиназа, которая также является потребителем энергии мембраносвязанного АТФ.

Ранее сообщалось об обнаружении эктопротеинкиназной активности в ПМЯЛ кролика [10]. Эти исследования позволяют предположить, что на поверхности мембраны лейкоцитов имеется АТФ-зависимый центр протеинкиназы, который может утилизировать как мембраносвязанный, так и эк-

Синтез мембраносвязанного АТФ в ОПМЧ активированных ФМЛФ ПМЯЛ циркулирующей крови человека в норме и при хирургической инфекции

Группа обследуемых	Синтез АТФ, нмоль на 1 мг белка в 1 мин		Стимулирующий эффект ФМЛФ, $\Delta$ АТФ, нмоль на 1 мг белка в 1 мин
	без ФМЛФ	с ФМЛФ	
Доноры (контроль; $n = 7$ )	$2,26 \pm 0,29$	$18,81 \pm 1,30$	$16,55$ $P < 0,001$
Сепсис:			
больной А.	0,00	3,91	3,91
»    Б.	0,44	4,99	4,55
Синдром гнойно-резорбтивной лихорадки:			
больной В.	0,77	7,67	6,90
»    Г.	0,64	7,67	7,03

Примечание. У больного А. летальный исход через 2 сут после определения АТФ-образующей активности ПМЯЛ. Объем проб был уменьшен с 3,6 до 2,4 мл.

зогенный АТФ, высвобождающийся из некротизированных тканей. В последнем случае АТФ выступает в роли самостоятельного хемотактического фактора.

Особый интерес представляют исследования АТФ-образующей активности препаратов ОПМЧ, полученных из ПМЯЛ периферической крови человека в норме и при патологии (табл. 3). Для устранения влияния потребителей АТФ во всех случаях инкубацию проводили в присутствии  $10^{-6}$  М ФСБА. Обнаружено, что ПМЯЛ периферической крови человека обладают более высокой АТФ-образующей активностью по сравнению с аналогичными препаратами, полученными из перитонеальной жидкости морской свинки.

Нами обследован на начальной стадии лечения ряд хирургических больных с различными по тяжести формами местной и генерализованной инфекции. В большинстве случаев АТФ-образующая активность ОПМЧ ПМЯЛ была сниженной по сравнению с таковой доноров.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Карелин А. А. // Вопр. мед. химии. — 1981. — № 5. — С. 679—685.
2. Карелин А. А. // Вестн. АМН СССР. — 1983. — № 7. — С. 74—85.
3. Карелин А. А., Глоба А. Г., Демидова В. С. и др. // Вопр. мед. химии. — 1985. — № 2. — С. 111—117.
4. Andrews P. C., Babior B. M. // Blood. — 1984. — Vol. 64. — P. 883—890.
5. Badwey J. A., Karnovsky M. L. // J. biol. Chem. — 1979. — Vol. 254. — P. 11530—11537.
6. Вогут А. // Scand. J. clin. Lab. Invest. — 1968. Suppl. 97. — P. 77—89.

7. Bradford Peter G., Rubin Roland P. // Molec. Pharmacol. — 1985. — Vol. 27. — P. 74—78.
8. Cockcroft S., Barrowman M. M., Gomperts B. D. // FEBS Lett. — 1985. — Vol. 181. — P. 259—263.
9. Colman R. F. // Rev. Biochem. — 1982. — Vol. 52. — P. 67—91.
10. Emes C., Crawford N. // Biochim. biophys. Acta. — 1982. — Vol. 717. — P. 98—104.
11. Grinstein S., Furuya W. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1984. — Vol. 122. — P. 755—762.
12. Kamps M. P., Taylor S. S., Sefton P. M. // Nature. — 1984. — Vol. 310. — P. 589—592.
13. Kornbers A. // J. biol. Chem. — 1950. — Vol. 182. — P. 779—793.
14. Lowry G. H., Rosebrongh N. J., Farr A. L., Randall R. I. // Ibid. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
15. Pal P. K., Wechter W. J., Colman R. F. // Ibid. — 1975. — Vol. 250. — P. 8140—8147.
16. Sha'afi R. J., Naccache P. H., Molshi T. F. P., Volpi M. // Intracellular pH: its Measurement Resultation and Utilization in Cellular Functions. — New York, 1982. — P. 513—525.
17. Zinsde S. M., Gothoskar B. P. // FEBS Lett. — 1982. — Vol. 139. — P. 317—320.
18. Zoller M. J., Nelson N. C., Taylor S. S. // J. biol. Chem. — 1981. — Vol. 256. — P. 10837—10842.

Поступила 23.12.85

#### PRODUCTION OF THE SIGNAL ATP IN PLASMATIC MEMBRANES OF POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES, ACTIVATED BY FORMYLMETHIONYL LEUCYLPHENYLALANINE

A. A. Karelin, A. G. Globa, V. S. Demidova, A. I. Marchuk

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

Energy-consuming, ATP-dependent step of transmembrane transmission of the signal for chemotaxis was studied at the pathway between

receptors of formylpeptide and membrane kinase of polymorphonuclear leukocytes. Some peptides, particularly formylmethionyl leucylphenylalanine (FMLP), were demonstrated to have a property of chemostimulation, i. e. they had an ability to stimulate phagocytosis in human and animal neutrophils due to presence of specific receptors on the cell surface. Isolation, identification and use of the membrane ATP, synthesized in presence of the chemotactic peptide FMLP, is described. The ATP was produced within 1 min on the surface of polymorpho-

nuclear leukocytes during aerobic phosphorylation from ADP and inorganic phosphate, coupled with transmission of electrons and protons. The ATP-producing activity of polymorphonuclear leukocytes, stimulated by the formylpeptide, was distinctly decreased in the patients with various forms of purulent surgical infections — sepsis, pyo-resorptive fever. The ATP, synthesized in plasmatic membranes of polymorphonuclear leukocytes, appears to serve as a translator of the chemotactic, energy-consuming signal.

УДК 615.243.4:547.963.21.07

*Е. Я. Стан, А. П. Екимовский, С. И. Алейник,  
Л. С. Василевская, М. П. Черников*

## ВЫДЕЛЕНИЕ, АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ И ХАРАКТЕР ДЕЙСТВИЯ ИНГИБИТОРОВ ЖЕЛУДОЧНОЙ СЕКРЕЦИИ ИЗ к-КАЗЕИНА

Институт питания АМН СССР, Москва

Ранее установлено, что растворимый в 12 % ТХУ пептидный материал, образующийся из к-казеина при его ограниченном протеолизме пепсином, названный, согласно принятой номенклатуре молочных белков, гликомакропептидом (ГМП), оказывает выраженное ингибиторное действие на желудочную секрецию [10] и моторику [6]. Показано, что в растворе ГМП находится в сильно ассоциированной форме с мол. массой 32 000 Д, из которой при гель-хроматографии на колонках с биогелями вычлениается мономерная форма с мол. массой около 4000 Д [4]. Дальнейшее исследование позволило выявить более значительную гетерогенность ГМП и неравнозначность ингибиторной активности его гель-хроматографических фракций [9]. Наибольшая ингибиторная активность была локализована в пептидной фракции с мол. массой в пределах 700—2000 Д [5].

Выделенный пептидный препарат можно рассматривать как перспективное лекарственное средство для лечения гастродуоденальной патологии, связанной с гиперфункцией желудка.

В связи с тем что ранее описанный метод [1] не обеспечивает достаточно высокого выхода ингибитора со стабильной активностью, в настоящей работе был разработан метод выделения, обеспечивающий выход ингибитора с повышенной ингибиторной активностью. В работе приводятся данные, характеризующие аминокислотный со-

став и ингибиторную активность входящих в состав препарата пептидов.

### Методика

Общий казеин получают из свежего обезжиренного молока кислотным осаждением в изоточке [12]. Из общего казеина выделяют к-казеин методом [18], основанным на растворимости последнего в растворе мочевины при pH 1,3—1,5, когда остальные белки казеинового комплекса выпадают в осадок. После отделения осадка фильтрованием или центрифугированием при 4000 g в течение 20 мин к-казеин высаливают из фильтрата сернокислым аммонием при концентрации 132 г/л и после диализа дважды очищают от примесей  $\alpha_s$ - и  $\beta$ -казеинов осаждением его из 50 % этанола уксуснокислым аммонием [18]. Полученный осадок очищенного к-казеина растворяют в минимальном объеме 6 М мочевины, диализуют против 0,5 % раствора NaCl и используют для выделения ингибитора. Для этого незначительную часть раствора лиофилизуют и оценивают чистоту к-казеина электрофоретически. Электрофорез проводят в 7 % ПААГ в трис-буфере pH 9,1 при силе тока 5 мА на трубку диаметром 6 мм и напряжении 175 В в течение 1½ ч. Гель, буфер и проба содержат мочевины в концентрации 7 М [16].

Для проведения ферментативного гидролиза в полученном растворе очищенного к-казеина определяют концентрацию белка спектрофотометрически по поглощению при 280 нм с помощью калибровочной прямой, построенной по раствору к-казеина. Обычно  $E_{280}^{0,1\%} = 1,12$ . Раствор к-казеина разбавляют 0,5 % NaCl до концентрации 2 %, подогревают до 37 °С, 0,1 и. НСl доводят pH до 5,65 и вносят пепсин, растворенный в небольшом количестве дистиллированной воды из расчета 1 весовая часть фермента на 100 весовых частей к-казеина, инкубируют 2½ мин и прибавляют 50 % ТХУ до конечной концентрации 12 % (31,5 мл 50 % ТХУ на 100 мл гидролизата). Через 1 ч осадок белка и крупных полипептидов отделяют фильтро-

ванием через бумажный складчатый фильтр и отбрасывают, а фильтрат очищают от ТХУ 5—6-кратной экстракцией равными объемами серного эфира (длительность каждой экстракции 3—4 мин). Водную фазу лиофилизируют, получая препарат ингибитора. Содержание пептидного материала в препарате определяют методом Кьельдаля с последующей пессеризацией [14].

В другом варианте метода к-казеин после высаливания не очищают от примесей  $\alpha_s$ - и  $\beta$ -казеинов, его обработку пепсином проводят при фермент-субстратном соотношении 1:200 [1] или 1:100, а ТХУ удаляют из фильтрата диализом.

Полученный препарат в количестве 100 мг в 2 мл 0,01 М  $\text{NH}_4\text{OH}$  фильтруют через колонку с сфадексом G-50 средним ( $1,5 \times 105$  см), уравновешенную 0,01 М  $\text{NH}_4\text{OH}$  со скоростью 24 мл/ч. Выход материала с колонки автоматически регистрируют с помощью РЭПИС-1М и самописца КСП-4 при длине волны 260 нм. Элюат собирают порциями по 2 мл. Полученные пептидные фракции лиофилизируют. Аминокислотный состав фракций определяют на аминокислотном анализаторе «Бекман-121» после гидролиза в 6 н.  $\text{HCl}$  в атмосфере азота при  $106^\circ\text{C}$  в течение 24 ч. Ингибиторную активность определяют в опытах на 5 собаках с павловским изолированным желудочком. Всего проведено 20 опытов. Животных брали в опыт через 18 ч после кормления при щелочной или нейтральной реакции желудка. Исходные препараты ингибитора, полученные разными методами, вводили внутривенно в дозах, вызывающих 50 % снижение объема секретируемого желудочного сока за 4 ч опыта. Очищенные фракции вводили подкожно в дозе 0,095 мг на 1 кг массы тела. Дозы указаны для чистого пептида, определенного методом Кьельдаля. Через 15 мин после введения препарата животных кормили (100 г хлебной крошки с лизином) и через каждые 15 мин определяли количество выделенного желудочного сока и концентрацию общей кислоты титрационным методом.

### Результаты и обсуждение

В ранее описанном способе [1] для получения ингибитора использовали неочищенный к-казеин, его гидролиз пепсином осуществляли при фермент-субстратном соотношении 1:200, а фильтрат, получаемый после осаждения белка и крупных полипептидов, очищали от ТХУ диализом. Полученный препарат содержал ГМП, который тормозил желудочную секрецию [10]. Выход ГМП из 10 л обраты составлял 0,6—0,8 г пептида, определенного по N, а его активность, выраженная как количество пептида, вызывающее 50 % угнетение объема желудочного сока за 4 ч, составляло 0,43, 0,45—0,55 мг на 1 кг массы животного.

Поскольку в дальнейшем было показано [5], что значительная ингибиторная активность локализована в низкомолекулярной фракции гидролизата, то концентрация пепсина в инкубаци-

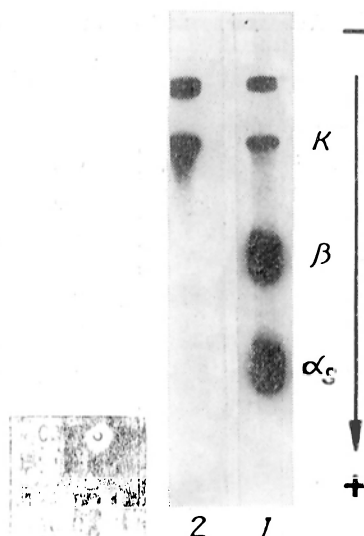


Рис. 1. Электрофореграмма общего казеина (1) и очищенного к-казеина (2).

онной среде была увеличена в 2 раза, до фермент-субстратного соотношения 1:100. При этом выход ингибитора значительно вырос, составив 1—1,2 г пептида, но его активность снизилась в 6—10 раз.

Возможной причиной снижения ингибиторной активности могло быть загрязнение препарата неактивными балластными примесями, которые образуются вследствие ферментативной деградации  $\alpha_s$ - и  $\beta$ -казеинов, присутствующих в неочищенном к-казеине. Поэтому была введена стадия очистки к-казеина осаждением его из 50 % этанола уксуснокислым аммонием [18], в результате которой, согласно электрофоретическим данным, получался практически чистый к-казеин (рис. 1). Другой причиной снижения активности может быть потеря части низкомолекулярных продуктов протеолиза при диализе фильтрата. Так как вследствие увеличения концентрации пепсина возможно образование более значительной фракции низкомолекулярных пептидов, для их сохранения диализ был заменен на экстракцию ТХУ из фильтрата эфиром. При этом выход ингибитора составлял 1—1,1 г пептида, что на 25—40 % выше по сравнению с выходом ГМП, а его активность увеличивалась в 3—4 раза и составляла 0,1—0,13 мг на 1 кг массы тела.

Выделенный ингибитор отличается от ГМП, полученного ранее, своей аминокислотной и фракционным составом. В его состав входят Тир, Фен, Гис,

**Аминокислотный состав безуглеводного пептида (в г/100 г)**

Аминокислота	Фракция			Пара-к-казеин	ГМП
	I	II	III		
Аспарагиновая кислота*	7,35	8,64	6,53	6,56	6,86
Треонин	16,32	15,46	7,50	2,42	16,83
Серин	7,77	7,61	5,80	4,96	7,80
Глутаминовая кислота†	19,50	21,30	14,26	17,78	19,39
Пролин	11,56	10,27	12,60	9,51	11,78
Глицин	1,01	2,80	3,95	0,46	0,84
Аланин	5,32	4,06	6,98	5,20	6,34
1/2 цистина	—	—	—	1,81	—
Валин	6,51	6,30	4,75	4,06	8,83
Метионин	Следы	0,045	0,21	1,07	1,94
Изолейцин	7,50	8,50	4,16	5,60	12,00
Лейцин	1,66	2,75	6,78	6,44	1,67
Тирозин	0,50	0,065	0,78	11,95	—
Фенилаланин	1,19	0,88	2,35	4,70	—
Лизин	5,74	9,67	11,36	6,27	5,72
Гистидин	7,40	0,54	8,11	3,30	—
Аргинин	0,67	1,16	4,60	6,40	—
Триптофан	N/o	N/o	N/o	1,49	—

Примечание. \* Аминокислота + амид; аминокислотный состав пара-к-казеина и ГМП рассчитан, исходя из первичной структуры [11, 15]. N/o—не определяли.

Арг (см. таблицу), отсутствующие в аминокислотном составе ГМП [2], а при гелъ-хроматографии на сефадексе G-50 он разделяется на 4 фракции, в то время как ГМП имеет на хроматограмме только 2 фракции (рис. 2). Из сравне-

ния аминокислотных составов фракций I, II и III ингибитора (см. таблицу) следует, что во фракциях I и III отмечается высокое содержание остатков Гис. При переходе от I фракции к III наблюдается нарастание содержания Гли, Мет, Лей, Лиз, Арг. В III фракции имеет место отчетливое нарастание уровня Тир и Фен и снижение содержания Тре и Иле по сравнению с I и II фракциями. Для всех фракций характерно высокое содержание Лиз и особенно Гли, уровень которого многократно превышает его содержание в к-казеине.

Все исследованные фракции оказывали ингибиторное действие на желудочную секрецию, но оно было выражено в различной степени. Так, фракция I снижала объем секретиремого желудочного сока за 4 ч лишь на  $10 \pm 5\%$ , в то время как фракции II и III в такой же дозе снижали его на  $50 \pm 7\%$ . Результаты статистически достоверны ( $P < 0,01$ ). При этом отмечалась тенденция к снижению общей кислотности сока.

Временная динамика ингибиторного действия фракции II носила двухфазный характер (рис. 3). Первое торможение сокоотделения наблюдалось сразу же после дачи пищевого раздражителя, когда в течение 45 мин объем секретиремого сока снижался на 70—80%, в течение последующих 60 мин секреция сохранялась на уровне конт-

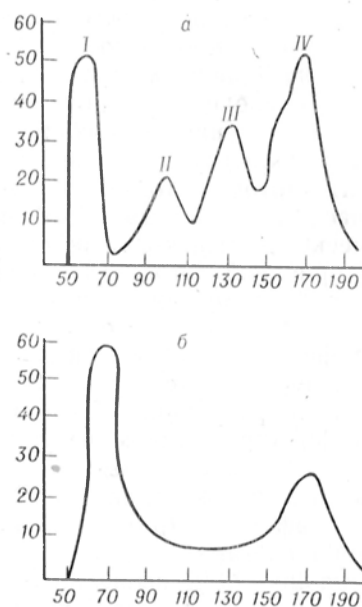


Рис. 2. Гель-хроматограммы ингибиторов желудочной секреции, полученных с помощью предлагаемого (а) и ранее описанного (б) методов.

По осям абсцисс — объем (в мл); по осям ординат — поглощение при 260 нм (в %). I, II, III, IV — фракции.



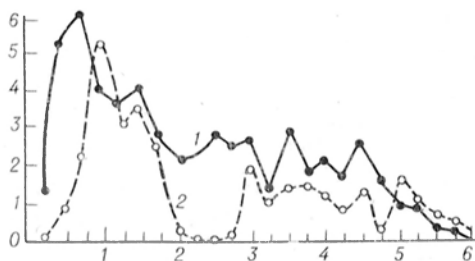


Рис. 3. Временная динамика ингибиторного действия II фракции.

По оси абсцисс — время опыта (в ч); по оси ординат — количество желудочного сока (в мл). 1 — контроль; 2 — введение фракции II.

рольных значений, после чего наступал второй период торможения, когда секреция сока падала до нуля и полностью отсутствовала в течение 1 ч, оставаясь ниже контрольного уровня в последующие 4-й и 5-й часы опыта. Под влиянием фракции III увеличивался латентный период закисления желудка, а разрыв между первой и второй фазами торможения секреции сокращался или совсем отсутствовал. При этом секреция равномерно снижалась на протяжении 4—5 ч опыта в среднем на 50 %.

Ранее сообщалось, что ингибиторная активность в отношении желудочной секреции продуктов ограниченного протеолиза к-казеина пепсином связана с ГМП [7], отщепляемым, как известно, от молекулы к-казеина в результате разрыва одной пептидной связи, Фен 105 — Мет 106 [13], имеющей повышенную чувствительность к действию протеиназ [17]. При этом остальная часть молекулы к-казеина — пара-к-казеин — теряет свою растворимость и выпадает в осадок.

Известно, что пара-к-казеин и ГМП существенно отличаются друг от друга по аминокислотному составу [11, 15]. Такие аминокислоты, как  $\frac{1}{2}$  Цис, Тир, Фен, Гис, Трп и Арг, присутствуют только в пара-к-казеине. Содержание в нем Тре в 7 раз, Вал в 2 раза, Иле в 2 раза ниже, а Лей в 4 раза выше, чем в ГМП. Соотношение Иле/Лей составляет в пара-к-казеине и ГМП соответственно 0,9 и 7.

Исходя из этих четких различий аминокислотного состава пара-к-казеина и ГМП, мы провели сравнение аминокислотных составов выделенных фракций ингибитора. Во всех выделенных фракциях имеются аминокислоты Тир, Фен, Гис, Арг, присущие только пара-к-казеину.

Динамика изменения содержания Тре, Вал, Иле, Лей, имеющих в обеих частях молекулы к-казеина, но в четко различных количествах, показала, что фракции I и II по содержанию этих аминокислот приближаются к ГМП, а содержание их во фракции III приближается к таковому пара-к-казеина. Соотношение Иле/Лей составляет 4,5, 3,0 и 0,6 соответственно для фракций I, II и III, что также свидетельствует о существенном сдвиге аминокислотного состава в сторону пара-к-казеиновой части молекулы при переходе от I к III фракции и, следовательно, о наличии в них фрагментов молекулы пара-к-казеина.

Двухфазный характер ингибирования желудочной секреции свидетельствует о том, что препарат представляет собой комплекс двух ингибиторов, один из которых (ингибитор 1) проявляет свое действие сразу же после введения без латентного периода, когда в механизме желудочной секреции преобладают центрально-первичные влияния, и, следовательно, действие этого ингибитора опосредуется через центральные нервные механизмы. Тормозящее действие второго ингибитора (ингибитор 2) проявляется через 2-часовой латентный период, когда в механизмы желудочной секреции включается весь комплекс гуморальных факторов, обусловленный как перевариванием нутриентов в тонком кишечнике, так и поступлением их из кишечника в кровь.

Латентный период действия ингибитора 2 совпадает с латентным периодом действия ГМП [3], выделенного ранее. Отставленность во времени тормозящего действия ингибитора 2 связана, по-видимому, не только с особенностью механизма его действия, но, возможно, также с необходимостью его дополнительной деградации под влиянием эндогенных протеиназ крови для освобождения активного пептидного биорегулятора, законсервированного в аминокислотной последовательности пептида-предшественника, находящегося в препарате.

Таким образом, введение стадии очистки к-казеина, увеличение фермент-субстратного соотношения на стадии протеолиза и замена диализа фильтрата на экстракцию эфиром позволили увеличить выход ингибитора желудочной секреции на 25—40 % и повысить в 3—4 раза его ингибиторную актив-

ность по сравнению с этими параметрами при использовании ранее описанного метода.

Аминокислотный анализ гель-хроматографических фракций ингибитора свидетельствует о наличии фрагментов пара-к-казеиновой части молекулы. На основании временной кинетики ингибиторного действия сделан вывод о наличии в препарате двух ингибиторов желудочной секреции. Ингибитор I проявляет свое действие сразу после введения и увеличивает латентный период за кислнения желудка. Тормозной эффект ингибитора 2 проявляется через  $1\frac{1}{2}$ —2 ч после введения. Выделенный препарат может быть перспективным лекарственным препаратом для лечения гастродуоденальной патологии, связанной с гиперацидным состоянием.

С учетом исключительной роли казеинов как истинно алиментарных (пищевых) белков новорожденных [8] обнаружение двух ингибиторов желудочной секреции в структуре к-казеина, которые освобождаются из него при протеолизе, имитирующем желудочное переваривание, позволяет рассматривать к-казеин в качестве носителя регуляторных пептидов, чье действие тесно связано с функционированием желудочно-кишечного тракта и может играть важную роль в процессе переваривания и утилизации белков молока в период новорожденности.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Варсанович Е. А., Никольская Г. В., Черников М. П. // *Вопр. питания.* — 1974. — № 1. — С. 31—34.
2. Варсанович Е. А., Усачева Н. Т., Стан Е. Я. и др. // *Вопр. мед. химии.* — 1976. — № 5. — С. 648—651.
3. Василевская Л. С., Стан Е. Я., Черников М. П., Шлыгин Г. К. // *Вопр. питания.* — 1977. — № 4. — С. 21—24.
4. Стан Е. Я., Черников М. П. // *Вопр. мед. химии.* — 1974. — № 6. — С. 644—648.
5. Стан Е. Я., Черников М. П. // *Там же.* — 1979. — № 3. — С. 348—352.
6. Стан Е. Я., Гройсман С. Д., [Красильников К. Б.], Черников М. П. // *Бюл. экспер. биол.* — 1983. — № 7. — С. 10—12.

7. Черников М. П., Никольская Г. В., Стан Е. Я. и др. // *Вопр. питания.* — 1974. — № 2. — С. 21—25.
8. Черников М. П. Протеолиз и биологическая ценность белков. — М., 1975. — С. 203—210.
9. Черников М. П., Стан Е. Я., Василевская Л. С., Шлыгин Г. К. // *Вопр. питания.* — 1979. — № 5. — С. 22—25.
10. Шлыгин Г. К., Василевская Л. С., Черников М. П., Никольская Г. В. // *Бюл. экспер. биол.* — 1971. — № 2. — С. 9—12.
11. Brignon G., Mercier J. C., Ribadeau-Dumas B., Das B. // *FEBS Lett.* — 1972. — Vol. 27. — P. 301.
12. Hipp N., Groves M., Custer J. et al. // *J. Amer. chem. Soc.* — 1950. — Vol. 72. — P. 4928—4931.
13. Jolles J., Alais C., Jolles P. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1968. — Vol. 168. — P. 591—593.
14. Long C. A. // *Analyt. Chem.* — 1958. — Vol. 30. — P. 1692.
15. Mercier J. C., Uro J., Ribadeau-Dumas B., Grosclaude F. // *Europ. J. Biochem.* — 1972. — Vol. 27. — P. 535.
16. Petersen R. F. // *J. Dairy Sci.* — 1963. — Vol. 46. — P. 1136.
17. Visser S., Rooijen P. Y. von, Slanger K. J. // *Europ. J. Biochem.* — 1980. — Vol. 108. — P. 415—421.
18. Zittle C. A., Custer J. H. // *J. Dairy Sci.* — 1963. — Vol. 46. — P. 1183—1188.

Поступила 25.10.85

#### ISOLATION, AMINO ACID COMPOSITION AND EFFICIENCY OF THE INHIBITORS OF GASTRIC SECRETION DERIVED FROM K-CASEIN

E. Ya. Stan, A. P. Ekimovsky, S. I. Aleinik, L. S. Vasilevskaya, M. P. Chernikov

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

Yield of an inhibitor of gastric secretion and its activity were increased after additional step of the k-casein purification as well as a result of increase in the enzyme/substrate ratio at the step of enzymatic hydrolysis and of substitution of the filtrate dialysis by extraction with ether. Amino acid analysis of the gel chromatographic fractions of inhibitor demonstrated the presence of para-k-casein fragments in its molecule. As shown by kinetics of inhibitory action the preparation included two inhibitors of gastric secretion. The inhibitor I exhibited its effect immediately after administration and increased the latent period of the gastric acidification. The effect of the inhibitor II was manifested with in 1.5-2 hrs after administration. The preparation isolated may be an useful drug in treatment of gastroduodenal impairments caused by hyperacidic states.

А. М. Герасимов, Л. В. Гудошникова, Н. Е. Махсон,  
З. И. Уразильдиев

## СВОЙСТВО ПОЛИМОРФНО-ЯДЕРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ ПРОДУЦИРОВАТЬ СУПЕРОКСИД ПРИ ОСТЕОМИЕЛИТЕ

Центральный научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Н. Н. Приорова, Москва

Продукция супероксидного аниона ( $O_2^-$ ) полиморфно-ядерными лейкоцитами, моноцитами и макрофагами является одним из механизмов бактерицидной активности этих клеток [6]. По отношению к тканям макроорганизма усиление генерации  $O_2^-$ , возникающее при вовлечении лейкоцитов в воспалительный процесс, может быть причиной нарушения микроциркуляции [8], деструкции полимеров межклеточного матрикса [9, 12]. После воздействия супероксида плазма крови приобретает хемотактическую активность [13].

В литературе отсутствуют данные о  $O_2^-$ -продуцирующих свойствах лейкоцитов при локальных процессах гнойного воспаления.

В настоящей работе исследовано свойство лейкоцитов периферической крови больных с острым и хроническим остеомиелитом генерировать  $O_2^-$ .

### Методика

Полиморфно-ядерные лейкоциты выделяли из крови больных с острым и хроническим течением остеомиелита костей конечностей и у здоровых доноров. Для этого к 2 мл гепаринизированной крови добавляли 2 мл 10 мМ натрий-фосфатного буфера pH 7,35, содержащего 138 мМ хлорида натрия, 0,6 мМ хлорида кальция и 5,5 мМ глюкозы; разбавленный образец крови (4 мл) наносили на 3 мл Фиколла — Пак и центрифугировали при 400 g 30 мин. Верхний слой, содержащий плазму и лимфоциты, отбрасывали; осадок, содержащий эритроциты и гранулоциты, доводили тем же буфером до 4 мл и вносили в равный объем 3 % раствора декстрана Т-500 на 0,9 % хлориде натрия. Осторожно перемешивали суспензию и оставляли для осаждения слоя эритроцитов отстаиванием примерно до  $1/3$  объема (5—10 мин). Надосадочную жидкость отбирали и центрифугировали при 250 g 10 мин. Для лизиса оставшихся эритроцитов к осадку добавляли 2,5 мл дистиллированной воды и точно через 30 с приливали равный объем 1,8 % хлорида натрия. Отмывали осадок гранулоцитов 0,9 % раствором хлорида натрия и суспендировали в указанной выше буферной среде, не содержащей хлорида кальция. Микроскопически в полученных препаратах выявлялось не менее 85—88 % полиморфно-ядерных клеток. Скорость генерации  $O_2^-$  определяли по количеству ингибируемого

супероксиддисмутазой восстановления цитохрома с при инкубации (37 °C, 30 мин) клеток (около  $10^6$  клеток в мл) в среде (1 мл), содержащей 10 мМ натрий-фосфатного буфера (pH 7,38), 5,5 мМ глюкозы, 138 мМ хлорида натрия, 0,6 мМ  $CaCl_2$ , 100 мкМ цитохрома с, 200 ед. супероксиддисмутазы (или без нее).

Число клеток, добавляемых в среду, определяли при помощи целлюскопа Picoscale или микроскопически. Содержание восстановленного цитохрома с определяли по разнице оптической плотности при 540 и 550 нм с коэффициентом экстинкции  $15,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [14].

Для исследования  $O_2^-$ -генерирующей способности стимулированных клеток в среду инкубации добавляли 0,01 % латекс (частицы 1,1 мкМ, фирма «Serva») и 300 мкМ менадион (конечные концентрации). Содержание белка в клеточных препаратах определяли по Лоури и соавт. [11] после предварительной обработки клеток 0,5 % раствором дезоксихолата натрия в 0,1 н. NaOH.

### Результаты и обсуждение

$O_2^-$ -продуцирующая способность лейкоцитов *in vitro* может быть повышена добавлением различных природных и синтетических веществ [5]. Известно, например, что добавление частиц латекса к лейкоцитам усиливает образование  $O_2^-$  примерно в 2 раза [15].

Таблица 1

Стимуляция продукции  $O_2^-$  лейкоцитами человека в присутствии латекса и менадиона

Стимулятор	Образование $O_2^-$	
	абсолютное нмоль на 1 мг белка	относительное, %*
Без стимулятора	$6,70 \pm 1,52$	$3,4 \pm 3,2$
Латекс	$26,37 \pm 5,75$	$25,2 \pm 6,3$
Менадион	$33,34 \pm 1,25$	$42,6 \pm 9,5$
Латекс + менадион	$43,85 \pm 3,38$	$26,4 \pm 11,2$

\* Доля цитохрома с, восстановленного  $O_2^-$ , от общего количества феррицитохрома, принятого за 100 %. Результаты 6 экспериментов в каждой группе. Отличия от контроля (без стимулятора) во всех группах достоверны при  $P < 0,05$ .

Таблица 2

Образование  $O_2^-$  полиморфно-ядерными лейкоцитами крови у больных с остеомиелитом

Группа	Стимуляция	Образование $O_2^-$ нмоль на $10^6$ клеток за 30 мин
Доноры	— +	$2,42 \pm 1,06$ $8,59 \pm 1,43$
Больные:		
острое течение	— +	$0,31 \pm 0,10$ $1,93 \pm 0,33$
хроническое »	— +	$0,42 \pm 0,16$ $1,78 \pm 0,27$

Примечание. Было исследовано по 6 человек в каждой группе.

В наших условиях постановки эксперимента латекс повышал интенсивность продукции  $O_2^-$  в 3—4 раза (табл. 1). Ранее нами установлено, что витамин  $K_3$  (менадион) также может быть использован в подобных системах в качестве стимулятора [2]. Добавление менадиона повышает на 67 % интенсивность генерации  $O_2^-$ -клетками, стимулированными латексом, т. е. эффект латекса и менадиона аддитивен. Стимулированные таким способом клетки генерируют  $O_2^-$  в 5—6 раз более интенсивно, чем в отсутствие стимуляторов, что объясняется различным механизмом стимуляции клеток этими агентами. Вместе с тем хотя количество электронов, переносимое  $O_2^-$  на цитохром *c* в присутствии двух стимуляторов, выше, чем с каждым из них, но доля  $O_2^-$ -зависимого пути относительно общей мощности внеклеточного транспорта электронов на акцентор при аддитивности оказывается более низкой, чем при действии одного менадиона. Причиной уменьшения относительной мощности  $O_2^-$ -зависимого пути при его абсолютном увеличении может быть ограничение доступности кислорода или снижение сродства менадиона к мембранным рецепторам клеток при фагоцитозе частиц латекса. Что касается действия одного менадиона, то большее возрастание абсолютного и относительного количества  $O_2^-$ , генерируемого лейкоцитами, по сравнению с латексом позволяет рассматривать хиноны, как сравнительно специфичные стимулято-

ры  $O_2^-$ -зависимой биологической активности нейтрофилов *in vitro* и, возможно, *in vivo*.

Участие  $O_2^-$ , генерируемого полиморфно-ядерными лейкоцитами и макрофагами, в бактерицидной способности клеток, с одной стороны, и в процессах окислительной деструкции коллагена и гиалуроновой кислоты [9, 12], с другой, необходимо для «очищения» некротических масс, позволяет предположить, что ослабление  $O_2^-$ -продуцирующих свойств фагоцитов может быть одной из причин существования гнойного очага. Напротив, можно было ожидать, что проникновение в кровяное русло продуктов распада гнойного очага приводит к стимуляции лейкоцитов не только в отношении их хемотактической активности, но и других функциональных параметров, включая  $O_2^-$ -продуцирующую способность. Как оказалось, лейкоциты крови больных с острым и хроническим остеомиелитом в отсутствие стимуляторов продуцируют  $O_2^-$  со скоростью в 3—4 раза меньшей, чем у доноров (табл. 2). Однако колебания величин продукции  $O_2^-$  в группе здоровых и группе хронических больных довольно велики и различия усредненных значений не достигают уровня достоверности. У больных с острым остеомиелитом клетки в нестимулированном состоянии продуцируют  $O_2^-$  достоверно ( $P < 0,001$ ) меньше, чем у доноров. Во всяком случае стимуляции  $O_2^-$ -продуцирующих свойств лейкоцитов в кровеносном русле под влиянием продуктов резорбции из гнойного очага ни при остром, ни при хроническом остеомиелите не происходит. Напротив, в большинстве случаев можно констатировать снижение эндогенных  $O_2^-$ -генерирующих свойств.

Уменьшение продукции  $O_2^-$  клетки в нестимулированном состоянии могло быть следствием либо ослабления их функциональных свойств, либо снижения чувствительности к активирующим сигналам. Для выявления максимальных  $O_2^-$ -продуцирующих свойств в данной работе использована стимуляция одновременно двумя активаторами: и латексом, и менадионом. Оказалось, что лейкоциты больных с острым и хроническим остеомиелитом не отличаются от клеток доноров по свойству

отвечать на присутствие стимуляторов продукции  $O_2^-$  (см. табл. 2). Но образование  $O_2^-$  стимулированными клетками доноров примерно в 4 раза выше, чем больных ( $P < 0,001$ ). Следовательно, общая мощность клеток по образованию  $O_2^-$  в условиях стимуляции при остеомиелите снижена, несмотря на сохранение рецепторной чувствительности лейкоцитов к использованным сигналам активации окислительного метаболизма. Различие между интенсивностью генерации супероксида лейкоцитами больных с острым и хроническим остеомиелитом оказалось недостоверным.

Известно, что угнетение гемолитической активности моноцитов и снижение бактерицидной способности полиморфно-ядерных лейкоцитов, уменьшение хемотактической активности и содержания катионных белков являются факторами риска возникновения гнойного осложнения переломов костей. Представленные выше данные свидетельствуют о недостаточной функции лейкоцитов при остеомиелите и по такому параметру, как  $O_2^-$ -продуцирующие свойства.

Больные с гнойными процессами, как правило, получают массивную антибиотикотерапию. У 3 больных с хроническим остеомиелитом, получавших антибиотики, коэффициент усиления продукции  $O_2^-$ -стимуляторами оказался ниже в 3 раза, чем у леченных без применения антибиотиков, но уровень продукции  $O_2^-$  в стимулированном состоянии не зависел от этих препаратов. Таким образом, эти предварительные данные свидетельствуют о том, что длительная антибиотикотерапия не восстанавливает максимальной мощности продукции  $O_2^-$  лейкоцитами при гнойном воспалении, а вероятно, подавляет ее. Если учесть полученные ранее данные о свойствах антибиотиков взаимодействовать с  $O_2^-$  и ингибировать  $O_2^-$  зависимые процессы [3], то можно предполагать, что уменьшение эффективности  $O_2^-$ -зависимых процессов антибиотиками может быть весьма важным фактором ослабления бактерицидной функции лейкоцитов при длительной антибиотикотерапии.

Представленные выше данные о снижении  $O_2^-$ -продуцирующих свойств полиморфно-ядерных лейкоцитов кро-

ви при остеомиелите не позволяют однозначно оценить состояние окислительного метаболизма фагоцитирующих клеток в зоне гнойного очага, хотя и могут служить достаточным основанием для предположения о их недостаточности, как возможном патогенетическом факторе ослабления «окислительного фагоцитоза» [6] и способности к резорбции некротических масс фагоцитами очага. Следует отметить, что активность миелопероксидазы — фермента, необходимого для окислительной деструкции микробов и клеточных фрагментов внутри фагоцита, при остеомиелите снижается [1], уменьшается число функционирующих СЗ-рецепторов мембран гранулоцитов и способность к усилению восстановления пирозинового тетразолия при стимуляции клеток эндотоксином *E. coli* [10]. Поскольку многие параметры функциональной активности лимфоцитов при остеомиелите также снижены [4, 7], можно думать об ослаблении функции иммунокомпетентных клеток организма при гнойном процессе в костной ткани.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Галанови Р. Я. // Съезд травматологов-ортопедов Украины: 8-й: Тезисы докладов. — Киев. — 1979. — С. 132—133.
2. Герасимов А. М., Гудошникова Л. В., Топорова С. М., Топоров Ю. А. // Взаимодействие ультразвука с биологической средой. — М., 1983. — С. 21.
3. Герасимов А. М., Овчинников К. Г., Мельникова В. М. // Антибиотики. — 1984. — № 8. — С. 600—604.
4. Лизик Г. М. // Съезд травматологов-ортопедов Украины: 8-й. Тезисы докладов. — Киев, 1979. — С. 130—131.
5. Маянский А. Н., Маянский Д. Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. — Новосибирск, 1983.
6. Панченко Л. Ф., Герасимов А. М., Антоненков В. Д. Роль пероксида в патологии клетки. — М., 1981.
7. Руиндеж Т. Г., Шеина Э. П., Ахундов А. А., Алиев А. Г. // Съезд травматологов-ортопедов Украины: 8-й. Тезисы докладов. — Киев, 1979. — С. 133—135.
8. Del Maestro R. F., Björk J., Arfors K. E. // Microvasc. Res. — 1981. — Vol. 22. — P. 239—270.
9. Greenwald R. A. // Biological and Clinical Aspects of Superoxide and Superoxide Dismutase. — New York, 1980. — P. 160—171.
10. Hierholzer S., Hierholzer G. // Unfallheilkunde. — 1980. — Bd 83. — S. 241—244.



11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem., — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
12. McCord J. M. // Science. — 1974. — Vol. 185. — P. 529—531.
13. McCord J. M., Roy R. S. // Canad. J. Physiol. Pharmacol. — 1982. — Vol. 60. — P. 1346—1352.
14. Nakagawara A., Minakama S. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1975. — Vol. 64. — P. 760—767.
15. Salin M. L., McCord J. M. // J. clin. Invest. — 1974. — Vol. 54. — P. 1005—1009.

Поступила 05.12.85

## THE PROPERTY OF POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES TO PRODUCE SUPEROXIDE ANION IN OSTEOMYELITIS

A. M. Gerasimov, L. V. Gudoshnikova, N. E. Makhson, Z. I. Urazgil'diev

Central Institute of Traumatology and Orthopaedics, Moscow

Rate of superoxide anion production was decreased in blood polymorphonuclear leukocytes of patients with acute and chronic osteomyelitis both in absence of an activator and after stimulation of the cells by latex particles and menadion *in vitro*.

УДК 616-056.43-07:[616.153.1:577.152.34+616.154:577.175.85]

Н. М. Ненашева, В. Л. Доценко, Л. А. Горячкина, Г. А. Яровая

## АКТИВНОСТЬ СИСТЕМЫ ПРЕКАЛЛИКРЕИН — КАЛЛИКРЕИН И ОСОБЕННОСТИ ЕЕ РЕГУЛЯЦИИ ПРИ НЕКОТОРЫХ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

ЦОЛИУВ, Москва

В изучении патогенеза ряда патологических состояний большое внимание уделяется калликреин-кининовой системе (ККС). Это объясняется высокой биологической активностью кининов, широким спектром их действия, тесным взаимодействием этой системы с другими протеолитическими системами крови (гемокоагулирующей, фибринолитической, ренин-ангиотензиновой, компонентом), ответственными за поддержание гемодинамического равновесия, сосудистого тонуса и участвующими в защитных реакциях организма. При многих патологических состояниях происходит нарушение адаптивно-регуляторной функции ККС, что делает определение ее активности важным моментом в изучении патогенеза заболевания и выбора тактики лечения [2].

При изучении аллергических заболеваний интерес к ККС, в частности к определению активности основного кининообразующего фермента плазмы крови — калликреина (К) и содержания его предшественника прекалликреина (ПК) как важным показателям активности системы, обусловлен сходством патогенетического действия кининов (расширение капилляров и увеличение их проницаемости, спазм гладкой мускулатуры бронхов) и аллергических реакций у человека. Кроме того, брадикинин стимулирует синтез простагландинов в тканях [12, 16], способствует освобождению катехоламинов из над-

почечников, гистамина и серотонина из тучных клеток [16].

Активация ККС при немедленной гиперчувствительности возможна как результат взаимодействия антигена с антителом класса иммуноглобулинов Е (IgE) на поверхности мембран базофилов и секреции из них биологически активных веществ, среди которых имеются высокомолекулярные медиаторы, обозначенные как базофильная калликреиноподобная активность (БКА) [13, 14]. БКА генерирует кинины из кининогена плазмы, отщепляет от фактора Хагемана активный фрагмент, способный активировать ПК в К, активирует плазминоген в плазмин [15]. БКА может оказаться важным звеном между реакциями повышенной чувствительности и каскадными системами плазмы крови [14, 15].

Несмотря на широкое изучение ККС при аллергии, ряд вопросов в этой области остается нерешенным. В частности, почти не изучена роль ККС при атонической астме, реакция со стороны системы на специфическую иммунотерапию (СИТ) аллергенам. Остается невыясненным вопрос об участии ингибиторов К в регуляции кининогенеза при атопии, неизвестна роль  $\alpha$ -1-протеолитического ингибитора ( $\alpha$ -1-ПИ) и его дефицита в развитии аллергических состояний. Между тем эти данные могли бы способствовать не только пониманию патогенеза заболевания, но и

правильному выбору терапевтических мероприятий.

Целью настоящей работы было определение активности ККС в сыворотке крови больных поллинозом с клиническими проявлениями пылевой бронхиальной астмы и без таковой. Активность К, а также ПК,  $\alpha$ -1-ПИ и  $\alpha$ -2-макроглобулина ( $\alpha$ -2-МГ) изучали у больных атопией, получавших специфическую иммунотерапию, у пациентов с острой и хронической крапивницей.

### Методика

Активность К и содержание его предшественника ПК в сыворотке крови больных определяли хроматографическим методом после отделения от других протеиназ и их проферментов на ДЭАЭ-сфадексе А-50 («Pharmacia Fine Chem.», Швеция). Об активности К судили по начальной скорости расщепления N-бензил-L-аргинин-этилового эфира (БАЭЭ, «Reanal», ВНР) не адсорбированной на анионообменнике фракцией; количество предшественника оценивали после активирования его трипсином («Sprot», ЧССР) и подавления активности последнего овомукоидом (Олайнский завод) [3, 4]. Активность К и содержание ПК, определенные данным методом в сыворотке крови здорового человека, равны соответственно  $13,8 \pm 0,5$  и  $334 \pm 10,8$  МЕ/мл [4].

Активность  $\alpha$ -1-ПИ и  $\alpha$ -2-МГ в сыворотке крови определяли унифицированным энзиматическим методом В. Ф. Нартиковой и Т. С. Пасхиной [1], принимая за норму величины, полученные авторами метода —  $29,9 \pm 1,2$  и  $4,9 \pm 0,12$  ИЕ/мл соответственно.

У 10 больных, у которых выявилась низкая активность  $\alpha$ -1-ПИ в сыворотке крови, было проведено фенотипирование  $\alpha$ -1-ПИ методом изоэлектрофокусирования в ПААГ при pH 3,5—6,0 [9, 11].

Обследован 51 больной, находившийся на лечении в аллергологическом стационаре. Всем им были проведены общеклиническое и специфическое аллергологическое обследования, определение уровня общего IgE в сыворотке крови иммуноферментным методом (совместно с аллергологической лабораторией Московского НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова). Больные были разделены на 3 группы.

В 1-ю группу вошли 17 больных поллинозом в возрасте от 16 до 62 лет. Из них 13 обследовано в момент обострения болезни (сезон цветения), в том числе 5 больных с ярко выраженным обострением и 8 с менее выраженной клиникой обострения. В состоянии ремиссии (вне сезона цветения) были обследованы 4 больных. Клинические проявления поллиноза у лиц этой группы были различными: у 3 больных имел место риноконъюнктивит, у 7 — риноконъюнктивит и предастма и у 7 — риноконъюнктивит и пылевая бронхиальная астма преимущественно легкого и среднетяжелого течения.

Во 2-ю группу выделены 17 больных в возрасте от 15 до 52 лет, получавших СИТ аллергенами, на которые была выявлена у них повышенная чувствительность. Исследование проводили до начала СИТ и после окончания стационарного курса лечения. В дальнейшем боль-

ные продолжали СИТ амбулаторно поддерживающими дозами аллергена. СИТ всем больным проводили по ускоренной схеме, начиная с разведения аллергена  $10^{-6}$  при первом курсе лечения (12 больных) и с разведения  $10^{-5}$  при повторных курсах (5 больных).

В 3-ю группу вошли 17 больных крапивницей в возрасте от 18 до 58 лет. Из них острой крапивницей страдало 6 человек; уртикарные высыпания и отеки типа Квинке были связаны с приемом лекарственных препаратов (витамины группы В, антибиотики и сульфаниламиды, новокаин, пиразолоновые препараты). 11 больных хронической рецидивирующей крапивницей (средняя длительность болезни 1—2 года) не могли указать причины, вызывающей высыпания.

Антигистаминовая терапия, начатая у всех больных за 2—3 дня до исследования, оказалась малоэффективной у больных с хронической крапивницей. 5 лицам этой группы был проведен курс лечения препаратами ингибиторов протеиназ: 4 больных получали контрикал (ВЕВ, ГДР) и 1 — гордокс («Гедсон Рихтер», ВНР). Препараты вводили внутривенно капельно в физиологическом растворе. Дозу препарата подбирали индивидуально. Средняя доза на курс составляла 195 тыс. ед. Исследование К, ПК, ингибиторов протеиназ у этих больных проводили до и после лечения.

### Результаты и обсуждение

Результаты определения К, ПК и ингибиторов протеиназ у больных 1-й группы представлены в табл. 1. Как видно из этой таблицы, у 5 больных с аллергией к пыльце деревьев, у которых в период исследования отмечалось выраженное обострение поллиноза, активность К была достоверно выше, чем у 8 больных с аллергией к пыльце злаковых трав в сочетании (или без) с аллергией к пыльце деревьев или сорных трав ( $P < 0,01$ ), у которых обследование было проведено в сезон цветения злаков. У последних больных обследованию предшествовала длительная антигистаминовая терапия, и клиническая картина обострения была стертой. Активность К у 4 больных, обследованных в состоянии ремиссии, приближалась к нулю. Содержание ПК у всех больных поллинозом в состоянии обострения была ниже нормальных величин и достоверно ниже содержания ПК у больных, обследованных в состоянии ремиссии ( $P < 0,01$ ).

Таким образом, при поллинозе в период обострения болезни наблюдается активация ККС, обусловленная степенью выраженности обострения. Зависимости исследуемых показателей от клинических проявлений заболевания, в частности от наличия астматического компонента, не обнаружено. Некоторое

Таблица 1

Результаты исследования общего IgE, К, ПК и ингибиторов протейназ в сыворотке крови больных 1-й группы

Подгруппа обследованных	К	ПК	$\alpha$ -1-ПИ	$\alpha_2$ -МГ	Общий IgE
Здоровые лица	13,8 $\pm$ 0,5	334 $\pm$ 10,8	29,9 $\pm$ 1,2	4,9 $\pm$ 0,12	75,9 $\pm$ 9,0
Больные с аллергией к пыльце деревьев, имевшие выраженное обострение болезни (5)	76,5 $\pm$ 19,13	142 $\pm$ 29,4	31,0 $\pm$ 4,49 (3)	6,17 $\pm$ 0,8	322 $\pm$ 92,2
Больные с аллергией к пыльце злаков и деревьев (5) и к пыльце злаковых и сорных трав (3), имевшие стертую клинику обострения	9,25 $\pm$ 6,46	141 $\pm$ 20,8	3,4 $\pm$ 3,4* (2)	4,3 $\pm$ 0,47	176 $\pm$ 55,5
Больные поллинозом, обследованные в состоянии ремиссии (4)	0	278 $\pm$ 15,3	34,9 $\pm$ 4,0	4,3 $\pm$ 0,47	176 $\pm$ 55,5
			25,6 $\pm$ 1,94	4,42 $\pm$ 0,28	520 $\pm$ 187

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 в скобках число больных в подгруппах. Звездочкой отмечен уровень  $\alpha$ -1-ПИ у больных с дефицитным фенотипом.

снижение содержания ПК в состоянии ремиссии у больных поллинозом по сравнению с нормой, возможно, является показателем неполного излечения больных.

У больных с выраженным обострением поллиноза отмечено значительное повышение ингибиторной активности  $\alpha_2$ -МГ. Столь заметное для данного ингибитора повышение активности может быть вызвано увеличением его концентрации как высокомолекулярного белка при некотором сгущении крови (белок сыворотки у больных данной группы составлял 7,65 $\pm$ 0,1 %). Возрастание его относительной концентрации среди остальных белков плазмы крови могло быть обусловлено высокой проницаемостью капилляров для белков средней и низкой молекулярных масс на фоне активации ККС.

Содержание  $\alpha$ -1-ПИ у больных поллинозом имело тенденцию к повышению, однако эти изменения достоверно не отличались от нормы. Такой незначительный ответ  $\alpha$ -1-ПИ, белка острой фазы, на обострение аллергического воспаления требовало дополнительного анализа. При фенотипировании  $\alpha$ -1-ПИ у 2 больных с наименьшей активностью этого ингибитора был обнаружен дефицитный MS-тип, что позволило выделить этих больных в отдельную подгруппу. Причины слабого реагирования  $\alpha$ -1-ПИ у остальных больных остались неясными.

Результаты исследования активности К, содержания ПК,  $\alpha$ -1-ПИ и  $\alpha_2$ -МГ в сыворотке крови больных, получавших

СИТ, представлены в табл. 2. У всех больных до СИТ наблюдалась активация ККС, вероятно, связанная со сроками исследования: у большинства больных кровь для исследования брали на 4—5-й день пребывания в стационаре, когда эффект элиминации был неполным, либо когда клиническому благополучию не соответствовала еще нормализация биохимических показателей.

Как видно из табл. 2, в результате СИТ происходит еще более глубокое активирование ККС: уменьшение содержания ПК ( $P < 0,05$ ) у всех больных этой группы и резкое увеличение активности К ( $P < 0,01$ ) у больных с бытовой и пыльцевой, перекрестной пищевой и лекарственной аллергиями, которым СИТ проводили несколькими смесями аллергенов и которые к моменту повторного исследования получали достоверно большую суммарную дозу аллергенов (990 $\pm$ 508 PNU), чем больные бытовой аллергией, получавшие СИТ одной смесью аллергенов из домашней пыли. У больных с бытовой и пыльцевой аллергией отмечались и более выраженные реакции на инъекции аллергена в процессе СИТ.

Осталась невыясненной причина низкой активности К у лиц с бытовой аллергией при значительном снижении содержания ПК и несколько более высоком значении  $\alpha_2$ -МГ.

Содержание  $\alpha$ -1-ПИ до СИТ оказалось повышенным только у больных бытовой аллергией, получавших СИТ одной смесью аллергенов из домашней

Таблица 8

Результаты исследования общего IgE, К, ПК и ингибиторов протеиназ в сыворотке крови больных 2-й группы

Подгруппа обследуемых	Суммарная доза аллергена, полученная в стационаре	Общее IgE		К		ПК		$\alpha$ -1-ПИ		$\alpha_2$ -МГ	
		до СИТ	по окончании СИТ	до СИТ	по окончании СИТ	до СИТ	по окончании СИТ	до СИТ	по окончании СИТ	до СИТ	по окончании СИТ
Больные бытовой аллергией, получавшие СИТ одной смесью аллергенов из домашней пыли (11)	338 $\pm$ 111	247 $\pm$ 98	901 $\pm$ 179	26,9 $\pm$ 8,41	0	238 $\pm$ 23,7	177 $\pm$ 15,3	39,4 $\pm$ 3,29	29,8 $\pm$ 4,63	5,5 $\pm$ 0,73	5,26 $\pm$ 0,49
Больные пыльцевой и бытовой аллергией, получавшие лечение пыльцевыми и бытовыми аллергенами (6)	990 $\pm$ 508	343 $\pm$ 132	324 $\pm$ 69,2	1,49 $\pm$ 10,3	54,5 $\pm$ 4,67	242 $\pm$ 35,6	191 $\pm$ 29,8	30,7 $\pm$ 7,8 (4) 14,3 $\pm$ 0,71* (2)	26,6 $\pm$ 5,73 22,9 $\pm$ 1,04*	4,55 $\pm$ 0,35	4,63 $\pm$ 0,43

пыли. Больные с сочетанной аллергией на пыльцевые и бытовые аллергены не реагировали повышением концентрации этого ингибитора. Проведение СИТ даже несколько снижало его содержание. В результате исследования фенотипических проявлений ингибитора у 2 больных этой подгруппы с особенно низким уровнем  $\alpha$ -1-ПИ выявилось у них частично дефицитный MS-тип.

Из изложенного, по-видимому, следует, что СИТ приводит ККС к еще более глубокому активированию на фоне практически не меняющегося или даже снижающегося содержания ингибиторов. Очевидно, определение степени ее активирования может служить критерием переносимости СИТ, в частности СИТ ускоренным методом. По-видимому, целесообразно при регистрации высокой активности К (в 2 раза и более выше нормы) и низкого содержания ПК (меньше 250—200 мЕ/мл) в сыворотке крови больного, которому проводится СИТ ускоренным методом, делать большие интервалы между инъекциями аллергенов и (или) применять препараты — естественные ингибиторы протеиназ (контрикал, трасилол и др.).

Полученные данные об изменении компонентов ККС в процессе СИТ согласуются с данными других авторов [6]. Активация ККС в процессе СИТ возможна как результат реакции аллерген + специфическое IgE-антитело [13, 15], которая наблюдается при ускоренном методе СИТ и следствием которой является истощение клеток-мишеней аллергической реакции [5].

Результаты определения К, ПК и ингибиторов протеиназ у больных крапивницей представлены в табл. 3. Как видно из этой таблицы, у больных этой группы наблюдается активация ККС, проявляющаяся в снижении содержания ПК и повышении активности К, причем наиболее выраженными эти изменения были у больных хронической рецидивирующей крапивницей в стадии выраженного обострения.

Активность  $\alpha$ -1-ПИ оказалась повышенной у больных острой крапивницей и в группе больных хронической крапивницей с единичными уртикариями. У больных хронической крапивницей в стадии выраженного обострения, несмотря на клиническую картину аллергического воспаления, ингибиторная активность  $\alpha$ -1-ПИ незначительно отличалась от нормы. Фенотипирование

Результаты исследования общего IgE, К, ПК и ингибиторов протеиназ в сыворотке крови больных 3-й группы

Подгруппа обследованных	Общий IgE	К	ПК	$\alpha$ -1-ПИ	$\alpha$ -2-МГ
Больные острой крапивницей (6)	125 $\pm$ 46,4	19,0 $\pm$ 10,1	184 $\pm$ 53,4	39,9 $\pm$ 8,27 (4) 15,0 $\pm$ 0,005 (2)*	3,56 $\pm$ 0,4
Больные хронической крапивницей в стадии выраженного обострения (7)					
Больные хронической крапивницей с единичными уртикариями или без них (4)	183 $\pm$ 67,5	67,0 $\pm$ 12,2	170 $\pm$ 9,96	33,7 $\pm$ 6,81	3,17 $\pm$ 0,35
	177 $\pm$ 128	16,2 $\pm$ 11,1	165 $\pm$ 39,0	41,4 $\pm$ 8,29	4,25 $\pm$ 0,45

ингибитора у больных острой крапивницей с низким уровнем активности выявило 2 больных с MS- и MZ-фенотипами.

У больных как острой, так и хронической крапивницей выявлены необъяснимо низкие величины активности  $\alpha$ -2-МГ. Заметное снижение содержания этого ингибитора в плазме крови может свидетельствовать, как указывают некоторые авторы [7, 8, 10], об интенсификации протеолитических процессов в тканях, что может иметь место при обострении крапивницы.

Как указано выше, 5 больным с выраженным обострением хронической рецидивирующей крапивницы был проведен курс лечения препаратами ингибиторов протеиназ. Средние значения исследуемых компонентов ККС и ингибиторов до и после лечения у этих больных представлены в табл. 4. У всех больных отмечалось улучшение состояния в процессе лечения: уртикарные высыпания исчезали сразу после капельницы, но через некоторое время (3—12 ч) возникали вновь, хотя и в меньшем количестве, чем до инфузии препарата. После окончания курса лечения наступала ремиссия заболевания, которая длилась от 7—10 дней до 2—3 нед, что свидетельствует о времен-

ном эффекте терапии. У 4 больных отмечено на фоне проводимого курса лечения ингибиторами протеиназ повышение эффективности антигистаминовых препаратов и пролонгирование их действия. Результаты исследования компонентов кининовой системы  $\alpha$ -1-ПИ и  $\alpha$ -2-МГ у больных данной группы после лечения природными ингибиторами протеиназ выявили достоверное снижение активности К после лечения ( $P < 0,05$ ), повышение содержания ПК, что свидетельствует о тенденции к нормализации активности ККС, несмотря на временный эффект, получаемой от терапии ингибиторами, этот метод все же можно рекомендовать больным хронической рецидивирующей крапивницей неясной этиологии в случае, если не получен эффект от других видов лечения, в том числе антигистаминовой терапии.

В целом полученные данные позволяют сделать следующие выводы.

Для правильного выбора терапевтических мероприятий при обострении аллергических заболеваний может быть рекомендовано определение степени активации ККС плазмы крови хроматографическим методом.

При поллинозе, в период обострения болезни, происходит активация ККС

Т а б л и ц а 4

Результаты определения К, ПК и ингибиторов протеиназ у больных, получавших лечение препаратами естественных ингибиторов протеиназ

Время обследования	К	ПК	$\alpha$ -1-ПИ	$\alpha$ -2-МГ
До лечения	64,4 $\pm$ 17,8	166 $\pm$ 15,4	38,2 $\pm$ 6,62	3,12 $\pm$ 0,46
После лечения	11,7 $\pm$ 13,0	246 $\pm$ 36,6	50,0 $\pm$ 9,28	3,87 $\pm$ 0,33



сыворотки крови, обусловленная степенью выраженности обострения.

В процессе СИТ происходит активация ККС, более выраженная у больных, страдающих аллергией ко многим видам экзоаллергенов и получающих СИТ несколькими смесями аллергенов. Активация ККС при СИТ зависит от общей суммарной концентрации аллергена, полученной к моменту исследования.

Определение активности К и содержания ПК в сыворотке крови больных может служить критерием переносимости СИТ ускоренным методом.

Активация калликреин-кининовой системы при хронической крапивнице более глубока, чем при острой, и зависит от степени выраженности обострения крапивницы.

Препараты ингибиторов протеиназ (контрикал, гордокс) дают временный эффект при хронической рецидивирующей крапивнице, стойкой к антигистаминным препаратам.

У больных поллинозом и крапивницей даже в стадии выраженного обострения не выявлено значимого увеличения  $\alpha$ -1-ПИ.

Фенотипирование  $\alpha$ -1-ПИ у индивидов со значительным снижением активности данного ингибитора выявило гетерозиготный генотип с дефектным аллелем.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Нартикова В. Ф., Пасхина Т. С. // Вопр. мед. химии. — 1979. — Т. 25, № 4. — С. 494.
2. Пасхина Т. С., Яровая Г. А. // Биохимия. — 1970. — Т. 35, № 5. — С. 1055—1058.
3. Пасхина Т. С., Доценко В. Л., Блинные Е. И. // Там же. — 1973. — Т. 38. — С. 420—423.
4. Пасхина Т. С. // Целенаправленный поиск новых сердечно-сосудистых препаратов. — Рига, 1980. — С. 50—70.
5. Порошина Ю. А., Полсачева О. В., Титова С. М., Шустова В. И. // Иммунология. — 1985. — № 1. — С. 50—54.
6. Ханцис Е. А.: Автореф. дис. канд. мед. наук. — М., 1979.
7. Beatby K., Travis J., Bieth J. // Biochim. biophys. Acta. — 1982. — Vol. 704. — P. 221—226.
8. Brissenden J. E., Nilson Cox D. // Clin. chim. Acta. — 1983. — Vol. 128. — N 2—3. — P. 241—248.
9. Fagerhol M. K., Layrell C. B. // Ibid. — 1967. — Vol. 16. — P. 199.

10. Gonias S. J., Balber A. E., Hubbard W. Y., Pizzo S. V. // Biochem. J. — 1983. — Vol. 209. — P. 99—106.
11. Hoffman J. J., Van Den Brock W. // Clin. chim. Acta. — 1977. — Vol. 75. — P. 233—242.
12. McGiff J. C., Itskovitz H. D., Terragno A., Nonq P. J.-K. // Fed. Proc. — 1976. — Vol. 35. — P. 175—180.
13. Newball H. H., Talamo R. C., Lichtenstein L. M. // Nature. — 1975. — Vol. 254. — P. 633—636.
14. Newball H. H., Talamo R. C., Lichtenstein L. M. // J. clin. Invest. — 1979. — Vol. 64. — P. 466—475.
15. Newball H. H., Meier H. L., Lichtenstein L. M. // J. invest. Derm. — 1980. — Vol. 74. — P. 344—348.
16. Terragno A., Terragno H. Handbook of Experimental pharmacology. — Berlin, 1979. — Vol. 25. — P. 401—426.

Поступила 02.12.85

#### ACTIVITY OF THE PREKALLIKREIN-KALLIKREIN SYSTEM AND CHARACTERISTIC PROPERTIES OF ITS REGULATION IN SOME ALLERGIC DISEASES

N. M. Nenashina, V. L. Dotsenko, L. A. Goryachkina, G. A. Yarovaia

Central Institute for Postgraduate Training of Physicians, Moscow

Activity of kallikrein and content of prekallikrein were estimated in blood serum of 34 patients with atopy and of 17 patients with urticaria by means of the chromatographic procedure. In these patients activity of  $\alpha_1$ -proteolytic inhibitor ( $\alpha_1$ -PI) and  $\alpha_2$ -macroglobulin ( $\alpha_2$ -MG) was studied. At the acute period of pollinosis activation of the kallikrein-kinin system was found, which correlated with the disease aggravation. During specific immunotherapy of the patients with atopy activation of the kallikrein-kinin system occurred, which depended on the total concentration of allergen administered. At the same time, activation of the kallikrein-kinin system, observed under conditions of urticaria, was most distinct in the patients with chronic relapsing urticaria and was related to the degree of the disease aggravation. Preparations of proteinase inhibitors analogous to contrical were only short-term effective in chronic relapsing urticaria. In the patients with distinct aggravation of pollinosis inhibitory activity of  $\alpha_2$ -MG was markedly increased which occurred apparently as a result of blood pachyemia simultaneously with activation of the kallikrein-kinin system. Distinct increase in the  $\alpha_1$ -PI activity was not found in the patients with pollinosis and urticaria even at the step of pronounced aggravation. Phenotyping of the inhibitor in 10 patients with a marked decrease in its activity enabled to find 6 persons exhibiting the heterozygous genotype with a defect allele.

*И. С. Лукомская, Т. П. Лавренова, Н. А. Томилина,  
М. Л. Зубкин, Н. Д. Федорова*

## ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ НЕЙТРАЛЬНОЙ $\alpha$ -ГЛЮКОЗИДАЗЫ И N-АЦЕТИЛ- $\beta$ -D-ГЕКСОЗАМИНИДАЗЫ В МОЧЕ ПРИ ПАТОЛОГИИ ПОЧЕК

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР и НИИ трансплантологии  
и искусственных органов Минздрава СССР, Москва

Определение активности различных ферментов в моче для диагностики повреждения почек давно привлекает внимание биохимиков и клиницистов. Наибольший интерес представляет определение в моче активности ферментов, имеющих почечное происхождение. К таким ферментам относится нейтральная  $\alpha$ -глюкозидаза мочи [2, 8, 13, 14]. Иммунохимическим методом было показано [15], что в почках человека нейтральная  $\alpha$ -глюкозидаза содержится в эпителиальных клетках извитых канальцев и отсутствует в клубочках. Фермент локализован преимущественно в щеточной кайме (мембранно-связанная форма) этих клеток и лишь около 8 % от общей активности содержится в цитозоле (растворимая форма) [9]. Растворимая и мембранно-связанная  $\alpha$ -глюкозидазы являются близкими ферментами, и синтез обоих форм фермента кодируется, очевидно, одним структурным геном [5]. В моче содержится в основном растворимая (цитозольная) форма фермента [2]. Фермент, идентичный нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазе почек и мочи, был обнаружен только в эпителиальных клетках слизистой оболочки кишечника [11] и не найден в других органах и тканях [15]. Ранее [4] было показано, что при поражении почек активность нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы в моче возрастает и что фермент может служить маркером на повреждение почек.

Настоящее исследование посвящено выяснению диагностического значения определения активности нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы в моче при различных нефронпатиях. Для сравнения в тех же образцах мочи определяли активность лизосомальной N-ацетил- $\beta$ -D-гексозаминидазы ( $\beta$ -гексозаминидазы), которая считается [17] одним из лучших ферментов-маркеров на повреждение почек.

### Методика

Активность нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы определяли по скорости образования глюкозы из мальтозы. Реакционная смесь состояла из 0,1 мл диализованной мочи и 0,2 мл 0,2 М калий-фосфатного буфера pH 6,5, содержащего 8,3 мМ мальтозу. При определении расщепления мальтозы при pH 4,5 реакционная смесь включала в себя 0,1 мл диализованной мочи и 0,2 мл 0,2 М ацетатного буфера pH 4,5, содержащего 8,3 мМ мальтозы. Пробы инкубировали 30 мин при 37 °C. Реакцию останавливали кипячением в течение 2 мин. Образовавшуюся глюкозу определяли глюкозооксидазным методом [3].

Активность N-ацетил- $\beta$ -D-гексозаминидазы ( $\beta$ -гексозаминидазы) определяли по количеству образовавшегося п-нитрофенола при расщеплении п-нитрофенил-N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминида [12]. Реакционная смесь состояла из 0,2 мл диализованной мочи и 0,2 мл 0,5 М цитратного буфера pH 4,5, содержащего 7,5 мМ п-нитрофенил-N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминид. Инкубацию проводили 1 ч при 37 °C. Реакцию останавливали добавлением 3 мл 0,1 М  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Оптическую плотность образовавшегося п-нитрофенола измеряли при 400 нм.

Активность ферментов в моче выражали в микромолях распавшегося субстрата на 1 ммоль креатинина в 1 ч.

При сравнительном определении активности ферментов в диализованной и недиализованной моче об активностях  $\alpha$ -глюкозидазы и  $\beta$ -гексозаминидазы судили по образованию 4-метилумбеллиферона при расщеплении соответственно 4-метилумбеллиферил- $\alpha$ -D-глюкопиранозид и 4-метилумбеллиферил-N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминида. Реакционная смесь состояла из 0,2 М калийфосфатного буфера pH 6,5, содержащего 1 мМ 4-метилбеллиферил- $\alpha$ -D-глюкопиранозид, или из 0,2 М цитратного буфера pH 4,5, содержащего 1 мМ 4-метилумбеллиферил-N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминид, и аликвоты мочи. Общий объем реакционной смеси составлял 0,25 мл. Смеси инкубировали 30 мин при 37 °C. Реакции останавливали добавлением 5 мл 0,1 М  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Флюоресценцию образовавшегося 4-метилумбеллиферона определяли на флюориметре «Биан-130» (СССР) при возбуждении 365 нм и испускании при 436 нм.

При определении активности нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы в диализованной и недиализованной моче 10 больных было установлено, что хотя в 60 % случаев активность фермента в обоих образцах мочи была одинаковой, в 40 % случаев в моче больных присутствовал диализуемый ингибитор нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы,

ингибирующий фермент на 20—50 %. Ингибирование активности фермента наблюдали даже при 80-кратном разведении мочи в пробе. В педиализованной моче этих больных отмечали также ингибирование  $\beta$ -гексозаминидазной активности на 18—55 %. Ингибирование этого фермента было более выраженным при использовании в качестве субстрата *p*-нитрофенил-*N*-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминида, когда разведение мочи в инкубационных пробах было незначительным (1:1). При 20—40-кратном разведении мочи в пробе ингибирование активности  $\beta$ -гексозаминидазы сохранялось, но проявлялось в меньшей степени. В связи с наличием в моче у некоторых больных диализуемого ингибитора (или ингибиторов) нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы и  $\beta$ -гексозаминидазы определение этих ферментов проводили в диализованной моче.

Ранее [4] было показано, что нейтральная  $\alpha$ -глюкозидаза не утрачивает активности во время длительного хранения педиализованной мочи при 2°C или в замороженном состоянии (от 14 до 20°C). Хранение 6 образцов мочи при -20°C в течение 2 мес не приводило к заметному изменению активности как нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы, так и  $\beta$ -гексозаминидазы.

В связи с изложенным активности нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы и  $\beta$ -гексозаминидазы определяли в моче, собранной за 1 ч (с 7 до 8 ч утра). Мочу использовали тотчас же после сбора или хранили в замороженном состоянии от 14 до 20°C в течение 5—10 дней. Для определения активности ферментов 5 мл мочи диализовали против 25 мМ NaCl, содержащего 1 мМ ЭДТА pH 6,7, в течение суток при 4°C.

В связи с тем что в моче, кроме нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы (оптимальный pH 5,75—6,5), присутствует кислая лизосомальная  $\alpha$ -глюкозидаза (оптимальный pH 4,5), необходимо было убедиться, что определяемая при pH 6,5 активность нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы не завышена за счет активности кислого фермента. Для этого во всех образцах диализованной мочи активность фермента определяли при pH 6,5 и 4,5. Поскольку известно [2], что при pH 4,5 активность нейтрального фермента составляет примерно 60 % от его активности при оптимальном pH, то активность кислой  $\alpha$ -глюкозидазы в моче рассчитывали по разности между величиной активности, измеренной при pH 4,5, и величиной, составляющей 60 % от активности, измеренной при pH 6,5. Во всех случаях рассчитанная таким способом активность кислой  $\alpha$ -глюкозидазы не превышала активность, измеренную при pH 6,5. Поскольку кислая  $\alpha$ -глюкозидаза обладает крайне низкой активностью при pH 6,5 [18], то активность, измеренную при pH 6,5, принимали за истинную активность нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы.

Концентрацию белка в моче определяли биуретовым методом [10], концентрацию креатинина в сыворотке крови больных и в моче — по реакции Яффе в модификации Поппера и соавт. [16]. Клиренс креатинина рассчитывали как среднее из двух определений, проведенных в двух 1-часовых пробах, взятых утром натощак (с 7 до 8 или с 8 до 9 ч) после водной нагрузки (500—700 мл).

Способность почек к осмотическому концентрированию мочи оценивали по максимальной осмолярности мочи в условиях дегидратации в течение 36 ч.

Достоверность различий устанавливали при помощи критерия Стьюдента; при анализе ре-

зультатов использовали корреляционный анализ [1].

Обследовано 55 здоровых (18 женщин и 37 мужчин) людей в возрасте от 20 до 56 лет и 123 больных (55 женщин и 68 мужчин) с различными заболеваниями почек. Возраст больных колебался от 15 до 54 лет (у большинства — от 26 до 35 лет). 86 пациентов (69,9 %) страдали хроническим гломерулонефритом (ХГН), длительность которого составляла от 3 мес до 35 лет, но у большинства не превышала 5 лет. Диагноз ХГН у 68 больных был подтвержден гистологически (биопсия почки): липоидный нефроз (ЛН) установлен у 1 больного, мембранозный гломерулонефрит (МГН) — у 7, мезангиопролиферативный (МезПГН) — у 28, мезангиокапиллярный (МезКГН) — у 17, фокальный сегментарный гломерулярный гломерулонефрит (ФСГГ) — у 5, фибропластический гломерулонефрит (ФПГН) — у 10 больных. В 16 случаях констатирована фибропластическая трансформация клубочков почек, в 32 — тубулоинтерстициальный компонент. У 16 больных был диагностирован хронический пиелонефрит длительностью от 2 до 15 лет. Выраженная лейкоцитурия определена лишь у 2 больных, у 14 больных хронический пиелонефрит находился в латентной стадии и был установлен на основании анамнестических и рентгенологических данных. Артериальная гипертония в пределах 150/90—180/100 мм рт. ст. наблюдалась у 18 больных. 8 больных страдали гипертонической нефроангиопатией, у 1 больного был диагностирован синдром Фанкони, у 3 — острый интерстициальный нефрит в стадии реконвалесценции, у 2 больных — амилоидоз почек.

## Результаты и обсуждение

Как видно из табл. 1, активность нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы в моче здоровых людей (55 человек) составляет  $27,9 \pm 11,6$  микромоля распадающейся мальтозы на 1 миллимоль креатинина в 1 ч, а активность  $\beta$ -гексозаминидазы (обследовано 46 человек) —  $16,8 \pm 8,9$  микромоля на 1 миллимоль креатинина в 1 ч.

Активность нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы мочи больных варьировала в широком диапазоне (от 16 до 460 микромолей на 1 миллимоль креатинина в 1 ч) и в среднем значимо превышала норму ( $111 \pm 84$  микромоля на 1 миллимоль креатинина в 1 ч;  $p < 0,01$ ). Активность  $\beta$ -гексозаминидазы в моче больных составляла в среднем  $121 \pm 149$  микромолей на 1 миллимоль креатинина в 1 ч. Между активностями обоих ферментов в моче существует прямая линейная корреляция ( $r = 0,5 \pm 0,09$ ).

Из табл. 2 следует, что наиболее высокая активность обоих ферментов наблюдается у больных ХГН и амилоидозом почек (нефротическая форма).

Активность нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы и N-ацетил- $\beta$ -D-гексозаминидазы ( $\beta$ -гексозаминидазы) в моче больных ХГН

Показатель	Статистический критерий	Группа обследуемых			Норма
		1-я	2-я	3-я	
Нейтральная $\alpha$ -глюкозидаза, мкмоль расщепившейся мальтозы на 1 ммоль креатинина в 1 ч	$\bar{X}$	156,9*	57,2*	130,9*	27,9
	$\delta$	85,1	35,4	89,7	11,6
	$m$	15,8	6,4	19,6	1,6
	Диапазон колебания	60—460	16—162	39—407	5,7—52,6
	$n$	29	31	21	55
$\beta$ -Гексозаминидаза, мкмоль образованного п-нитрофенола на 1 ммоль креатинина в 1 ч	$\bar{X}$	213,8*	36*	125,2*	16,8
	$\delta$	225,8	30,6	107,9	8,9
	$m$	53,2	7,7	27,0	1,3
	Диапазон колебания	27—903	6—120	9—407	3,5—41,1
	$n$	17	16	16	46
Белок, г/сут	$\bar{X}$	5,15	0,52	6,10	<0,1
	$\delta$	3,90	0,28	7,30	
	$m$	0,70	0,05	1,60	
Клиренс креатинина, мл/мин	$\bar{X}$	91,2	121,8	108,0	>80
	$\delta$	32,4	23,7	28,8	
	$m$	6,0	4,2	6,6	
Максимальная осмолярность мочи, мосм/кг	$\bar{X}$	647,6	951,7	756,2	>900
	$\delta$	241,7	197,1	190,0	
	$m$	45,7	36,0	43,6	

\*  $P < 0,01$  по сравнению с нормой.

Для выяснения возможной взаимосвязи между активностью ферментов в моче и тяжестью почечного поражения больных ХГН были разделены на 3 группы в соответствии с представлениями о клинических типах болезни, предложенными М. Я. Ратнер и соавт. [7]. К 1-й группе отнесено 29 больных (см. табл. 1), у которых были констатированы I и II клинические типы ХГН. Они характеризовались ярко выраженным нефритическим синдромом, т. е. сочетанием выраженной протеинурии ( $5,5 \pm 3,9$  г белка в сутки) с гематурией и (или) артериальной гипертензией. Этому сопутствовало снижение способности к осмотическому концентрированию мочи ( $647,6 \pm 242$  мосм/кг). Клиренс креатинина, как правило, был в пределах нормы ( $91,2 \pm 32,4$  мл/мин). Во 2-ю группу (см. табл. 1) включен 31 больной III клинического типа. Нефритический синдром был выражен умеренно и проявлялся сочетанием протеинурии ( $0,52 \pm 0,28$  г белка в сутки) с микрогематурией, а у  $1/3$  больных определялась умеренная артериальная ги-

пертония. Функциональное состояние почек у больных этой группы близко к норме (см. табл. 1). К 3-й группе (см. табл. 1) отнесен 21 больной с IV клиническим типом ХГН. Единственным проявлением заболевания было увеличение клубочковой проницаемости для сывороточных белков, что клинически проявлялось резко выраженной протеинурией ( $6,1 \pm 7,3$  г белка в сутки); артериальная гипертензия и гематурия отсутствовали. В этой группе, как и в 1-й, отмечено снижение способности к осмотическому концентрированию мочи (см. табл. 1).

В зависимости от морфологического типа болезни активность (по крайней мере нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы) была различной. Так, при МезПГН она составляла  $86 \pm 57$  микромоль на 1 миллимоль креатинина в 1 ч и была статистически значимо ниже, чем при МезКГН или МГН ( $122 \pm 57$  и  $156 \pm 80$  микромоль на 1 миллимоль креатинина в 1 ч соответственно;  $p < 0,05$ ). При ФПГН активность нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы очень близка к таковой для

Таблица 2

Активность нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы и N-ацетил- $\beta$ -D-гексозаминидазы ( $\beta$ -гексозаминидазы) в моче больных ХГН и другими нефропатиями

№ п/п	Больной	Заболевание и морфологический тип	Нейтральная $\alpha$ -глюкозидаза	$\beta$ -Гексозаминидаза	Белок, г/сут
		Хронический гломерулонефрит			
1-я группа					
1	Ч-н	—	108	285	2,65
2	И-н	Лобулярный	119	—	2,70—9,00
3	К-к	Лобулярный	227	—	0,80
4	М-в	МезКГН	119	—	0,3
5	Д-ва	Лобулярный	118	47	0,88
6	К-в	МезКГН	182	81	1,60—4,50
7	М-на	МГН	266	62	2,30
8	С-п	МезКГН	223	93	0,88—3,50
9	К-в	МезКГН	107	123	2,60
10	В-в	Лобулярный	116	111	5,39
		»	269	691	15,00
11	К-н	МезКГН	63	167	6,80
12	А-в	МезКГН	60	122	7,00
13	П-ва	МезПГН	149	115	0,95—1,10
14	М-в	—	460	223	2,10
2-я группа					
15	К-н	МезПГН	26	15	0,34—0,63
16	Ш-ва	МезПГН	138	61	0,43—1,10
17	С-в	МезПГН	114	69	0,80
18	И-н	МезПГН	93	48	0,19
19	Ж-в	МезПГН	162	120	0,35
20	М-в	МезПГН	51	12	0,56
21	В-в	МезПГН	55	6	0,08
22	Н-н	ФСГГ	22	20	0,54
23	Т-на	—	35	30	0,08
24	Е-в	—	117	67	0,72
3-я группа					
25	Д-в	МезПГН	59	69	4,20
26	К-ч	МезКГН	103	60	1,95—3,70
27	В-к	МГН	107	72	2,25
28	А-в	МГН	78	131	12,3
29	Е-ва	МезПГН	165	156	2,40
		МезПГН	132	45	1,56
30	Г-на	ФСГГ	129	131	1,00
31	Л-на	ЛН	134	297	3,26
32	Я-в	МГН	237	193	11,30
33	С-ва	—	368	88	6,20
		—	407	208	3,22
34	А-н	Системная красная волчанка	217	—	0,87—1,50
35	Б-я	То же	239	407	1,60—3,4
36	Д-ва	Синдром Фанкони	24	39	1,46
37	Р-ий	Амилоидоз почек	501	1690	—
38	А-ко	То же	130	—	2,40—4,00
		Хронический пиелонефрит			
39	Ж-ва	Лейкоцитурия	33	21	—
40	Г-н	Лейкоцитурия	24	31	0,10—0,14
41	П-в		106	—	0,08
42	С-ва		129	—	0,10
43	З-ва		92	—	0,13

Примечание. Здесь и в табл. 3 и 4 активности ферментов выражены в микромолях расщепившего субстрата на 1 миллимоль креатинина в 1 ч; прочерки — исследования не проводили.



МезПГН ( $88 \pm 54$  микромоли на 1 миллимоль креатинина в 1 ч).

Наиболее высокая активность изучаемых ферментов отмечалась у больных с ярко выраженной клинической картиной заболевания (I и III типы ХГН; см. табл. 1). У больных 2-й группы с умеренной выраженностью заболевания активность ферментов была статистически значимо ниже, но превышала уровень, характерный для контрольной группы. Таким образом, выявляется отчетливая взаимосвязь между характером клинических проявлений ХГН и активностью как нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы, так и  $\beta$ -гексозаминадазы.

Следует отметить, что активность ферментов была наиболее высокой именно при тех клинических вариантах ХГН, которые протекали с нарушением одной из канальцевых функций — осмотического концентрирования мочи.

Как видно из данных табл. 2, при ХГН, особенно при тяжелых его формах (I-я и 3-я группы) у некоторых больных отмечалась высокая активность  $\alpha$ -глюкозидазы при умеренном увеличении активности  $\beta$ -гексозаминадазы. На различную степень увеличения активности двух ферментов при ХГН у больных I-й группы указывает коэффициент корреляции между актив-

ностями нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы и  $\beta$ -гексозаминадазы: для I-й группы  $r=0,44 \pm 0,24$ , для 2-й  $r=0,89 \pm 0,06$  и для 3-й  $r=0,64 \pm 0,16$ . Различная степень изменения активности этих двух ферментов у больных ХГН объясняется, вероятно, их разной локализацией в эпителиальных клетках извитых канальцев почек: нейтральная  $\alpha$ -глюкозидаза — цитозольный, а  $\beta$ -гексозаминадаза — лизосомальный фермент. В связи с этим нам представляется важным при диагностике поражения почек определять активности обоих ферментов.

Особую группу составили больные ХГН в стадии почечной недостаточности (15 человек). У 4 из них почечная недостаточность развивалась в острой фазе болезни — в течение короткого срока в результате быстро прогрессирующего течения заболевания на фоне его ярких клинических проявлений. Активности обоих ферментов в этих случаях были высокими (табл. 3). У 11 больных хроническая почечная недостаточность развивалась в результате медленно прогрессирующего ХГН. Активность нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы в моче этих больных была низкой (в пределах нормы), а активность  $\beta$ -гексозаминадазы, наоборот, высокой. По-видимому, низкая активность нейтральной  $\alpha$ -глю-

Таблица 3

Активность нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы и N-ацетил- $\beta$ -D-гексозаминадазы ( $\beta$ -гексозаминадазы) в моче больных ХГН в стадии почечной недостаточности

№ п/п	Больной	Нейтральная $\alpha$ -глюкозидаза	$\beta$ -Гексозаминадаза	Клиренс креатинина, мл/мин	Белок, г/сут
Почечная недостаточность в острой фазе ХГН					
1	Ч-п	108	285	34,8	2,90
2	Т-ч	98	175	45,2	8,00
3	К-ва	266	903	41,5	9,20
4	Б-в	114	348	—	—
		169	1068	48,1	7,50
Необратимая хроническая почечная недостаточность					
5	К-ва	38	209	13,9	3,60
		8	91	34,3	5,60
		10	130	35,6	—
6	Ц-на	45	172	18,4	8,30
7	Ш-в	49	190	36,9	1,84—4,92
8	З-ая	38	93	48,4	0,11
9	П-т	21	133	21,0	2,50
		29	133	12,4	1,56
10	Л-в	22	—	12,3	0,90
11	Р-с	31	—	15,7	0,77
12	У-ва	35	—	46,6	1,68
13	С-па	20	—	15,6	1,90
14	В-п	21	—	—	—
15	Б-ва	34	49	49,6	2,20

козидазы в моче характерна для больных с почечной недостаточностью в конечной необратимой стадии заболевания, а высокая — для больных с почечной недостаточностью, возникшей в острой фазе ХГН; для  $\beta$ -гексозаминидазы таких различий в активности не наблюдалось. Возможно, что низкая активность в моче нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы при высокой активности  $\beta$ -гексозаминидазы может служить диагностическим признаком ХПН в конечной, необратимой стадии.

У 22 больных ХГН изменения активности изучаемых ферментов в моче были прослежены в динамике заболевания. Как видно из табл. 4, при полной и частичной ремиссии ХГН (12 больных) активности ферментов в моче существенно снижались. Однако тесная взаимосвязь между состоянием больного и активностью фермента выявлялась лишь для нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы, активность которой снижалась постепенно и достигала нормального значения только при наступлении полной ремиссии. Следует отметить, что ремиссии сопутствовало восстановление канальцевых функций (величина максимальной осмолярности мочи увеличивалось от  $716,2 \pm 55,0$  до  $976,5 \pm 43,5$  мосм/кг;  $P < 0,01$ ). Для  $\beta$ -гексозаминидазы наблюдалось «преждевременное» снижение активности до нормального значения уже при частичной ремиссии. В тех случаях, когда лечение не было эффективным, активности ферментов в моче не изменялись (см. табл. 4). При обострении заболевания резко возрастали активности нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы и  $\beta$ -гексозаминидазы (см. табл. 4).

Из представленных данных видно, что изменение активности обоих ферментов отражало картину клинического состояния больного, однако полное соответствие между клинико-лабораторными показателями состояния больного и активностью фермента наблюдалось только для нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы.

Возвращаясь к данным, приведенным в табл. 2, следует отметить, что у больных хроническим пиелонефритом активность нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы в моче была выше нормы ( $56,6 \pm 35,7$  микромоля на 1 миллимоль креатинина в 1 ч;  $P < 0,01$ ), но у подавляющего большинства больных она была существенно ниже, чем при ХГН ( $P <$

$< 0,001$ ). Активность фермента отмечалась высокой при пиелонефрите, сопровождающемся изменениями чашечно-лоханочной системы, нарушением канальцевых функций и артериальной гипертонией. У 2 больных пиелонефритом с высокой лейкоцитурией [ $(1,5 - 2) \cdot 10^5$  при подсчете по Амбурже] активность нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы была в пределах нормы (см. табл. 2). Из этих данных также видно, что наличие в моче лейкоцитов, содержащих  $\alpha$ -глюкозидазу, не влияет на определение нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы в моче больных.

При синдроме Фанкони, при котором натрийзависимые системы транспорта в щеточной кайме почек нарушены, но патологические изменения эпителиальных клеток [19] методом электронной микроскопии не обнаруживаются, активность нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы в моче не отличалась от нормы.

Таким образом, результаты исследования показали, что активность нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы в моче при гломерулопатиях значительно превышает таковую при других заболеваниях почек и что величина активности фермента соответствует активности процесса и остроте заболевания.

Поскольку нейтральная  $\alpha$ -глюкозидаза локализована в эпителиальных клетках извитых канальцев почек [5], высокая активность этого фермента в моче при гломерулопатиях (ХГН и амилоидоз почек) еще раз подтверждает [6], что при этих заболеваниях наряду с клубочками почек повреждаются и эпителиальные клетки извитых канальцев.

Известно, что суточная экскреция белка является одним из важных показателей поражения почек. Низкий коэффициент корреляции ( $r = 0,35 \pm 0,09$ ) для всех обследованных больных между суточной экскрецией белка и активностью нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы в моче свидетельствует о том, что величина активности фермента является независимым от протеинурии и самостоятельным критерием повреждения почек, что, вероятно, объясняется различными механизмами протеинурии и выхода нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы из эпителиальных клеток извитых канальцев почек. В этой связи важно подчеркнуть, что активность нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы была наиболее высока именно при тех вариантах ХГН, кото-

Таблица 4

Активность нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы и N-ацетил- $\beta$ -D-гексозаминидазы ( $\beta$ -гексозаминидазы) в моче больных в динамике заболевания ХГН

№ п/п	Больной	Первоначальные исследова- ния			Частичная ремиссия			Полная ремиссия			Стабильное течение			Ухудшение состоя- ния			Развитие ХПН		
		$\alpha$ -глю	$\beta$ -гек	белок	$\alpha$ -глю	$\beta$ -гек	белок	$\alpha$ -глю	$\beta$ -гек	белок	$\alpha$ -глю	$\beta$ -гек	белок	$\alpha$ -глю	$\beta$ -гек	белок	$\alpha$ -глю	$\beta$ -гек	белок
1	К-к	245	117	0,65	80	25	0,44												
2	Д-ва	118	47	0,88	72	36	1,01												
3	Я-в	237	193	11,0—4,4	97	50	6,5—2,5												
4	Б-в	—	—	—	103	27	0,03												
5	М-в	119	—	0,50	52	23	—												
6	К-ва	88	82	1,30	54	47	0,04												
7	С-п	223	97	3,50	87	20	1,28												
8	З-ва	98	—	2,41	69	33	0,59	21	16	0,06									
		98	—	2,41	69	33	0,59	12	5	0,05									
9	С-ва	407	208	3,22	—	—	—	49	26	0,06									
10	Ш-р	148	83	3,20	—	—	—	50	27	0,08									
11	Л-на	134	297	2,00	—	—	—	29	15	0,09									
12	Б-ва	101	77	6,66	—	—	—	16	12	—									
13	М-ва	—	—	—	—	—	—	39	27	Нет									
14	Д-ба	—	—	—	—	—	—	43	27	0,03									
15	К-ва	95	66	1,04	—	—	—	—	—	—	88	82	1,30						
16	Ж-в	130	101	2,92	—	—	—	—	—	—	118	357	8,13						
17	Б-н	153	—	9,80	—	—	—	—	—	—	105	54	4,70						
18	Е-ва	165	156	2,40	—	—	—	—	—	—	132	45	1,56						
19	В-в	116	111	7,30	—	—	—	—	—	—	111	82	5,39	269	691	22,40			
20	М-на	67	17	1,20	—	—	—	—	—	—	—	—	—	267	62	2,30			
21	П-в	58	48	0,05	—	—	—	—	—	—	—	—	—	217	301	0,87			
22	К-ва	189	—	9,80	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	38	209	3,60
23	Ц-на	84	—	1,87	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	45	172	8,30
24	Ш-в	88	—	4,92	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	49	190	3,40

рые протекали с признаками поражения канальцевых функций на фоне максимальной выраженности клинических проявлений заболевания.

Проведенные исследования также показали, что изменение активности нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы и  $\beta$ -гексозаминидазы в динамике заболевания является достаточно чувствительным тестом на изменение клинического состояния больного, который может быть использован в клинике для оценки течения заболевания. Наличие хорошей корреляции при терапии между клинико-лабораторными показателями состояния больного и активностью нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы в моче показывает, что определение активности этого фермента может быть применено для контроля за эффективностью проводимого лечения.

Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности одновременного определения в моче больных активностей нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы и  $\beta$ -гексозаминидазы, так как определение одновременно обоих ферментов расширяет и улучшает возможности дифференциальной диагностики почечных поражений.

Авторы выражают глубокую благодарность члену-корр. АМН СССР В. В. Серову и доктору мед. наук В. А. Варшавскому за морфологическую диагностику заболевания почек и проф. Е. Л. Розенфельд и проф. М. Я. Ратнер за обсуждение результатов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Каминский Л. С. Статистическая обработка лабораторных и научных данных. Применение статистики в научной и практической работе врача. 2-е изд. Л., 1964.
2. Лавренова Т. П., Лукомская И. С. — Вopr. мед. химии, 1983, № 4, с. 91—95.
3. Лукомская И. С., Городецкий В. К. — Биохимия, 1961, т. 26, № 3, с. 477—482.
4. Лукомская И. С., Лавренова Т. П., Томила Н. А. и др. — Вopr. мед. химии, 1984, № 4, с. 74—78.
5. Лукомская И. С., Ушакова Н. А., Казлас Е. В. — Биохимия, 1983, т. 48, № 11, с. 1810—1819.
6. Ратнер М. Я., Серов В. В., Томила Н. А. Ренальные дисфункции. М., 1977.
7. Ратнер М. Я., Томила Н. А., Бродский М. А. и др. — Тер. арх., 1984, № 7, с. 11—15.

8. Ушакова Н. А., Казлас Е. В., Лукомская И. С. — Биохимия, 1983, т. 48, № 4, с. 678—683.
9. Ушакова Н. А., Лукомская И. С. — Там же, 1976, т. 41, № 7, с. 1320—1329.
10. Шюк О. Функциональное исследование почек. Прага, 1975, с. 173—176.
11. De Burler G., Vannier C., Gindicelli J., Sudaka P. — Biochimie, 1979, vol. 61, p. 1177—1183.
12. Hultberg B. — Clin. chim. Acta, 1980, vol. 108, p. 195—199.
13. Lukomskaia I. S., Ushakova N. A. — In: FEBS Special Meeting on Enzymes. Abstracts. Dubrovnik, 1979, p. 35—54.
14. Minamiura N., Matoba K., Nishinaka H., Yamamoto T. — J. Biochem. (Tokyo), 1982, vol. 91, p. 809—816.
15. Nishinaka H., Minamiura N., Matoba K. et al. — J. Histochem., Cytochem., 1982, vol. 30, p. 1186—1189.
16. Popper H., Mandel E., Mayer H. — Biochem. Z., 1937, Bd 291, S. 354—367.
17. Price R. G. — In: Diagnostic Significance of Enzymes and Proteins in Urine / Ed. U. C. Dubach, U. Schmidt. Bern, 1979, p. 150—163.
18. Schram A. W., Brouwer-Kelder B., Donker-Koopman W. E. et al. — Biochim. biophys. Acta, 1979, vol. 567, p. 370—383.
19. Silverman M., Turner R. J. — Biomembranes, 1979, vol. 10, p. 1—50.

Поступила 02.07.85

#### DIAGNOSTIC IMPORTANCE OF ESTIMATION OF NEUTRAL $\alpha$ -GLUCOSIDASE AND N-ACETYL- $\beta$ -D-HEXOSAMINIDASE ACTIVITIES IN URINE OF PATIENTS WITH KIDNEY PATHOLOGY

I. S. Lukomskaia, T. P. Lavrenova, N. A. Tomilina, M. L. Zubkin, N. D. Fedorova

Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Institute of Transplantology and Artificial Tissues, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

As shown in studies of 123 patients with various nephropathies, activities of  $\alpha$ -glucosidase and N-acetyl- $\beta$ -D-hexosaminidase in urine of the patients correlated with severity and stages of these diseases; at the same time, simultaneous estimation of both enzymatic activities in urine was shown to be more informative in diagnostic of kidney impairments. Low values of correlation coefficient ( $r=0.35 \pm 0.09$ ) between daily excretion of protein and the activity of neutral  $\alpha$ -glucosidase in urine showed that the enzyme activity did not depend on proteinuria and was independent test for kidney impairment. Estimation of  $\alpha$ -glucosidase activity could be used for control of the therapy; the enzymatic activity in urine correlated distinctly with the clinico-laboratory patterns of the patients studied.

Г. Я. Видершайн, Е. М. Бейер, М. М. Мендельсон,  
Ю. А. Ливановский

## БИОХИМИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА БОЛЕЗНИ АНДЕРСОНА—ФАБРИ У ДВУХ БРАТЬЕВ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Московская городская клиническая больница № 52, Московский медицинский стоматологический институт

Болезнь Андерсона — Фабри, или диффузная ангиокератома, относится к группе наследственных гликолипидозов и развивается в результате недостаточности лизосомной  $\alpha(1\rightarrow4)$ -галактозил-гидролазы, или церамидтригексоид- $\alpha$ -галактозидазы (КФ 3.2.1.22). В норме этот фермент катализирует отщепление концевых галактозных остатков в церамидтри- и церамиддигалактозидах, а также в гликолипидных и гликопротеидных В-антигенах системы АВ0 [1, 5]. Болезнь Фабри является единственным гликолипидозом, при котором генетический дефект связан с X-хромосомой. Несмотря на то что болезнь Фабри характеризуется определенными клиническими симптомами — кожными изменениями типа диффузной ангиокератомы, нарушением функции почек и сердца, четкая диагностика этой патологии может быть проведена только при выявлении у больных недостаточности церамидтригексоид- $\alpha$ -галактозидазы и ее форм. Именно эта задача решалась в настоящей работе при биохимическом исследовании 2 больных, состоящих в кровном родстве (родные братья), которые в прошлом в течение длительного периода обследовались клиницистами разных профилей без установления точного диагноза.

### Методика

В качестве источника ферментных препаратов для определения активности ряда лизосомных гликозидаз использовали плазму крови и суммарную лейкоцитную фракцию обследованных больных и здоровых доноров, которые получали по описанной ранее методике [3].

У одного из больных (Г. В.) после биопсии кожи была получена культура кожных фибробластов, также использованных в качестве источника ферментных препаратов.

В качестве флуорогенных субстратов при определении ферментативной активности использовали следующие 4-метилумбеллиферил-гликозиды (4-МУФ-гликозиды): 4-МУФ- $\alpha$ -D-галактопиранозид; 4-МУФ- $\beta$ -D-галактопиранозид, 4-МУФ- $\alpha$ -L-фукопиранозид, 4-МУФ- $\beta$ -D-N-ацетилглюкозаминид (все гликозиды производства фирмы «Koch-Light», Великобритания). Активность  $\beta$ -галактоцереброзидазы определяли

с помощью 6-гексадеканоиламино-4-МУФ- $\beta$ -D-галактопиранозиды в качестве субстрата [2]. При определении активности лизосомных ферментов инкубационная проба содержала от 10 до 50 мкл ферментного препарата в случае лейкоцитарной фракции или плазмы, соответственно, 100 мкл соответствующего субстрата (конечная концентрация 1 мМ) и 100 мкл 0,1 М ацетатного буфера pH 4,65. Ферментную реакцию останавливали добавлением 2 мл 0,4 М глицин-NaOH-буфера pH 10,5. Флуоресценцию в пробах измеряли на спектрофотометре «Спекорд М-40» («Карл Цейс, Йена», ГДР) с приставкой для измерения флуоресценции  $\lambda_{возб}$  365 нм,  $\lambda_{фл}$  450 нм; в случае использования 6-гексадеканоиламино-4-МУФ- $\beta$ -D-галактопиранозиды  $\lambda_{возб}$  составляла 385 нм).

Изоэлектрическое фокусирование ферментных препаратов из экстрактов лейкоцитов и фибробластов кожи проводили на пластинах полиакриламидного геля (ЛКБ, Швеция) при 4 °C в течение 3 ч, используя градиенты pH 3,5—9,5 и 4—6,5 соответственно согласно [11]. Для идентификации активности церамидтригексоид- $\alpha$ -D-галактозидазы (далее  $\alpha$ -D-галактозидаза) слой геля разрезали на участки размером 0,25 × 1 см, которые помещали в 0,1—0,2 мл 0,1 М ацетатного буфера (pH 4,65). Полученные образцы инкубировали с 0,1 мл 2 мМ раствора 4-МУФ- $\alpha$ -D-галактозида, приготовленного на указанном выше буферном растворе, в течение 24 ч при 37 °C. Фиксацию проб и измерение флуоресценции проводили как описано выше.

Для определения градиента pH вырезанные участки геля указанного размера помещали в 0,5 мл H<sub>2</sub>O и после 12 ч инкубации при 4 °C измеряли значения pH на потенциометре ЛПУ-01.

Общее количество сахаров во фракции гликолипидов, полученной из осадка мочи экстракцией смесью хлороформ-метанол (2:1 по объему) [8], определяли с помощью фенол-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-реактива по методу [6].

Сывороточные липопротеиды низкой плотности (ЛНП) выделяли методом препаративного ультрацентрифугирования [7]. Концентрацию отдельных фракций липопротеидов рассчитывали по площадям пиков на флотационных шпирен-диаграммах [4].

### Результаты и обсуждение

У больного Г. В., 49 лет, первые признаки заболевания появились в 7 лет и выражались сильными болями в суставах стоп и кистей рук. Больной поступил в клинику для обследования с типичными для диффузной ангиокератомы Фабри кожными высыпаниями на нижней части туловища, бедрах, губах

Таблица 1

Активность некоторых лизосомных ферментов в лейкоцитах (I) и плазме крови (II) в норме и при болезнях Рендю — Ослера и Фабри

Обследованные	$\alpha$ -D-галактозидаза		$\beta$ -D-галактозидаза		$\alpha$ -L-фукозидаза		N-ацетилгексозаминидаза		Галактоцереброзид- $\beta$ -галактозидаза
	I	II	I	II	I	II	I	II	I
Норма	60,7	7,8	211	3,8	72,0	84,5	222	255	2,4
Больной III.*	50,2	9,2	190	3,1	55,3	168	199	400	1,8
Больной Д.*	58,5	7,6	196	3,3	67,4	143	176	270	1,9
Больной Г. И.**	3,0	1,1	167	6,7	60,8	170	304	850	2,0
Больной Г. В.**	3,7	0,75	213	2,9	74,5	146	311	390	2,0

Примечание. В качестве контроля (нормы) использовали лейкоциты и плазму крови, полученные от 2 здоровых доноров. Активность ферментов выражали в наномолях соответствующих 4-МУФ-гликозидов в 1 ч на 1 мг белка лейкоцитов или на 1 мл плазмы. Одна звездочка — при болезни Рендю — Ослера, две — при болезни Фабри.

и слизистой рта. Отмечены тяжелые поражения сердечно-сосудистой системы (диффузные изменения миокарда, артериальная гипертензия без поражения клапанного аппарата) и нефропатия с хронической почечной недостаточностью. У его младшего брата (больной Г. И.), 47 лет, заболевание проявилось в 11 лет болями в суставах. Кожные изменения оказались малозаметными, нефропатия — выраженной, но без почечной недостаточности. Изменения сердца характеризовались очаговыми поражениями миокарда и митральным пороком.

В табл. 1 представлены данные об активности 5 лизосомных ферментов в лейкоцитах и плазме крови в норме и у пациентов, страдающих болезнью Рендю — Ослера и диффузной ангиоkerатомой. Активность  $\alpha$ -галактозидазы в лейкоцитах и плазме больных с диффузной ангиоkerатомой (Г. И. и Г. В.) значительно снижена и составляет в

лейкоцитной фракции около 5—6 %, а в плазме — около 10 % от нормы. Активность других исследованных ферментов у этих больных находится в пределах нормы или даже существенно повышена в плазме ( $\alpha$ -L-фукозидаза и гексозаминидаза). Снижение активности  $\alpha$ -галактозидазы было отмечено также в культуре фибробластов кожи больного Г. В. (табл. 2).

В литературе имеются данные о том, что остаточная активность  $\alpha$ -D-галактозидазы в лейкоцитах пациентов с болезнью Фабри обусловлена одной из трех форм этого фермента, обнаруживаемых в лейкоцитах здоровых людей с помощью изоэлектрического фокусирования [9].

Результаты проведенного нами изоэлектрофокусирования  $\alpha$ -D-галактозидазы лейкоцитов 2 здоровых людей и пациентов с болезнью Фабри представлены на рис. 1 и 2.  $\alpha$ -D-галактозидаза нормальных лейкоцитов характеризуется 2—3 формами с изоэлектрическими точками (pI) от 3,5 до 5,6.  $\alpha$ -D-галактозидаза пациентов с болезнью Фабри проявлялась при изоэлектрофокусировании единственным компонентом, соответствующим изоформе с pI 4,35  $\alpha$ -D-галактозидазы нормальных лейкоцитов. Полученные результаты согласуются с данными литературы [9]. Следует отметить, что, несмотря на значительные различия в клинических проявлениях болезни, профили изоэлектрофокусирования  $\alpha$ -D-галактозидазы лейкоцитов больных Г. В. и Г. И. достаточно сходны (см. рис. 2). При этом, как видно на рис. 1 и 2, соот-

Таблица 2

Удельная активность ряда гликозидаз в фибробластах человека в норме и при болезни Фабри (в нмолях/ч на 1 мг белка)

Фибробласты	Гексозаминидаза	$\alpha$ -L-фукозидаза	$\beta$ -D-галактозидаза	$\alpha$ -D-галактозидаза
Норма <sup>1</sup> (штамм № 25)	3100	97	688	19
Больной Г. В.	2633	42	711	4,6

<sup>1</sup> Постнатальные кожные фибробласты из клеточного банка Института ревматизма АМН СССР.



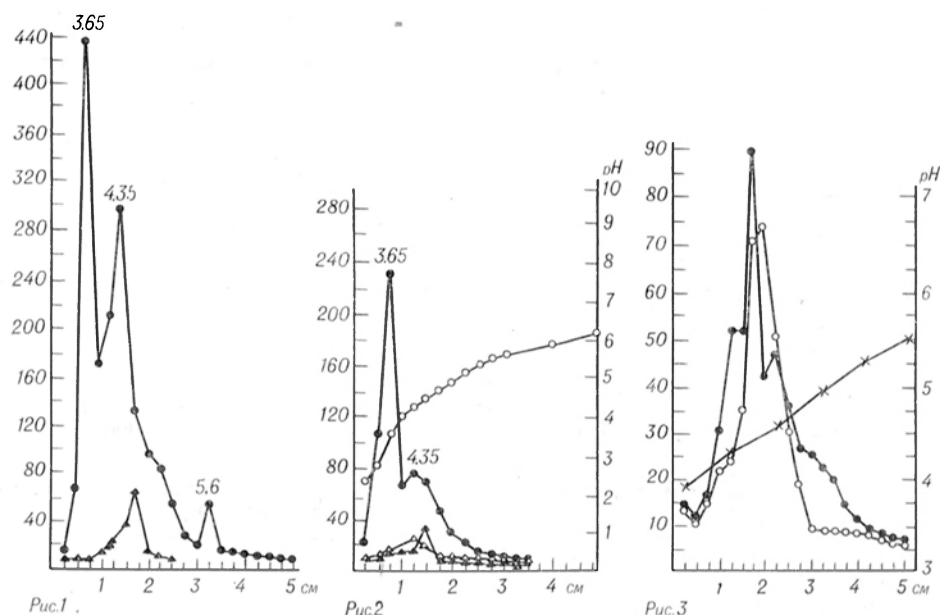


Рис. 1. Изоэлектрическое фокусирование  $\alpha$ -D-галактозидазы лейкоцитов человека в норме и при болезни Фабри в тонком слое полиакриламидного геля (pH 3,5—9,5). Черные кружки — норма; треугольники — больной Г. В.; здесь и на рис. 2 и 3: по оси абсцисс — расстояние от анода, см; по оси ординат — активность, усл. ед.

Рис. 2. Изоэлектрическое фокусирование  $\alpha$ -D-галактозидазы лейкоцитов человека в норме и при болезни Фабри в тонком слое полиакриламидного геля (pH 3,5—9,5). Черные кружки — норма, черные треугольники — больной Г. В.; светлые треугольники — больной Г. И.; белые кружки — градиент pH.

Рис. 3. Изоэлектрическое фокусирование  $\alpha$ -D-галактозидазы фибробластов человека в норме и при болезни Фабри в тонком слое полиакриламидного геля (pH 4,0—6,5). Черные кружки — норма; белые кружки — больной Г. В.; крестики — градиент pH.

ношение изоформ L-D-галактозидазы в лейкоцитах двух нормальных индивидов различалось, хотя в работе [9] отмечено сходство профилей изоэлектрофокусирования  $\alpha$ -D-галактозидазы нормальных индивидов.

Результаты изоэлектрического фокусирования  $\alpha$ -D-галактозидазы нормальных кожных фибробластов и клеток больного Г. В. представлены на рис. 3. Как видно на рис. 3, профиль активности  $\alpha$ -D-галактозидазы больного характеризуется снижением активности компонента с  $pI \sim 4,2$  по сравнению с нормой, некоторым уменьшением и сдвигом в более щелочную область главного компонента с  $pI \sim 4,4—4,5$ , а также полным отсутствием плеча в области  $pH > 4,6$ .

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что значительная недостаточность активности  $\alpha$ -D-галактозидазы в лейкоцитах обоих пациентов с болезнью Фабри обусловлена отсутствием определенных форм фермента. В случае же фибробластов изменение профиля фермента у больного при изо-

электрофокусировании было не столь выраженным по сравнению с нормой и отличалось от данных зарубежных исследователей [10], показавших наличие по крайней мере 6 изоформ  $\alpha$ -D-галактозидазы в нормальных фибробластах и полное отсутствие 2—3 наиболее «кислых» форм фермента при болезни Фабри.

Одним из основных продуктов накопления при болезни Фабри является, как известно, церамидтригексозид, накапливающийся в плазме крови, лейкоцитах и выделяющийся с мочой больных. Обнаружение церамидтригексозида в осадке мочи больных — один из наиболее ранних диагностических признаков болезни Фабри [1].

При определении общего содержания нейтральных углеводов в гликолипидной фракции осадка мочи больного Г. В. выявлено их увеличение в 4,4 раза по сравнению с нормой.

В сыворотке крови этого же больного отмечалось существенное повышение фракции ЛНП с  $s_f 0—12S$ , которое составило 549 мг/100 мл (норма 350—

400 мг/100 мл) и с  $s_f$  12—20S — 82 мг/100 мл (норма до 50 мг/100 мл). Поскольку, как известно, ЛНП является одним из основных переносчиков нейтральных гликофинголипидов [5], то увеличение концентрации этого класса липопротеидов может быть обусловлено повышением содержания церамидтригексозида в сыворотке больного.

Таким образом, результаты проведенного исследования позволяют диагностировать у обследованных больных наследственный гликолипидоз — диффузную ангиокератому Фабри.

Авторы выражают признательность М. И. Фрейдину (Институт медицинской генетики АМН СССР) за проведение биопсии кожи и получение культуры фибробластов от одного из больных и И. М. Карманскому и Г. Г. Ковалевой (Институт биологической и медицинской химии АМН СССР) за определение концентрации липопротеидов в сыворотке крови.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Видершайн Г. Я. Биохимические основы гликозидозов. — М., 1980.
2. Видершайн Г. Я., Козлова И. К., Ильина Г. С. // Биохимия. — 1985. — № 10. — С. 1665—1668.
3. Кузьмичева Н. А., Видершайн Г. Я. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 5. — С. 76—80.
4. De Lalla O. F., Tandy R. K., Loeb H. G. // Clin. Chem. — 1967. — Vol. 13. — P. 85—100.

5. Desnick R. J., Sweeley C. C. // The Metabolic Basis of Inherited Diseases / Ed. B. Stanbury et al. — New York, 1983. — P. 906—944.
6. Dubous M., Gilles K. A., Hamilton J. K. et al. // Analyt. Chem. — 1956. — Vol. 28. — P. 350—356.
7. Havel R. J., Eder H. A., Bragdon J. H. // J. clin. Invest. — 1955. — Vol. 34. — P. 1345—1353.
8. Malmqvist E., Ivemark B. I., Lindsten J. et al. // Lab. Invest. 1971. — Vol. 25. — P. 1—14.
9. Salvayre R., Maret A., Negre A. et al. // Europ. J. Biochem. — 1979. — Vol. 100. — P. 377—383.
10. Sørensen S. A., Hasholt L. // Ann. hum. Genet. — 1980. — Vol. 43. — P. 313—321.
11. Vesterberg O. // Sci. Tools. — 1973. — Vol. 20. — P. 22—29.

Поступила 05.07.85

#### BIOCHEMICAL DIAGNOSIS OF THE ANDERSON-FABRI DISEASE IN TWO BROTHERS

G. Ya. Wiedershain, E. M. Beyer, M. M. Mendelson, Yu. A. Livandovsky

Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Hospital 52, Medico-Stomatological School, Moscow

Activity of several lysosomal enzymes was studied in leukocytes, blood plasma and skin fibroblasts of two adult brothers with clinical diagnosis of Fabry disease. Activity of ceramide trihexoside-galactosidase was distinctly decreased in both patients. The residual enzymatic activity constituted 5-6 % in the patients leukocytes, less than 10 % in blood plasma and 25 % in fibroblasts as compared with controls. Differences in composition of  $\alpha$ -D-galactosidase multiple forms were detected in fibroblasts and blood cells of the patients with Fabry disease as compared with normal leukocytes by means of isoelectric focusing.

# МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 612.12+616.153:612.015.3:541.135.5:577.15

А. С. Ефимов, Д. С. Черепанов

## ФЕРМЕНТНЫЕ ЭЛЕКТРОДЫ ДЛЯ АНАЛИЗА МЕТАБОЛИТОВ КРОВИ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Киевский институт эндокринологии и обмена веществ Минздрава УССР, Киев

Ферментные анализаторы с электрохимической индикацией находят применение в пищевой промышленности, охране окружающей среды, фармацевтической промышленности и медицине [1—5].

Ферментные электроды в медицине используются при диагностике и лечении различных заболеваний, в частности эндокринных. В первую очередь это относится к диагностике и лечению сахарного диабета. Широкое внедрение в практику экспресс-анализаторов глюкозы будет способствовать ранней диагностике и изучению эпидемиологии сахарного диабета, позволит осуществлять самоконтроль за лечением и дозированием вводимых сахарснижающих препаратов и, кроме того, при использовании в системе биостатора поможет выведению больных из коматозных состояний.

Ферментные электроды могут служить для однократного определения анализируемого компонента (анализ дискретных проб) и для непрерывного слежения за его содержанием в течение определенного промежутка времени (мониторинг). В перспективе возможно имплантирование ферментных электродов в живые организмы, например для определения содержания глюкозы, как составной части аппарата «искусственная эндокринная поджелудочная железа», вживляемого в организм больного диабетом [6].

Применение ферментов в аналитических системах с электрохимической индикацией (ферментных электродах), а также в системах со спектрофотометрической, люминесцентной и прочими видами индикации имеет следующие преимущества. Ферментные анализаторы отличаются большой специфичностью, быстротой анализа (вследствие высоких скоростей химических реакций, идущих на высокоактивных катализаторах — ферментах), высокой чувствительностью, позволяющей определять анализируемые компоненты в концентрациях  $10^{-7}$ М и менее.

Ферментные электроды используются для количественного определения субстратов ферментативных реакций, ферментов, коферментов, ингибиторов и активаторов ферментов [3, 7—9]. В медицине наибольший интерес представляет определение метаболитов в крови, моче и других биологических жидкостях.

В ряде случаев можно подобрать ферментативную реакцию, в которой данный метаболит служил бы субстратом, и разработать соответствующий ферментный электрод.

### Принцип устройства

Если рассматривать ферментный электрод как систему, то можно выделить две его составные части: ферментный реактор и электрохимический сенсор. В ферментном реакторе протекает катализируемая ферментом реакция превращения анализируемого компонента в продукты ферментативной реакции, из которых один по крайней мере является электрохимически активным, т. е. способным претерпевать электрохимические превращения на электроде, который является сенсором — чувствительным элементом всего устройства. В результате на электроде возникает потенциал или через него начинает протекать электрический ток, величина которых зависит от содержания анализируемого компонента. В первом случае ферментная система является потенциометрической, во втором — амперометрической.

Ферментные электроды в отличие от наиболее распространенных в настоящее время ферментных систем со спектрофотометрической индикацией не требуют использования оптически прозрачных жидкостей, что позволяет применять их при анализе мутных сред (например, цельной крови). Кроме того, анализ при помощи ферментных электродов легко поддается автоматизации, так как информация о содержании метаболита получается в виде электрического сигнала. Этот же фактор обеспечивает простоту создания замкнутых систем пациент — анализатор — ЭВМ — насос инфузии лекарственного препарата — пациент, применяющихся при создании аппаратов типа «искусственная эндокринная поджелудочная железа» [6, 10]. Подобная система с постоянной индикацией уровня мочевины может быть использована в клинике при выведении больных из уремического состояния, развивающегося в условиях хронической почечной недостаточности.

В ферментных электродах используют, как правило, иммобилизованные ферменты. Существует несколько методов иммобилизации ферментов [1, 11]. При иммобилизации наблюдается увеличение стабильности фермента, что обеспечивает получение воспроизводимых результатов. Кроме того, иммобилизация дает возможность многократно использовать ферментный электрод, т. е. понижается стоимость анализа. Однако при иммобилизации уменьшается активность ферментов, поэтому в ряде случаев используются растворы по-

следних и ферментативная реакция протекает при смешении раствора фермента с анализируемой жидкостью [12].

Как уже отмечалось, электрохимические сенсоры ферментных электродов могут быть потенциометрическими и амперометрическими. Потенциометрическая индикация осуществляется при помощи ионоселективных и газовых электродов [9]. Ионоселективные электроды чувствительны к определенным ионам, образующимся в ходе ферментативной реакции. В газовых электродах между ферментным реактором и электрохимическим сенсором имеется воздушный промежуток или мембрана, проницаемая для образующегося в ходе реакции газа, но непроницаемая для молекул органических веществ, ионов, молекул воды. Системы с потенциометрической индикацией обладают более высокой селективностью и операционной стабильностью (сроком службы при постоянных показаниях), чем амперометрические системы. Однако интервал определяемых концентраций у них уже, а время ответа дольше, чем у систем с амперометрической индикацией [13].

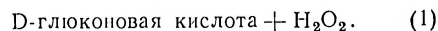
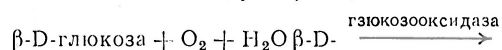
Ферментные аналитические системы с амперометрической индикацией получили наибольшее распространение. Особенно широко применяется при создании ферментных электродов класс ферментов — оксидоредуктазы. В большинстве случаев используются реакции окисления субстратов растворенным кислородом, а одним из продуктов ферментативной реакции является перекись водорода. Это обусловило разработку двух основных типов амперометрических сенсоров: кислородных и перекисно-водородных [1, 3]. В первых регистрируется уменьшение концентрации кислорода в ходе реакции, во вторых — концентрации генерирующейся перекиси водорода. Обе величины пропорциональны содержанию субстрата в анализируемой жидкости.

Не всегда проведение одной ферментативной реакции приводит к появлению электрохимически активных частиц. В таких случаях используются би- и мультиферментные электроды, в которых последовательно протекают две и более ферментативных реакций [14]. Эти системы служат в некоторой степени моделью живого организма, в котором вещества претерпевают целый ряд последовательных и параллельных химических превращений, катализируемых различными ферментами.

#### Анализ углеводов

Первые ферментные электроды были созданы для определения глюкозы [15, 16]. Для клиники экспресс-метод определения глюкозы с помощью ферментных электродов имеет важное значение. Внедрение в практику данного метода позволит, во-первых, решить проблему ранней диагностики сахарного диабета при массовых обследованиях населения, во-вторых, обеспечить самоконтроль за течением диабета у больного. Не менее важно применение ферментного анализатора в системе искусственной поджелудочной железы (типа «Биостатор») для мониторингового слежения за уровнем гликемии.

В ферментных электродах для определения глюкозы используют реакцию:



Глюкозу можно определять по потреблению кислорода в ходе реакции (1), по изменению pH в результате образования глюконовой кислоты и по количеству образующейся перекиси водорода.

Первый описанный в литературе ферментный электрод был разработан Кларком и Лайонсом [15]. Глюкозооксидаза была иммобилизована между мембранами из купрофана. Глюкоза из анализируемой жидкости диффундирует через внешнюю мембрану к ферментному слою, где окисляется до глюконовой кислоты. Последняя через внутреннюю мембрану диффундирует к pH-чувствительному стеклянному электроду. По изменению pH судят о содержании глюкозы.

В работе [15] описан также способ определения глюкозы по потреблению кислорода. Глюкозооксидазу иммобилизовали между диализной мембраной и гидрофобной мембраной, проницаемой для кислорода. За гидрофобной мембраной расположен кислородный электрод. По разности показаний между ним и аналогичным электродом, не содержащим ферментного слоя, определяют содержание глюкозы.

Апдайк и Хикс [16] иммобилизовали глюкозооксидазу в слое полиакриламидного геля. К нему примыкает полимерная мембрана, в которой имеются отверстия диаметром 50—300 мкм, через них кислород диффундирует к поверхности полярографического кислородного электрода. Более подробно принцип работы кислородного электрода описан в обзоре [1]. Поглощение кислорода в ходе реакции (1) лежит в основе работы автоматического анализатора глюкозы, выпускаемого фирмой «Бекман» [17]. Анализатор позволяет определять глюкозу в сыворотке крови в течение 3—5 мин при концентрации до 25 мМ.

В последние годы наибольшее распространение получили датчики, в которых содержание глюкозы определяется по количеству образующейся перекиси водорода [18—20]. В работах [18, 19] использовалась трехслойная мембрана. Внешняя фильтрующая мембрана служит для предотвращения попадания на электрод макромолекул и форменных элементов крови. Внутренняя мембрана, примыкающая к электроду, служит для тонкой фильтрации и предотвращает попадание на электрод веществ с молекулярной массой более 250. Между этими мембранами заключен ферментный слой с иммобилизованной глюкозооксидазой. Образующаяся в этом слое перекись водорода диффундирует через внутреннюю мембрану к платиновому аноду, на котором протекает реакция ее окисления.

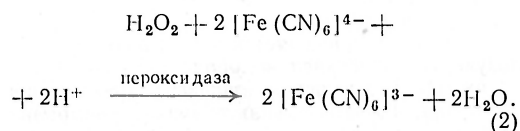
Дискретный анализатор «Иселлоу Спрингс Инструментс» [18] дает возможность анализировать 40 образцов плазмы в час. Аналогичный датчик монитора глюкозы, входящего в состав искусственной эндокринной поджелудочной железы «Биостатор» [19], позволяет непрерывно получать информацию о содержании глюкозы в крови больного диабетом с временной задержкой всего 90 с с момента

отбора крови в диапазоне концентраций от 1 до 50 мМ, при этом количество анализируемой крови не превышает 50 мл/сут. После 25—50 ч непрерывной работы достаточно заменить трехслойную мембрану, чтобы восстановить чувствительность датчика к глюкозе.

Датчик на перекись водорода более удобен, чем кислородные: как правило, достаточно одного электрода для измерения содержания перекиси водорода после реакторного слоя с ферментом [21], в то время как при использовании кислородных электродов требуется определять кислород как до, так и после ферментного реактора. Кроме того, кислородные электроды затруднительно использовать в цельной крови, так как клетки крови потребляют кислород, изменяя его содержание. Поэтому кислородные электроды в настоящее время используются, как правило, для определения глюкозы в сыворотке и плазме [22].

Недостатком перекисноводородных сенсоров является достаточно высокий анодный потенциал определения перекиси водорода (0,5—0,8 В), при котором возможно окисление других компонентов крови, приводящее к получению завышенных значений концентрации глюкозы. Даже применение сложных трехслойных мембран [19] не обеспечивает полного исключения влияния этих веществ.

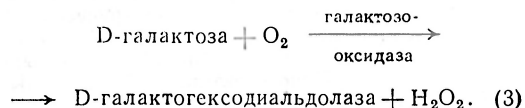
От этого недостатка свободен биферментный глюкозный электрод [23]. Образующаяся в ходе реакции (1) перекись водорода реагирует с вводимым в анализируемую жидкость ферроцианидом калия:



В ферментный слой входят два фермента: глюкозооксидаза и пероксидаза, катализирующая реакцию (2). Образующийся феррицианид восстанавливается далее на катоде из платины или стеклоуглерода при низком потенциале (от 0,3 до —0,1 В), при котором сопутствующие глюкозе компоненты крови электрохимически неактивны. Возникающий ток пропорционален содержанию глюкозы в крови в области 0,1—10 мМ (с учетом 10-кратного разбавления анализируемой жидкости буферным раствором). Время ответа датчика 2—4 мин.

Помимо глюкозы, с помощью ферментных электродов возможно определение галактозы, что важно для предварительного диагноза галактоземии. Кроме того, результаты исследований показывают, что галактоза может быть важным дополнительным источником энергии

у недоношенных детей [24]. Галактозу определяют при помощи ферментного электрода с иммобилизованной галактозооксидазой [24] по реакции:

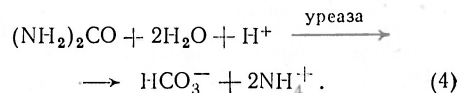


Галактозооксидаза иммобилизована при помощи глутаральдегида между двумя мембранами: внешней лавсановой и внутренней ацетатцеллюлозной. Образующаяся в результате реакции перекись водорода определяется на платиновом аноде. Электрод позволяет определять галактозу в цельной крови и плазме в диапазоне концентраций 0,3—22 мМ в течение 40 с.

#### Анализ мочевины, креатина и креатинина

Ферментные электроды для определения мочевины по своей распространенности уступают только глюкозным электродам [25]. Это объясняется важностью определения мочевины в крови. Повышенное ее содержание наблюдается при почечной недостаточности, хронических нефритах, диабетической нефропатии, нефропатии беременных и острых отравлениях.

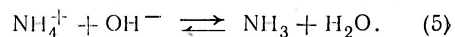
В анализаторе для определения мочевины ферментным реактором служит слой геля, содержащего уреазу, катализирующую гидролиз мочевины:



Образующиеся ионы диффундируют к поверхности селективного к ионам  $\text{NH}_4^+$  стеклянного электрода, изменение потенциала которого служит мерой содержания мочевины в анализируемой жидкости [27]. Время ответа ферментного электрода 1—3 мин. Диапазон определяемых концентраций мочевины  $4 \cdot 10^{-5}$ — $2 \cdot 10^{-4}$  М.

Описан потенциометрический электрод, селективный к мочеvine, электрохимическим сенсором которого служит рН-чувствительный электрод на основе двуокиси иридия [26]. Потенциал электрода линейно зависит от логарифма концентрации мочевины в области  $5 \cdot 10^{-5}$ — $5 \cdot 10^{-3}$  М. Электрод отличается быстротой установления сигнала — 1—2 мин.

В электроде с газовым мембранным сенсором [9] вслед за реакцией (4) протекает реакция:



При подщелачивании среды до pH 11 равновесие этой реакции сдвигается вправо, происходит выделение аммиака, который диффундирует через газопроницаемую мембрану к стеклянному электроду, чувствительному к изменению pH среды. Выделение аммиака происходит в полости внутри газопроницаемой мембраны в результате образования ионов  $\text{OH}^-$  по реакции (5), протекающей справа налево. Отмечается, что газовые сенсоры такого типа являются наиболее специфичными при определении субстратов, однако характеризуются замедленностью действия. Линейность их до концентрации мочевины в сыворотке и плазме 15 мМ.

Менее инерционен ферментный электрод с газовым сенсором [21]. Уреаза иммобилизована на нейлоновой сетке, которая фиксируется на аммиачном сенсоре. Сыворотка крови разбавляется в 10 раз и прокачивается в течение 1 мин через проточную ячейку объемом 40 мкл. Затем осуществляется промывка ячейки в течение 2 мин, и электрод подготовлен к следующему определению мочевины.

При почечной недостаточности, особенно в начальных стадиях, важно знать концентрации креатинина и креатина в крови. Креатинин сыворотки определяли при помощи аммиачного газового электрода [28]. В ферментном реакторе происходит образование ионов аммония из креатинина в присутствии креатининдезаминазы. Интервал анализируемых концентраций составляет  $1 \cdot 10^{-4}$  —  $2 \cdot 10^{-3}$  М. Отмечено влияние мочевины на результаты анализа.

Для определения креатина и креатинина могут быть использованы мультиферментные электроды [14]. При помощи глутарового альдегида иммобилизовали на пористой мембране креатининиминогидролазу, креатинамидиногидролазу и саркозиноксидазу. Для определения креатина применяют датчики, содержащие последние два фермента. Креатинамидиногидролаза переводит креатин в саркозин, а саркозиноксидаза катализирует окисление последнего до нескольких продуктов, одним из которых является перекись водорода, определяемая амперометрически на платиновом аноде.

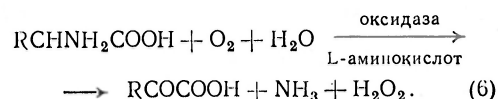
Если необходимо определить креатинин, на мембране иммобилизуют все три фермента. Креатининиминогидролаза переводит креатинин в креатин, дальнейшие ферментативные реакции которого описаны выше. Метод позволяет проводить определение в пробе объемом 25 мкл. Минимальная определяемая концентрация  $1 \cdot 10^{-5}$  М.

#### Анализ аминокислот

Необходимость определения содержания в крови отдельных аминокислот и их суммарного количества возникает при патологии пече-

ни (гепатите, острой атрофии), инфаркте миокарда и ряде других патологических состояний.

В одной из первых работ, посвященных определению аминокислот [29], использовали реакцию:



Оксидаза L-аминокислот катализирует окисление всех L-аминокислот независимо от длины их цепи и электрод с ее использованием позволяет определять суммарное содержание L-аминокислот. Оксидаза L-аминокислот иммобилизована на платиновом электроде и отделена от анализируемой жидкости полупроницаемой мембраной из целлофана. Образующаяся в результате реакции (6) перекись водорода окисляется на платиновом электроде при +0,35 В относительно насыщенного каломельного электрода. Время достижения стационарного тока не превышает 1 мин.

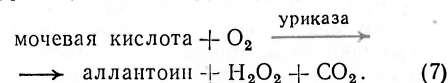
Для анализа отдельных аминокислот можно использовать ферменты типа декарбоксилазы, которые катализируют отщепление от аминокислот углекислого газа с образованием аминов. Получающийся при этом углекислый газ определяют с использованием углекислотного газового электрода [30]. Таким методом находят лизин, тирозин, фенилаланин при помощи иммобилизованных лизиндекарбоксилазы, тирозиндекарбоксилазы и фенилаланиндекарбоксилазы соответственно. Ферменты иммобилизовывали с помощью глутарового альдегида.

Возможен другой метод определения лизина [31]. На мембране кислородного электрода Кларка иммобилизуют лизиндекарбоксилазу совместно с диаминооксидазой. Образующийся после декарбоксилирования диамин окисляется на диаминооксидазе, при этом происходит поглощение кислорода, определяемое на платиновом катоде кислородного электрода при потенциале -0,65 В. Метод позволяет определять лизин в количестве до 2 мМ и анализировать 15—30 образцов в час, впрыскивая пробу в носитель — текущий буфер.

#### Анализ мочевой кислоты и ксантина

Определение мочевой кислоты в крови имеет значение как для дифференциальной диагностики подагрического полиартрита, так и для оценки методов лечения — определения периодов обострения и ремиссии заболевания.

При определении мочевой кислоты используют уриказу, катализирующую реакцию:

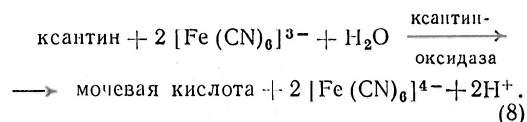


В качестве сенсора использовали электрод, чувствительный к перекиси водорода [32]. Линейная зависимость тока от содержания мочевой кислоты наблюдается до концентрации 3 мМ. Время ответа не превышает 30 с. Для анализа требуется 25 мкл цельной крови или сыворотки. Одна мембрана может быть использована для проведения нескольких сотен анализов и храниться без использования более года.

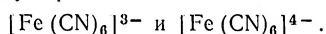


К продуктам метаболизма пуриновых оснований, содержание которых повышается при подагрических полиартритах, относится и ксантин.

Ксантиноксидаза, ковалентно иммобилизованная на графитовом электроде [13], используется для определения ксантина по реакции:



Эта реакция интересна тем, что в качестве окислителя используется не растворенный кислород, а специально вводимый феррицианид. При протекании реакции (8) образуется ферроцианид, который может быть определен двумя способами: амперометрически путем окисления на графитовом электроде при потенциале +0,3 В относительно хлорсеребряного электрода сравнения, либо потенциометрически, путем измерения потенциала, обусловленного наличием в растворе одной ионной частицы в двух различных степенях окисления:



Потенциометрический вариант позволяет определять ксантин при концентрациях  $8 \cdot 10^{-6}$ — $6 \cdot 10^{-3}$  М в течение 2—5 мин, а амперометрический —  $6,5 \cdot 10^{-6}$ — $4,5 \cdot 10^{-3}$  М в течение 1—2 мин.

#### Анализ билирубина

Определение билирубина отражает функциональное состояние печени и является диагностическим тестом при различных формах печеночной патологии (гепатиты, холелитиаз, новообразования и др.). Для анализа билирубина в сыворотке используется биферментный электрод с иммобилизованными глюкозооксидазой и пероксидазой [20]. При пропускании через этот электрод 1 мМ раствора глюкозы в нем протекает реакция (1). Далее, как и в работах [18, 19], определяют ток анодного окисления перекиси водорода.

При введении в раствор глюкозы образца сыворотки крови, содержащей билирубин, часть образовавшейся перекиси водорода расходуется на катализируемую пероксидазой реакцию окисления билирубина. При этом уменьшается ток окисления на электроде перекиси водорода. Уменьшение тока пропорционально содержанию билирубина в анализируемой жидкости при его концентрациях 0,1—2 мМ.

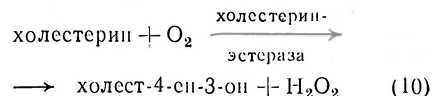
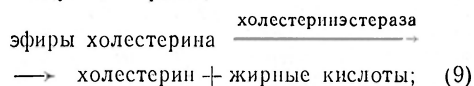
#### Анализ холестерина

Определение уровня холестерина в крови не менее важно для практики здравоохранения, чем анализ крови на сахар. Повышение содержания холестерина может быть ранним диагностическим признаком атеросклероза, ишемической болезни сердца, гипертонической болезни, сахарного диабета.

Актуальность разработки ферментных электродов для установления содержания холестерина определяется приведенными ниже факторами [33]: традиционные методы определения холестерина, использующие цветные химические реакции, зависят от условий экспонирования; другие вещества влияют на результаты определения; требуется большой объем образца. Ферментативный анализ холестерина

со спектрофотометрической индикацией подвержен влиянию таких веществ, как билирубин и аскорбиновая кислота.

В ферментном электроде для определения общего холестерина в сыворотке [33] используют растворы холестеринэстеразы, холестериноксидазы и пероксидазы. В растворе протекают следующие реакции:



и далее реакция (2). Образующийся феррицианид восстанавливается на трубчатом угольном электроде при потенциале —0,075 В относительно насыщенного каломельного электрода сравнения. Для измерения необходимо 20 мкл сыворотки.

Если нужно определить лишь свободный холестерин, то реакцию (9) не проводят. Билирубин, гемоглобин и аскорбиновая кислота в обычных концентрациях не влияют на точность определения холестерина, и лишь повышенные количества аскорбиновой кислоты искажают результаты анализа.

Недостатком описанного метода является большая длительность анализа. Этого недостатка лишен метод [34], в котором образующуюся в реакции (10) перекись водорода определяют при помощи анализатора «Йеллоу Спрингс Инструментс» на платиновом аноде, как и при определении глюкозы [18]. Продолжительность анализа 1 мин.

Сначала определяют свободный холестерин введением в измерительную кювету холестериноксидазы. Если затем добавить холестеринэстеразу, то к первоначальным показаниям прибавится величина, характеризующая содержание эфиров холестерина. Объем исследуемой пробы 10 мкл, диапазон анализируемых концентраций 3—13 мМ.

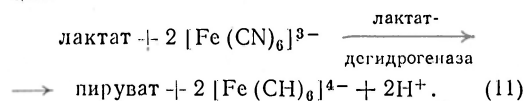
Методы анализа холестерина [33, 34] имеют аналоги в методах определения глюкозы при помощи ферментных электродов, поскольку и те и другие используют ферменты группы оксидаз, а окислителем служит кислород. Различие этих методов состоит в том, что в ферментных электродах для определения глюкозы ферменты иммобилизуют, а в случае холестерина используют растворенные ферменты. В связи с этим приходится определять холестерин по перекиси водорода, образующейся в объеме пробы, а не внутри мембраны, как в случае глюкозы. Поскольку в эритроцитах содержится каталаза, быстро разрушающая перекись водорода, то анализировать на холестерин и его эфиры целую кровь не представляется возможным. Это служит еще одним аргументом, свидетельствующим в пользу иммобилизованных ферментов, и еще одним стимулом для поиска методов иммобилизации тех ферментов, для которых они еще не разработаны.

#### Анализ лактата и этанола

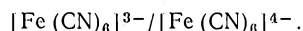
Содержание лактата может служить показателем для оценки реакции организма на физическую нагрузку. Клиницисты придают важное значение содержанию молочной кислоты,

поскольку этот показатель помогает в диагностике молочнокислотного ацидоза, нередко осложняющего течение сахарного диабета.

Лактат может быть окислен в пируват [35] в присутствии лактатдегидрогеназы по реакции:



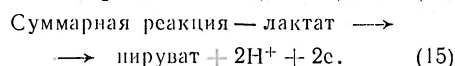
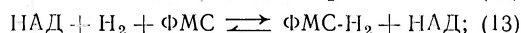
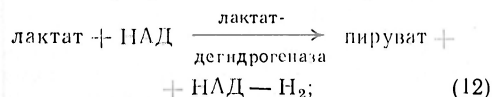
Электрохимическим сенсором служит окислительно-восстановительный электрод, измеряющий потенциал пары



Потенциал электрода зависит от концентрации лактата в области его концентраций от  $10^{-4}$  до  $10^{-1}$  М. Для установления потенциала затрачивается этим методом 20—30 мин.

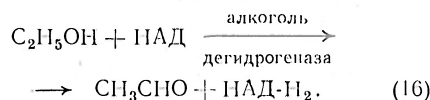
Описан [36] амперометрический лактатный электрод, использующий реакцию, аналогичную (11), но в ней в качестве окислителя используется не феррицианид, а феррицитохром С, который в ходе реакции восстанавливается до ферроцитохрома С. Лактатдегидрогеназа в виде водного раствора иммобилизована полупроницаемой мембраной, через которую диффундирует определяемый лактат. Образующийся ферроцитохром С окисляется электрохимически на платиновом аноде. Метод использован для определения лактата в крови и обеспечивает линейный ответ при концентрациях лактата от 0,3 до 5 мМ.

Ю. Ю. Кулис и А. А. Малинаускас [37] иммобилизовали при помощи диализной мембраны лактатдегидрогеназу и НАД. В анализируемую жидкость добавляли феназинметосульфат (ФМС). Совокупность протекающих в анализаторе реакций была следующей:



Электрод позволяет определить лактат в концентрации до 1,5 мМ в течение 3 мин. Датчик теряет 50 % чувствительности за 60 ч работы.

В работе [37] описан также электрод для анализа этанола. Иммобилизованная алкогольдегидрогеназа катализирует реакцию:



Последующие реакции (13) и (14) были такими же, как и для лактата. Суммарная реакция имеет вид:

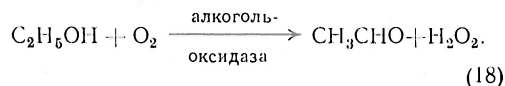


Датчик позволяет определять этанол в концентрации до 80 мМ за 3 мин.

В работе [38] алкогольдегидрогеназа была адсорбционно иммобилизована на саже совместно с НАД. Перед каждым определением

на поверхность электрода наносили тонкий слой сажевой пасты, содержащей фермент, который после определения снимали с поверхности электрода и заменяли свежим слоем. Расход фермента на 1 определение был в 3—5 раз меньше, чем при спектрофотометрическом анализе, линейная зависимость тока от концентрации этанола наблюдалась в области  $3 \cdot 10^{-5}$ — $5 \cdot 10^{-4}$  М. Время отклика составило 1 мин.

Для определения этанола может быть использован ферментный электрод с иммобилизованной алкогольоксидазой [39]. В ферментном реакторе протекает реакция:



Содержание этанола в сыворотке крови оценивали при помощи кислородного полярографического электрода по убыли кислорода в ходе реакции (18). На платиновый катод подавали потенциал —0,6 В и вводили 25 мкл сыворотки в 10 мл фосфатного буфера. Минимальная определяемая концентрация спирта в сыворотке 2 мМ.

### Особенности использования ферментных электродов

Выше при описании конкретных ферментных электродов приводились данные о диапазоне концентраций анализируемых метаболитов, продолжительности анализа и т. д. Эти характеристики были индивидуальны для каждого описанного ферментного электрода. Здесь мы коснемся некоторых вопросов, общих для всех ферментных электродов и касающихся главной характеристики любого аналитического устройства — селективности.

Рассмотрим отдельно две составные части ферментного электрода: ферментный реактор и электрохимический сенсор. Естественно предположить, что на селективность анализатора в целом будет влиять избирательность действия фермента. Как правило, фермент не обладает абсолютной специфичностью и может катализировать химическое превращение ряда сходных по строению (а иногда и имеющих различную структуру) веществ. Так, при определении холестерина путем его окисления холестериноксидазой до перекиси водорода [33] было обнаружено, что аналогичному окислению подвергаются дигидрохолестерин и 7-дегидрохолестерин (12). Наличие этих веществ в пробе, анализируемой на содержание холестерина, приводит к завышенным значениям концентрации последнего.

Еще более важную роль в селективности ферментного электрода играет селективность электрохимического сенсора, причем потенциометрические и амперометрические сенсоры заметно отличаются по характеру восприятия помех. Так, при работе с ионоселективными электродами, особенно селективными к ионам аммония, возможно мешающее влияние других ионов крови:  $\text{K}^+$  и  $\text{Na}^+$ . При определении мочевины с помощью реакции (4), катализируемой уреазой [9], необходимо учитывать тот факт, что в различных пробах анализируемой жидкости (крови, плазмы и т. д.) могут содержаться различные количества ионов  $\text{K}^+$  и  $\text{Na}^+$ , в некоторой степени искажающих

результаты определения мочевины по данной методике. pH-чувствительные электроды, также относящиеся к группе ионоселективных электродов, менее подвержены влиянию других ионов.

Газовые электроды, составляющие вторую группу потенциометрических сенсоров, отличаются несколько большей специфичностью, чем ионоселективные [22].

Амперометрические сенсоры дают информацию об анализируемом метаболите в виде тока окисления [13, 18, 24, 29] или восстановления [15, 23, 31] электрохимически активного вещества. В этих сенсорах причинами уменьшения селективности являются низкеледующие.

Во многих случаях электродные реакции протекают при значительных потенциалах. Так, окисление перекиси водорода на платиновом электроде требует наложения на него потенциала около  $+0,7$  В [18] относительно хлорсеребряного электрода сравнения. При этом потенциале наряду с перекисью водорода происходит окисление других восстанавливающих веществ: мочевой кислоты, аскорбиновой кислоты, метионина и некоторых других. Это ведет к погрешностям измерений.

Кроме того, при высоких анодных потенциалах возможно непосредственное окисление субстрата ферментативной реакции. Указывается на возможность расходования ксантина [13] в результате его окисления на платиновом аноде при потенциале окисления перекиси водорода. В данном случае часть метаболита не вступает в ферментативную реакцию, что также искажает результаты анализа.

И, наконец, в случае анализа по истощению кислорода [15, 39] теоретически возможно потребление кислорода в результате его химической реакции с аскорбиновой кислотой и цистеином [39], что также может вызвать понижение селективности ферментного электрода к анализируемому метаболиту.

Увеличение селективности амперометрических сенсоров может быть достигнуто путем покрытия электродов сложными в изготовлении полупроницаемыми мембранами [18] либо, что более перспективно, уменьшением потенциалов окисления или восстановления электрохимически активных частиц, например путем использования веществ, облегчающих процессы переноса электронов — медиаторов [23, 24].

#### Пути совершенствования ферментных электродов

Совершенствование ферментных электродов аналитического назначения идет в основном по пути сокращения времени реакции и повышения селективности. Все большее распространение в последние годы получают кинетические методы анализа. О концентрации вещества при использовании этих методов судят не по стационарному значению тока или потенциала, а по скорости нарастания электрического сигнала. Во многих случаях эта величина коррелирует с концентрацией метаболита [7, 14, 40]. В таких устройствах можно, к примеру, измерять ток через фиксированное время после начала нарастания (или падения) сигнала датчика [14, 22], а затем, после отмывания датчика от остатков предыдущей пробы, вводить в него следующую. При этом производительность устройства возрастает в несколько раз.

Значительно сокращает время анализа использования более тонких ферментных мембран. В этом случае ускоряется диффузия электрохимически активных частиц к сенсору ферментного электрода [22], а также диффузия метаболита к слою фермента.

Повышение селективности ферментных электродов, как указывалось выше, достигается уменьшением потенциалов биоэлектрокаталитического превращения. Одним из способов достижения этой цели является использование биотопливных элементов [37], в которых генерирование тока, являющегося мерой содержания анализируемого компонента, происходит без наложения потенциала извне. Возможно также использование вводимых вместе с пробой переносчиков электронов, облегчающих электрохимические реакции [33].

Иллюстрацией нового подхода к созданию ферментных электродов может служить работа [41], в которой в качестве окислителя в реакции (1) используется не кислород, а такой полимер, как полихинон или полибензилвиологен, что обеспечивает проведение анализа при низких потенциалах ( $0,2—0,4$  В относительно насыщенного каломельного электрода). О концентрации глюкозы судят либо по скорости увеличения тока окисления накапливающейся восстановленной формы полимерного акцептора на графитовом электроде, либо по стационарным значениям тока окисления.

Создание новых типов электрохимических сенсоров и разработка новых методов иммобилизации ферментов, а также совершенствование и удешевление методик получения очищенных ферментов, несомненно, приведут к появлению новых ферментных электродов аналитического назначения.

#### Использование ферментных электродов в клинике

Ферментные электроды применяют в диагностических и лечебных целях. Для определения глюкозы в плазме и сыворотке крови больных диабетом используют анализаторы «Бекман» [17] и «Иеллоу Спрингс Инструментс» [18], описанные выше и использующие в качестве глюкозного датчика электроды с иммобилизованной глюкозооксидазой.

Для лечения больных сахарным диабетом применяют аппарат «Искусственная эндокринная поджелудочная железа» типа «Биостатор», в состав которого входит глюкозный датчик — ферментный электрод [19]. Аппарат может быть использован для выведения больных из состояния гипергликемии [42]. Использование «Биостатора» при лечении больных инсулинозависимым диабетом может нормализовать не только уровень глюкозы в крови, но и содержание лактата, пирувата, аланина и липидов [6]. При помощи «Биостатора» можно определять потребность больных в инсулине; аппарат «Искусственная эндокринная поджелудочная железа» используют при оперативных вмешательствах у диабетических пациентов [6]. Возможно использование аппарата при родовспоможении, хронической почечной недостаточности, возникающей у больных диабетом [43], для выведения больных из кетоацидотической комы [44].

Полуавтоматический анализатор «Кимбл» предназначен для определения азота мочевины в плазме и сыворотке [45]. В нем используется ферментный электрод с уреазой, иммо-

билизированной на пористом оксиде алюминия. После прохождения ферментативной реакции анализируемая жидкость смешивается с щелочным раствором и подается на газовый мембранный электрод, чувствительный к аммиаку. Анализатор «Кимбл» позволяет определять мочевины в 20 мкл образца, содержащего до 17 мМ мочевины. Анализатор удобен для широкого использования в лабораторной практике и позволяет получать точные и воспроизводимые результаты при определении азота мочевины в плазме и сыворотке крови пациентов.

Фирмой «Бекман» выпускается анализатор азота мочевины, предназначенный для работы с цельной кровью [46]. Уреаза катализирует реакцию гидролиза мочевины (6), и образующиеся ионы увеличивают электропроводность образца. Данный кондуктометрический метод используют для измерения азота мочевины крови пациентов с уреемией, а также в педиатрии.

Для определения лактата в плазме и цельной крови можно использовать прибор «Лактатапалайзер-640», в основе которого лежит ферментно-электрохимический принцип [47]. Прибор применяют для определения содержания лактата в спинномозговой жидкости и используют в спортивной медицине [48].

Современной тенденцией в разработке анализаторов клинического назначения является создание многоканальных анализаторов. С их помощью можно определять одновременно несколько биохимических показателей.

Для замены оптической индикации в центрифужном анализаторе «Джемсек» разработан новый прибор с электрохимической индикацией [49]. Образцы сыворотки больного впрыскивают в 8 камер, в них же подают растворы соответствующих ферментов и при помощи угольных электродов измеряют ток. В число анализируемых компонентов входит и глюкоза, окисляющаяся на глюкозооксидазе и определяемая электрохимически.

Фирмой «Бекман» выпускается многоканальный анализатор «Астра-8», работа которого контролируется микропроцессором [50]. В число анализируемых компонентов сыворотки крови входят мочевина и глюкоза, определяемые электрохимически после ферментных реакций. Мочевина определяется кондуктометрически, как описано выше, а глюкоза — полярографически, при помощи кислородного электрода. Для определения мочевины и глюкозы требуется по 10 мкл сыворотки. Нижний предел чувствительности прибора по мочеине 0,2 мМ, по глюкозе  $5 \cdot 10^{-6}$  М. Анализатор отличается точностью, надежностью в работе и простотой эксплуатации. Прибор способен автоматически проводить серийные исследования.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Лакшминараянах Н. Мембранные электроды: Пер. с англ., Л., 1979.
2. Семичаевский В. Д., Шовкопляс Н. П. — В кн.: Фермакология и токсикология. Киев, 1979, вып. 14, с. 3—12.
3. Угарова Н. Н. — В кн.: Введение в прикладную энзимологию, М., 1982, с. 306—342.
4. Shichiri M., Kawamori R., Hakui N. et al. — Biomed. biochem. Acta, 1984, vol. 43, p. 561—568.
5. Davis J. E., Solsky R. L., Giering L., Malhotra S. — Analyt. Chem., 1983, vol. 55, p. 202R—214R.
6. Soeldner J. S. — Amer. J. Med., 1981, vol. 70, p. 183—194.
7. Mizutani F., Sasaki K., Shimura Y. — Analyt. Chem., 1983, vol. 55, p. 35—38.
8. Abel P., Müller A., Fischer U. — Biomed. biochim. Acta, 1984, vol. 43, p. 577—584.
9. Gray D. N., Keyes M. H., Watson B. — Analyt. Chem., 1977, vol. 49, p. 1067A—1078A.
10. Ефимов А. С., Звериховский И. В., Хведынич В. П. и др. — В кн.: Актуальные вопросы экспериментальной и клинической эндокринологии. Киев, 1982, с. 123—124.
11. Камышный А. Л. — В кн.: Введение в прикладную энзимологию. М., 1982, с. 62—100.
12. Buffone G. J., Johnson J. M., Lewis S. A., Sparks J. W. — Clin. Chem., 1980, vol. 26, p. 339—340.
13. Janniello R. M., Lindsay T. J., Yacynych A. M. — Analyt. Chem., 1982, vol. 54, p. 1980—1984.
14. Tsuchida T., Yoda K. — Clin. Chem., 1983, vol. 29, p. 51—55.
15. Clark L. S., Lyons C. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1962, vol. 102, p. 29—45.
16. Updike S. J., Hicks G. P. — Nature, 1967, vol. 214, p. 986—988.
17. McLean M. H., Ryan W. T., Hearn D. J. — Amer. J. med. Technol., 1977, vol. 43, p. 164—166.
18. Chua K. S., Tan J. K. — Clin. Chem., 1978, vol. 24, p. 150—152.
19. Fogt E. J., Dodd L. M., Jennings E. M., Clemens A. H. — Ibid., p. 1366—1372.
20. Ranneberg R., Pfeiffer D., Scheller F., Janchen M. — Analyt. chim. Acta, 1982, vol. 134, p. 359—364.
21. Черепанов Д. С., Лауринавичюс В.-С. А. — В кн.: Актуальные вопросы экспериментальной и клинической эндокринологии. Киев, 1982, с. 177.
22. Mascini M., Palleschi G. — Analyt. chim. Acta, 1983, vol. 145, p. 213—217.
23. Kulys J. J., Pesliakienė M. V., Samalius A. S. — Bioelectrochem. Bioenerg., 1981, vol. 8, p. 81—88.
24. Johnson J. M., Kmetec E., Taylor P. — In: Year Pittsburgh Conference of Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy. 28-th. Abstracts. Pittsburg, 1977, p. 471.
25. Rovida E., Mosca A., Dossi G. et al. — J. clin. Chem., 1981, vol. 19, p. 820—821.
26. Janniello R. M., Yacynych A. M. — Analyt. chim. Acta, 1983, vol. 146, p. 249—253.
27. Vadgama P. M., Alberti K. G. M. M., Co-vington A. K. — Ibid., 1982, vol. 136, p. 403—406.
28. Morishita Y., Nakane K. — Eisei Kensa, 1979, vol. 28, p. 174—177.
29. Guilbault G. G., Lubrano G. J. — Analyt. chim. Acta, 1974, vol. 69, p. 183—188.
30. Calvol C., Berjonneau A.-M., Cellf G., Thomas D. — FEBS Lett., 1975, vol. 59, p. 258—262.
31. Mscholun L., Londyn P., Fischer J. — Col. csl. chem. Commun., 1981, vol. 46, p. 2871—2876.
32. Tsuchida T., Yoda K. — Nippon Kagaku Kai-shi, 1982, vol. 8, p. 1347—1351.
33. Hahn Y., Olson C. L. — Analyt. Chem., 1979, vol. 51, p. 444—449.

24. Clark L. C., Duggan C. A., Grooms T. A. et al. — Clin. Chem., 1981, vol. 27, p. 1978—1982.
35. Shinbo T., Sugiura M., Kato N. — Analyt. Chem., 1979, vol. 51, p. 100—104.
36. Maccene J., Comlat M., Durlat H. — Пат. 2 439 995 (Франция).
37. Кулис Ю. Ю., Малинаускас А. А. — Журн. аналит. химии, 1979, т. 34, № 5, с. 876—881.
38. Ястребова Е. А., Осипов И. В., Варфоломеев С. Д., Агасян П. К. — Там же, 1982, т. 37, № 7, с. 1278—1283.
39. Nanjo M., Guilbault G. G. — Analyt. chim. Acta, 1975, vol. 75, p. 169—180.
40. Bertermann K., Elze P., Scheller F. et al. — Analyt. Lett., 1982, vol. B-15 p. 397—404.
41. Александровский Я. А., Сухно А. А., Родионов Ю. В., Пирузян Л. А. — А. с. 830 229 (СССР).
42. Юдаев Н. А., Перелыгина А. А., Алексеев Ю. П. — Пробл. эндокринологии, 1979, № 5, с. 3—7.
43. Роман Рамос Р., Алексеев Ю. П., Кулик В. П. — Там же, № 1, с. 80—91.
44. Шумаков В. И., Сеид-Гусейнов А. А., Лившиц А. Л., Гор Н. Р. — В кн.: Трансплантация органов и тканей. Тбилиси, 1979, с. 322—323.
45. Hanson D. J., Bretz N. S. — Clin. Chem., 1977, vol. 23, p. 477—484.
46. Heick H. M. C., Mohammed A., Begin Heick N. — Clin. Biochem., 1981, vol. 14, p. 102—103.
47. Kragenings J., Brackewitz R. — Arztl. Laboratorium, 1977, Bd 23, S. 549—554.
48. Hoffman O., Busse O., Dasch U. — Ibid., 1980, Bd 26, S. 34—37.
49. Cho H. K., Lee Y. H., Couch R. A. et al. — Clin. Chem., 1982, vol. 28, p. 1956—1961.
50. Finley P. R., Williams R. J., Lichtl D. A., Thies A. C. — Ibid., 1978, vol. 24, p. 2125—2131.

Поступила 30.01.85

## ENZYME ELECTRODES FOR ANALYSIS OF BLOOD METABOLITES IN NORMAL AND PATHOLOGICAL STATES

A. S. Efimov, D. S. Cherepanov

Institute of Endocrinology and Metabolism,  
Ministry of Public Health of the Ukrainian  
SSR, Kiev

The construction and properties of enzyme electrodes used in medicine and biology for determination of glucose, galactose, urea, creatinine, amino acids, uric acid, xanthine, bilirubin and cholesterol, lactate and ethanol are reviewed. Advantages and disadvantages of enzyme electrodes are analyzed. Use of the enzyme electrodes in clinical medicine is discussed.

УДК 612.123:547.922]-088.1+616.153.922-074

А. С. Иванов, Э. М. Халилов, Э. Ф. Соловьева, В. А. Стоник,  
И. И. Мальцев, Г. Б. Еляков

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ СВОБОДНОГО ХОЛЕСТЕРИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГОЛОТОКСИНА А<sub>1</sub>

Отдел клинической биохимии II ММИ им. Н. И. Пирогова, Москва; Лаборатория биосинтеза Тихоокеанского института биоорганической химии Дальневосточного научного центра АН СССР, Владивосток

В плазме крови человека обнаруживают как свободный, так и связанный (этерифицированный) холестерин [3]. Обычно методы анализа сыровороточного холестерина позволяют определять суммарный (свободный + связанный) холестерин [9]. Свободный холестерин в настоящее время определяют в основном двумя методами: осаждением свободного холестерина из суммарного липидного экстракта с помощью дигитонина [2] или томатына [7] с последующим химическим анализом холестерина в промытом осадке; ферментативным методом анализа с использованием холестериноксидазы [6]. Второй метод обладает рядом преимуществ, но для широкого применения остается пока слишком дорогим. Первая методика более трудоемка, требует боль-

ше времени, но она значительно дешевле. Широкому ее использованию в клинике препятствует отсутствие достаточных количеств дигитонина и томатына.

В данной работе исследовали ряд веществ из класса тритерпеновых гликозиновых с целью поиска доступного заменителя дигитонина, могущего использоваться для определения содержания свободного холестерина в сыроворотке крови.

### Методика

В работе была использована сыроворотка крови здоровых доноров и больных с гиперхолестеринемией после предварительной проверки на содержание общего и свободного холестерина с помощью ферментативного теста (124087, "Boehringer Mannheim GmbH", ФРГ). Для экстракции суммарных липидов смешива-

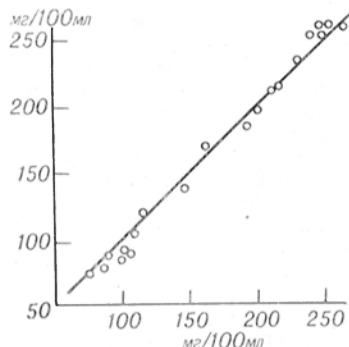
**Содержание свободного холестерина (в мг%) в сыворотке крови здоровых доноров и больных с гиперхолестеринемией**

Химический метод анализа				Фермента - тивный метод анализа
Дигитонин	голоток - син А <sub>1</sub>	стихопозиды		
		С	Д	
87	90	52	48	89
73	77	50	51	76
73	73	49	54	74
96	95	55	58	98
95	94	55	53	97
256	248	104	115	250
196	195	87	91	200
182	178	73	81	188
122	129	63	71	135
179	185	82	90	189

ли 0,1 мл сыворотки с 2,5 смеси ацетон — этанол (1 : 1), центрифугировали (2000 об/мин) 1 ч, надосадочный слой сливали и упаривали на водяной бане до объема 0,5 мл. Для осаждения свободного холестерина были использованы 0,25 % растворы следующих гликозидов: дигитонина ("Serva Heidelberg", ФРГ), голотоксина А<sub>1</sub> из голотурии *Stichopus japonicus* [1], стихопозидов С и Д из голотурии *Stichopus chloronotus* [4, 5].

Тритерпеновые гликозиды голотоксин А<sub>1</sub>, стихопозиды С и Д были получены в Тихоокеанском институте биоорганической химии Дальневосточного научного центра АН СССР.

Гликозиды растворяли в смеси этанол — вода — уксусная кислота (1 : 0,8 : 0,02). К 0,5 мл липидного экстракта добавляли 0,2 мл раствора гликозида и через 1 ч центрифугировали. Полученный осадок трижды промывали смесью ацетон — этанол (1 : 1). Содержание холестерина определяли по методу [9]. Осажденный в виде комплекса с гликозидом холестерин растворяли в ледяной уксусной кислоте. Пробу объемом 0,1 мл, содержащую не более 0,6 мг холестерина, смешивали с 2,5 мл смеси ледяная уксусная кислота — уксусный ангидрид (2 : 3), инкубировали при комнатной температуре 5 мин и добавляли при охлаждении 0,5 мл концентрированной серной кислоты, перемешивали и инкубировали 10 мин в холод-



Корреляционная зависимость между уровнями свободного холестерина, определенными с использованием дигитонина и голотоксина А<sub>1</sub>.

По оси абсцисс — концентрация холестерина, определенная с голотоксином А<sub>1</sub> (в мг на 100 мл); по оси ординат — то же при определении с дигитонином.

ной водяной бане. Оптическую плотность раствора измеряли на цифровом фотометре «Спектротом-410» (МОМ, ВНР) с фильтром 570 нм относительно холостого опыта. Калибровку проводили по результату анализа, где в качестве пробы был взят раствор холестерина в ледяной уксусной кислоте (2 мг/мл).

## Результаты и обсуждение

При сравнении результатов оценки содержания свободного холестерина в сыворотках с использованием различных гликозидов было обнаружено, что в случае применения дигитонина и голотоксина А<sub>1</sub> данные совпадают и соответствуют данным ферментативного анализа (см. таблицу).

Результаты определения содержания свободного холестерина в одних и тех же пробах с использованием дигитонина и голотоксина А<sub>1</sub> представлены на рисунке. Имеет место линейная зависимость между результатами анализа, проведенного двумя методами. Был проведен корреляционный анализ этих данных с помощью вычислительной машины ЕМГ-666/В (ВНР). Коэффициент корреляции равен 0,983, что подтверждает идентичность сравниваемых методик. Таким образом, тритерпеновый гликозид голотоксин А<sub>1</sub> может быть успешно использован вместо дигитонина в клиническом анализе свободного холестерина сыворотки крови.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Еляков Г. Б., Мальцев И. И., Калиновский А. И., Стоник В. А. — Биоорг. химия, 1983, т. 9, с. 280.
2. Кейтс М. Техника липидологии. Пер. с англ. М., 1975, с. 84.
3. Климов А. И. — В кн.: Липиды. Структура, биосинтез, превращения и функции. М., 1977, с. 57.
4. Стоник В. А., Мальцев И. И., Калиновский А. И. и др. — Химия природ. соединений, 1982, с. 194.
5. Стоник В. А., Мальцев И. И., Калиновский А. И., Еляков Г. Б. — Там же, с. 200.
6. Brecher P. I., Chobanian A. V. — Circulat. Res., 1974, vol. 35, p. 692.
7. Richmond W. — Clin. Chem., 1973, vol. 19, p. 1350.
8. Rinehart R. et al. — J. Lipid Res., 1962, vol. 5, p. 383.
9. Watson D. — Clin. chim. Acta, 1960, vol. 5, p. 637.
10. Zak B. — Lipids, 1980, vol. 15, p. 698.

Поступила 16.02.85



# ASSAY OF FREE CHOLESTEROL IN HUMAN BLOOD SERUM USING TRITERPENE GLYCOSIDE GOLOTOXIN A<sub>1</sub>

A. S. Ivanov, E. M. Khalilov, E. F. Solovyova,  
V. A. Stonik, I. I. Maltsev, G. B. Eljakov

Department of Clinical Biochemistry, N. I. Pirogov II Medical School, Moscow, Pacific Ocean Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Research Centre, Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok

Triterpene glycosides from holothurians golotoxin A<sub>1</sub>, stichoposides C and D were used

for assay of blood serum free cholesterol instead of digitonin. Blood serum lipids were extracted by a mixture of acetone-ethanol (1:1). Free cholesterol was precipitated from the extract after addition of the glycosides and analyzed in reactions with acetic anhydride, acetic and sulfuric acids. These results were compared with the data of an enzymatic test for estimation of free cholesterol. Golotoxin A<sub>1</sub> from *Stichopus japonicus* enabled to obtain results similar to those demonstrated with digitonin ( $r=0.98$ ). Golotoxin A<sub>1</sub> may be used instead of digitonin in clinical practice for assay of free cholesterol content in blood serum.

УДК 612.015.16:577.152.241]-088.1 + 616-008.931:577.152.241]-074:543.545

И. К. Филиппов, В. Н. Титов, В. И. Саргина, А. Ж. Ажмуханбетова

## РАЗДЕЛЕНИЕ ИЗОФОРМ ГЛИКОГЕНФОСФОРИЛАЗЫ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА НА АЦЕТАТЕ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

Институт клинической кардиологии ВКНЦ АМН СССР, Москва

В настоящее время для разделения изоферментов гликогенфосфорилазы используют оригинальный метод, предложенный Волленбергером и соавт. [7]. Метод основан на электрофоретическом разделении изоформ гликогенфосфорилазы в блоке полиакриламидного геля (ПААГ). При длительном инкубировании в субстратной смеси реакция протекает в сторону синтеза гликогена из глюкозо-1-фосфата. Образованный полисахарид окрашивают раствором Люголя. В общей сложности все исследование, включая приготовление ПААГ, инкубацию с субстратной смесью и окрашивание, занимает более 24 ч, требует большого количества реактивов.

В связи с изложенным, нами поставлена задача разработать новый метод разделения изоформ гликогенфосфорилазы, который при такой же высокой аналитической надежности позволял бы сократить время исследования. Для решения поставленной задачи мы изменили поддерживающую среду, буфер и параметры электрофореза, направление реакции в процессе инкубации, способ оценки результатов разделения изоформ. Суть изменений состоит в разделении изоферментов гликогенфосфорилазы методом электрофореза на ацетате целлюлозы с последующим определением их активности по образованию глюкозо-1-фосфата. Концентрацию последнего определяют в сопряженных ферментативных реакци-

ях по эквимольному приросту содержания НАДН, измеряемому флуориметрически. Как и в оригинальном методе, фермент, содержащийся в биологическом материале, концентрировали аффинной хроматографией. Метод электрофореза изоформ гликогенфосфорилазы на ацетате целлюлозы описан впервые (авторское свидетельство № 1008655).

### Методика

Материалом служил гомогенат свежей мышцы сердца. Ткань миокарда получена при аутопсии в случаях внезапной смерти не позже 4 ч с момента остановки сердца. Материал брали из миокарда вне зоны некроза и обрабатывали следующим образом: к 2 г измельченной сердечной мышцы добавляли 7,5 мл раствора следующего состава:  $\beta$ -глицерофосфат Na  $5 \cdot 10^{-3}$  М, ЭДТА  $1 \cdot 10^{-3}$  М, 2-меркаптоэтанол  $15 \cdot 10^{-3}$  М, бидистиллированная вода до 200 мл, pH 6,8 и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе 4 раза по 10 л с интервалами в 60 с для предупреждения нагревания гомогената. Гомогенат центрифугировали 10 мин при 10 000 об/мин и 4°C. В две хроматографические колонки объемом 5 мл заливали по 2 мл суспензии нерастворимого крахмала ("Merck"), приготовленного следующим образом: 20 г крахмала промывали 500 мл дистиллированной водой; 50 мл раствора, состоящего из фторид натрия  $100 \cdot 10^{-3}$  М, 2-меркаптоэтанол  $15 \cdot 10^{-3}$  М и  $\beta$ -глицерофосфат Na  $1 \cdot 10^{-3}$  М, затем заливали 40 мл того же раствора и ставили в холодильник; перед употреблением крахмал взбалтывали до образования гомогенной суспензии. Раствору давали возможность стечь, после чего на слой крахмала насаивали 2 мл надосадочной фракции гомогената сердечной мышцы и давали возможность самостоятельно пройти через колонку. После этого колонку отмывали от балластных белков 2 мл раствора, на котором

готовили суспензию крахмала. Гликогенфосфо-  
рилазу элюировали 1 мл раствора следующего  
состава: 1 % раствор гликогена; ЭДТА  
 $0,65 \cdot 10^{-3}$  М; 2-меркаптоэтанол  $0,65 \cdot 10^{-3}$  М,  $\beta$ -  
глицерофосфат  $\text{Na}$   $15 \cdot 10^{-3}$  М, бидистиллиро-  
ванная вода до 100 мл, рН 6,8. Полученный  
элюат хранили при  $-18^\circ\text{C}$ .

Электрофоретическую ацетатцеллюлозную  
пленку производства ВНИИСС (Владимир) за-  
мачивали на 20 мин в буфере (веронал 1,34 г,  
мединал 10,3, трис 5,06 г на 1 л дистиллиро-  
ванной воды рН 8,8, ионная сила 0,075). Ис-  
пользовали пленки ацетата целлюлозы разме-  
ром  $100 \times 50$  мм. Высокие аналитические свой-  
ства отечественной ацетатцеллюлозы были вы-  
явлены нами ранее при исследовании изофер-  
ментов креатинкиназы и лактатдегидрогеназы  
[4]. После того как пленки намочили, их про-  
сушивали и наносили предварительно размор-  
женный элюат аппликатором или пастеров-  
ской пипеткой с оттянутым носиком; количе-  
ство наносимого материала 8—10 мкл. Место  
нанесения располагали в 3 см от края пленки;  
движение фракций гликогенфосфо-рилазы было  
направлено к аноду. Пленку помещали в  
электрофоретическую камеру, располагая ее  
таким образом, чтобы сторона, на которую  
нанесены образцы, была обращена вниз. Элек-  
трофорез проводили при напряжении 350 В,  
силе тока 10 мА в течение 10 мин. Сразу  
после начала электрофореза на другую, ана-  
логично вымоченную пленку, наносили инку-  
бационную смесь, которую каждый раз гото-  
вили во время электрофореза, смешивая рас-  
творы 1, 2, 3 и 4.

Раствор 1: гликоген —  $292,4 \cdot 10^{-3}$  М; адено-  
зин-5-монофосфат  $\text{Na}$ -соль —  $19,2 \cdot 10^{-3}$  М; глю-  
козо-1,6-дифосфат —  $0,066 \cdot 10^{-3}$  М; ЭДТА —  
 $32,7 \cdot 10^{-3}$  М, НАДФ- $\text{Na}$  —  $6,55 \cdot 10^{-3}$  М.

Раствор 2: сульфат магния —  $32,7 \cdot 10^{-3}$  М.

Раствор 3: фосфоглюкомутаза,  $\text{Ca}$ -соль —  
40 Е; глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа,  $\text{Ca}$ -  
соль — 200 Е.

Раствор 4:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 327 мМ;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  —  
327 мМ, рН 6,8.

Для приготовления инкубационной смеси  
растворы 1, 2, 3, 4 смешивали в объемах 0,3,  
0,3, 0,03 и 0,3 мл. После тщательного переме-  
шивания смесь наносили на ацетатцеллюлоз-  
ную пленку так, чтобы она растеклась ров-  
ным слоем по поверхности. По окончании  
электрофореза пленку, на которой проводи-  
лось разделение изоферментов, накладывали на  
пленку с инкубационным раствором. Пленки  
помещали между двумя стеклами, прижимали  
грузом (200 г) и термостатировали при  $37^\circ\text{C}$   
в течение 40 мин. Затем пленки разъединяли  
и просушивали при той же температуре в те-  
чение 10 мин. Результаты электрофореза оце-  
нивали методом денситометрии по флюорес-  
ценции на денситометре фирмы «Хелена»  
(США).

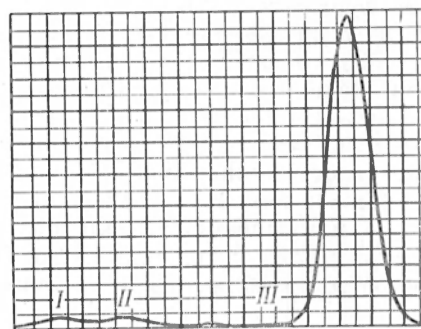
## Результаты и обсуждение

Известно, что гликогенфосфо-рилаза  
( $\alpha$ -1,4 глюкан; ортофосфат-глюкозил-  
трансфераза; КФ 2.4.1.1) представле-  
на в цитозоле миоцитов в трех изо-  
формах, отражающих наличие моно-,  
ди- и тетрамеров ферментов [5].

При освещении в хемископе пленки

ацетатцеллюлозы, на которой прове-  
дено электрофоретическое разделение  
изоформ гликогенфосфо-рилазы, мож-  
но отметить флуоресцирующие фрак-  
ции, продвинувшиеся при 10-минут-  
ном электрофорезе от старта на 20—  
25 мм. При разделении гомогената  
сердечной мышцы человека обнару-  
жено, что наиболее ярким является  
третий изофермент гликогенфосфо-  
рилазы, наиболее медленный по скоро-  
сти движения в электрическом поле.  
На расстоянии 8 мм впереди него  
располагался второй изофермент, ме-  
нее яркий, и в 5 мм впереди второ-  
го — первый изофермент гликоген-  
фосфо-рилазы, так же слабо окрашен-  
ный. Для документирования резуль-  
татов электрофореза мы применили  
денситометрию в режиме флюорес-  
ценции. На денситограмме гомогена-  
та сердечной мышцы человека (рису-  
нок) видны 3 фракции гликогенфос-  
фо-рилазы: I, II и III, как это было  
показано ранее и при электрофорезе  
в ПЛАГ [1, 5].

При электрофорезе сыворотки кро-  
ви больного инфарктом миокарда об-  
наружен лишь один изофермент, за-  
нимающий наиболее удаленное поло-  
жение от старта. Это изофермент  
ГФ-1 [1, 2]. В отличие от фракций  
гомогената сердечной мышцы фрак-  
ция гликогенфосфо-рилазы, полу-  
ченная при электрофоретическом раз-  
делении сыворотки крови больного ин-  
фарктом миокарда, выявляется сла-  
бее, так как активность фермента в  
сыворотке крови значительно мень-  
ше, чем в гомогенате. Вследствие не-  
большой общей активности гликоген-  
фосфо-рилазы в сыворотке крови  
больного инфарктом миокарда нам



Денситограмма изоформ гликогенфосфо-рилазы  
гомогената сердечной мышцы человека.  
I—III — фракции.

не удалось получить при электрофоретическом разделении отчетливых фракций фермента. Активность изоферментов в миокарде зависит и от используемого материала. Так, в гомогенате сердечной мышцы, которая была заморожена через 3 ч после взятия, не удавалось обнаружить изофермент ГФ-I, а через 6 ч — и ГФ-I.

При исследовании изоферментного состава гликогенфосфорилазы в миокарде с помощью ПААГ и на ацетате целлюлозы выявлены 3 изоформы [5]. Изоформа ГФ-I в ПААГ является основным изоферментом миокарда, в качестве добавочных компонентов в миокарде присутствуют ГФ-II и ГФ-III [6]. В сыворотке крови больных инфарктом миокарда показано наличие только ГФ-I. Как уже было отмечено выше, гликогенфосфорилаза присутствует в цитозоле миоцитов в нескольких молекулярных формах — тетра-, ди- и мономер. Каждый из мономеров имеет участки молекулы фермента, обуславливающие структуру его активного центра: молекулярная масса мономера 92 000 [7]. В крови больных инфарктом миокарда гликогенфосфорилаза представлена в форме нефосфорилированного димера — фосфорилазы *в* [5]. Наличие только этой изоформы показано и в перфузате ишемизированного сердца [2]. Электрофоретический метод определения изоформ гликогенфосфорилазы может быть применен в экспериментальных исследованиях при работе с гомогенатами органов и тканей. Исследование изоформ гликогенфосфорилазы в сыворотке крови больных инфарктом миокарда несколько ограничено низкой активностью фермента. Выявление фракций гликогенфосфорилазы возможно в основном только при достаточно высокой активности фермента в крови. Данная работа является первой попыткой определения изоферментной активности гликогенфосфорилазы с использованием ацетатцеллюлозной пленки, и мы надеемся в дальнейшем улучшить метод разделения изоферментов. Мы ставили целью данной

работы проведение клинического испытания электрофоретического метода разделения изоферментов гликогенфосфорилазы. В дальнейшем будет исследована возможность использования определения изоформ гликогенфосфорилазы как способа диагностики инфаркта миокарда [3]. Основываясь на предварительных данных, можно сказать, что исследования в этой области могут быть весьма перспективными.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бем М., Го С. Х., Краузе Е. и др. — *Вопр. мед. химии*, 1979, № 1, с. 37—41.
2. Краузе Е. Г., Борк Р., Цастов И., Вollenberger А. — Там же, 1971, № 6, с. 635—639.
3. Титов В. Н., Краузе Е., Филиппов И. К. и др. — *Кардиология*, 1983, № 3, с. 51—55.
4. Филиппов И. К., Титов В. Н., Кантарджян И. К. — *Вопр. мед. химии*, 1981, № 3, с. 388—391.
5. Krauze G., Will H., Böhm et al. — *Clin. chim. Acta*, 1975, vol. 58, p. 145—154.
6. Rais J., Sundberg M., Härm T. et al. — *J. molec. cell. Cardiol.*, 1980, vol. 12, p. 1227—1238.
7. Wollenberger A., Krause E. — *Amer. J. Cardiol.*, 1968, vol. 22, p. 349—359.

Поступила 24.05.85

#### SEPARATION OF GLYCOGEN PHOSPHORYLASE ISOFORMS USING THE ELECTROPHORESIS ON ACETATE CELLULOSE FILMS

I. K. Filippov, V. N. Titov, V. I. Sargina,  
A. Zh. Azhmukhanbetova

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

A new electrophoretic procedure is developed for estimation of glycogen phosphorylase isoforms using acetate cellulose films. In the course of incubation of a mixture containing substrate the reaction was directed towards formation of glucose-1-phosphate, concentration of which was estimated in the coupled reactions based on equimolar increase in content of NADH. Content of the reduced nucleotide was evaluated by means of fluorescent densitometry. Three fractions of glycogen phosphorylase I, II and III were detected after electrophoretic separation of an extract from heart muscle homogenate. Only the isoenzyme I was found in blood serum of patients with myocardium infarction. In subsequent studies clinical validity of the procedure should be evaluated in order to prove the suitability of glycogen phosphorylase isoenzymes estimations for diagnostics of myocardial infarction.

# КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 616-006-008.939.22-074

Г. Е. Морозевич, А. Е. Берман, В. И. Мазуров

## ИЗМЕНЕНИЕ БИОСИНТЕЗА КОЛЛАГЕНОВЫХ БЕЛКОВ В ОНКОТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТАХ ЧЕЛОВЕКА

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Снижение синтеза коллагеновых белков при опухолевом росте обнаружено при исследовании линий онкотрансформированных клеток, а также клеточных клонов, полученных из опухолей [1, 4, 5]. Следует, однако, отметить противоречивый характер сведений о том, является ли снижение коллагенового синтеза признаком, специфическим для опухолевого роста. Например, известны случаи, когда клеточная пролиферация онкогенной природы также сопровождалась торможением синтеза коллагена [3]. При исследовании фенотипических признаков онкогенной трансформации, в том числе особенностей синтеза белков, в каждом конкретном случае возникает вопрос об адекватности сравниваемых моделей, например растущих в культуре исходных нормальных клеток определенной природы и аналогичных клеток, трансформированных тем или иным агентом.

В настоящей работе проведено исследование синтеза коллагеновых белков в культурах нормальных эмбриональных фибробластов человека, находящихся на различных пассажных уровнях и стадиях роста, а также эмбриональных человеческих фибробластов, трансформированных онкогенным вирусом SV-40.

Штаммы диплоидных фибробластов эмбрионов человека (получены в Институте медицинской генетики АМН СССР, Москва) культивировали в среде Игла с добавлением 10 % сыворотки крупного рогатого скота, 5 % сыворотки эмбрионов крови и 1 мкг/мл канамицина. Линии эмбриональных человеческих фибробластов, трансформированных вирусом SV-40 (получены во Всесоюзном онкологическом центре АМН СССР, Москва) культивировали в среде Игла, содер-

жащей 10 % сыворотки крупного рогатого скота, 0,25 % гидролизата лактальбумина и 1 мкг/мл канамицина. При исследовании белкового синтеза в культурах с образовавшимся монослоем клеток (стационарная фаза роста) или в культурах через 24 ч после пассажа (логарифмическая фаза роста) заменяли среду с добавлением в нее аскорбиновой кислоты и  $\beta$ -аминопропионитрила в конечных концентрациях 50 мкг/мл. Еще через 24 ч проводили замену среды на не содержащую сыворотки среду с добавлением  $[^{14}\text{C}]$ -пролина в концентрации 8 мкКи/мл и проводили инкубацию в течение 4 ч. После инкубации белки из инкубационной среды осаждали сульфатом аммония и растворяли в буфере для коллагеназной реакции [2], а клеточный слой растворяли в щелочи, нейтрализовали

Таблица 1

Включение  $[^{14}\text{C}]$ -пролина (в имп/мин на 1 мкг ДНК) в расщепляемые коллагеназой белки, синтезированные в культурах нормальных эмбриональных фибробластов человека

Штамм	Пассаж	Стадия роста	
		логарифмическая	стационарная
845	15	—	6 600 (40)
	18	—	16 000 (35)
	20	—	9 000 (21)
	21	—	6 700 (25)
	23	13 100 (28)	6 200 (33)
814	17	12 000 (47)	9 000 (48)
	19	— (34)	—
	22	— (31)	8 400
	23	26 000 (32)	18 500 (29)
	26	— (39)	— (27)
	39	13 500 (28)	11 000 (36)

Примечание. В скобках — процентное содержание расщепляемых коллагеназой радиоактивных белков в радиоактивном белковом материале. Здесь и в табл. 2: прочерки — исследований не проводили.

и разводили избытком указанного буфера. Определение радиоактивных коллагеновых белков проводили с помощью высокоочищенной бактериальной коллагеназы [2]. Синтез коллагена оценивали как в абсолютном выражении по количеству расщепляемых коллагеназой радиоактивных белков в расчете на 1 мкг ДНК, так и по содержанию расщепляемых белков в тотальном синтезированном *de novo* белке.

Как видно из табл. 1, синтез коллагена в нормальных фибробластах мало изменяется между 15-м и 39-м пассажами клеток. Важно подчеркнуть, что относительно стабильный уровень коллагенового синтеза обнаруживается при анализе двух различных штаммов эмбриональных фибробластов в условиях нескольких рекультиваций и с использованием различных партий среды, сыворотки и меченого предшественника.

Из табл. 1 также видно, что на ранних и поздних пассажах клетки, находящиеся в стадии активной клеточной пролиферации (логарифмическая стадия), несколько более активны в синтезе коллагеновых белков по сравнению с неделящимися клетками (стационарная фаза).

При сопоставлении синтеза коллагеновых белков в нормальных и трансформированных фибробластах было установлено, что последние продуцируют примерно в 6—8 раз меньше синтезированных *de novo* и расщепляемых коллагеназой белков. Однако оказалось, что содержание ДНК в трансформированных фибробластах примерно в 2,7 выше, чем в нормальных клетках. Из этого следует, что нормальная клетка продуцирует в 3 раза больше коллагена, чем трансформированная. Тем не менее для более корректного вывода следует также учитывать возможные различия в удельной радиоактивности внутриклеточного фонда пролина между нормальными и трансформированными фибробластами. Исследования в этой области в настоящее время проводятся.

При анализе относительного синтеза коллагеновых белков (табл. 2) было установлено, что на одном и том же пассажном уровне в пределах 15—39 пассажей культуры нормаль-

Таблица 2

Включение [ $^{14}\text{C}$ ]-пролина в расщепляемые коллагеназой белки, синтезированные в культурах эмбриональных фибробластов, трансформированных вирусом SV-40

№ опыта	Радиоактивность, имп/мин на 1 мкг ДНК	Содержание расщепляемых коллагеназой белков*, %
1	1100	15
2	3500	14
3	2000	6
4	1720	9
5	1000	—
6	—	11
7	750	10
8	—	7
9	—	17
10	—	9

\* За 100% принято общее содержание радиоактивных белков, осаждаемых трихлоруксусной кислотой.

ных фибробластов в фазе активной пролиферации и в стационарной стадии не различаются между собой по содержанию расщепляемых коллагеназой синтезированных *de novo* коллагеновых продуктов.

Однако при сопоставлении более ранних и более поздних пассажей видно, что в пределах 15—19 субкультиваций относительный синтез коллагеновых белков несколько выше, чем на более поздних пассажах. В пределах 21—39 пассажей этот синтез остается практически одинаковым.

При анализе относительного синтеза коллагена в трансформированных фибробластах (см. табл. 2) было установлено, что содержание коллагеновых пептидов в белках, синтезированных этими клетками, в 2—4 раза ниже по сравнению с таковым в нормальных фибробластах. Таким образом, снижение относительного синтеза коллагеновых белков при трансформации соответствует уменьшению их абсолютного синтеза. Из этого следует, что по общему белковому синтезу, оцениваемому по включению пролина в расчете на 1 клетку, нормальные и трансформированные фибробласты различаются незначительно. Действительно, включение меченого пролина в белки, синтезированные в культурах нормальных клеток различных пассажей и стадиях роста, а

также в белки, синтезированные в трансформированных культурах, колебалось в пределах 120—240 имп/мин на  $10^3$  клеток и 130—320 имп/мин на  $10^3$  клеток соответственно.

Таким образом, установлено, что культивируемые эмбриональные фибробласты человека поддерживают постоянный уровень синтеза коллагена на протяжении 20 пассажей культуры. Эта особенность характерна для пролиферирующих и покоящихся клеток. Различия между нормальными и трансформированными фибробластами в синтезе коллагеновых белков были обнаружены как при абсолютном, так и при относительном выражении этого показателя. При этом следует учесть, что относительный синтез коллагена является более стабильным критерием, поскольку в этом случае нивелируется значение неизбежных при культивировании вариаций условий (различные партии питательных сред, неодина-

ковая удельная радиоактивность предшественника и др.). Устойчивый характер коллагенового синтеза в культуре клеток на протяжении длительных сроков «жизни» популяции и вне зависимости от фазы роста позволяет считать, что использованные штаммы эмбриональных фибробластов — адекватная модель для исследования синтеза коллагена при онкогенной трансформации клеток.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Берман А. Е. — Биохимия, 1985, т. 50, с. 1763—1781.
2. Берман А. Е., Оборотова Т. А., Мазуров В. И. — Там же, 1975, т. 40, с. 432—440.
3. Hiramatsu T., Kumegawa M., Hatakeyama S. et al. — Endocrinology, 1982, vol. 111, p. 1810—1816.
4. Sandmeyer S., Smith R., Kiehn D., Bornstein P. — Cancer Res., 1981, vol. 41, p. 830—838.
5. Yoshimura M., Jimenez S. A., Kaji A. — J. biol. Chem., 1981, vol. 256, p. 9111—9117.

Поступила 15.01.86

# ХРОНИКА

УДК 612.398-088.1+616-008.939.6-074]:543.545

С. С. Шишкин

## КОНФЕРЕНЦИЯ «ИЗУЧЕНИЕ БЕЛКОВ МЕТОДОМ ДВУМЕРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ»

Институт медицинской генетики

В Институте медицинской генетики АМН СССР состоялась конференция на тему «Изучение белков методом двумерного электрофореза в медико-биологических исследованиях». Организаторами конференции были Научный совет по медицинской генетике АМН СССР, проблемная комиссия «Молекулярная и биохимическая генетика», Институт медицинской генетики АМН СССР и Московское городское научное общество медицинских генетиков. В конференции приняли участие около 60 сотрудников различных научных учреждений АН СССР, АМН СССР и Минздрава СССР.

Появление 10 лет назад метода двумерного электрофореза по О'Фарреллу привело в конечном счете к важному качественному скачку в изучении белков как продуктов экспрессии генов. Открылись возможности систематического анализа состава различных биологических объектов с целью каталогизации составляющих их белков. В начале 80-х годов в США была раз-

работана программа «Молекулярная анатомия» с задачей построения каталога белков человека. Следствием прогресса в изучении белков явилось таким образом возникновение фактически нового научного направления, определяемого отмеченными выше целями. Это направление в настоящее время успешно развивается и его достижения используются для разработки различных проблем генетики, онкологии, биологии развития и других научных дисциплин.

В 80-е годы в нашей стране в ряде научных учреждений начались работы по освоению и использованию технологической основы молекулярно-анатомического направления. В связи с этим и была организована конференция, задачами которой были обмен накопленным опытом и обсуждение перспектив развития этого направления в нашей стране.

Конференцию открыл заместитель председателя Научного совета по медицинской генетике член-корр. АМН СССР В. И. Иванов.



В кратком вступительном сообщении, сделанном С. С. Шишкиным (Институт медицинской генетики — ИМГ АМН СССР), нашли отражение основные этапы развития молекулярно-анатомического направления за рубежом в последние годы.

В. В. Адлер, А. В. Полоцкая и М. А. Красильников (Всесоюзный онкологический научный центр АМН СССР) представили доклад «Использование двумерного электрофореза для изучения фенотипических особенностей нормальных и опухолевых клеток». Объектом исследования послужили культуры клеток гепатомы Морриса. С помощью фракционирования белков двумерным электрофорезом по О'Фарреллу и детекции автордиографией было обнаружено несколько полипептидов, синтез которых резко менялся при воздействии стероидными гормонами и некоторыми цитостатиками.

В докладе Л. И. Ковалева, Г. Л. Иволгиной, С. С. Шишкина (ИМГ АМН СССР) «Двумерный электрофорез белков сердечной мышцы в норме и при наследственной патологии» были представлены результаты, полученные на 4 инбредных линиях мышей. При детекции с помощью кумасси R-250 авторы обнаружили на электрофореграммах 158 белковых фракций и охарактеризовали их по электрофоретической подвижности в обоих направлениях. На основе этих данных была построена предварительная двумерная карта, на которой с помощью коэлектрофореза удалось идентифицировать креатинфосфокиназу, альбумин, миоглобин и другие белки. Сравнение результатов фракционирования белков разных линий животных позволило выявить 6 случаев белкового полиморфизма.

С. Г. Волощук и И. Н. Акулов (Всесоюзный научный центр психического здоровья АМН СССР) в докладе «Исследование белкового полиморфизма разных отделов мозга» сообщили о полученных ими результатах фракционирования двумерным электрофорезом белков биоптатов мозга собаки. Особое внимание было уделено стандартизации методики приготовления образцов (лизатов) для анализа. Авторы обнаружили небольшие различия в белковом составе разных отделов мозга.

Возможности применения двумерного электрофореза для изучения проблем биологии развития продемонстрировали в своем докладе «Двумерный электрофорез в изучении смены белков в раннем развитии» А. А. Нейфах и С. В. Ермолаев (Институт биологии развития АН СССР). Авторы показали, что для оценки изменений в спектре синтезирующих белков целесообразно использовать два метода детекции белковых фракций на электрофореграммах — окрашивание серебрением и флуоресцентную автордиографию. Различия в результатах детекции позволяли выявить активно синтезирующиеся и метаболически стабильные белки. На примере развития зародышевой выюны показаны изменения в белковом спектре за счет быстро синтезирующихся белков.

Построению двумерной карты мембранных белков эритроцитов человека был посвящен доклад П. С. Громова, А. М. Шандалы, Е. Е. Колосковой и С. С. Шишкина «Изучение белков мембран эритроцитов методом двумерного электрофореза». Отмечалось, что трудности в работе с этим объектом связаны со склонностью к агрегации главных высокомолекулярных мембранных белков и высо-

кой чувствительностью их к протектической деградации. Тщательная очистка от загрязняющих протеаз и модифицированный режим изоэлектрического фокусирования позволили авторам получить двумерные электрофореграммы, на которых присутствовали все главные мембранные белки. Кроме того, был отмечен ряд дополнительных фракций, не выявляемых одномерным электрофорезом.

Ю. Е. Дубрава и Н. Л. Бабкина (Институт общей генетики АН СССР) представили доклад «Изучение семян голосеменных методом двумерного электрофореза для оценки темпа мутационного процесса». Сопоставив возможности выявления различных мутаций традиционными методами, базирующимися на одномерном электрофорезе, и двумерного электрофореза по О'Фарреллу, авторы отметили, что последний метод позволяет одновременно анализировать продукты экспрессии сотен геновых локусов. В качестве примера были представлены результаты фракционирования белков семян сосны, на электрофореграммах, окрашенных кумасси R-250, удавалось охарактеризовать более 100 белковых пятен.

В докладе А. Г. Малыгина и О. Н. Лариной (Институт биорганической химии АН СССР) «Опыт создания оборудования для двумерного электрофореза в полиакриламидном геле» были продемонстрированы оригинальные модификации стандартного электрофоретического оборудования, позволяющие эффективно использовать его для электрофореза по О'Фарреллу. Отметив необходимость серийных исследований двумерным электрофорезом, авторы предложили прибор для одновременного анализа 8 образцов. Результаты фракционирования на этом оборудовании белков плазмы крови хорошо соответствовали литературным данным.

Переход к серийным исследованиям с помощью электрофореза по О'Фарреллу требует разработки систем автоматического анализа результатов. Вопросы, связанные с этой проблемой, обсуждались в докладе С. А. Толчко, М. И. Розенберга, Н. Н. Сопсалева и С. С. Шишкина (ЦКБ с опытным заводом АМН СССР и ИМГ АМН СССР) «На пути к разработке автоматической системы анализа результатов фракционирования белков двумерным электрофорезом». В качестве сканирующего устройства авторы предложили использовать отечественный фотоувеличитель с кареткой на воздушной подушке, способный осуществлять сканирование пластин геля с шагом 0,1 мм и точностью позиционирования около 3 мк. В ходе дискуссии выступил А. В. Шурхал (Институт общей генетики АН СССР), который поделился опытом использования для изоэлектрического фокусирования отечественных амфолинов.

Следует отметить, высокий методический уровень подготовки докладов, сделанных на конференции. Представленные результаты свидетельствовали об определенном прогрессе в области изучения белков как продуктов экспрессии генов разных организмов на основе двумерного электрофореза. Вместе с тем указывалась необходимость учета различных артефактов при интерпретации результатов. Установлено, что важным условием быстрого развития молекулярно-анатомического направления в нашей стране является более тесная координация исследований, проводящихся в различных научных учреждениях.

Поступила 24.06.85

## СОДЕРЖАНИЕ

- Шинкаренко Н. В. Химическая основа поведения синглетного кислорода в организме человека (Обзор)
- Санина О. Л., Бердинских Н. К. Биологическая роль церулоплазмина и возможности его клинического применения (Обзор литературы)
- Лукиенко П. И., Бушма М. И. Биологическая роль монооксигеназ и пути управления их активностью
- Фомиченко К. В., Ермаков В. Ф. Эффективность эссенциале и витогепаата как стабилизаторов мембран лизосом печени
- Ташмухамедова М. А., Алматов К. Т., Сыров В. Н., Султанов М. Б., Абидов А. А. Сравнительное изучение действия экдистерона, туркестерона и неробола на функции митохондрий печени крыс при экспериментальном диабете
- Пасторова В. Е., Табакина Т. Е., Иванов А. Ю. Нейтрализация тромбина анти-тромбином III в зависимости от интенсивности тромбообразования при экспериментальных и клинических хирургических вмешательствах
- Сторожук П. Г., Скляр В. А., Корочанская С. П., Гонтмахер Ю. В. Утилизация глюкозы и активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, изоцитратдегидрогеназы и малатдегидрогеназы эритроцитов крыс при действии туберкулостатическими препаратами
- Якубовская Р. И., Коростелева М. Д., Александер С. К., Авдеев Г. И. Выделение мембранных антигенов эпителиальных клеток молочной железы из мембран жировых глобул женского молока
- Козлов Г. С., Носков С. М. Перекисное окисление липидов и антиоксидантные системы организма при экспериментальном стрептококковом миокардите и ревмокардите
- Власов Б. Я., Хрустелевская А. М. Метаболизм цитрата в динамике консолидации экспериментального перелома
- Горняк Л. Л., Краснополянская К. Д., Одинокова О. Н., Фещенко С. П., Шишкин С. С. Взаимодействие гликозаминогликанов с положительно заряженными флюорокрасителями
- Зурашвили Б. Ш. Влияние аскорутина на обеспеченность организма тиаминном и обмен аскорбиновой кислоты у крыс при физических нагрузках различной тяжести
- Кудряшов Б. А., Ульянов А. М., Ляпина Л. А. Функциональные изменения в состоянии инсулярной системы у животных после внутривенного введения диабетогенного фактора
- Яцык М. И. Влияние бромкриптина на захват  $^3\text{H}$ -допамина синапсосомами гипоталамуса интактных и адrenaлэктомированных крыс
- Иванова Л. И., Халилов Э. М., Горбатенкова Е. А., Арчаков А. И., Лопухин Ю. М. Встраивание и выведение холестерина из плазматической мембраны гепатоцитов и клеток гепатомы Зайделя
- Меерсон Ф. З., Сазонтова Т. Г., Архипенко Ю. В., Казан В. Е. Анализ термодес-

## CONTENTS

- Shinkarenko, N. V. Chemical basis of singlet oxygen behavior in humans
- Sanina, O. L., Berdinskykh, N. K. Biological role of ceruloplasmin and its clinical potential (a review)
- Lukienko, P. I., Bushma, M. I. Biological significance of monooxygenases and possibility of their activity control
- Fomichenko, K. V., Ermakov, V. F. Efficiency of essential and vitohepatum as stabilizers of liver tissue lysosomal membranes
- Tashmukhamedova, M. A., Almatov, K. T., Syrov, V. N., Sultanov, M. B., Abidov, A. A. Effect of ecdisterone, turkesterone and nerobol on the functions of rat liver mitochondria in experimental diabetes
- Pastorova, V. E., Tabakina, T. E., Ivanov, A. Yu. Neutralization of thrombin by means of antithrombin III depending on the rate of thromboformation in experimental and clinic surgical operations
- Storozhuk, P. G., Sklyar, V. A., Korochanskaya, S. P., Gontmakher, Yu. V. Consumption of glucose and activities of glucose-6-phosphate-, isocitrate- and malate dehydrogenases in erythrocytes of rats treated with tuberculostatic preparations
- Yakubovskaya, R. I., Korosteleva, M. D., Alexander, S. K., G. I. Avdeev. Isolation of membrane antigens of mammary gland epithelial cells from membranes of fatty globules of human milk
- Kozlov, G. S., Noskov, S. M. Lipid peroxidation and the antioxidant systems of a body in experimental streptococcal myocarditis and rheumatic carditis
- Vlasov, B. Ya., Khrustalevskaya, A. M. Metabolism of citrate in dynamics of experimental fracture consolidation
- Horniak, L. L., Krasnopol'skaya, X. D., Odionokova, O. N., Feshchenko, S. P., Shishkin, S. S. Interaction of glycosaminoglycans with cationic fluorochromes
- Zurashvili, B. Sh. Effect of ascorutin on the content of thiamin and metabolism of ascorbic acid in rats subjected to physical exercises
- Kudryashov, B. A., Ul'yanov, A. M., Lyapina, L. A. Functional alterations in the state of animal insulin system after intravenous administration of diabetogenous factor
- Yatsuk, M. I. Influence of bromocriptine on  $^3\text{H}$ -dopamine uptake in hypothalamic synaptosomes from intact and adrenalectomized rats
- Ivanova, L. I., Khalilov, E. M., Gorbatenkova, E. A., Archakov, A. I., Lopukhin, Yu. M. Introduction and liberation of cholesterol in plasmatic membranes of hepatocytes and of Zaidhelahepatoma cells
- Meerson, F. Z., Sazontova, T. G., Arkhipenko, Yu. V., Kagan, V. E. Analysis of the

- натурации Na, K-АТФазы сарколеммы миокарда крыс при стрессе и возможная роль повреждения этого фермента в патогенезе аритмий
- ✓ *Геворкян Н. М., Локишина Л. А., Николаева Н. В., Иткин Б. З.* Сравнительная характеристика протеолитических ферментов лимфоцитов в норме и при хроническом лимфолейкозе
- ✓ *Волковицкая О. Э., Бочев П. Г., Рибаров С. Р., Горкин В. З., Кэган В. Е.* Исследование моноаминоксидазы митохондрий плаценты человека методом хемилюминесценции
- Жукова Н. Л., Гедымин Л. Е., Голышевская В. И.* Сравнительная характеристика активности протеолитических ферментов и их ингибиторов в легочной ткани морских свинок при развитии генерализованного и деструктивного туберкулеза
- Кулинский В. И., Медведев А. И., Кунцевич А. К.* Стимуляция окислительных ферментов митохондрий при остром охлаждении и ее катехоламинные механизмы
- Степанова Н. Г.* Определение активности альдолазы типа А в сыворотке крови больных инфарктом миокарда
- Карелин А. А., Глоба А. Г., Демидова В. С., Марчук А. И.* Образование сигнального АТФ плазматическими мембранами полиморфно-ядерных лейкоцитов, активированных формилметнониллейцил-фенилаланином
- Стан Е. Я., Екимовский А. П., Алейник С. И., Василевская Л. С., Черников М. П.* Выделение, аминокислотный состав и характер действия ингибиторов желудочной секреции из к-казеина
- Герасимов А. М., Гудошникова Л. В., Махсон Н. Е., Уразгильдиев З. И.* Свойство полиморфно-ядерных лейкоцитов крови продуцировать супероксид при остеомиелите
- Ненасьева Н. М., Доценко В. Л., Горячкина Л. А., Яровая Г. А.* Активность системы прекалликреин-калликреин и особенности ее регуляции при некоторых аллергических заболеваниях
- ✓ *Лукомская И. С., Лавренова Т. П., Томила Н. А., Зубкин М. Л., Федорова Н. Д.* Диагностическое значение определения активности нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы и N-ацетил- $\beta$ -D-гексозаминидазы в моче при патологии почек
- ✓ *Видершайн Г. Я., Бейер Е. М., Менделсон М. М., Ливандовский Ю. А.* Биохимическая диагностика болезни Андерсона — Фабри у двух братьев
- Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase thermodenaturation in rat myocardium sarcolemma in stress and possible role of the enzyme impairment in pathogenesis of arrhythmias
- Gevorkyan, N. M., Lokshina, L. A., Nikolaeva, N. V., Itkin, B. Z.* Characteristics of lymphocyte proteolytic enzymes in normal state and in chronic lympholeukosis
- Volkovitskaya, O. E., Bochev, P. G., Ribarov, S. R., Gorkin, V. Z., Kagan, V. E.* Studies on monoamine oxidase from human placenta mitochondria using the chemiluminescence technique
- Zhukova, N. L., Gedymin, L. E., Golyshevskaya, V. I.* Activity of proteolytic enzymes and of their inhibitors in lung tissue of guinea pigs with generalized and destructive forms of tuberculosis
- Kulinsky, V. I., Medvedev, A. E., Kuntsevich, A. K.* Contribution of catecholamines to stimulation of mitochondrial oxidative enzymes under conditions of acute cooling
- Stepanova, N. G.* Estimation of aldolase of the type A in blood serum of patients with myocardial infarction by means of the procedure based on specific properties of the enzyme
- Karelin, A. A., Globa, A. G., Demidova, V. S., Marchuk, A. I.* Production of the signal ATP in plasmatic membranes of polymorphonuclear leukocytes, activated by formylmethionyl leucylphenylalanine
- Stan, E. Ya., Ekimovskiy, A. P., Aleinik, S. I., Vasilevskaya, L. S., Chernikov, M. P.* Isolation, amino acid composition and efficiency of the inhibitors of gastric secretion derived from k-casein
- Gerasimov, A. M., Gudoshnikova, L. V., Makhson, N. E., Urazgil'diev, Z. I.* The property of polymorphonuclear leukocytes to produce superoxide anion in osteomyelitis
- Nenasheva, N. M., Dotsenko, V. L., Goryachkina, L. A., Yarovaia, G. A.* Activity of the prekallikrein-kallikrein system and characteristic properties of its regulation in some allergic diseases
- Lukomskaya, I. S., Lavrenova, T. P., Tomilina, N. A., Zubkin, M. L., Fedorova, N. D.* Diagnostic importance of estimation of neutral  $\alpha$ -glucosidase and N-acetyl- $\beta$ -D-hexosaminidase activities in urine of patients with kidney pathology
- Wiedershain, G. Ya., Beyer, E. M., Mendelson, M. M., Livandovsky, Yu. A.* Biochemical diagnosis of the Anderson-Fabri disease in two brothers

#### Методы биохимических исследований

- Ефимов А. С., Черепанов Д. С.* Ферментные электроды для анализа метаболитов крови в норме и при патологии
- Иванов А. С., Халилов Э. М., Соловьева Э. Ф., Стоник В. А., Мальцев И. И., Еляков Г. Б.* Определение содержания свободного холестерина в сыворотке крови человека с использованием голотоксина А<sub>1</sub>
- Филиппов И. К., Титов В. Н., Саргина В. И., Ажмуханбетова А. Ж.* Разделе-

#### Methods of Biochemical Investigations

- Efimov, A. S., Cherepanov, D. S.* Enzyme electrodes for analysis of blood metabolites in normal and pathological states
- Ivanov, A. S., Khalilov, E. M., Solovyova, E. F., Stonik, V. A., Maltsev, I. I., Eljakov, G. B.* Assay of free cholesterol in human blood serum using triterpene glycoside Golotoxin A<sub>1</sub>
- Filippov, I. K., Titov, V. N., Sargina, V. I., Azhmukhanbetova, A. Zh.* Separation of

ние изоформ гликогенфосфоорилазы методом электрофореза на ацетате целлюлозы 134

Glycogen phosphorylase isoforms using the electrophoresis on acetate cellulose films

#### Краткое сообщение

#### Brief Communication

✓ Морозевич Г. Е., Берман А. Е., Мазуров В. И. Изменение биосинтеза коллагеновых белков в онкотрансформированных фибробластах человека . . . . . 137

Morozevich, G. E., Berman, A. E., Mazurov, V. I. Changed biosynthesis of collagen proteius in oncologically transformed human fibroblasts

#### Хроника

#### Current Events

Техн. редактор Н. К. Евстигнеева

Корректор Л. Ф. Карасёва

Сдано в набор 11.07.86	Подписано в печать 20.08.86	Формат 70×108 <sup>1/8</sup>	Бумага тип. № 1
Гарнитура литературная	Печать высокая	Печ. л. 9,00+печ. л. вкл. 0,13	усл. печ. л. 12,78
усл. кр-отт. 13,30	Уч.-изд. л. 15,41	Тираж 1513 экз.	Цена 1 р. 30 к. Заказ 1982

Ордена Трудового Красного Знамени  
Издательство «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

УДК 61.591.105:591.133.591.8.612.014.43

*Аминокислотные резервы сыворотки крови, ткани почек и их субклеточных структур у крыс при глубокой гипотермии.* Туряница И. М., Пащенко А. Е., Туряница С. М.

Проведено исследование пула свободных аминокислот в сыворотке крови, ткани почек, их ядрах и митохондриях у белых крыс при 1, 3 и 6 ч гипотермии. Свободные аминокислоты определяли с помощью одномерной нисходящей хроматографии на обессоленной бумаге FN-1 ГДР.

Выявлена перестройка резервов свободных аминокислот в сыворотке крови, ткани почек, выделенных из них ядрах и митохондриях у белых крыс при гипотермии. Установлено накопление резервов подавляющего большинства свободных аминокислот в ткани почек (цистеин с цистином, орнитин, лизин, гистидин, аргинин, аспарагиновая кислота, глицин, треонин, аланин, тирозин, метионин, валин, фенилаланин и лейцин с изолейцином) и ряда из них в сыворотке крови (аспарагиновая кислота, серин, глутаминовая кислота, третионин, тирозин) в динамике к 3 ч охлаждения и падение концентраций их большинства к 6 ч опыта. Найденное уменьшение резервов большинства свободных аминокислот в ткани почек к 6 ч опыта сочеталось с таковым в сыворотке крови лишь для аспарагиновой кислоты, третионина, тирозина, лейцина с изолейцином.

К концу 1 ч в митохондриях найдено уменьшение резервов всех свободных аминокислот, за исключением нарастания содержания аргинина. К 3 ч опыта определено нарастание количеств лизина, серина, глутаминовой кислоты, третионина, аланина, пролина, тирозина, метионина, но падение — аргинина, валина, фенилаланина и лейцина с изолейцином в митохондриях. В ядрах при этом отмечено увеличение уровней аспарагиновой кислоты, лейцина с изолейцином и снижение — аланина. К 6 ч охлаждения наблюдалось падение пула цистеина с цистином, аргинина, аспарагиновой кислоты, серина, третионина, аланина и лейцина с изолейцином в ядрах; лизина, аспарагиновой кислоты, серина, третионина, тирозина, метионина при увеличении — гистидина, аргинина, глицина, триптофана, фенилаланина и лейцина с изолейцином в митохондриях.

Таким образом, выявленное нарастание количества свободных аминокислот в почках на тканевом уровне, по-видимому, явилось результатом повышенной протеолитической активности лизосомальных ферментов, а не как результат лишь межтканевого перераспределения через кровь из других тканей, поскольку нет однозначности сдвигов в сыворотке и этих органах. Уменьшение содержания ряда свободных аминокислот в сыворотке крови, видимо, связано с их интенсивным использованием в других органах и тканях, что является причиной возникновения аминокислотного дисбаланса при гипотермии. Сдвиги, выявленные на субклеточном уровне, вероятно, происходят вследствие повышенного включения свободных аминокислот в энергетический метаболизм.

Таблиц 4. Библиография: 16 названий.

(Рукопись деп. в ВИНТИ 3.10.85, № 6994—В85).

УДК 612.391-08:612.273.2.017.2

*Сравнительное исследование некоторых показателей метаболизма изолированной печени интактных кроликов и кроликов, подвергнутых полному алиментарному голоданию.* Зиновьев Ю. В., Козлов С. А., Киселев Е. Н.

С целью выяснения роли глюконеогенеза печени в повышенной устойчивости голодавших в течение 4 суток кроликов к высотной гипоксии были исследованы скорость потребления лактата и кислорода, а также скорость выброса глюкозы изолированной перфузируемой печенью этих животных. При этом перфузат, раствор Хенкса с 20 ммоль лактата, не содержал эритроцитов.

В обеих сравниваемых группах скорости расхода печенью кислорода, выброса глюкозы в перфузат и потребления лактата по мере увеличения длительности и перфузии снижались.

Скорость потребления кислорода изолированной печенью через 3 мин после начала перфузии была одинаковой в сравниваемых группах кроликов. По мере увеличения длительности перфузии она снижалась с одинаковой скоростью в группах интактных и голодающих животных, достигая к концу перфузии соответственно 57% и 62% от исходных величин.

Абсолютные величины скорости потребления кислорода, а также их значительное снижение по мере увеличения времени перфузии свидетельствуют о том, что перфузия печени осуществлялась в гипоксическом режиме.

Скорость потребления печенью лактата в этих условиях в группе голодающих кроликов была значительно выше по сравнению с питающимися нормально. У интактных кроликов уже на 10-й минуте перфузии убыль лактата сменялась увеличением его концентрации в перфузате. Однако выброс глюкозы в перфузат изолированной печенью интактных кроликов был выше по сравнению с голодающими. Это связано, вероятно, с тем обстоятельством, что источником глюкозы у интактных кроликов служит не лактат, а гликоген. Об этом свидетельствует тот факт, что скорость выброса глюкозы в 2—3 раза превышала скорость убыли лактата. Напротив, в начальном периоде перфузии печени голодающих кроликов скорость убыли лактата превышала скорость выброса глюкозы. Как известно, при голодании запасы гликогена в печени резко уменьшаются уже через 1—2 сут, после последнего приема пищи.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что в условиях гипоксии печень голодающих кроликов удаляет лактат из сосудистого русла более эффективно, чем печень животных, находящихся на обычном пищевом режиме. Это подтверждает предположение о положительной роли глюконеогенеза печени в механизме антигипоксического действия длительного голодания.

Таблиц 3. Библиография: 5 названий.

(Рукопись деп. в ВИНТИ 3.10.85, № 6995—В85).