

ТОМ XXXIII

ВЫПУСК I

ЯНВАРЬ — ФЕВРАЛЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1987

ВОПРОСЫ
МЕДИЦИНСКОЙ
ХИМИИ



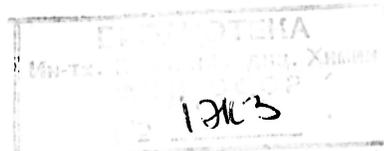
РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. И. МАЗУРОВ (зам. главного редактора), И. П. АШМАРИН, Т. Т. БЕРЕЗОВ,
Е. Н. ГЕРАСИМОВА, В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ, В. Л. КОЗЕЛЬЦЕВ,
А. Н. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВКИН, Л. А. ЛОКШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАН-
ЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ, Е. Л. РОЗЕНФЕЛЬД, Ю. А. РОМАКОВ (ответствен-
ный секретарь), В. А. САКС, С. Е. СЕВЕРИН, В. Б. СПИРИЧЕВ, В. А. ТУТЕЛЬЯН

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

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



Адрес редакции журнала:

Москва, 109801, Солянка, 14

АМН СССР

Тел. 297-16-44

Зав. редакцией Л. А. Фирсова

И. Ф. Чернядьева, В. Н. Титов

АПОПРОТЕИНЫ ЭФФЕРЕНТНОГО ТРАНСПОРТА ХОЛЕСТЕРИНА В КРОВИ (обзор)

Всесоюзный кардиологический научный центр АМН СССР, Москва

Сердечно-сосудистая система представляет собой специализированную транспортную систему организма. Содержащиеся в плазме, лимфе и интерстициальной жидкости соединения и клетки крови осуществляют перенос многих веществ, необходимых для поддержания гомеостаза. Результаты исследования последних лет показали, что существуют белки, осуществляющие перенос липидов в плазме крови. Целью данного обзора является обобщение данных о роли белков в транспорте и метаболизме липидов в сосудистом русле. Проблеме сердечно-сосудистых заболеваний, обусловленных нарушениями обмена липидов [2, 21, 35, 47, 48], уделяется в последнее время самое пристальное внимание, поэтому количество информации по этому вопросу увеличилось настолько, что дальнейшие исследования ее целесообразно планировать лишь при обобщении уже накопленного материала.

Одним из важных аспектов обмена липидов является транспорт липидных соединений от синтезирующих их органов к тканям, в которых они подвергаются деструкции (эфферентный транспорт). Основной транспортной формой для ряда гидрофобных соединений, обладающих крайне низкой растворимостью в водных растворах, являются липопротеиды (ЛП), Чарлтон и Смит [16] назвали их своеобразными «циркулирующими резервуарами». Формирование мицелл ЛП, построенных, вероятно, по единому принципу, несмотря на различие апопротеинов (апо), входящих в их состав, является весьма выгодным, поскольку обеспечивает термодинамическую устойчивость входящих в их состав соединений. Согласно современной пространственной модели ЛП, поверхностный их слой занят головными фосфолипидными и поляр-

ными группами белков и не оставляют какого-либо пространства для нейтральных липидных компонентов. Роль молекул холестерина (ХС) на поверхности заключается, по-видимому, в создании свободного пространства между полярными группами фосфолипидов, что позволяет амфипатическим пептидным фрагментам энергетически более выгодно располагаться на границе раздела фаз [71]. Изучение термодинамики образования ЛП показало, что гидрофильность эфирных групп ХС и триглицеридов значительно ниже, чем таковая заряженных групп аминокислотных остатков участков полипептидной цепи, контактирующих с водой, и фосфолипидных головных групп. Удаление с поверхности ЛП гидрофобных остатков липидов обеспечивает значительный выигрыш в свободной энергии, поскольку величина последнего значительно превышает потерю свободной энергии в результате отдаления от поверхности мицелл небольших гидрофильных групп [71].

Относительно постоянный состав циркулирующих ЛП поддерживается одновременно протекающими процессами: 1) синтеза и секреции; 2) пассивного транспорта и обмена липидных и апопротеиновых компонентов; 3) активного транспорта, в том числе под влиянием специфичных плазмальных белков; 4) изменения в составе под действием ферментов — фосфатидилхолин: холестеролацилтрансферазы (КФ 2.3.1.43; тривиальное название ЛХАТ), постгепариновой (КФ 3.1.1.3) и печеночной (КФ 3.1.1.3) триацилглицероллипаз; 5) удаления из циркуляции путем поглощения клетками как ЛП, так и их белковых и липидных компонентов. Судьба циркулирующих в сосудистом русле ЛП и их способность участвовать в переносе разных

липидов зависят прежде всего от свойств входящих в их состав апопротеинов.

Апопротеины, входящие в состав ЛП, в зависимости от их роли в организации первичных ЛП-мицелл могут быть условно разделены на 2 группы. Согласно предложенной Райнольдс и соавт. классификации [30], к 1-й группе следует отнести апопротеины, способные служить «скелетом» в первичных ЛП-частицах. Это апоВ для ЛП-частиц, осуществляющих эфферентный транспорт липидов из печени к периферическим тканям, и апоА для ЛП высокой плотности (ЛПВП), основной функцией которых является перенос ХС в обратном (афферентном) направлении. 2-ю группу составляют апопротеины, содержащиеся в ЛП в значительно меньших количествах и перемещающиеся между ними. Основной ролью последних является осуществление регуляторных функций в процессе метаболизма ЛП.

Предполагают, что апоА и апоВ играют ведущую роль в организации ЛП-мицелл, поскольку эти апопротеины обычно не присутствуют вместе в длительно циркулирующих ЛП-частицах. Исключение составляют хиломикроны (ХМ), синтезированные в эпителиальном слое тонкой кишки. Эти наиболее крупные ЛП-частицы характеризуются коротким временем жизни: после поступления в кровь они в течение 5 мин гидролизуются постгепариновой триацилглицеролгидролазой, фиксированной на эндотелии капилляров [5].

Перенос синтезированных в печени липидов к периферическим тканям осуществляется в составе богатых триглицеридами частиц — ХМ и ЛП очень низкой плотности (ЛПОНП), синтезированных в печени и тонкой кишке; интегральными белками этих частиц являются апоВ. При отсутствии в сыворотке крови апоВ, что имеет место у пациентов с одной из форм абетапопротеинемий, триглицериды не секретируются в кровь, несмотря на то что их синтез в гепатоцитах не нарушен. Характерной особенностью апоВ-белков является то, что они неспособны перемещаться между ЛП-частицами и нерастворимы в 4,2 М тетраметилмочевине и водных буферах после делипидирования. Наличие общих свойств у этих белков в совокупности с их сходными аминокислотным соста-

вом и углеводными компонентами в течение долгого времени ставило под сомнение существование *in vivo* разных апоВ-белков; казалось более вероятным, что наблюдаемая после выделения гетерогенность апоВ является артефактом. Веской причиной трудно-сти интерпретации получаемых при исследовании апоВ результатов является нетипичное для других белков поведение апоВ в растворах амфифильных соединений: кажущаяся мол. масса апоВ, вычисленная по скорости седиментации в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН), составляла 500 кД, что в 2 раза превышало цифры, получаемые методом седиментационного равновесия в 7—8 М гуанидинхлориде. Это позволило высказать предположение о том, что апоВ сохраняет в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) димерную структуру [83]. Кан и соавт., предложившие в 1980 г. рациональную номенклатуру для апоВ-белков, считают, что *in vivo* мол. масса наиболее крупного из апоВ (обозначенного В-100) составляет 549 кД. Недавние исследования, проведенные методом седиментационного равновесия в гуанидинхлориде, показали, что мол. масса апоВ-100 составляет примерно 400 кД. При этом кажущуюся мол. массу других форм апоВ выражают цифровыми значениями, соответствующими относительной величине их массы по отношению к таковой апоВ-100 (позже мол. массы были уточнены, а наименования остались неизменными). Согласно данной номенклатуре, В-74 и В-26 обозначены апоВ-белки с мол. массами 300 и 100 кД соответственно, а В-48 — белок с мол. массой 264 кД [43, 44]. В случае применения более жестких методов делипидирования, чем использовали Кан и соавт. (экстракция липидов смесью этанол — этиловый эфир), например, таких как обработка смесью хлороформа с метанолом [64] или этанола с диэтиловым эфиром в присутствии гуанидина — $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{+2}$, исследователи обнаруживают [37] фрагменты с мол. массой от 63 до 136 кД. Делипидирование с последующим маленированием или сукцинилированием и солюбилизацией при высоком рН [45], солюбилизация в дезоксихолате натрия [17], делипидирование на ионообменной смоле с амфифильными соединениями [76], прогревание

и хранение в присутствии ДНС [83] приводят к получению белков со значительно меньшими мол. массами. Эти данные наводили на мысль, что первичные молекулы apoB состоят из белков с кажущимися мол. массами менее 44 кД [76]. Во-вторых, фактором, обуславливающим возможное артефактное появление фрагментов apoB с более низкой, чем *in vivo* мол. массой, служит подверженность apoB бактериальной деградации. В-третьих, важным фактором является окисление нативных молекул apoB соединениями, вводимыми в среду в процессе выделения (в том числе препаратами, препятствующими микробной деградации), и продуктами окисления ненасыщенных жирных кислот, возникающими в процессе окисления липидных компонентов частиц, богатых триглицеридами. Возможно также расщепление нативных apoB молекул неспецифическими протеазами [82, 83].

Ввиду трудности работы с apoB полная первичная структура этого белка окончательно не установлена, но изучена последовательность аминокислот в отдельных фрагментах. ApoB-100 содержит углеводы в количестве 8—10%, в том числе маннозу, N-ацетилглюкозамин, галактозу и N-ацетилнейраминную кислоту. Исходя из первичной структуры фрагментов, apoB обладает обычным аминокислотным составом [44]. Белок содержит 14 моль полуцистиновых остатков. В составе ЛП низкой плотности (ЛПНП) apoB имеет 2 свободные сульфгидрильные группы, в то время как 12 остальных остатков образуют внутримолекулярные дисульфидные связи [13]. ApoB взаимодействует с гепарином и другими сульфатированными гликозамингликанами, что, возможно, играет определенную роль при атероматозе. Иммуноморфологическими методами показано присутствие apoB в пораженной артериальной стенке, при этом apoB присутствовал как в непораженной интиме, так и в липидных фиброзных бляшках [36].

Гетерогенность apoB была показана для сыворотки крови человека [44] и крыс [46]. Обнаруженные в ЛПОНП и ЛПНП крови человека наряду с apoB-100 белки B-74 и B-26 являются, судя по их аминокислотному составу, фрагментами apoB-100 [44]. Показано, что эти фрагменты могут быть образованы из ЛПНП при инкубации с

каликреином [14]. B-100 является единственным apoB-белком у 50% здоровых людей, у остальных в ЛПНП наряду с apoB-100 были обнаружены белки B-74 и B-26, причем их присутствие в сыворотке крови было отмечено на протяжении нескольких месяцев [19].

Найденный в ХМ apoB-48 в отличие от приведенных выше не является фрагментом apoB-100. По аминокислотному составу apoB-48 отличается от фрагментов apoB-100 [44]. Существуют экспериментальные доказательства различий в синтезе и метаболизме apoB-100 и apoB-48 [43, 44]. Неисключено, что эти белки кодированы разными генами. Выделенные из сыворотки крови крыс формы apoB обозначены apoB_H (apoB с «высокой» мол. массой) и apoB_L (apoB с «низкой» мол. массой) [76]. Одновременно другие исследователи при электрофорезе в ПААГ в присутствии ДСН выделили из сыворотки крови 3 формы apoB, обозначив их как фракции I, II, III [22, 23]. Согласно подвижности при электрофорезе, фракция I apoB сыворотки крови крыс была сходна с apoB-100 сыворотки крови человека, а фракция III — с apoB-48. Относительное содержание фракции III в ЛП сыворотки крови крыс уменьшалось по мере увеличения гидратированной плотности частиц: от 70—90% в ЛПОНП до 7% в ЛПНП₂ ($1,038 \leq d \leq 1,063$ г/см³). Отметив сходство apoB фракции III сыворотки крови крыс с apoB белком сыворотки крови человека, являющимся маркером ХМ, и отсутствующим в составе ЛПОНП, липопротеидов промежуточной плотности (ЛППП) и ЛПНП, авторы впервые провели аналогию между apoB-100 и наиболее крупным apoB-белком из сыворотки крови крыс. Эксперименты со следовой меткой показали, что формы I и II apoB сыворотки крыс присутствовали в ЛПОНП. Затем указанные белки в виде ремнантов удаляются печенью, и снижение отношения apoB формы III к суммарному содержанию форм I и II может служить критерием скорости метаболизма ЛП. Однако номенклатура, в которой apoB-белки обозначены римскими цифрами, не получила широкого распространения: обычно используют обозначения B_H и B_L.

Гетерогенность apoB-белков, образующих субфракции ЛПНП сыворотки

крови человека, обусловлена формированием молекул апоВ из полипептидных фрагментов с мол. массой от 14 до 250 кД, составленных в разной последовательности. Эти молекулы, возможно, содержат сходные полипептидные фрагменты, однако определенные части являются, очевидно, специфичными для индивидуальных апоВ-белков и обуславливают антигенную гетерогенность последних. Нельзя исключить, однако, возможность отличий в углеводной части молекул апоВ. Таким образом, апо ЛПНП представляет собой систему гетерогенных антигенов, неравномерно распределенных на пептидных фрагментах [77]. Существование общих антигенных детерминант было установлено для апоВ-100 и апоВ-48, но согласно их иммунореактивности в апоВ-48 отсутствует часть субъединиц апоВ-100, а апоВ-100 не содержит определенных фрагментов В-48 [26, 57]. В соответствии с такой моделью отсутствие генетического кодирования синтеза отдельных пептидных фрагментов апоВ может приводить к избирательному нарушению синтеза апоВ-100 или апоВ-48. Отсутствие синтеза субъединиц, общих для обоих белков, вызывает, очевидно, нарушение образования апоВ-содержащих ЛП в печени и тонкой кишке [43, 44, 57]. Сходство аминокислотного состава отмечено для апоВ_h и апоВ₁ сыворотки крови крыс; характерным также является наличие сходных и различающихся пептидных фрагментов [22, 43]. Различия в иммунореактивности поверхностных структур апоВ, найденных в составе ЛПОНП и ЛПНП человека, дают основания полагать, что во время липолиза происходит изменение поверхностных детерминант апоВ. Образовавшиеся после липолиза формы апоВ имеют большее сродство к Е-рецепторам фибробластов человека, возможно, за счет демаскирования открытых до липолиза антигенных детерминант и связывающих участков [73, 74, 77].

Синтез апоВ происходит в печени, тонкой кишке и, возможно, в почках [8—10]. У человека в печени синтезируются апоВ-100 и его комплементарные фрагменты — апоВ-74 и апоВ-26, обнаруживаемые в составе циркулирующих ЛПОНП и ЛПНП. Нефракционированная РНК из печени человека способна программировать в лизате

ретикулоцитов кролика синтез полипептидов, специфически связываемых антителами против ЛПНП ($1,030 \leq d \leq 1,055$ г/см³) так же, как и антителами против апоВ-100 [63]. Синтез апоВ-48, входящего в состав ХМ человека, происходит в тонкой кишке [35, 44]. У крыс в тонкой кишке синтезируются только В₁ [82], тогда как печень синтезирует как апоВ_h, так и апоВ₁ [22, 78]. Предположение, что ЛПНП, содержащие обе формы апоВ, секретируются печенью, в настоящее время в большей мере доказано для крыс, чем для человека.

Мнение о последовательном превращении ЛПОНП в ЛПВП и далее в ЛПНП было высказано Гитлиным (1956) на основании исследования в сосудистом русле судьбы входящего в состав ЛПОНП ¹²⁵I-апоВ. Однако в последнее время накоплены факты, не согласующиеся с данной концепцией. Согласно гипотезе Айзенберг, ЛПОНП, богатые апоС, взаимодействуют первоначально с гепаринзависимой триацилглицероллипазой, ЛПНП, обогащенные апоВ, связываются с рецепторами плазматических мембран внепеченочных тканей; в то время как обогащенные апоЕ ЛПОНП поглощаются рецепторным механизмом гепатоцитов [21].

Наличие в ЛП-частицах крови двух форм апоВ (апоВ-100 и апоВ-48 у человека; апоВ_h и апоВ₁ у крыс) свидетельствует о различии их метаболических превращений [35]. Временные различия метаболизма двух форм апоВ исследованы при введении добровольцам ЛП, содержащих меченые апоВ-100 и апоВ-48. В этих условиях не отмечено различий в динамике исчезновения из крови обеих форм апоВ. В то же время у пациентов с ГЛП элиминация апоВ-100 из крови была значительно выше, чем для апоВ-48 [62]. У гипотиреоидных крыс в крови происходит накопление ЛПНП, содержащих преимущественно апоВ-100, что связано не с изменением метаболизма ЛПОНП, а скорее с нарушением рецепторного связывания ЛПНП и снижением их клиренса [91]. Эти данные указывают на то, что в механизмах развития нарушений обмена ЛП и накопления в крови апоВ-содержащих ЛП одинаково важную роль играет изменение метаболизма как апоВ-100, так и апоВ-48. При введении крысам

меченых ЛПОНП показано, что апоВ-100 быстро удалялся из крови, в то время как апоВ-48 оставался в крови в составе ЛПНП [81]. Несмотря на явное различие в метаболизме апоВ, обе формы являются функционально связанными. Превращение апоВ-содержащих ЛПОНП в ЛПНП зависело от апоВ. Меченные ^{125}I ЛПОНП были получены от крыс, которым скармливали сахарозу. Затем эти ЛПОНП инъецировали крысам-донорам совместно с гепарином. В таких условиях апоВ оставались в составе ЛПНП [81]. Возможно, что существует популяция ЛПОНП, содержащая одновременно апоВ_n и В₁ [80]. Если это действительно так, то метаболические превращения этих ЛП должны быть более длительными, чем скорость исчезновения из крови ЛПОНП с апоВ₁. Не исключено, что ЛПНП, содержащие обе формы апоВ, вообще секретируются печенью и отдельные формы нарушения обмена ЛП прямо связаны с избыточным синтезом ЛПНП в печени [20]. Результаты исследований с мечеными аминокислотами свидетельствовали о прямом синтезе ЛППП в печени и их превращении в ЛПНП в сосудистом русле. Возможно, что более половины циркулирующих в крови ЛПНП секретирует печень независимо от ЛПОНП. Содержащие апоВ ЛПНП могут быть метаболизированы как периферическими тканями, так и печенью в зависимости от их липидного состава и входящих в них апопротеинов. Показано также, что и у человека печень *de novo* синтезирует и секретирует богатые холестерином ЛП с гидратированной плотностью ЛПНП [21]. Описанные ранее в литературе случаи генетического нарушения синтеза апоВ (абеталипопротеидемии) характеризовались низкой концентрацией липидов в крови, в том числе и триглицеридов. Однако в последнее время описаны случаи данного заболевания, сопровождающиеся нормальным уровнем триглицеридов в крови (нормотриглицеридемическая абеталипопротеидемия) [57]. При этом варианте абеталипопротеидемии в крови пациентов отсутствуют ЛПОНП и ЛПНП, содержащие апоВ, но нормальный уровень триглицеридов обусловлен присутствием в крови ХМ, секретируемых тонкой кишкой. В основе этой формы патологии обмена ЛП лежит избирательное

нарушение синтеза в организме апоВ-100, при этом образование апоВ-48 в кишечнике не нарушено и существует обычный перенос липидов от тонкой кишки к печени. Эти данные показывают, что 2 формы апоВ находятся под влиянием разных генетических факторов и что ЛПОНП и ЛПНП не являются продуктами превращения ХМ. Гетерогенность форм апоВ в крови людей может быть обусловлена также индивидуальными вариантами апоВ. У здоровых людей ферментативный гидролиз апоВ, выделенного из ЛПНП, и последующее электрофоретическое фракционирование полипептидного гидролизата в геле полиакриламида показали большое сходство полипептидных фрагментов апоВ, но были выявлены и некоторые различия [19].

Различия в отдельных полипептидах апоВ были установлены и методом пептидных карт.

АпоВ является лигандом для ЛПНП рецепторов плазматических мембран [21]. Непрерывное функционирование рецепторов захвата ЛПНП клетками внепеченочных тканей играет важную роль в снабжении их ХС и поддержании его гомеостаза в крови.

От $\frac{2}{3}$ до $\frac{3}{4}$ ЛПНП катаболизируются путем взаимодействия с апоВ, Е-рецепторами, главным образом в печени. Модификация лизинового остатка апоВ с нейтрализацией его заряда (ацетацетилирование или малеинирование) устраняет связывание апоВ как со специфическими рецепторами плазматических мембран, так и с гепарином [56, 85]. Это указывает на то, что остатки аргинина и лизина апоВ участвуют во взаимодействии с рецепторами и гепарином, а не с холестерином. Взаимодействующий с этими же рецепторами апоЕ также богат лизином и аргинином [70, 86]. Нарушение взаимодействия апоВ-рецепторов плазматической мембраны периферической клетки, как показано на примере фибробластов, приводит к развитию ГЛП типа IIa, накоплению в крови ЛПНП и, в конечном итоге, к развитию атеросклероза [48, 52]. АпоВ-48 в отличие от апоВ-100 не взаимодействует с апоВ, Е-рецепторами плазматических мембран, его содержание в ЛП не оказывает влияния на поглощение β -ЛПОНП макрофагами [39].

В последнее время для исследования апоВ применяют моноклональные ан-

титела [58]. Получены 6 моноклональных антител к апоВ-100. Исследование стехиометрической связи полученных антител с ЛПНП показало, что Fab-фрагмент реагирует только с одной липопротеидной частицей. Это предполагает существование 1 молекулы апоВ-100 на липопротеидную частицу [61]. Из 6 антител 4 блокировали связывание ЛПНП с апоВ, Е-рецепторами. Не было взаимодействия между антителами и апоВ-48 или апоВ-26; такое взаимодействие было отмечено для апоВ-74. По-видимому, этот фрагмент апоВ-100 содержит идентичные с апоВ-100 иммунологические детерминанты и может принимать участие в рецепторном поглощении липопротеидных частиц клетками [58].

Способностью к эфферентному транспорту ХС обладает и другой апопротеин — апоЕ. АпоЕ найден в ЛПОНП здоровых людей [52] и в ЛПВП₂. Показано [47, 49], что у некоторых видов животных диета, богатая ХС, приводит к накоплению в крови ЛПВП с гидратированной плотностью, приближающейся к ЛПНП—ЛПВП₁. Одним из основных апопротеинов, образующих ЛПВП_С или ЛПВП₁, является апоЕ. АпоЕ в отличие от апоВ способен перемещаться между ЛП отдельных классов [67]. АпоЕ входит в состав ХМ, ремнантов ХМ, ЛПОНП и ЛПВП_С. Концентрация белка в плазме крови составляет 3—7 мг/дл и повышается до 20—60 мг на 100 мл у пациентов с ГЛП (особенно типа III) [50]. Концентрация апоЕ в крови человека возрастает также при голодании одновременно с увеличением концентрации ХС и триглицеридов [59]. Методом изофокусирования выделены 6 основных фенотипов апоЕ: 3 гомозиготных — Е 4/4; Е 3/3 и Е 2/2 и 3 гетерозиготных — Е 4/3; Е 4/2 и Е 3/2. Изoeлектрические точки основных изоформ апоЕ расположены в интервале рН от 5,7 до 6,2 [90, 92]. Три минорные формы представляют собой гликолизированные формы основного белка. Преобладающим в популяции является апоЕ 3/3, который найден у 60 % исследованных людей. Наличие в организме гомозиготного фенотипа Е 2/2 является реальной причиной возникновения ГЛП (особенно типа III) [50, 68, 69]. Для апоЕ в отличие от апоВ установлена первичная структура, последовательность из 299 аминокислотных остатков с молекулярной

массой 34,2 кД [70]. Изоформы апоЕ₂ и апоЕ₄ отличаются от апоЕ₃ единственной аминокислотой в положении 112. АпоЕ₃ в этом положении имеет цистеин, а апоЕ₄ — аргинин, что создает относительную разницу в заряде. АпоЕ₂ является генетически неоднородным. Описаны 3 формы апоЕ₂, ассоциированные с ГЛП типа III [50, 52, 68, 69]. Эти формы отличаются тем, что в них один из нейтральных аминокислотных остатков замещен лизинном или аргинином. Наиболее часто встречаются варианты апоЕ₂, в которых аргинин, находящийся в положении 158, заменен на цистеин. АпоЕ, как и другие апо, имеет упорядоченную структуру, в частности α -спиральную вторичную [70]. Полагают, что основным липидсвязывающим доменом является треть его молекулы, с С-конца полипептидной цепи [70]. АпоЕ не обладает протеидной формой [60, 95], он секретрируется в высокоспирализованной форме, и в плазме циркулирующей крови 80 % белка не вступает в реакцию с сиаловыми кислотами [94, 95].

Формы апоЕ, присутствующие в крови экспериментальных животных, сходны с таковыми человека. Полная первичная структура апоЕ крысы, рассчитанная на основании анализа матричной РНК, оказалась на 70 % гомологичной апоЕ человека. АпоЕ кролика и собаки также сходны с апопротеином человека.

АпоЕ осуществляет транспорт ХС, синтезированного в печени, но не в тонкой кишке. Концентрация апоЕ в плазме крови увеличивается у многих животных после скармливания им ХС. АпоЕ становится в этих условиях основным белком ЛП богатых ХС, — ЛПОНП и ЛПВП_С. ЛПОНП представляют собой фракцию ЛП, синтезированную в тонкой кишке и печеночные ремнанты, а ЛПВП_С — фракцию, обогащенную ХС и апоЕ [47, 49, 52].

При метаболизме ЛПОНП в крови основная часть апоЕ остается в составе образующихся ЛППП, $1,006 \leq d \leq 1,019$ г/см³. На этапе действия печеночной триацилглицерол-липазы, до момента формирования ЛПНП, апоЕ покидает ЛППП и транспортируется в ЛПВП. При инкубации с плазмой крови человека ¹²⁵I — ЛПОНП, обогащенных апоЕ, 50 % радиоактивности было найдено в ЛПВП, 20 % оставалось в

ЛПОНП и 30 % — во фракции с плотностью более $1,21 \text{ г/см}^3$ [25]. До настоящего времени остается открытым вопрос о том, какое значение имеет присутствие в крови апоЕ в форме, не связанной с ЛП, затрудняет интерпретацию данных и увеличение доли свободного апоЕ после ультрацентрифугирования [15].

Увеличение содержания апоЕ во всех классах ЛП крови при скормлении им ХС сопровождается снижением свободной формы апоЕ во фракции с плотностью более $1,12 \text{ г/см}^3$ [25, 52]. Накопление ЛПВП_с в крови подопытных животных наблюдается и после гепатэктомии. В течение 1 ч после гепатэктомии у крыс в крови не изменяется содержание апоВ и апоЕ, но изменяется их перераспределение между отдельными классами ЛП. При этом в ЛПНП повышается содержание апоВ и апоЕ. Основная масса апоЕ обнаруживается в частицах, богатых апоА-1, которые были меньше, чем ЛПНП, но больше, чем ЛПВП. Это свидетельствует о том, что при физиологических условиях печень элиминирует из крови апоЕ, богатые ЛП, которые образуются в процессе трансформации ЛПОНП в крови [18, 21]. Полагают, что ЛПВП_с или ЛПВП₁ в условиях нагрузки ХС формируются в плазме или экстрацеллярном пространстве из ЛПВП, не содержащих апоЕ. ЛПВП_с, содержащие высокую концентрацию апоЕ, состоят более чем на 50 % из свободного ХС и фосфолипидов, представляя собой полиморфные образования от везикулярных частиц до цепочек бислойных дисков [84]. Морфологически и структурно ЛПВП_с похожи на ЛПВП, богатые апоЕ, которые секретирует печень при перфузии ее средой, содержащей ингибиторы ЛХАТ. Основным местом синтеза апоЕ является печень. Однако и многие другие ткани содержат значительное количество мРНК для синтеза апоЕ. К таким тканям относятся мозг, надпочечники, селезенка, почки, яичники и поперечнополосатые мышцы [24]. Доля апоЕ крови, синтезированного в периферических тканях, может составлять до 20 % от общего содержания белка. Скорость образования апоЕ в корковом слое надпочечников в 6 раз выше, чем в мозговом [10]. Синтез апоЕ в тканях может быть необходим для перераспределения ХС между раз-

ными популяциями клеток в одном органе, являясь высокоактивным лигандом для стерина. Не до конца понятной остается высокая концентрация (30 % по сравнению с печенью) апоЕ мРНК в мозговой ткани человека, крыс и обезьян. В ткани мозга весь апоЕ локализован в клетках астроцитарной глии [12]. В цереброспинальной жидкости содержание апоЕ выше, чем в плазме крови. Не исключено, что апоЕ может функционировать как лиганд и при транспорте ХС в ткани мозга.

Полагают, что ЛПОНП, богатые апоЕ, являются атерогенными, что связано с их способностью вызывать накопление эфиров ХС в макрофагах [47, 48, 52, 54]. Донаторами ХС могут быть и ЛПВП_с, хотя не исключено, что они обеспечивают афферентный транспорт ХС к печени, осуществляя присущее им антиатерогенное действие.

Общность физиологических функций апоВ и апоЕ соответствует тесной взаимосвязи процессов их метаболизма. ЛПВП_с являются вторым классом ЛП, которые, как и ЛПНП, богатые апоВ, связываются со специфическими рецепторами плазматической мембраны клеток. В дополнение к теории рецепторного связывания и интернализации ЛПНП, богатых апоВ [32, 33], показано, что некоторые органы имеют другие рецепторы, но не только к апоВ. Так, печень имеет рецепторы к апоЕ, ремнантам ХМ. Известно, что макрофаги имеют рецепторы, или места связывания, по крайней мере, к ЛПНП, β -ЛПОНП пациентов с ГЛП типа III и отрицательно заряженным ЛПНП (полученным химической модификацией белка). ГЛП типа III только отчасти связан с нарушенным взаимоотношением ЛП — рецептор [50, 52, 54]. Число рецепторов является фактором, контролирующим поступление ХС в клетку. Недавно показано, что не все интернализированные ЛП подвергаются лизосомальному гидролизу; часть из них может быть возвращена на поверхность клетки в результате процесса, названного «ретроэндоцитозом» [6]. В новом свете стали рассматривать конкуренцию ЛПНП и ЛПВП за связь с рецепторами: конкурирующей формой ЛПВП являются ЛПВП_с, богатые апоЕ. Действительно, если ЛПВП, богатые ХС, лишены

апоЕ, то они не взаимодействуют с рецепторами [21, 52, 87]. Создается впечатление, что апоЕ и апоВ взаимодействуют на поверхности клетки с одними и теми же рецепторами.

Ацетилирование аргинина и восстановительное метилирование лизина позволили установить роль как апоВ, так и его отдельных аминокислотных остатков в связывании ЛПНП с рецепторами. В обоих случаях взаимодействие апоВ и апоЕ с рецепторами фибробластов было полностью подавлено [55]. Наличие апоВ и апоЕ в составе ЛП не всегда является гарантией, что эти частицы будут связываться с апоВ Е-рецепторами. Кажется вероятным, что липидный состав и размер мицелл могут оказывать влияние на их способность взаимодействовать с рецепторами. Так, ХМ и нормальные ЛПОНП, несмотря на то что они содержат апоВ и апоЕ, не вступают во взаимодействие с рецепторами фибробластов [52]. После частичного делипидирования диэтиловым эфиром ХМ приобретают способность взаимодействовать с апоВ, Е-рецепторами, они даже могут вступать в конкурентные взаимоотношения с ЛПНП. Присутствие в ЛП апоС также может предотвращать взаимодействие апоВ и апоЕ с рецепторами [89].

Способностью специфически взаимодействовать с апоВ, Е-рецепторами обладает и ЛП (а) [28]. Являясь генетически детерминированным, ЛП (а) присутствует в крови многих людей в низкой концентрации. В качестве основного белкового компонента ЛП (а) содержит апоВ, отличающийся от апоВ-100 высоким содержанием углеводов, сиаловых кислот и менее активным взаимодействием с рецепторами. Не исключено, что высокое содержание сиаловых кислот оказывает влияние на взаимодействие апо с рецепторами [27].

Установлено, что ЛПВП_с, содержащие апоЕ, связываются с рецепторами фибробластов более интенсивно, чем ЛПНП [41]. Высокое сродство апоЕ как к апоВ, Е, ЛПНП, так и с апоЕ-рецепторами коррелирует с высокой скоростью клиренса апоЕ, содержащих ЛП (клиренс ЛПОНП от нескольких минут до 1 ч), по сравнению с более медленным клиренсом апоВ, содержащих ЛПНП (2—3 сут). АпоЕ является основной детерминантой, ответственной за рецепторное связывание

ЛПВП₁, ЛПВП_с, ЛПОНП, ремнантов ХМ и ЛПОНП у кормленных ХС животных и при ГЛП типа III у человека [38, 47].

Фибробласты связывают ЛПВП_с в 80—100 раз более активно, чем ЛПНП и, кроме того, для насыщения всех мест связывания на плазматической мембране фибробласта требуется в 4 раза больше частиц ЛПНП, чем ЛПВП_с (соответственно 90—100 000 и 25 000) [52, 65]. Оба типа ЛП конкурируют за связывание с одними и теми же рецепторами. У больных с наследственной гомозиготной гиперхолестеринемией фибробласты не связывают ни ЛПНП, ни ЛПВП_с. Высказано предположение, что апоВ, Е-рецепторные единицы имеют 4 места связывания. Согласно этой модели, мицеллы ЛПВП_с связываются одновременно с 4 точками связывания, а ЛПНП только с 1 точкой [65, 66]. Исходя из данных по молекулярной массе ЛПВП_с (хотя единого мнения по последнему вопросу не имеется) эти ЛП содержат 16 молекул апоЕ, в то время как в состав каждой ЛПНП-частицы входит 2 молекулы апоВ (В-100). Показано, что ХМ и ЛПОНП связываются с апоВ, Е-рецепторами крыс и человека в культуре фибробластов и гладкомышечными клетками крысы с высокой специфичностью [42].

Важные сведения были получены при исследовании рецепторного связывания аномальных форм апоЕ₂, которые присутствуют в крови пациентов с ГЛП типа III [50]. Для этого типа характерно нарушение клиренса ремнантов ЛПОНП и ХМ и накопление в крови ЛПОНП. Все мутантные формы апоЕ₂ обладают сниженной способностью взаимодействовать как с апоВ-, Е-, ЛПНП-рецепторами, так и с рецепторами апоЕ; связывающая способность разных форм апоЕ₂ составляет от 2 до 45 % по сравнению с таковой апоЕ₃. Исследование таких мутантов позволило охарактеризовать домены молекул апоЕ, ответственные за рецепторное связывание. Нарушение взаимодействия с рецепторами зависит от замещения нейтральных аминокислот в положениях 142, 145, 146 и 158 на лизин и аргинин [68, 69]. Дальнейшие исследования показали, что все домены рецепторного взаимодействия расположены на участке полипептидной цепи от 140 до 160 аминокислотного остат-

ка. Содержание апоЕ в крови возрастает в условиях холестаза [29].

Известно, что очищенный апоВ, Е, ЛПНП-рецептор является кислым гликопротеидом с rL 4,6. Это дает основание предполагать существование ионного взаимодействия между положительно заряженными группами аминокислотных остатков апоВ и апоЕ и отрицательно заряженным рецептором. ЛП, содержащие апоЕ, взаимодействуют с гепарином [56]; это относится и к липопротеидным частицам, содержащим апоВ. Тот же самый участок полипептидной цепи, взаимодействующий с рецепторами плазматической мембраны, взаимодействует и с гепарином. Не исключено, что присоединение ЛП, содержащих апоВ, Е к гепарину (или другим гликозаминогликанам) является важным физиологическим механизмом фиксации ЛП на поверхности эндотелия или при взаимодействии с основным веществом артериальной стенки. Возможно, в этом состоит один из моментов образования липидных отложений на деэндоотелизированном участке стенки сосуда. Гепарин, являющийся сильно кислым протеогликаном, тормозит освобождение ЛПНП и ЛПВП_с от их связи с рецепторами. В то же время связывание ЛП с гепарином не препятствует их взаимодействию с рецепторами [31, 56].

Поглощение ремнантов печенью определяется тем, что они содержат апоЕ. Поэтому в норме ЛПВП_с, содержащие апоЕ, также быстро удаляются из крови. В то же время в условиях патологии нарушение взаимодействия апоЕ₂ ЛПОНП с рецепторами гепатоцитов приводит к развитию ГЛП типа III [50, 72, 86]. Однако не исключено существование на мембране гепатоцитов рецепторов к разным формам апоЕ [51].

Не до конца установлено значение апоЕ в формировании липопротеидных частиц, обогащенных эфирами ХС. Последний может быть получен из нагруженных ХС клеток или ЛПВП, утративших апоЕ, который может перейти в сыворотку крови в свободной форме. В эксперименте накопление свободного ХС в липопротеидных частицах активирует ЛХАТ по типу субстратной активации. Малые формы ЛПВП в крови увеличивают свои размеры параллельно с возрастанием в них содержания апоЕ и эфиров ХС, в резуль-

тате чего образуются ЛПВП размера ~ 15 (малые) и 20 (большие) и ЛП диаметром 25 нм, являющиеся ЛПВП_с [34].

Увеличение размера ЛПВП происходит вследствие образования 1, 2 или 3 слоев эфиров ХС внутри ядра частицы, а накопление в них апоЕ необходимо для стабилизации возросшего поверхностного слоя [54]. Если апоЕ отсутствует в крови, не могут быть образованы большие ЛПВП_с, обогащенные ХС. Столь же активна и роль апоЕ в метаболизме ЛП, богатых триглицеридами. Показано, что β -ЛПОНП, выделенные из крови пациента с ГЛП типа III, не превращаются в ЛПНП при инкубации *in vitro* с гепаринзависимой триглицероллипазой. Добавление апоС—II и фракции с $d > 1,21$ г/см³ активирует превращение ЛПОНП в ЛППП, но не в ЛПНП [54]. Добавление в инкубационную среду апоЕ₃ и фракции с $d > 1,21$ г/см³ (фракция ЛП, не содержащая постгепариновой триглицероллипазы) активирует процесс метаболизма ЛПОНП с образованием ЛПНП. Добавление апо и фракции $d > 1,21$ г/см³, выделенных от пациентов с ГЛП типа III, не активируют процесс превращения ЛПОНП. Это свидетельствует о том, что апоЕ₃ (но не апоЕ₂) могут взаимодействовать с фракцией $d > 1,21$ г/см³, содержащей иной липидтранспортный белок, который, модифицируя состав ЛПОНП, способствует липолизу. Предстоит еще выяснить, как апоЕ₃ модифицирует структуру ЛПОНП, делая возможным течение липолиза и превращение ЛППП в ЛПНП при действии липопротеидлипазы. Неспособность апоЕ₂, содержащих ЛПОНП, быть превращенными в ЛПНП является причиной того, почему при ГЛП типа III концентрация ЛПНП в крови оказывается сниженной [21, 50].

ЛП, содержащие апоЕ, особенно ЛПВП с апоЕ (ЛПВП₁ и ЛПВП_с), играют важную роль в эфферентном транспорте ХС у пациентов с абетапопротеидемией [11, 40]. Эти люди, у которых в крови отсутствуют ЛП, содержащие апоВ-100, имеют одновременно значительное количество вышеуказанных ЛП, способных транспортировать ХС в клетки через апоВ, Е, ЛПНП-рецепторы. Кроме того, ЛПВП, содержащие апоЕ, являются основным

классом ЛП в плазме крови поворожденных [40].

Большое количество апоЕ продуцируют макрофаги, которые секретируют белок независимо от ХС. АпоЕ доступен для взаимодействия с ЛПВП₁ экстрацеллюлярной жидкости и участвует в обратимом транспорте ХС [7]. ЛПВП, содержащие апоЕ, могут быть образованы *in vitro* и являются основной формой ЛП в периферической лимфе [34, 75]. В дополнение к возможному участию апоЕ макрофагов в транспорте липидов в интерстициальной жидкости апоЕ, синтезируемый и секретируемый макрофагами, может функционировать как активатор иммунокомпетентных клеток. Во время стимуляции макрофагов эндотоксином продукция апоЕ была снижена [88] по сравнению с таковой интактных клеток. На плазматической мембране лимфоцитов показано присутствие иммунорегуляторных рецепторов. Связывание апоЕ с этими рецепторами обеспечивает устойчивость лимфоцитов к митогенной стимуляции. Очевидно, связывание ЛП рецепторами ингибирует ранние стадии трансформации клеток, а именно поглощение ими Ca^{2+} , обновление фосфатидилинозитола и метаболизм цАМФ. Не исключена определенная роль апоЕ и в регуляции иммунологического ответа организма. Возможно, что при исследовании метаболического и иммунорегуляторного действия апоЕ будет объяснено взаимоотношение между активацией иммунного ответа организма и развитием ГЛП. Исследование апоЕ и апоВ представляется актуальной областью липидологии и на этом пути мы вправе ожидать появления новых данных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акимова Е. И., Мельгунов В. И. // ФЕБО. — Конф. 1984. — С. 222.
2. Климов А. Н. // Дислипидотендемии и ишемическая болезнь сердца. — М., 1980. — С. 10—25.
3. Климов А. Н., Титова Г. В., Кожевникова К. А. и др. // Биохимия. — 1982. — Т. 47, № 2. — С. 226—232.
4. Акимова Е. И., Мельгунов В. // Biochem. int. — 1984. — Vol. 9. — P. 463—467.
5. Alpers D. H., Lock D. R., Lancaster N. et al. // J. Lipid Res. — 1985. — Vol. 1. — P. 1—10.
6. Aulinskas T. H., Van der Westhuyzen D. R., Bierman E. L. et al. // Biochim. biophys. Acta. — 1981. — Vol. 664. — P. 255—265.
7. Bazu S. K., Brown M. S., Ho Y. K. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1981. — Vol. 78. — P. 7545—7549.
8. Bell-Quinn J., Forte T., Graheim P. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1981. — Vol. 99. — P. 700—706.
9. Blue M. L., Protter A. A., Williams D. L. // J. biol. Chem. — 1980. — Vol. 255. — P. 1048—1051.
10. Blue M. L., Williams D. L., Zucker S. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1983. — Vol. 80. — P. 283—287.
11. Blum C. B., Deckelbaum R. J., Witte L. D. et al. // J. clin. Invest. — 1982. — Vol. 70. — P. 1157—1169.
12. Boyles J. K., Pitas R. E., Mahley R. W. // Circulation. — 1984. — Vol. 70. — Suppl. 2. — P. 120.
13. Cardin A. D., Witt K. A., Barnhart C. L., Jackson R. L. // Biochemistry (Wash.). — 1982. — Vol. 21. — P. 4503—4511.
14. Cardin A. D., Witt K. A., Chao J. et al. // J. biol. Chem. — 1984. — Vol. 259. — P. 8522—8528.
15. Castro G. R., Fielding C. J. // J. Lipid Res. — 1984. — Vol. 25. — P. 58—67.
16. Charlton S. R., Smith L. C. // Biochemistry (Wash.). — 1982. — Vol. 21. — P. 23171—23178.
17. Chen C. H., Aladjem F. // Biochem. Med. — 1978. — Vol. 19. — P. 178—187.
18. Davis R. A., Hartman A. D., Dory L. et al. // Biochim. biophys. Acta. — 1981. — Vol. 665. — P. 154—164.
19. Eastley C. W., Patterson B. W., Fischer W. R. // Ibid. — Vol. 751. — P. 145—152.
20. Eaton R. P., Allen R. C., Schade D. S. // J. Lipid Res. — 1982. — Vol. 23. — P. 738—752.
21. Eisenberg S. // Klin. Wschr. — 1983. — Bd 1. — S. 119—132.
22. Elovson J., Huang Y. O., Baker N., Kanner R. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1981. — Vol. 78. — P. 157—161.
23. Elovson J., Jacobs J. A., Schumaker V., Puppione D. L. // Biochemistry (Wash.). — 1985. — Vol. 24. — P. 1569—1578.
24. Elshourbagy N. A., Liao W. S., Mahley R. W., Taylor J. M. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1985. — Vol. 82. — P. 203—207.
25. Felker T., Fainaru M., Hamilton R. // J. Lipid Res. — 1977. — Vol. 18. — P. 465—474.
26. Fikonen M. J., Dargar R., Blegger B. et al. // Ibid. — 1982. — Vol. 23. — P. 1032—1038.
27. Filipović I., Schwarzmann G., Mraz W. et al. // Europ. J. Biochem. — 1979. — Vol. 93. — P. 51—55.
28. Floren C. H., Albers J. J., Bierman E. L. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1981. — Vol. 102. — P. 636—639.
29. Floren C. H., Gustafson A. // Scand. J. clin. Lab. Invest. — 1985. — Vol. 45. — P. 103—108.
30. Friedberg S. J., Reynolds J. A. // J. biol. Chem. — 1976. — Vol. 251. — P. 4005—4011.
31. Goldstein J. L., Bazu S. K., Brunschede G. Y., Brown M. S. // Cell. — 1976. — Vol. 7. — P. 85—95.
32. Goldstein J. L., Brown M. S. // J. biol. Chem. — 1974. — Vol. 49. — P. 5153—5162.
33. Goldstein J. L., Brown M. S. // Ann. Rev. Biochem. — 1977. — Vol. 46. — P. 897—930.
34. Gordon V., Innerarity T. L., Mahley R. W. // J. biol. Chem. — 1983. — Vol. 258. — P. 6202—6212.
35. Green P. H. R., Glickman R. M. // J. Lipid Res. — 1981. — Vol. 22. — P. 1153—1178.
36. Hoff H. F., Gerrity R. G., Naito H. K., Du-

- sek D. M. // Lab. Invest. — 1983. — Vol. 48. — P. 492—504.
37. Huang S. S., Lee D. M. // Biochim. biophys. Acta. — 1983. — Vol. 577. — P. 421—441.
 38. Hui D. J., Innerarity T. L., Mahley R. W. // J. biol. Chem. — 1984. — Vol. 259. — P. 1860—1869.
 39. Hui D. J., Innerarity T. L., Milne R. W. et al. // Ibid. — P. 15060—15068.
 40. Innerarity T. L., Bersot T. P., Arnold K. et al. // Metabolism. — 1984. — Vol. 33. — P. 186—195.
 41. Innerarity T. L., Mahley R. W. // Biochemistry (Wash.). — 1978. — Vol. 17. — P. 1440—1447.
 42. Innerarity T. L., Pitas R. E., Mahley R. W. // J. biol. Chem. — 1980. — Vol. 255. — P. 11163—11172.
 43. Kane J. P. // Ann. Rev. Physiol. — 1983. — Vol. 45. — P. 637—650.
 44. Kane J. P., Hardman D. A., Paulus H. E. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1980. — Vol. 77. — P. 2465—2469.
 45. Kane J. P., Richards E. G., Havel R. J. // Ibid. — 1970. — Vol. 66. — P. 1075—1082.
 46. Krishnaiah K. V., Walker L. F., Borensztain Y. et al. // Ibid. — 1980. — Vol. 77. — P. 3806—3810.
 47. Mahley R. W. // Med. Clin. N. Amer. — 1982. — Vol. 66. — P. 375—402.
 48. Mahley R. W. // Arch. Path. Lab. Med. — 1983. — Vol. 107. — P. 393—399.
 49. Mahley R. W. // Disturbance in Lipid and Lipoprotein Metabolism. / Ed. J. M. Dietschy et al. — Bethesda, 1978. — P. 117—132.
 50. Mahley R. W., Angelin B. // Advanc. intern. Med. — 1984. — Vol. 29. — P. 385—411.
 51. Mahley R. W., Hui D. Y., Innerarity T. L., Weisgraber K. H. // J. clin. Invest. — 1981. — Vol. 68. — P. 1197—1206.
 52. Mahley R. W., Innerarity T. L. // Biochim. biophys. Acta. — 1983. — Vol. 737. — P. 197—222.
 53. Mahley R. W., Innerarity T. L., Pitas R. E. et al. // J. biol. Chem. — 1977. — Vol. 252. — P. 7279—7287.
 54. Mahley R. W., Innerarity T. L., Rall S. C., Weisgraber K. H. // J. Lipid Res. — 1984. — Vol. 25. — P. 1277—1294.
 55. Mahley R. W., Innerarity T. L., Weisgraber K. H. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1980. — Vol. 348. — P. 265—277.
 56. Mahley R. W., Weisgraber K. H., Innerarity T. L. // Biochim. biophys. Acta. — 1979. — Vol. 575. — P. 81—85.
 57. Malloy M. J., Kane J. P., Hardman D. A. et al. // J. clin. Invest. — 1981. — Vol. 67. — P. 1441—1450.
 58. Marcel Y. L., Hogue H., Theolis J. E. Jr., Milne R. W. // J. biol. Chem. — 1982. — Vol. 257. — P. 13165—13168.
 59. Markel A., Brook J. G., Aviram M. // Postgrad. med. J. — 1985. — Vol. 61. — P. 449—452.
 60. McLean J. W., Elshourbay N. A., Chang D. J. et al. // J. biol. Chem. — 1984. — Vol. 259. — P. 6498—6504.
 61. Milne R. W., Marcel Y. L. // FEBS Lett. — 1982. — Vol. 146. — P. 97—100.
 62. Nestel P. J., Billington T., Fidge N. M. // Biochim. biophys. Acta. — 1983. — Vol. 751. — P. 422—427.
 63. Oloffson S. O., Elias P., Boström K. et al. // FEBS Lett. — 1983. — Vol. 165. — P. 63—66.
 64. Oloffson S. O., Boström K., Svanberg U., Bondjers G. // Biochemistry (Wash.). — 1980. — Vol. 19. — P. 1059—1064.
 65. Pitas R. E., Innerarity T. L., Arnold K. S., Mahley R. W. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1979. — Vol. 76. — P. 2311—2315.
 66. Pitas R. E., Innerarity T. L., Mahley R. W. // J. biol. Chem. — 1980. — Vol. 255. — P. 5454—5460.
 67. Quarfordt S. // Biochim. biophys. Acta. — 1977. — Vol. 489. — P. 477—485.
 68. Rall S. C. Jr., Weisgraber K. H., Innerarity T. L. et al. // J. clin. Invest. — 1983. — Vol. 72. — P. 1288—1297.
 69. Rall S. C. Jr., Weisgraber K. H., Innerarity T. L., Mahley R. W. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1982. — Vol. 79. — P. 4696—4700.
 70. Rall S. C. Jr., Weisgraber K. H., Mahley R. W. // J. biol. Chem. — 1982. — Vol. 257. — P. 4171—4178.
 71. Shen B. W., Scanu A. M., Kezdey F. Y. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1977. — Vol. 74. — P. 837—841.
 72. Schneider W. J., Kovanen P. T., Brown M. S. et al. // J. clin. Invest. — 1981. — Vol. 68. — P. 1075—1085.
 73. Schonfeld G., Patsch W., Pfeleger B., Witztum J. L. // Ibid. — 1979. — Vol. 64. — P. 1288—1297.
 74. Schonfeld G., Patsch W. // Drug Affecting Lipid Metabolism / Eds. R. Fumagalli et al. — Amsterdam, 1980. — P. 37—52.
 75. Sloop C. H., Dory L., Krause B. R. et al. // Atherosclerosis. — 1983. — Vol. 49. — P. 9—21.
 76. Socorro L., Camey O. G. // J. Lipid Res. — 1979. — Vol. 20. — P. 631—638.
 77. Socorro L., Lopes F., Lopes A., Camejo G. // Ibid. — 1982. — Vol. 23. — P. 1283—1291.
 78. Sparks C. E., Hnatiuk O., Marsh J. B. // Canad. J. Biochem. — 1981. — Vol. 59. — P. 693—699.
 79. Sparks C. E., Marsh J. B. // J. Lipid Res. — 1981. — Vol. 22. — P. 514—518.
 80. Sparks C. E., Marsh J. B. // Ibid. — P. 519—527.
 81. Sparks C. E., Rader D. Y., Marsh J. B. // Ibid. — 1983. — Vol. 24. — P. 156—166.
 82. Steele J. C. H. // Thrombos. Rev. — 1979. — Vol. 15. — P. 573—579.
 83. Steele J. C. H., Reynolds J. A. // J. biol. Chem. — 1979. — Vol. 254. — P. 1633—1638.
 84. Weidman S. W., Ragland J. B., Sabesin S. M. // J. Lipid Res. — 1982. — Vol. 33. — P. 556—569.
 85. Weisgraber K. H., Innerarity T. L., Mahley R. W. // J. biol. Chem. — 1978. — Vol. 253. — P. 9053—9062.
 86. Weisgraber K. H., Innerarity T. L., Mahley R. W. // Ibid. — 1982. — Vol. 257. — P. 2518—2521.
 87. Weisgraber K. H., Mahley R. W. // J. Lipid Res. — 1980. — Vol. 21. — P. 316—325.
 88. Werb Z., Chin J. R. // J. biol. Chem. — 1983. — Vol. 258. — P. 10642—10648.
 89. Windler E., Chao Y.-S., Havel R. J. // Ibid. — 1980. — Vol. 255. — P. 5475—5480.
 90. Uterman G. A., Steinmetz A., Weber W. // Hum. Genet. — 1982. — Vol. 60. — P. 344—351.
 91. Zannis V. I., Breslow J. L. // Biochemistry (Wash.). — 1981. — Vol. 20. — P. 1033—1041.
 92. Zannis V. I., Breslow J. L., Uterman G., Mah-

- ley R. W. // J. Lipid Res. — 1982. — Vol. 23. — P. 911—917.
93. Zannis V. I., Just P. W., Breslow J. L. // Amer. J. hum. Genet. — 1981. — Vol. 33. — P. 11—24.
94. Zannis V. I., Murnit D. M., Breslow J. L. // J. Biol. Chem. — 1982. — Vol. 257. — P. 536—544.
95. Zannis V. I., McPherson J., Goldberger G. et al. // Ibid. — 1984. — Vol. 259. — P. 5495—5499.

Поступила 16.09.85

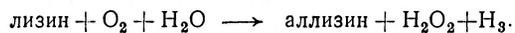
УДК 616.13/.14-008.931:577.152.1]:616.13/.14-008.925.6

З. Б. Меграбян, Р. М. Налбандян

МЕДЬСОДЕРЖАЩИЕ АМИНОКСИДАЗЫ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ (Обзор)

Институт биохимии АН Армянской ССР, Ереван

Дефицит меди у высших животных отражается на функционировании многих систем организма, при этом наиболее уязвимыми являются легкие, кости, нервная и сердечно-сосудистая системы. Так, при недостатке меди наблюдается утолщение стенок кровеносных сосудов, что может привести к спонтанному разрыву крупных артерий. Оказалось, что такой исход связан с изменением строения эластина — основного структурного белка сосудов. Свообразные механические свойства эластина и других коллагеновых белков обеспечиваются наличием определенного числа внутри- и межмолекулярных поперечных ковалентных сшивок [1]. В молекуле нормального эластина на 1000 аминокислотных остатков приходится в среднем 16 поперечных сшивок [2]. От числа ковалентных сшивок зависят механические свойства кровеносных сосудов — высокая прочность при высокой эластичности. Увеличение числа сшивок до величин, превышающих норму, приводит к повышению хрупкости сосудов, сокращение их числа — к увеличению «текучести». Начальным звеном образования поперечных сшивок является ферментативный процесс, в ходе которого из лизильных и оксизильных остатков полипептидных цепей коллагеновых белков путем окислительного дезаминирования синтезируются γ -п-альдегиды α -аминоадипиновой кислоты — аллизин и оксиаллизин. Катализируемая ферментом реакция протекает по следующей схеме:



Альдегидная группа аллизина далее взаимодействует неферментативно с Σ -аминогруппами эластина, приводя к образованию шиффовых оснований по-

перечных сшивок. Образование поперечных сшивок совершенно необходимо для нормального биосинтеза этих структурных белков. Существование фермента, участвующего в образовании таких связей, было предсказано на основании опытов по ингибированию их биосинтеза так называемыми «латирогенными агентами», а также по изучению влияния дефицита меди на экспериментальных животных. Позже было показано, что латирогенные соединения и дефицит меди направленно действуют через одну мишень — фермент лизилоксидазу. Уже давно было замечено, что скормливание растущим крысам сладкого горошка (*dathyrus odoratus*) приводит к различным дефектам соединительной ткани [3]. Химический аналог активного начала *L. odoratus*, оказывающий латирогенное действие, представляет собой β -аминопропионитрил. В настоящее время он применяется при изучении экспериментального латиризма — модели патологических изменений соединительной ткани. Как уже указывалось, такие же дефекты имеют место при недостатке в организме меди. Ингибирующее влияние дефицита меди на образование поперечных сшивок с самого начала позволило предположить, что фермент, ответственный за образование этих сшивок, является медьсодержащим или медьзависимым. Действительно, целенаправленный поиск привел к обнаружению в 1968 г. фермента, катализирующего образование ковалентных сшивок, так называемой «лизилоксидазы» [4]. Как оказалось, этот фермент специфически ингибируется латирогенными соединениями, необратимо и неконкурентно связывающимися с ферментом, блокируя его каталитический центр. Как видно из при-

веденного выше уравнения, реакция, катализируемая этим ферментом, представляет собой окислительное дезаминирование лизильных остатков. Таким образом, по типу осуществляемой реакции и продуктам реакции (альдегид, перекись водорода, аммиак) лизилоксидаза является аминоксидазой. Этот фермент действует на лизильные остатки, входящие в состав пептидов, но не на свободный лизин.

Хорошо известно, что аминоксидазы в зависимости от их субстратной специфичности, отношения к ингибиторам, субклеточной локализации и природы кофактора могут быть подразделены на 2 основные группы: флавиновые ферменты, которые обычно имеют митохондриальную локализацию [5—7], и медьсодержащие аминоксидазы. Последние обычно имеют внемитохондриальную локализацию, окисляют моноалкиламины с длинной цепью, ди- и полиамины, а также искусственный субстрат — бензиламин. Ферменты такого типа широко распространены в природе. Так, за последние годы они были выделены из растений, микроорганизмов и различных животных тканей [8—10]. К этой группе аминоксидаз относится, в частности, и лизилоксидаза. Основным отличием лизилоксидазы от других медьсодержащих аминоксидаз является ее необычная субстратная специфичность. Ни один из вышеперечисленных аминов этим ферментом не окисляется. С другой стороны, ни одна аминоксидаза, кроме фермента из плаценты человека, не окисляет субстратов лизилоксидазы — лизильных и оксизильных остатков в полипептидных цепях коллагеновых белков [11]. Остальные свойства лизилоксидазы вполне коррелируют со свойствами других медьсодержащих аминоксидаз.

Имунофлюоресцентными методами было показано, что лизилоксидаза имеет внеклеточную локализацию [12]. При выращивании фибробластов в культуре установлено, что примерно 90 % лизилоксидазной активности обнаруживается в среде. Лизилоксидаза после выделения ее из аорты [4] была получена в очищенном виде из различных соединительных тканей животных и человека: кожи, сухожилий, хрящей, костей, мышц и легких [13—15]. Высокоочищенная лизилоксидаза из аорты цыплят содержит 0,14 % меди —

максимальное значение, встречающееся у медьсодержащих аминоксидаз. Минимальная молекулярная масса этого фермента составляет 45—46 кД. Методом ЭПР показано, что лизилоксидаза из аорты быка имеет сигнал ЭПР двухвалентной меди типа II, характерный для так называемых «несиних» медьсодержащих оксидаз [16]. Высказано предположение, что медь необходима лизилоксидазе не только в качестве кофактора, но и для синтеза фермента *de novo* в системах *in vivo*. Действительно, добавление меди к экстрактам ткани цыплят, выросших на диете с недостаточным количеством меди, не восстанавливает активности. Это свидетельствует о том, что при дефиците меди апофермент лизилоксидазы не синтезируется. Таким образом, как и для других медьсодержащих ферментов, наличие меди является предпосылкой, необходимой для синтеза лизилоксидазы *de novo*. Лизилоксидаза, подобно большинству медьсодержащих аминоксидаз, содержит также органическую простетическую группу, чувствительную к реагентам на карбонильные группы (предположительно, пиридоксальфосфат). Эксперименты с аортами цыплят и лизилоксидазой, полученной из аорты быка, подтвердили, что карбонильные реагенты, такие, как фенилгидразин, изониазид, гидроксилламин, в микромолярных концентрациях ингибируют активность лизилоксидазы [17]. Активность фермента ингибируется также диаминами: путресцином и гистамином. Косвенным доказательством того, что простетической группой лизилоксидазы служит пиридоксальфосфат, является модельная система, состоящая из меди и пиридоксала, катализирующая образование аллизина и оксизлизина из лизильных и оксизильных остатков в системе *in vitro* [18].

Определение минимальной молекулярной массы фермента, необходимой для проявления каталитической активности, осложнено тем обстоятельством, что лизилоксидаза склонна образовывать агрегаты с молекулярной массой 1000 кД и выше. Причины этой склонности не установлены. Однако не исключено, что значительную роль в этом процессе могут играть тиоловые группы. Так, определение аминокислотного состава белка показало, что на 1000 аминокислотных остатков при-

ходится 30 остатков цистеина. И хотя число свободных SH-групп, приходящееся на молекулу фермента, еще нельзя считать окончательно установленным, показано, что тиол-дисульфидный обмен существенно влияет на активность фермента. Так, дитиотреитол ингибирует активность, а дисульфиды частично ее восстанавливают. Температурный оптимум активности лизилоксидазы из аорты цыплят довольно высок (52°C), фермент не теряет активности даже при 80°C. Столь высокие значения температурного оптимума и температуры инактивации свидетельствуют о наличии четвертичной структуры, стабилизированной ковалентными, возможно, дисульфидными, связями.

Таким образом, по типу ферментативной реакции, природе кофакторов и взаимодействию с ингибиторами лизилоксидаза является специфической аминоксидазой, характеризующейся широким распространением в животных тканях и рядом необычных свойств. Ее роль в тканях состоит в обеспечении нормальной эластичности, а нарушения ее активности приводят к тяжелым последствиям для организма. Так, генетические нарушения нормального созревания коллагеновых и эластиновых волокон наблюдаются у пациентов с синдромами Элерса — Данлоса, Марфана, при аневризме аорты, синдроме Менке и др. [19, 20]. В частности, при синдроме Менке медь, поступающая в организм, задерживается в слизистой оболочке кишечника, что приводит к значительному уменьшению ее всасывания. Следствием недостатка меди в тканях является увеличение содержания растворимых коллагеновых белков, что приводит к разрыву внутренней эластиновой прослойки аорты. В культуре фибробластов, полученных у пациентов с синдромом Элерса — Данлоса, лизилоксидазная активность составляет только 15 % от контроля [21]. Несмотря на то что при ряде патологий непосредственного изменения активности лизилоксидазы не показано, ряд фактов неопровержимо свидетельствует о том, что именно недостаточная деятельность этого фермента ответственна за развитие патологического процесса. Так, экспериментальный латироз, при котором необратимым некооперативным способом ингибируется активность ли-

зилоксидазы, или содержание экспериментальных животных на диете с недостаточным количеством пиридоксала приводят к одинаковым симптомам, характеризующим необратимые изменения соединительной ткани. С другой стороны, дефицит меди (генетический или алиментарный) вызывает аналогичные нарушения в строении и функционировании кровеносных сосудов. Изучение лизилоксидазы, механизма образования внутри- и межмолекулярных поперечных сшивок коллагеновых белков, нормального созревания волокнистых структур соединительной ткани привлекает внимание не только в связи с поисками новых подходов к терапии различных заболеваний, в основе которых лежат дефекты соединительной ткани, но также при терапии воспалительных процессов, ревматизма и для заживления ран.

Помимо специфических ингибиторов — латирогенных агентов, лизилоксидаза ингибируется также рядом аминов, в частности гистамином. Поэтому некоторые исследователи задаются вопросом: не объясняется ли общезвестное значение гистамина в воспалительных процессах тем, что он препятствует образованию поперечных сшивок в коллагеноподобных белках [22]. С другой стороны, ингибирование лизилоксидазы латирогенными агентами при заживлении ран может служить эффективным подходом для предупреждения образования рубцов и излишних складок соединительной ткани. Эксперименты по использованию латирогенов приводятся также для предотвращения фиброзов [23]. Многие латирогены выступают как антигипертензивные агенты. Показано, что возрастание лизилоксидазной активности наблюдается в сосудах гипертензивных крыс; следовательно, при этом имеет место увеличение числа поперечных сшивок в коллагеноподобных белках [24]. Продемонстрировано сильное ингибирующее действие гипотензивных средств типа гидралазина на активность медьсодержащих аминоксидаз, в частности лизилоксидазы. Высказано предположение, что именно этот механизм ингибирования лежит в основе действия упомянутых лекарственных препаратов.

Кроме лизилоксидазы, в кровеносных сосудах была обнаружена и другая медьсодержащая аминоксидаза.

В 1971 г. в аорте быка был обнаружен растворимый фермент, окисляющий алкиламин с длинной цепью: бензиламин, спермин и спермидин [25]. Показано, что утраченная под влиянием хелаторов активность этой аминоксидазы восстанавливается при добавлении двухвалентных ионов меди. Описанный фермент не был гомогенен и имел сравнительно низкую для аминоксидаз активность. В дальнейших работах [26—28] было показано, что бензиламиноксидазная активность обнаруживается также в сосудах печени, почечной артерии, крупных сосудах мозга. Сообщалось также о двух типах бензиламиноксидазы из аорты свиньи [29], причем один фермент имел свойства, аналогичные ферменту из плазмы крови, тогда как свойства другой бензиламиноксидазы значительно отличались от таковых аминоксидазы из плазмы. Хорошо известно, что бензиламиноксидазной активностью, кроме медьсодержащих аминоксидаз, обладает также В-форма флавиновых моноаминоксидаз (МАО) [30]. Субстратами этой формы МАО наряду с другими аминами служат также β -фенилэтиламин и бензиламин, причем в ряде случаев показано, что для В-формы МАО бензиламин является более предпочтительным субстратом, т. е. обладает большим сродством к ферменту, чем β -фенилэтиламин. Производные бензиламина в низких концентрациях обнаружены в тканях, хотя их физиологическое значение остается неизвестным. Различить активность флавиновых и медьсодержащих ферментов по отношению к бензиламину можно по типу ингибирования. В частности, бензиламиноксидазная активность В-формы МАО ингибируется депренилом ($4 \cdot 10^{-7}$ М).

В исследованиях на стенках сосудов и других видах соединительной ткани свойства медьсодержащих аминоксидаз часто сравнивают с таковыми аминоксидазой плазмы, описанной ранее [3]. Более того, в некоторых работах обсуждается возможность того, что фермент плазмы является продуктом деградации аминоксидаз сосудов или секреции клетками соединительной ткани [32]. Однако различить медьсодержащие бензиламиноксидазы сосудов с целью окончательного доказательства их взаимосвязи с плазменным ферментом значительно сложнее, поскольку в

крупных, не тщательно отмывтых сосудах может содержаться примесь плазменного фермента, включенного в толщу стенки сосудов. С другой стороны, для этого фермента характерно также образование олигомеров, свойства которых могут значительно отличаться от исходной «мономерной» формы. Так, в ряде работ [33, 34] показано наличие в крупных и мелких сосудах медьсодержащей аминоксидазы с молекулярной массой около 1000 кД. Показано, что фермент состоит из 24 идентичных субъединиц с молекулярной массой 70 кД, из которых каждая содержит 1 атом двухвалентной меди. Показано, что аминоксидаза из аорты в отличие от медьсодержащей аминоксидазы плазмы не имеет углеводных компонентов или липидов. Установлено, что медь, входящая в состав активного центра, имеет сигнал ЭПР, присутствующий меди типа II. Как оказалось, сигнал, характеризующий окружение связывающего медь центра фермента, очень чувствителен к изменениям pH, причем изменения окружения меди тесно коррелируют с таковыми ферментативной активности.

Изучение субстратной специфичности показало, что, кроме искусственного субстрата и бензиламина, к которому фермент имеет высокое сродство, среди целого ряда исследованных аминов (моно-, ди-, полиамины) эта аминоксидаза с высокой скоростью дезаминирует только полиамины: спермин и спермидин. Высокие концентрации субстрата ингибируют эту аминоксидазу. Выявлен широкий ряд соединений, являющихся ингибиторами медьсодержащей аминоксидазы из аорты. К ним относятся прежде всего хелаторы меди с различными функциональными группами (α , α' -дипиридил, ЭДТА, диэтилдитиокарбамат), неорганические анионы с высоким сродством к меди (азид, цианид), тиоловые реагенты, поскольку, как оказалось, медьсодержащая аминоксидаза из аорты является типичным тиоловым ферментом. Отмечено сравнительно низкое содержание ароматических аминокислот в этом ферменте. Как олигомерная, так и мономерная формы фермента обладают одинаковой ферментативной активностью. Сравнение свойств медьсодержащей аминоксидазы из сосудов (аорта, капилляры мозга) с аминоксидазой плазмы выявило опре-

деленные различия. В сосудах, так же как и в плазме, имеется природный белковый ингибитор медьсодержащей аминоксидазы. Показано, что этот белок из сосудов содержит гем, тогда как свойства ингибитора бензиламиноксидазы плазмы практически не изучены. Если принять во внимание то обстоятельство, что бензиламин, его аналоги и метаболиты (за редким исключением) не являются физиологическими соединениями [35], в то время как полиамины широко распространены во всех организмах, а также тот факт, что рассматриваемый фермент имеет высокое сродство к этим субстратам и окисляет их со скоростью, примерно равной окислению бензиламина, то становится очевидным, что его следует рассматривать как медьсодержащую аминоксидазу, окисляющую полиамины. Хорошо известно, что полиамины выступают как факторы роста клеток, обеспечивают их дифференцировку, переключение клеток с одной фазы клеточного цикла на другую [36]. Поэтому поступление полиаминов в избыточном количестве к неактивно регенерирующим клеткам, какими являются клетки мозга, весьма нежелательно. Именно эту функцию ограждения мозга от высоких концентраций полиаминов, вероятно, несет аминоксидаза мозга. Таким образом, одна из функций медьсодержащих аминоксидаз мелких сосудов (например, таких, как капилляры мозга) состоит в защите тканей мозга от попадания в них избыточных количеств полиаминов.

Повышение уровня алифатических полиаминов, служащих субстратами медьсодержащей аминоксидазы из кровеносных сосудов, является универсальным ответом организма на развитие практически любых патологических процессов. Так, показано, что при малигнизации тканей, различных инфекционных заболеваниях, ожогах, отравлениях химическими веществами, гепатэктомии, переливании крови имеет место резкое, но кратковременное повышение концентрации полиаминов, превышающее норму нередко в несколько сотен раз [37—39]. Повышение уровня полиаминов также предшествует активации всех пролиферативных процессов. Установлено, что быстрорастущие клетки содержат более высокие концентрации полиаминов,

чем медленно растущие. Именно эти данные лежат в основе подхода, который намечается в настоящее время для терапии онкологических заболеваний, — путем снижения концентрации полиаминов за счет введения их антиметаболитов, ингибиторов ферментов их синтеза и активаторов ферментов их распада [40]. С другой стороны, полиамины выступают как ростовые факторы для нормально метаболизирующих клеток. Поэтому чрезвычайно важно располагать возможностью регуляции уровня полиаминов: снижать его для остановки роста злокачественных новообразований и повышать в тех случаях, когда необходимо стимулировать нормальные ростовые процессы.

Содержание полиаминов в клетках определяется соотношением активности ферментов двух типов — декарбоксилаз аминокислот, катализирующих их биосинтез, и аминоксидаз, осуществляющих их деградацию. Декарбоксилазы, являясь тиоловыми ферментами, ингибируются уже следовыми количествами меди. В то же время увеличение уровня меди приводит к увеличению активности оксидаз полиаминов, которые являются типичными медьсодержащими ферментами. Поэтому понятно, что обеспеченность организма медью непосредственно влияет на концентрацию полиаминов в клетках. При низком содержании меди имеют место, с одной стороны, высокая активность декарбоксилаз аминокислот, с другой — низкая активность аминоксидаз. Следовательно, при низком уровне меди должен быть высоким уровень полиаминов в клетке. И, наоборот, высокий уровень меди приводит к ингибированию декарбоксилаз и активации аминоксидаз. Следствием этого является понижение стационарного уровня полиаминов.

Из этих фактов можно заключить, что в ситуациях, когда желательно снизить уровень полиаминов (например, для остановки роста раковых клеток), это может быть достигнуто, в частности, увеличением содержания меди в диете. Наоборот, если необходимо увеличить концентрацию полиаминов (например, для ускорения роста нормальных клеток и тканей), желательно снизить содержание меди в диете.

Таким образом, обеспеченность ор-

ганизма медью является одним из важнейших показателей, определяющих нормальное формирование соединительной ткани (в частности, кровеносных сосудов), а также регуляцию клеточного роста. Дальнейшее изучение свойств медьсодержащих аминоксидаз сосудов позволит обнаружить специфические ингибиторы и активаторы этих ферментов. Эти соединения, а также факторы, влияющие на обеспеченность организма медью, могут составить принципиально новый арсенал средств, позволяющих регулировать рассмотренные выше физиологические функции и оказывающих терапевтический эффект при многих патологических процессах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мазуров В. И. // Биохимия коллагеновых белков. — М., 1974. — С. 81.
2. O'Dell B. L. // Phil. Trans. roy. Soc. Lond. — 1981. — Vol. 294-B. — P. 91—104.
3. Siegel R. C. // Int. Rev. Connect. Tissue Res. — 1979. — Vol. 8. — P. 73—118.
4. Pinnell S. R., Martin G. R. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1968. — Vol. 61. — P. 708—716.
5. Salach J. I. // Arch. Biochem. — 1979. — Vol. 192. — P. 128—137.
6. Akopyan Z. I., Stesina L. N., Gorkin V. Z. // J. biol. Chem. — 1971. — Vol. 246. — P. 4610—4618.
7. Stessina L. N., Akopyan Zh. I., Gorkin V. Z. // FEBS Lett. — 1971. — Vol. 22. — P. 349—351.
8. Matsuda H., Suzuki V. // Plant Cell Physiol. — 1981. — Vol. 22. — P. 734—747.
9. Haywood G. W., Large P. J. // Biochem. J. — 1981. — Vol. 199. — P. 187—201.
10. Kappler-Adler R., MacFarlane H. // Biochim. biophys. Acta. — 1963. — Vol. 67. — P. 542—565.
11. Crabe J. C., Waight R. D., Bardsley W. G. et al. // Biochem. J. — 1976. — Vol. 155. — P. 679—687.
12. Siegel R. C., Chen K. H., Greenspan J., Aquilar A. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1978. — Vol. 75. — P. 2945—2949.
13. Stassen F. L. H. // Biochim. biophys. Acta. — 1976. — Vol. 438. — P. 49—60.
14. Jordan R. E., Milbury P., Sullivan K. A. et al. // Advanc. exp. Biol. Med. — 1977. — Vol. 79. — P. 531—542.
15. Starcher B. C., Madaras J. S., Tepper A. S. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1977. — Vol. 78. — P. 706—712.
16. Shieh J. J., Yasunobu K. T. // Advanc. exp. Biol. Med. — 1976. — Vol. 74. — P. 447—463.
17. Kagan H. M., Hewitt N. A., Salcedo L. L., Franzblau C. // Biochim. biophys. Acta. — 1974. — Vol. 365. — P. 223—234.
18. Fowler L. J., Peach C. M., Bailey A. J. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1970. — Vol. 41. — P. 251—259.
19. Mc Kusick V. A. // Heritable Disorders of Connective Tissue. — St. Louis, 1972. — P. 128.
20. Mills C. F., Dalcarno A. C., Wenham G. //

- Brit. J. Nutr. — 1976. — Vol. 35. — P. 309—331.
21. Di Ferrante N., Leachman R. D., Anglini P. et al. // Connect. Tissue Res. — 1975. — Vol. 3. — P. 49—53.
22. Buffoni F. // Pharmacol. Res. Commun. — 1980. — Vol. 12. — P. 101—114.
23. Chvapil M. // Life Sci. — 1975. — Vol. 16. — P. 1345—1362.
24. Sheridan P. J., Kozar L. C., Benson S. C. // Exp. molec. Path. — 1979. — Vol. 30. — P. 315.
25. Rucker B. R., O'Dell B. L. // Biochim. biophys. Acta. — 1971. — Vol. 235. — P. 32—43.
26. Lewinsohn R. // J. Pharm. Pharmacol. — 1981. — Vol. 33. — P. 569—575.
27. Coquil J. F., Goridis C., Mack G., Neff N. H. // Brit. J. Pharmacol. — 1973. — Vol. 48. — P. 590—599.
28. Hainick D. H., Lidman R. K., Weiss J. et al. // Experientia (Basel). — 1981. — Vol. 37. — P. 764—765.
29. Buffoni F., Ignesti G., Lodovici M. // Ital. J. Biochem. — 1981. — Vol. 30. — P. 179.
30. Горкин В. З. // Вопр. мед. химии. — 1982. — № 2. — С. 2—9.
31. Hirsh J. C. // J. exp. Med. — 1953. — Vol. 97. — P. 345—355.
32. Buffoni F., Della Corte L., Hope D. B. // Proc. roy. Soc. (Lond.). — 1977. — Vol. 195. — P. 417—421.
33. Меграбян З. Б., Гюльхандяня Г. В., Налбандян Р. М. // Биохимия. — 1981. — Т. 46. — С. 612—619.
34. Mehrabian Z. B., Nalbandyan R. M. // FEBS Lett. — 1983. — Vol. 164. — P. 89—92.
35. Clarke D. E., Lyles G. A., Callingham B. A. // Biochem. Pharmacol. — 1982. — Vol. 31. — P. 27—35.
36. Tabor C. W., Tabor H. // Ann. Rev. Biochem. — 1984. — Vol. 53. — P. 749—790.
37. Russell D. H. // Polyamines in Normal and Neoplastic Growth — New York, 1973. — P. 429.
38. Tabor H., Tabor C. W. // Meth. Enzymol. — 1983. — Vol. 94. — P. 497.
39. Jänne J., Pösö H., Raina A. // Biochim. biophys. Acta. — 1978. — Vol. 473. — P. 241—293.
40. Jänne J., Holttä E., Kallio A., Käpyaho K. // Spec. Top. Endocr. Metab. — 1983. — Vol. 5. — P. 227—293.

Поступила 05.09.85

COPPER-CONTAINING AMINE OXIDASES OF BLOOD VESSELS

Z. B. Megrabyan, R. M. Nalbandyan

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Armenian SSR, Yerevan

Modern data on types, physico-chemical properties, physiological role of copper-containing amine oxidases of blood vessels are reviewed. Properties of lysyl oxidase—specific copper-containing amine oxidase—are described. Importance of the enzyme for normal functions of connective tissue as well as alterations in the enzymatic activity under various pathological conditions are discussed. At the same time, properties and physiological functions of another copper-containing amine oxidase of blood vessels, which uses polyamines as substrate, are considered. Effect of the copper levels on content of polyamines in body is discussed.

ВЛИЯНИЕ ГЕПАТЭКТОМИИ НА АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНУЮ СИСТЕМУ ПЕЧЕНИ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Лаборатория биохимии Института геронтологии АМН СССР, Киев

Известно, что циклазная система играет важную роль в регуляции пролиферативных процессов [2, 7]. В многочисленных экспериментальных исследованиях установлено, что изменения содержания и соотношения циклических нуклеотидов отражаются на процессах биосинтеза ДНК, РНК, белка, клеточного деления. С другой стороны, известно, что именно эти процессы претерпевают существенные изменения при старении [6]. Исходя из этого, были изучены изменения адепилатциклазной системы в условиях активации пролиферации, вызванной гепатэктомией. Эти исследования проведены в период максимального стимулирования синтеза ДНК (фаза S) в регенерирующей печени крыс разного возраста.

Методика

Опыты проводили на белых беспородных крысах двух возрастных групп: 6—8 мес (взрослые) и 26—28 мес (старые). Частичную гепатэктомию осуществляли удалением под эфирным наркозом 70 % массы печени. Резецированную часть органа использовали в качестве контроля. Оперированных крыс декапировали через 22 ч (взрослые) и 27 ч (старые) и извлекали регенерирующую часть печени. Эти сроки соответствуют периоду максимальной активации биосинтеза ДНК у животных обеих возрастных групп [5].

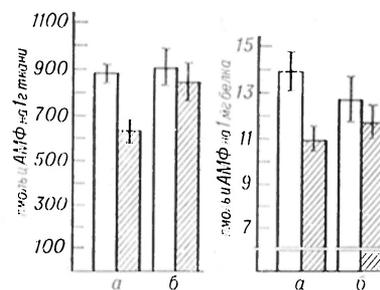
Содержание цАМФ определяли в ТХУ-экстрактах предварительно замороженных в жидком азоте образцов тканей методом радиоконкурентного связывания [10] с помощью стандартных наборов фирмы «Amersham» (Англия). Для определения активности аденилатциклазы использовали гомогенат ткани печени. Гомогенизацию проводили в гомогенизаторе типа Поттера в буфере, содержащем 0,25 М глюкозу, 0,01 М $MgCl_2$, 0,2 М трис-НСI, рН 7,5. Среда инкубации для определения активности фермента общим объемом 0,15 мл содержала 20 мМ трис-НСI рН 7,6 (37 °С), 1 мМ АТФ, 5 мМ теофиллин, 5 мМ $MgCl_2$, 20 мМ креатинфосфат, 1 мг/мл креатинфосфокиназы. Реакцию начинали добавлением 100 мкг белка гомогената и проводили 15 мин при 37 °С. Реакцию останавливали помещением проб в кипящую водяную баню. Денатурированный белок удаляли центрифугированием. Об активности аденилатциклазы судили по приросту цАМФ, который определяли, как указано выше. Радиоактивность образцов подсчитывали на сцинтилляционном счетчике Mark-III.

Адреналин (50 мкМ) и фтористый натрий (10 мМ) добавляли в среду инкубации.

Содержание белка определяли ранее описанным методом [13]. Результаты обрабатывали методом вариационной статистики с применением критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Полученные данные свидетельствуют о наличии возрастных изменений в циклазной системе. В условиях гепатэктомии наблюдается снижение содержания цАМФ на 27 % в печени взрослых животных в пересчете как на 1 г ткани, так и на 1 мг белка. У старых крыс подобных изменений не отмечено (см. рисунок). Значительное влияние оказывает гепатэктомия и на активность аденилатциклазы (см. таблицу). У взрослых животных происходит снижение базальной активности фермента по сравнению с контролем на 30 %. Поскольку это соответствует степени снижения уровня цАМФ, то можно полагать, что последнее обусловлено уменьшением базальной активности аденилатциклазы у взрослых животных. Следовательно, гепатэктомия приводит к изменениям базальной активности аденилатциклазы и содержания цАМФ лишь у взрослых животных. Противополож-



Влияние гепатэктомии на содержание цАМФ в печени крыс разного возраста.

а — взрослые крысы; б — старые крысы; светлые столбики — контроль; заштрихованные — гепатэктомия.

Влияние гепатэктомии на активность аденилатциклазы в печени крыс разного возраста (в пмоль цАМФ на 1 мг белка за 1 мин)

| Возраст | Контроль | | | Гепатэктомия | | |
|----------|-----------|-------------|--------------------|--------------|-------------|--------------------|
| | базальная | + адреналин | + фтористый натрий | базальный | + адреналин | + фтористый натрий |
| Взрослые | 14,8±1,2 | 20,8±1,8 | 27,1±2,2 | 9,7±0,8* | 18,7±1,4 | 24,3±2,0 |
| Старые | 12,8±1,1 | 24,0±2,1 | 28,0±2,5 | 12,1±1,1 | 17,6±1,6* | 23,1±2,1 |

* $P < 0,05$ по сравнению с контролем.

ные изменения наблюдаются при исследовании адреналинстимулируемой активности фермента. Так, адреналин активирует последний у взрослых и старых крыс. Однако в этих условиях отмечается достоверное (на 27 %) снижение степени активации аденилатциклазы у старых животных. Необходимо отметить, что столь значительное снижение обусловлено более высоким уровнем адреналинстимулируемой активности у контрольных старых животных по сравнению со взрослыми. Таким образом, в условиях пролиферации, вызванной гепатэктомией, не удается обнаружить возрастных различий в реакциях аденилатциклазы на адреналин, свойственных интактным животным. Не отмечается возрастных различий и во фторидстимулируемой активности аденилатциклазы, изменения которой по направленности аналогичны таковым контрольных животных. Следовательно, гепатэктомия приводит к разнонаправленным, в зависимости от возраста, изменениям в базальной и адреналинстимулируемой активности аденилатциклазы.

При обсуждении полученных данных необходимо учитывать, что направленность влияний цАМФ на процессы пролиферации в различные фазы клеточного цикла неодинакова. В настоящее время постулируется положение о том, что в фазах, предшествующих биосинтезу ДНК и митозу, наблюдается рост содержания цАМФ в клетке. Во время биосинтеза ДНК и деления содержание нуклеотида резко снижается [2, 3, 8, 12]. При этом как рост, так и снижение уровня цАМФ рассматриваются в качестве возможного триггерного механизма вступления клетки в соответствующие фазы клеточного деления. Имеются данные и о том, что рост содержания цАМФ при-

водит к ингибированию тимидинкиназы и, следовательно, подавлению синтеза ДНК [9, 11]. Исходя из этих сведений, можно полагать, что снижение уровня цАМФ в фазе S у взрослых животных должно способствовать более значительной активации биосинтеза ДНК. Отсутствие подобных изменений в содержании цАМФ у старых крыс может лимитировать интенсивность этого процесса. Подтверждением этому являются данные о меньшей активации биосинтеза ДНК у старых гепатэктомированных крыс по сравнению со взрослыми [5]. Представляет интерес также факт снижения адреналинстимулируемой активности аденилатциклазы у старых гепатэктомированных крыс. Известно, что катехоламины обеспечивают поддержание функций пролиферирующей печени [1]. Следовательно, снижение стимулируемой активности фермента может лимитировать восстановление функций этого органа после гепатэктомии. Поскольку влияние катехоламинов на печень во многом обусловлено активацией процессов энергообразования, можно предположить, что «энергетическая недостаточность», развивающаяся в этих условиях, будет ограничивать функциональную активность пролиферирующей печени старых крыс. Действительно, имеются данные о значительном снижении уровня АТФ в регенерирующей печени старых крыс по сравнению со взрослыми [4].

Таким образом, на основании полученных данных можно полагать, что возрастные особенности регуляции синтеза ДНК и функций регенерирующей печени, вероятно, обусловлены изменениями регуляторных воздействий циклазной системы, приводящими к снижению биосинтетических и энергетических процессов. При этом выявленные изменения могут влиять на

процессы биосинтеза ДНК как непосредственно, так и опосредованно через снижение их энергетической обеспеченности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андропова Т. А. // Бюл. экпер. биол. — 1981. — № 3. — С. 355—357.
2. Балаж А., Блажек И. Эндогенные ингибиторы клеточной пролиферации: Пер. с англ. — М., 1982.
3. Дорофеев Г. И., Кожемякин Л. А., Ивашкин В. Т. Циклические нуклеотиды и адаптация организма. — Л., 1978.
4. Литошенко А. Я. // Укр. биохим. журн. — 1981. — № 6. — С. 111—113.
5. Оболенская М. Ю., Левицкий Е. Л. // Вопр. мед. химии. — 1978. — № 3. — С. 345—347.
6. Фролькис В. В. Старение. Нейрогуморальные механизмы. — Киев, 1981.
7. Юдаев Н. А. // Вести. АМН СССР. — 1980. — № 7. — С. 3—9.
8. Boynton A. L., Whitfield J. F. // J. Cell. Physiol. — 1979. — Vol. 101. — P. 139—148.
9. Debov S. S., Delvig A. A., Silaeva S. A., Tarasov A. P. // Ergeb. exp. Med. — 1978. — Bd 28. — S. 195—208.
10. Gilman A. G., Murad F. // Meth. Enzymol. — 1974. — Vol. 38. — P. 49—61.
11. Kanta J., Bartos F., Chmelar V. // Physiol. Bohemosl. — 1978. — Vol. 27. — P. 225—229.
12. Krishnaaraj R. // Curr. Sci. — 1978. — Vol. 63. — P. 361—365.
13. Markwell M., Haas S., Reiber L., Tolbert N. // Analyt. Biochem. — 1978. — Vol. 87. — P. 206—210.

Поступила 02.06.85

EFFECT OF HEPATECTOMY ON THE ADENYLATE CYCLASE SYSTEM IN RATS OF DIFFERENT AGE

O. K. Kulchitsky

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

Age-dependent differences were found in patterns of rat liver adenylate cyclase system in response to hepatectomy-induced proliferation. After hepatectomy a decrease in basic activity of adenylate cyclase and in content of cAMP were observed only in adult animals. At the same time, the epinephrine-stimulated enzymatic activity was decreased in old hepatectomized rats as compared with intact animals. These alterations in regulatory activity of the adenylate cyclase system appear to affect the intensity of DNA biosynthesis and the functional activity of regenerating liver tissue of old rats.

УДК 616.127-005.4-07:616.127-008.924.1

Л. С. Мхитарян

ИОНТРАНСПОРТНАЯ СИСТЕМА И НЕКОТОРЫЕ КОМПОНЕНТЫ СТРУКТУРЫ САРКОЛЕММЫ В УСЛОВИЯХ ОСТРОЙ ИШЕМИИ МИОКАРДА

Лаборатория биохимии НИИ кардиологии им. акад. Н. Д. Стражеско, Киев

В настоящее время убедительно доказано, что сила и длительность сокращения сердечной мышцы зависят не только от процессов энергообеспечения, но во многом и от уровня ионов Ca^{2+} в сердечных клетках. Вместе с тем известно, что ионный гомеостаз в клетках обусловлен состоянием и функционированием различных мембранных систем и встроенных в них ионных насосов. Одной из этих систем, жизненно важных для клетки, является наружная мембрана, или сарколемма. Не подлежит сомнению огромная роль сарколеммы в электромеханическом сопряжении, т. е. сопряжении возбуждения с процессами сокращения и расслабления, а также в контроле уровня Ca^{2+} в цитоплазме сердечных клеток [12, 14]. Благодаря барьерной функции, избирательной проницаемости этой мембраны для различных ионов и функциониро-

ванию в ней систем активного их транспорта поддерживается высокая концентрация K^+ и низкая концентрация Na^+ и Ca^{2+} в цитоплазме сердечных клеток по сравнению с содержанием этих катионов в межтканевой жидкости.

Согласно современным представлениям, важнейшим фактором в ионном контроле сокращения миокарда является Ca^{2+} , связанный с поверхностью сарколеммы. При этом как в связывании ионов кальция, так и в кальциевой проницаемости сарколеммы важную роль играют мембранные фосфолипиды [13]. Наружная мембрана играет определенную роль также в удалении избытка Ca^{2+} из цитоплазмы в период диастолы. Выход кальция из клеток может осуществляться за счет энергии натриевого градиента через Na^+ , Ca^{2+} -обменный механизм, стехиометрия которого составляет

3:1 [7], либо с помощью кальцевого насоса — Ca^{2+} -зависимой АТФазы. Однако вопрос о существовании последней в сарколемме сердечных клеток остается спорным.

Поскольку сократительная функция миокарда зависит от уровня Ca^{2+} в цитоплазме в период возбуждения, а сарколемма осуществляет контроль за поступлением этих ионов в клетку, нам представлялось целесообразным изучить некоторые показатели ион-транспортной системы сарколеммы при остром нарушении коронарного кровообращения сердца. Учитывая решающую роль липидного окружения в функционировании мембранных ферментов, процессах связывания и транспорта ионов Ca^{2+} , мы изучали также некоторые компоненты липидной структуры сарколеммы в условиях ишемии миокарда.

Методика

Экспериментальную острую коронарную недостаточность моделировали путем внутривенного введения кроликам породы шиншилла вазопрессина в дозе 0,2 Е на 1 кг массы тела. Животные находились под непрерывным электрокардиографическим контролем. Через 3—5 мин от начала введения вазопрессина на высоте его гемодинамического эффекта у наркотизированных животных (этамниал натрия, 30 мг/кг) извлекали миокард, который после промывания струей охлажденного физиологического раствора немедленно помещали в среду для выделения сарколеммы. Все процедуры, связанные с получением гомогената и выделением мембран осуществляли при 0 °С. Сарколемму получали методом дифференциального ультрацентрифугирования [15]. Среда выделения содержала 20 мМ трис-НСl и 2 мМ дитиотрептола (Т-Д-буфер рН 7,4). Качество и чистоту полученных мембран оценивали электронно-микроскопически и по активности маркерных ферментов: Na, K-АТФазы и 5'-нуклеотидазы. Активность Na, K-АТФазы рассчитывали по разности между суммарной и Mg-зависимой АТФазной активностями. Суммарную АТФазную активность измеряли при 37 °С в инкубационной среде (1 мл), содержащей 5 мМ MgCl_2 , 140 мМ NaCl, 40 мМ KCl, 3 мМ АТФ и 50 мМ трис-НСl рН 7,4. Активность Mg-АТФазы определяли в тех же условиях в присутствии 0,25 мМ оубаина. Реакцию запускали внесением в реакционную смесь 100 мкг белка мембран и проводили в течение 10 мин. При измерении активности 5'-нуклеотидазы инкубационная смесь содержала 80 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgSO_4 и 5 мМ АМФ. Количество исследуемого белка составило 100 мкг. Пробы инкубировали 20 мин при 37 °С. Активность ферментов рассчитывали по приросту неорганического фосфата в инкубационной среде [17]. Количество белка в мембранной фракции определяли по Лоури [16]. В липидных экстрак-

тах, полученных из мембран, определяли содержание холестерина [11], фосфолипидов [6], жирных кислот [9]. Методом тонкослойной хроматографии в силикагеле [4] определяли уровень лизофосфолипидов в сарколемме. Ca^{2+} -связывающую способность мембран определяли с использованием ^{45}Ca и техники миллипорного фильтрования [10]. Методом пламенной фотометрии [2] измеряли общее содержание ионов Ca^{2+} в сарколемме. Изучали также скорость Na-, Ca^{2+} -обмена в везикулах мембран и пассивный транспорт кальция по скорости его выхода из везикул. Эти исследования проводили с использованием описанного в литературе метода [5]. Для загрузки везикул натрием пробы белка (3 мг/мл) преникубировали в течение 12 ч при 2 °С в среде, содержащей 140 мМ NaCl и 20 мМ трис-НСl рН 7,4. Непосредственно перед опытом пробы нагревали в течение 10 мин при 37 °С. Для изучения Na⁺-Ca²⁺-обмена отбирали аликвоты по 20 мкл, разводили их в среде, содержащей 50 мМ $^{45}\text{CaCl}_2$, 20 мМ трис-НСl (рН 7,4) и 140 мМ KCl. Через различные интервалы времени процесс ионного обмена останавливали путем добавления в пробу 1 мл раствора, содержащего 280 мМ сахарозы и 0,5 мМ LaCl_3 . Пробы быстро фильтровали через миллипорные фильтры (0,45 мк) и промывали 5 мл указанного выше раствора для удаления поверхностно-связанного кальция из везикул. После высушивания радиоактивность фильтров измеряли на жидкосинтом сцинтилляционном счетчике «Ультрабета 1210» (ЛКВ). При изучении пассивного транспорта кальция (по выходу ^{45}Ca) везикулы нагружали кальцием в течение 12 ч при 2 °С в среде, содержащей 100 мкМ $^{45}\text{CaCl}_2$, 140 мМ KCl, 20 мМ трис-НСl рН 7,4 с последующим прогреванием при 37 °С в течение 10 мин. Выход ионов кальция инициировали 30-кратным разбавлением аликвоты везикул сарколеммы, нагруженных ^{45}Ca в инкубационной среде, содержащей 20 мМ трис-НСl, 0,2 мМ ЭГТА и 140 мМ NaCl. Реакцию останавливали через разные промежутки времени и везикулы отмывали от поверхностно-связанного кальция.

Результаты и обсуждение

Выделенные нами препараты сарколеммы обладали достаточно высокой активностью Na, K-АТФазы ($5,15 \pm 0,53$ мкмоль Φ_n за 1 ч на 1 мг белка) и 5'-нуклеотидазы ($2,73 \pm 0,30$ мкмоль Φ_n за 1 ч на 1 мг белка). При электронно-микроскопическом исследовании препараты в основном имели вид везикул. На внутренней стороне единичных везикул были видны остатки размытого гликокаликса, что указывает на их обратную ориентацию.

Острое нарушение коронарного кровообращения сопровождается существенными изменениями в показателях, характеризующих процессы обмена и транспорта ионов в сарколемме сердечных клеток (см. таблицу). Актив-

Некоторые показатели ионтранспортной системы и липидной структуры сарколеммы при острой коронарной недостаточности

| Условия эксперимента | № К-АТФазы, мкмоль ФН за 1 ч на 1 мг белка | Связывание ^{45}Ca | Содержание Ca^{2+} в мембранах | Холестерин | Фосфолипиды | Лизофосфолипиды | Свободные жирные кислоты мкг на 1 мг белка |
|----------------------|--|-----------------------------|---|----------------------|------------------|-------------------|--|
| | | нмоль на 1 мг белка | | мкмоль на 1 мг белка | | | |
| Контроль (24) | $5,15 \pm 0,53$ | $41,4 \pm 2,6$ | $10,2 \pm 0,69$ | $0,61 \pm 0,028$ | $1,20 \pm 0,057$ | $0,060 \pm 0,003$ | $61,2 \pm 7,67$ |
| Острая ишемия (26) | $3,34 \pm 0,62$ | $48,0 \pm 3,2$ | $16,0 \pm 1,8$ | $0,70 \pm 0,038$ | $1,10 \pm 0,057$ | $0,074 \pm 0,006$ | $74,9 \pm 2,10$ |
| <i>P</i> | $<0,01$ | $<0,05$ | $<0,05$ | $>0,05$ | $>0,05$ | $<0,05$ | $<0,05$ |

Примечание. В скобках — число определений.

ность Na, К-АТФазы угнетается на 35 % по сравнению с контролем. При этом ^{45}Ca -связывающая способность везикул мембран умеренно повышается, соответственно увеличивается общее содержание ионов Ca^{2+} в мембранах.

Результаты изучения Na^+ , Ca^{2+} -обмена и пассивного транспорта Ca^{2+} через сарколемму приведены на рис. 1 и 2. Скорость Na^+ , Ca^{2+} -обмена при острой коронарной недостаточности снижается. Если в контрольных опытах она составляла в среднем $11,2 \pm 0,98$ нмоль на 1 мг белка в 1 мин, то при ишемии — $7,8 \pm 0,84$ нмоль на 1 мг белка в 1 мин ($p < 0,01$). Отличалась также кинетика выхода ^{45}Ca из везикул, предварительно нагруженных кальцием. Если в контрольных исследованиях 45 % от исходного уровня кальция выходило к концу 1-й минуты, а остальное количество постепенно по мере уменьшения градиента, то при острой ишемии основное количество ионов кальция (около 80 %) выходило из мембран быстро — в течение 1 мин.

Изучение липидной структуры в этих условиях (см. таблицу) не выявило существенных изменений в общем содержании двух основных классов липидов — холестерина и фосфолипидов в сарколемме. В то же время мы обнаружили повышение содержания свободных жирных кислот и фракции лизофосфолипидов соответственно на 22 и 23 %.

Таким образом, изучение ионтранспортной функции и тесно взаимосвязанной с ней липидной структуры сарколеммы при кратковременной ишемии миокарда выявило определенный комплекс изменений показателей, характеризующих эти процессы. Анализируя полученные нами результаты, можно отметить, что угнетение Na, К-АТФазы, возможно, связано как с нарушениями процессов энергообеспечения этого важного ионного насоса, так и изменениями его липидной окружения. Известно, что физиологическая роль липидной фазы мембранных структур заключается в создании окружения, обеспечивающего конфор-

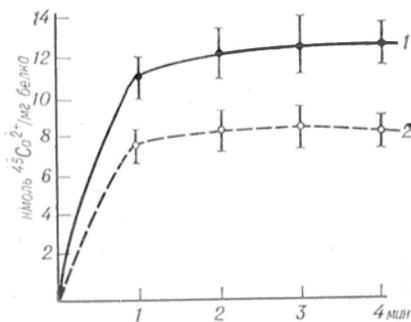


Рис. 1. Na^+ , Ca^{2+} -обмен в везикулах сарколеммы миокарда.

По оси абсцисс — продолжительность инкубации (в мин), по оси ординат — Na^+ , Ca^{2+} -обмен (в нмоль Ca^{2+} на 1 мг белка). 1 — контроль, 2 — ишемия.

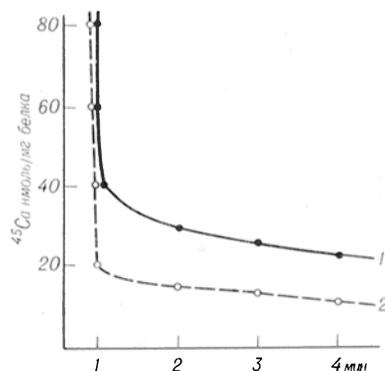


Рис. 2. Пассивный транспорт кальция (выход $^{45}\text{Ca}^{2+}$) в везикулах сарколеммы миокарда. По оси абсцисс — время (в мин), по оси ординат — выход Ca^{2+} (в нмоль на 1 мг белка).

мационную стабильность белков-ферментов в мембране и, следовательно, эффективность работы ионных насосов [3]. Со снижением активности Na, K-АТФазы тесно связано и нарушение Na^{+} -, Ca^{2+} -обменного механизма, обнаруженного в наших исследованиях. Поскольку везикулы мембран в большинстве случаев были инвертированы, то при изучении Na^{+} -, Ca^{2+} -обмена снижение скорости входа ^{45}Ca в везикулы расценивалось как снижение скорости выхода, высвобождения ионов Ca^{2+} из клетки через мембраны в условиях целостного организма. Соответственно повышенная скорость выхода ^{45}Ca из везикул в условиях нашего эксперимента указывала на усиленный вход этих ионов в клетку, что было непосредственно связано с повышением кальциевой проницаемости сарколеммы. В то же время необходимо отметить, что сам процесс выделения и очистки везикул сарколеммы, возможно, приводит к частичному повреждению этих мембран. В связи с этим нужно с должной осторожностью относиться к экстраполяции данных, полученных в эксперименте *in vitro*, на целостный организм. Вместе с тем установленные нами изменения, очевидно, носят закономерный характер, на что указывает высокая достоверность различий между контролем и острой коронарной недостаточностью.

Механизмы повышения содержания и связывания ^{45}Ca сарколеммой при кратковременной ишемии требуют дальнейшего изучения. Эти сдвиги, возможно, связаны с изменениями физических свойств мембран, в частности с изменением количества отрицательно заряженных Ca^{2+} -связывающих участков на поверхности мембраны при ишемии миокарда.

При изучении липидной структуры сарколеммы выявленные нами изменения носили преимущественно качественный характер. Так, уровень фосфолипидов имел только тенденцию к снижению, однако накопление свободных жирных кислот в этих условиях было более выраженным. Это, очевидно, связано с активацией при ишемии гидролиза наиболее представленного в данной мембране класса фосфолипидов — фосфатидилхолина, переходящего в лизоформу. На это указывало не только повышение уровня жирных кислот, но и увеличение концентрации

лизофосфолипидов. Согласно современным представлениям, проницаемость мембран для воды, различных ионов и других веществ во многом определяется их липидным составом [1]. Фосфолипидный и жирнокислотный спектр мембран регулирует также их проницаемость для кальция. Так, показано, что чем выше содержание лизофосфолипидов, тем больше кальциевая проницаемость мембран [8]. В условиях нашего эксперимента увеличение концентрации лизофосфолипидов в сарколемме, возможно, способствует повышению проницаемости мембраны для кальция и других катионов.

В заключение необходимо отметить, что острое кратковременное нарушение коронарного кровообращения сопровождается существенными изменениями в липидной структуре наружной мембраны, обуславливающими нарушение функции ионных насосов и повышение проницаемости для ионов Ca^{2+} . Нарушение барьерной функции мембран и усиленный вход кальция в клетку, с одной стороны, и угнетение функции Na, K-АТФазы и Na^{+} -, Ca^{2+} -обмена, с другой, могут лежать в основе механизмов повышения концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме сердечных клеток, нарушений временных соотношений цикла сокращения — расслабления. Кроме того, выявленные нами сдвиги в структуре и ионтранспортной системе сарколеммы могут обусловить нарушения электромеханического сопряжения и изменения сократительной функции миокарда при острой коронарной недостаточности. Согласно современным представлениям, немаловажную роль описанные изменения могут играть в механизмах нарушений генерации мембранного потенциала и возникновений аритмий при острой ишемии миокарда.

Тесная взаимосвязь липидной структуры, проницаемости и ионного транспорта через сарколемму диктует необходимость поиска и разработки путей коррекции изменений ионтранспортной функции этой мембраны с помощью мембраноактивных соединений, действующих именно на липидную фазу ее структуры.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов В. Ф. Липиды и ионная проницаемость мембран. — М. 1982.
2. Аронов О. М. // Лаб. дело. — 1962. — № 5. — С. 30—34.

3. Биохимические методы исследования в клинике / Под ред. А. А. Покровского. — М., 1969. — С. 314—315.
4. *Болдырев А. А.* // Всесоюзный симпозиум по биохимии липидов: 4-й. Тезисы докладов. — Киев, 1983. — С. 29—30.
5. *Величко Л. М., Тимофеев В. П., Шефер П. А.* // Вопр. мед. химии. — 1980. — № 2. — С. 275—277.
6. *Воробец З. Д., Курский Н. Д., Марченко С. Н.* // Биохимия. — 1983. — Т. 48, № 6. — С. 1020—1025.
7. *Barry P. J., Okhnyzen C. H., Enihman-Mark L.* // Calcium-Binding Proteins: Structure and Function. — New York, 1980. — P. 39—46.
8. *Chien C. R., Reeves J. P., Maximilian L.* et al. // Circulat. Res. — 1981. — Vol. 48. — P. 711—719.
9. *Duncombe W. G.* // Clin. chim. Acta. — 1964. — Vol. 9. — P. 122—125.
10. *Harigaya G., Schwartz A.* // Circulat. Res. — 1969. — Vol. 25. — P. 781—794.
11. *Кейтс М.* Техника липидологии: Пер. с англ. — М., 1975. — С. 257—290.
12. *Langer G. A.* // J. molec. cell. Cardiol. — 1980. — Vol. 12. — P. 231—239.
13. *Langer G. A., Philipson K. D., Berns D. M.* // Метаболизм миокарда. — М., 1981. — С. 11—22.
14. *Langer G. A., Frank I. S.* // J. Cell. Biol. — 1972. — Vol. 54. — P. 441—445.
15. *Louis P. J., Sulake P. V.* // Int. J. Biochem. — 1976. — Vol. 7. — P. 547—558.
16. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. I.* // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 256—265.
17. *Rathbum W. B., Bellach M. V.* // Analyt. Biochem. — 1969. — Vol. 28. — P. 436—445.

Поступила 16.07.85

THE SYSTEM OF ION TRANSPORT AND SOME COMPONENTS OF THE SARCOLEMMMA STRUCTURE IN ACUTE ISCHEMIA OF MYOCARDIUM

L. S. Mkhitarian

Institute of Cardiology, Kiev

Ion transport properties and some components of lipid structure in myocardial sarcolemma were studied under conditions of short-term, acute ischemia simulated in rabbits by means of intravenous administration of vasopressin at a dose of 0.2 U/kg. The acute coronary insufficiency was accompanied by distinct alterations in the parameters specific for calcium metabolism and transport: activity of Na^+ , K^+ -ATPase and the rate of Na^+ - Ca^{2+} turnover were decreased, while ^{45}Ca -binding ability and content of Ca^{2+} were increased in the myocardial sarcolemma. Alterations in lipid structure, phospholipid composition of membranes and accumulation of free fatty acids appear to be responsible for the phenomenon observed. The increased rate of calcium ions transport found may occur due to alterations in the sarcolemma structure.

УДК 616.127-002.4-07:616.152.41-02:613.863]-074

В. С. Якушев, Е. В. Миронова, В. И. Курипка

БАЛАНС КАЛЬЦИЯ ПРИ НЕКРОЗЕ МИОКАРДА И ЗНАЧЕНИЕ СТРЕССА В ЕГО НАРУШЕНИИ

Кафедра биохимии Запорожского медицинского института

Ранее установлено, что инфаркт миокарда сопровождается изменением состояния гормональных систем, регулирующих обмен кальция, выражающемся частым появлением гипокальциемии [2, 4, 5, 8]. Однако баланс кальция и его взаимосвязь с особенностями гормональной регуляции при некрозе миокарда не изучали. В то же время известно, что формированию некроза в миокарде нередко предшествует воздействие сильного психоэмоционального перевозбуждения или стресса. Последний [9] вызывает отрицательный кальциевый баланс, изменение транспорта кальция и его аккумуляции в субклеточных структурных органах, особенно в сердце и мозге.

Цель данной работы — изучение баланса кальция при некрозе миокарда и при его воспроизведении после пере-

несенного стресса с применением специального кишечного маркера [15], сопоставление характера баланса с особенностями внутриорганного перераспределения кальция при указанных моделях, исследование взаимосвязи выявленных изменений с особенностями продукции кортикостерона и кальцитонина.

Методика

Работу проводили на 151 крысе Вистар с массой тела 130—160 г. Животных содержали на стандартном комбикормовом рационе с добавлением премикса в течение 2 нед до проведения эксперимента и во время опыта. Животные были разделены на 4 группы: 1-ю составили интактные крысы, 2-ю — крысы, у которых воспроизводили стресс [10], 3-ю — животные, у которых моделировали некроз миокарда перевязкой артерии общепринятым методом и исследовали на 2-е и

7-е сутки после начала опыта, 4-ю — крысы, у которых воспроизводили некроз миокарда после перенесенного стресса и исследовали в те же сроки, что и предыдущую группу животных.

Развитие некроза оценивали по данным электрокардиографического и гистологического исследований. Воспроизведение стресса контролировали по количеству язв желудка [10], изменениям в тимусе и надпочечниках.

Объектами исследования явились сыворотка крови, левый желудочек сердца (его сохранившийся отдел), печень, большие полушария головного мозга, грудной отдел аорты, а также кал.

В сыворотке крови содержание кальция определяли с помощью глюкоксаль-бис-2 (2-оксанила) («Lachema», ЧССР). При изучении органов и кала последние подвергали минерализации и обработке 2 н. HCl [15].

Для определения баланса кальция крысам после суточного голодания вводили кармин, выполняющий роль маркера для сбора кала в течение 3 дней [15].

Полученные данные о содержании кальция в исследованных объектах и его фекальная экскреция соответствовали данным других авторов [3, 6].

Содержание кортикостерона изучали флюориметрически с применением «Specord M-40» (ГДР), кальцитонина — радиоиммунохимически с помощью наборов (RIA-mat Calcitonin II, ФРГ) и счетчика радиоактивности РАК-гамма (ЛКВ, Швеция).

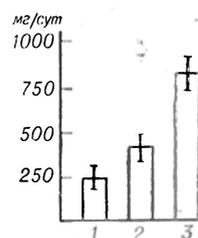
Полученные данные подвергали статистической обработке.

Результаты и обсуждение

Установлено, что развитие некроза миокарда сопровождается двукратным увеличением выведения кальция

Экскреция кальция у крыс при различных вариантах воспроизведения некроза миокарда.

1 — интактные животные; 2 — некроз миокарда; 3 — некроз миокарда после стресса.



с калом по сравнению с таковым у интактных животных. У крыс при воспроизведении некроза миокарда после перенесенного стресса фекальная экскреция кальция увеличивается в 1,6 раза больше, чем у животных, у которых некроз миокарда воспроизводился без предварительного воздействия стресса (см. рисунок).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что сам некроз миокарда является ведущей причиной отрицательного баланса кальция в организме. При этом предварительно перенесенный стресс усугубляет его степень, что существенно влияет на распределение кальция в крови и органах в условиях последующего формирования некроза в сердце.

Развитие крупноочагового трансмурального некроза миокарда сопровождается гипокальциемией (табл. 1). При этом в сохранившемся отделе левого желудочка сердца содержание кальция на 2-е и 7-е сутки после перевязки

Таблица 1

Содержание кальция в сыворотке крови и тканях крыс при различных вариантах воспроизведения некроза миокарда

| Объект исследования | Интактные животные | Некроз миокарда | | Некроз миокарда + стресс | |
|--|--------------------|----------------------|------------|-------------------------------------|----------------|
| | | сутки после операции | | сутки после воспроизведения стресса | |
| | | 2-е | 7-е | 2-е | 7-е |
| Сыворотка крови, ммоль/л | 2,1±0,05 | 1,9±0,01* | 1,6±0,003* | 1,7±0,05**, * | 1,6±0,02* |
| Сердце (левый желудочек), ммоль на 1 кг ткани | 1,8±0,03 | 1,5±0,03* | 1,39±0,05* | 1,2±0,03**, * | 1,2±0,01* |
| Печень, ммоль на 1 кг ткани | 2,7±0,02 | 3,9±0,12* | 4,2±0,10* | 4,26±0,07**, * | 4,74±0,08**, * |
| Полушария головного мозга, ммоль на 1 кг ткани | 1,08±0,01 | 1,29±0,05* | 1,4±0,04* | 1,4±0,02**, * | 1,5±0,02**, * |
| Аорта, ммоль на 1 кг ткани | 1,5±0,02 | 1,9±0,09* | 2,1±0,01* | 2,04±0,06* | 2,1±0,01* |

Примечание. В опыте использовали 6—10 животных. Одна звездочка — $P < 0,05$ по отношению к интактным животным, две — $P < 0,05$ животных с соответствующими сроками некроза миокарда + стресс к животным с некрозом миокарда.

коронарной артерии уменьшается соответственно на 16 и 25,7 % по сравнению с таковым у интактных животных. Необходимо отметить, что на 2-е сутки после развития некроза концентрация кальция в больших полушариях головного мозга, печени и аорте увеличивается соответственно на 19,4, 46,6 и 21 % по сравнению с исходным уровнем. К 7-м суткам опыта в указанных органах (мозг, печень, аорта) его содержание повышается соответственно на 29, 52 и 35 % по сравнению с таковым у интактных животных, что еще более подчеркивает нарастание изменений в обмене кальция в ранний период опыта.

Полученные данные позволяют заключить, что экспериментальный некроз миокарда сопровождается значительным перераспределением кальция в крови и органах. При этом, как и в клинике, воспроизводится гипокальциемия [2, 4]. Интересно отметить, что в целом сохранившийся отдел левого желудочка сердца теряет кальций, что соответствует общезвестным данным об ослаблении сократительной способности сердца в остром периоде некроза миокарда и, вероятно, является специфическим сдвигом в обмене кальция, сопровождающим это заболевание. Такое положение согласуется с данными авторов [3], которые отмечают понижение содержания кальция в сердце при миокардите. В то же время в аорте и других органах (в мозге и печени) концентрация кальция увеличивается. Особенно можно выделить интересный факт активного накопления кальция в печени в течение острого периода развития некроза в сердце. Известно, что печень является одним из важнейших органов, участвующих в выведении кальция из организма через кишечник [6].

Однако кальцийтранспортирующие и кальцийрегулирующие системы гепатоцитов [1] изучены мало, поэтому до сих пор остается неясным, каким образом печень концентрирует кальций в период острого развития некроза миокарда. Можно думать, что этот орган вносит существенный вклад в нарушение обмена кальция, что требует специального изучения.

Вместе с тем содержание кальция повышается как в мозге, так и в аорте. Их вклад в развитие гипокальциемии при некрозе миокарда является

значительно меньшим, чем печени. Однако последствия для состояния центральной нервной системы и аорты будут более значительными, так как кальций играет ключевую роль в регуляции метаболизма и функций [12, 14].

Таким образом, развитие некроза миокарда сопровождается значительным перераспределением кальция в крови и органах. Ведущими изменениями при этом являются гипокальциемия, дефицит кальция в левом желудочке сердца и его избыток в печени, больших полушариях головного мозга и аорте.

Предварительно перенесенный стресс углубляет нарушения кальциевого обмена, характерные для некроза (см. табл. 1). При этом в еще большей степени проявляется гипокальциемия и содержание кальция на 2-е и 7-е сутки опыта в крови у животных данной группы составляет 89 и 96 % по сравнению с таковым при обычном воспроизводимом некрозе миокарда. В сохранившемся отделе левого желудочка еще более значительно уменьшается содержание кальция, а в остальных органах оно увеличивается по сравнению с таковым при традиционной модели инфаркта. Особенно интенсивный сдвиг наблюдается в печени, где под влиянием предварительно перенесенного стресса концентрация кальция повышается на 2-е и 7-е сутки опыта соответственно на 107 и 112 % по сравнению с его содержанием при некрозе миокарда, воспроизведенном без предварительного стресса.

Учитывая, что в обмене кальция важную роль играют стероидные гормоны и гормоны щитовидной железы, нами было исследовано содержание кортикостерона и кальцитонина.

Из табл. 2 видно, что содержание кортикостерона у животных всех исследованных групп в 5—7 раз выше, чем у интактных. При этом развитие некроза миокарда после перенесенного стресса сопровождается несколько меньшим выбросом кортикостерона, особенно к 7-м суткам опыта, по сравнению с таковым при некрозе миокарда, воспроизведенном без предварительного воздействия стресса. Интересно отметить, что подобная динамика характерна и для кальцитонина. Вместе с тем гиперкальцитонинемия наблюдается только в ранний период развития стресса, а также при некро-

Содержание кортикостерона и кальцитонина при некрозе миокарда, воспроизведенном после перенесенного стресса

| Исследуемый показатель | Интактные животные | Стресс | | | | | Некроз миокарда, сутки | | Некроз миокарда + стресс, сутки |
|------------------------|--------------------|--------------------|-------------|--------------------|---------------|------------------------|------------------------|--------------|---------------------------------|
| | | период развития, ч | | после стресса, сут | | Некроз миокарда, сутки | | | |
| | | 2 | 4 | 16 | 2 | 7 | 2-е | 7-е | |
| Кортикостерон, мкг/л | 25 ± 5,0 | — | 125 ± 5,0* | 128,1 ± 4,9* | 205,7 ± 14,9* | 147,5 ± 3,4* | 277,1 ± 17,1* | 133,3 ± 6,8* | 192,1 ± 10,1*, ** |
| Кальцитонин, пг/мл | 43,5 ± 5,1 | 58,1 ± 1,2* | 70,3 ± 5,8* | 47,9 ± 4,1 | 51,1 ± 3,0 | 59,0 ± 9,0 | 71,4 ± 8,8* | 49,1 ± 6,3 | 44,0 ± 4,9** |

П р и м е ч а н и е. В опыте использовали 6—8 животных. Одна звездочка — $P < 0,05$ по отношению к показателям интактных животных; две — $P < 0,05$ животных с некрозом миокарда + стресс к животным с некрозом миокарда.

зе миокарда; последнее соответствует данным клиники [5]. Обращает на себя внимание и снижение концентрации кальцитонина в тот период, когда в наибольшей степени выявляются стрессорные повреждения желудка, т. е. после 6 ч воспроизведения стресса (см. табл. 2).

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что гиперкортикостеронемия на фоне нормокальцитонинемии при формировании некроза миокарда после перенесенного стресса, способствуя созданию отрицательного кальциевого баланса, не является ведущим фактором его более глубокого нарушения. Известно, что способность к всасыванию кальция в кишечнике определяется метаболизмом и функцией гормональной формы витамина D — $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, который индуцирует синтез кальцийсвязывающего белка в слизистой оболочке кишечника. Можно полагать, что предварительно перенесенный стресс у животных с некрозом миокарда существенно нарушает синтез указанного витамина в печени и почках [7], что угнетает витамин D-зависимый транспорт кальция. Этот сдвиг на фоне неспецифической гиперкортикостеронемии [11, 13] является, по-видимому, наиболее вероятной причиной углубления отрицательного кальциевого баланса и последующего перераспределения кальция в организме при развитии некроза в миокарде. Можно полагать, что одним из важнейших патогенетических моментов молекулярных нарушений кальциевого гомеостаза при воздействии стрессогенных факторов [9], а также изученных нами состояний является специфическое для него нарушение метаболизма и функции витаминов группы D. Отсюда следует заключить, что правильная или неправильная тактика использования этих витаминов в области профилактики или терапии создает соответственно эффективную или малозначимую естественную защиту организма от воздействия стрессогенных повреждающих факторов, которые характеризуются рядом неспецифических гормональных сдвигов гипофизнадпочечниковой системы.

Таким образом, некроз миокарда сопровождается нарушением баланса кальция в организме, а предварительно перенесенный эмоциональный стресс выполняет роль фактора, углуб-

ляющего эти нарушения. Это проявляется в более повышенном выведении кальция из организма, усилении степени гипокальциемии, а также резким увеличением содержания кальция в печени, аорте и больших полушариях головного мозга при одновременном снижении его концентрации в нешемизированном (сохранившемся) отделе левого желудочка сердца.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гепатоцит: Функционально-метаболические свойства / Гулак В. П., Дудченко А. М., Зайцев В. В. и др. — М., 1985.
2. Золотов Г. К., Слепушкин В. Д., Васильцева Я. С. // Кардиология. — 1983. — № 1. — С. 65—68.
3. Кирсанов Н. В., Хучашивили З. Г., Мамулашвили Л. Д. и др. // Там же. — 1984. — № 1. — С. 80—85.
4. Коц Я. И. // Там же. — 1969. — № 8. — С. 120—121.
5. Пименов Л. Т., Лецинский Л. А., Трусов В. В. // Тер. арх. — 1985. № 12. — С. 45—49.
6. Романенко В. Д. Физиология кальциевого обмена. — Киев, 1975.
7. Спиричев В. Б. // Казан. мед. журн. — 1976. — № 5. — С. 406—419.
8. Слепушкин В. Д., Лишманов Ю. Б., Золотов Г. К., Прум И. А. // Успехи физиол. наук. — 1985. — Т. 16, № 4. — С. 106—116.

9. Якушев В. С., Миронова Е. В., Курипка В. И. и др. // Физиол. журн. — 1985. — Т. 31, № 6. — С. 36—42.
10. Desiderato O., Mackinnon G., Hisson H. // Comp. Physiol. Psychol. — 1974. — Vol. 87. — P. 208—214.
11. Carre M., Agigbede O., Mrauel L. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1976. — Vol. 98. — P. 1065—1068.
12. Grinwald P. M., Nayler W. G. // J. molec. cell. Cardiol. — 1981. — Vol. 13. — P. 867—880.
13. Lukert B., Adams J. // Arch. intern. Med. — 1976. — Vol. 136. — P. 1241—1253.
14. Nayler W. // Amer. J. Path. — 1982. — Vol. 102. — P. 262—270.
15. Pak G., Stewart A., Raskin P., Galosy R. // Metabolism — 1980. — Vol. 29. — P. 793—796.

Поступила 13.03.85

BALANCE OF CALCIUM IN MYOCARDIUM NECROSIS AND ROLE OF STRESS IN THE BALANCE DETERIORATION

V. S. Yakushev, E. V. Mironova, V. I. Kuripka
Medical School, Zaporozh'e

Calcium balance was impaired in a body during myocardium necrosis. Emotional stress, which preceded the myocardial necrosis, fortified these impairments. This was manifested as follows: an increased rate of calcium excretion and elevated hypocalcemia, accumulation of calcium in liver tissue, aorta, brain hemispheres and a decrease of its content in the intact tissue of left heart ventricle.

УДК 616.438-089.87-092.9-07:616.36-008.931:577.152.241-074

И. С. Подосинников, С. В. Зозулякова, М. Л. Чухловина,
Л. И. Полушкина, Л. Г. Залкинд

ВЛИЯНИЕ ТИМЭКТОМИИ НА АКТИВНОСТЬ КЛЮЧЕВЫХ ФЕРМЕНТОВ ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗА В ПЕЧЕНИ КРЫС

Центральная научно-исследовательская лаборатория Ленинградского педиатрического
медицинского института

В настоящее время особое внимание уделяется изучению роли тимуса в регуляции углеводного обмена [3, 10, 14]. В предыдущих исследованиях [10] было показано, что тимэктомия (ТЭ) приводит к нарушению обмена глюкозы в тканях. Одним из основных метаболических путей, ответственных за сохранение гомеостаза глюкозы, является глюконеогенез [13, 15]. Эффективность его в организме зависит от совместной работы трех ключевых ферментов: фосфоенолпируваткарбоксикиназы (ФЕПКК), фруктозо-1,6-дифосфатазы (ФДФазы) и глюкозо-6-фосфатазы (Г-6-Фазы). Главным регулирующим звеном в глюконеогенезе считают [5, 19] реакцию фосфорилирования пи-

рувата, включающую карбоксилирование пирувата под действием пируваткарбоксилазы в присутствии положительного модулятора — ацетил-КоА с образованием оксалоацетата и фосфоенолпирувата под действием ФЕПКК. Установлено, что из трех ключевых ферментов глюконеогенеза роль лимитирующего фактора играет ФЕПКК. Повышение ее активности рассматривают как показатель активации глюконеогенеза при адаптации к холоду [22], гипоксии [11], термической травме [6], иммобилизации [19].

Цель настоящей работы состояла в исследовании активности ключевых ферментов глюконеогенеза в печени после тимэктомии крыс (ТЭК). Для

Активность ферментов глюконеогенеза у ТЭК и ЛОЖ через 9 и 12 мес после операции ($M \pm m$)

| Группа | Период исследования | Животные | Через 9 мес после операции | | | Через 12 мес после операции | | |
|--------|---------------------|-----------|--|--|--|--|--|--|
| | | | ФЕПКК, мкмоль НАДН на 1 мг белка в 1 мин | Г-6-Ф, мкмоль Рн на 100 мг белка в 1 мин | ФДФ, мкмоль Рн на 100 мг белка в 1 мин | ФЕПКК, мкмоль НАДН на 1 мг белка в 1 мин | Г-6-Ф, мкмоль Рн на 100 мг белка в 1 мин | ФДФ, мкмоль Рн на 100 мг белка в 1 мин |
| 1 | Без нагрузки | ЛОЖ | 8,28±0,66 (6) | 0,38±0,06 (6) | 5,96±0,51 (6) | 9,70±0,63 (7) | 0,63±0,13 (7) | 5,44±0,16 (7) |
| 2 | | ТЭК | 8,42±0,42 (6) | 0,56±0,11 (6) | 7,36±0,40 (6) | 6,59±0,35 (5) | 0,58±0,14 (5) | 6,10±0,64 (5) |
| 3 | После нагрузки | ЛОЖ | 8,44±0,44 (5) | 0,90±0,18 (6) | 6,93±0,53 (6) | 7,62±0,18 (6) | 1,02±0,16 (6) | 8,33±0,43 (6) |
| | | ТЭК | 7,11±0,56 (6) | 0,51±0,07 (6) | 7,26±0,40 (6) | 3,66±0,80 (6) | 1,29±0,21 (6) | 4,86±0,16 (6) |
| | | $P_{1,2}$ | >0,05 | >0,05 | <0,05 | =0,01 | >0,05 | >0,05 |
| | | $P_{1,3}$ | >0,05 | <0,01 | >0,05 | >0,05 | <0,05 | <0,05 |
| | | $P_{3,4}$ | =0,05 | <0,05 | >0,05 | >0,01 | >0,05 | <0,01 |
| | | $P_{2,4}$ | <0,05 | >0,05 | >0,05 | <0,05 | <0,05 | =0,05 |

Примечание. Здесь и в табл. 2: в скобках — число опытов.

выявления скрытых нарушений метаболизма у ТЭК проведена серия опытов с нагрузкой. Выбор нагрузки был обусловлен данными о том, что под влиянием физических нагрузок масса тимуса уменьшается, эндокринная активность его изменяется [23, 25].

Методика

Работа выполнена на 132 крысах-самцах Вистар. ТЭ проводили хирургическим способом под эфирным наркозом в возрасте животных 2 мес. Полноту ТЭ оценивали при вскрытии животных макроскопически и путем гистологического исследования клетчатки переднего средостения. Контролем служили ложнопериованные животные (ЛОЖ). Крыс умерщвляли методом деканитации. Определяли активность ключевых энзимов глюконеогенеза ФЕПКК [8], ФДФазы [18], Г-6-Фазы [24], а также содержание гликогена в печени крыс [21].

Исследования проводили через 3, 6, 9 и 12 мес после ТЭ. Использовали физическую нагрузку (плавание в течение 1 ч в воде 35 °С). Предварительно животных приучали к воде (плавали 2 раза через день по 10 мин, после чего перед опытом был перерыв 2 дня). Результаты обработаны статистическим методом Фишера — Стьюдента и непараметрически с использованием критерия Вилкоксона — Манна — Уитни.

Результаты и обсуждение

Изучение активности ФЕПКК в печени крыс после ТЭ через 3, 6, 9 и 12 мес показало, что через 3, 6, 9 мес этот

показатель не отличался от такового у ЛОЖ (табл. 1). Через 12 мес после ТЭ активность ФЕПКК в печени крыс была ниже, чем у ЛОЖ. Опыты с применением физической нагрузки показали, что через 3 и 6 мес после операции даже при нагрузке активность ФЕПКК не изменялась. Через 9 и 12 мес после нагрузки активность ФЕПКК у ТЭК была снижена по сравнению с таковой ЛОЖ.

Исследование активности ФДФазы показало, что через 3 и 6 мес после ТЭ активность энзима не изменялась ни в покое, ни при физической нагрузке. Через 9 мес после ТЭ выявлено повышение активности ФДФазы, через 12 мес последняя не отличалась от активности у ЛОЖ. Однако нагрузка, повышенная у ЛОЖ активность ФДФазы, у ТЭК вызывала снижение активности ФДФазы. У ТЭК после нагрузки активность ФДФазы была ниже, чем у ЛОЖ.

Активность Г-6-Фазы через 3 мес после ТЭ была снижена по сравнению с таковой ЛОЖ. Через 6 мес после ТЭ этот показатель не отличался от такового у ЛОЖ. Сходные данные получены через 9 и 12 мес после ТЭ. Однако при физической нагрузке через 9 мес после операции активность Г-6-Фазы

у ТЭ крыс была ниже, чем у ЛОЖ. Таким образом, изучение ключевых энзимов глюконеогенеза показало, что активность ФЕПКК в печени ТЭК снижается через 9 мес после операции, спустя 12 мес при нагрузке выявляется снижение активности ФДФазы. Активность Г-6-Фазы снижена у ТЭК через 3 мес после операции и через 9 мес при физической нагрузке. Следовательно, полученные данные свидетельствуют об угнетении процесса глюконеогенеза в печени ТЭК. В то же время отсутствие в ряде случаев синхронных изменений в активности ключевых энзимов глюконеогенеза в наших исследованиях не позволяет рассматривать их как единый генетически детерминированный аппарат с общими механизмами регуляции. По-видимому, следует согласиться с мнением, высказанным в работе [9] об отсутствии единого механизма регуляции синтеза ФЕПКК, ФДФазы, Г-6-Фазы. Эти ферменты играют разную функциональную роль и имеют свои механизмы регуляции. Так, Г-6-Фаза является ключевым энзимом не только глюконеогенеза, но и участвует в образовании глюкозы из гликогена в печени. Через 3 мес после операции наряду со сниженной активностью Г-6-Фазы отмечено снижение содержания гликогена в печени крыс (табл. 2). Последнее наблюдалось и через 6 мес после ТЭ. В последующие сроки исследования активность Г-6-Фазы и содержание

гликогена не отличались у ТЭК от значений, полученных у ЛОЖ. Через 9 мес после операции нагрузка, вызывавшая у ТЭК снижение содержания гликогена в печени, сопровождалась снижением активности Г-6-Фазы. Возможно, изменение активности Г-6-Фазы у ТЭК обусловлено не только угнетением процесса глюконеогенеза, но и нарушением процесса синтеза или распада гликогена. Кроме того, менее выраженное изменение активности Г-6-Фазы по сравнению с другими ферментами глюконеогенеза в отдаленные сроки после операции может быть связано с тем, что субстрат реакции глюкозо-6-фосфат усиленно используется при ТЭ, окисляясь в печени по пентозофосфатному пути, интенсивность которого существенно возрастает. Действительно, активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФД), пускового энзима пентозного цикла, повышена после ТЭ в миокарде, селезенке, печени [4]. По нашим данным, в эритроцитах при ТЭ также происходит активация пентозного цикла.

Активность Г-6-ДФ через 6 мес после ТЭ имела тенденцию к повышению, а через 9 и 12 мес у ТЭК выявлялось достоверное увеличение активности этого показателя, составлявшего соответственно $12,12 \pm 0,55$ против $9,22 \pm 1,27$ и $13,78 \pm 0,87$ против $9,71 \pm 0,44$ мкмоль НАДФ·Н на 1 г гемоглобина в 1 мин у ЛОЖ.

Активность фермента ФДФазы так-

Таблица 2
Содержание гликогена печени (мг/г) у тимэктомизированных (ТЭ) и ложнооперированных (ЛО) крыс ($M \pm m$)

| Группа | Период исследования | Животные | Сроки исследования после операции, мес | | | |
|--------|---------------------|-----------|--|------------------------|-----------------------|------------------------|
| | | | 3 | 6 | 9 | 12 |
| 1 | Без нагрузки | ЛОЖ | $303 \pm 43,6$ (6) | $508 \pm 62,4$ (12) | $373 \pm 71,2$ (7) | $315 \pm 25,1$ (14) |
| 2 | | ТЭК | $119 \pm 16,7$ (5) | $277 \pm 31,4$ (11) | $485 \pm 55,6$ (5) | $292 \pm 19,4$ (14) |
| 3 | С нагрузкой | ЛОЖ | $216 \pm 43,4$ (7) | $256 \pm 56,5$ (10) | $291 \pm 33,1$ (6) | $121 \pm 14,8$ (8) |
| 4 | | ТЭК | $143 \pm 64,6$ (6) | $277 \pm 86,9$ (8) | $231 \pm 33,9$ (6) | $134 \pm 33,8$ (5) |
| | | $P_{1,2}$ | <0,05 | <0,05 | >0,05 | >0,05 |
| | | $P_{1,3}$ | >0,05 | <0,05 | >0,05 | <0,01 |
| | | $P_{3,4}$ | >0,05 | >0,05 | >0,05 | >0,05 |
| | | $P_{2,4}$ | >0,05 | >0,05 | <0,01 | <0,01 |

же имеет свои механизмы регуляции. Разнонаправленность изменения активности ФДФазы в печени крыс через 9 и 12 мес после ТЭ может быть обусловлена нарушением соотношения содержания АМФ и АТФ в печени. Известно, что активность ФДФазы подавляется при увеличении содержания АМФ и снижении содержания АТФ. ФДФаза действует в направлении синтеза глюкозы, если концентрация АМФ мала, а концентрация АТФ велика. Однако вопрос о содержании АТФ и интенсивности процессов его образования в тканях ТЭК недостаточно изучен, имеющиеся данные литературы противоречивы. Сообщалось [2], что при ТЭ усиливаются окислительные процессы и распад АТФ за счет активации АТФаз. Но другие авторы [17] обнаружили снижение процессов окисления при тимэктомии. Отмечено [7] повышение активности гексокиназы в тканях ТЭК, что свидетельствует об активации начального этапа гликолиза. В то же время на поздних этапах гликолиза происходит понижение активности ферментов, в частности альдолазо-кетозо-1-фосфатальдегидазы и лактатдегидрогеназы в селезенке, миокарде и печени [4]. Это согласуется с нашими данными о более низком уровне пирувата и лактата у ТЭК по сравнению с ЛОЖ при физической нагрузке. Возможно, противоречивость литературных данных обусловлена фазностью изменения энергодающих путей и соответственно содержания АТФ при ТЭ, что может приводить к разнонаправленным изменениям активности ФДФазы в различные сроки после ТЭ.

Вопрос о причинах угнетения глюконеогенеза в печени при ТЭ сложен. Процесс глюконеогенеза находится под гормональным контролем. Глюкокортикоиды, глюкагон, катехоламины вызывают стимуляцию глюконеогенеза [20, 15]. Последнее происходит путем активации ключевых ферментов глюконеогенеза, опосредованной через цАМФ [9]. Известно, что при тимэктомии функция коры надпочечников изменяется. Так, уровень глюкокортикоидов в периферической крови ТЭК снижается [16]. Отмечено [2] повышение секреции кортикостероидов в ранние сроки после операции, сменяющиеся затем «гипокортикоидной» фазой.

Учитывая тесную взаимосвязь меж-

ду тимусом и корой надпочечников, выявленное угнетение глюконеогенеза в печени ТЭК, по-видимому, следует связать с отсутствием активирующего влияния глюкокортикоидов на глюконеогенез вследствие подавления функции коры надпочечников и отсутствия гормона тимуса, непосредственно участвующего в углеводном обмене. Поскольку в лечебной и профилактической медицине за последние годы применяют фракции пептидов тимуса, являющиеся иммуномодуляторами [1], а при ряде аутоиммунных заболеваний показана операция ТЭ, возникает необходимость изучения влияния тимуса на обменные процессы в организме. По-видимому, направленная регуляция активности ферментов может стать основой рациональной терапии [12]. Выявленные нарушения гомостаза глюкозы после ТЭ требуют дальнейшего исследования в целях предупреждения и коррекции метаболических нарушений при иммунодефицитном состоянии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин И. П. // *Вопр. мед. химии.* — 1984. — № 3. — С. 2—7.
2. Гроздов С. П. // *Пробл. эндокринологии.* — 1975. — № 1. — С. 98—102.
3. Гунько М. В., Осинк П. Д. // *Физиология, биохимия и биофизика возрастного развития.* — Киев, 1980. — С. 170—173.
4. Кемилева З. Вилочковая железа. — М., 1984.
5. Кендыш И. П. // *Вопр. мед. химии.* — 1984. — № 4. — С. 2—12.
6. Кидрасова Р. С., Камилев Ф. Х. // *Там же.* — 1982. — № 6. — С. 105—109.
7. Михайлова И. А., Подосинников И. С. // *Пробл. эндокринологии.* — 1981. — № 4. — С. 62—63.
8. Панин Л. Е., Нечаев Ю. С., Поляков Л. М. // *Вопр. мед. химии.* — 1977. — № 2. — С. 159—165.
9. Панин Л. Е., Колосова И. Е., Нечаев Ю. С. // *Бюл. экспер. биол.* — 1979. — № 6. — С. 544—547.
10. Подосинников И. С., Полушкина Л. И., Чуловина М. Л., Зозулякова С. В. // *Химия и биология углеводов.* — Пушкино, 1982. — С. 64.
11. Поступаев В. В., Литонян З. М. // *Бюл. экспер. биол.* — 1978. — № 4. — С. 415—416.
12. Проmysлов М. Ш. // *Вестн. АМН СССР.* — 1982. — № 9. — С. 81—86.
13. Смирнов А. В. // *Успехи совр. биол.* — 1984. — № 3. — С. 399—412.
14. Чеснокова В. М., Иванова Л. П., Грунтенко Е. В. // *Бюл. экспер. биол.* — 1983. — № 8. — С. 89—91.
15. Шапот В. С., Шелепов В. П., Ушаков В. А. // *Вестн. АМН СССР.* — 1982. — № 9. — С. 29—34.

16. Fachel J., Stark E., Vallent K., Palkovits M. // Acta med. Acad. Sci. hung. — 1962. — Vol. 18. — P. 461—466.
17. Gaburro D., Volpato S. // Minerva pediat. — 1966. — Vol. 18. — P. 445—450.
18. McGilvery R. W. // Meth. Enzymol. — 1955. — Vol. 2. — P. 543—546.
19. Groen A. K., Verwoorn R. C., Tager J. M. // Biochem. Soc. Trans. — 1983 — Vol. 11 — P. 88.
20. Kletzien R. F., Weber C. A., Stumpo D. J. // J. Cell. Physiol. — 1981. — Vol. 109. — P. 83—90.
21. Lo S., Rassel J. C., Taylor A. W. // J. appl. Physiol. — 1970. — Vol. 28. — P. 234—236.
22. Nakagawa H., Nagai K. // J. Biochem. — 1971. — Vol. 69. — P. 923—934.
23. Selye H. Stress in Health and Disease. — Boston, 1976. — P. 177—178.
24. Swanson M. A. // Meth. Enzymol. — 1955. — Vol. 2. — P. 541—543.
25. Reyes M. P., Lerner A. M., Ho K. L. // J. infect. Dis. — 1981. — Vol. 143. — P. 292.

Поступила 06.06.85

EFFECT OF THYMECTOMY ON ACTIVITY OF KEY ENZYMES OF GLUCONEOGENESIS IN RAT LIVER TISSUE

I. S. Podosinnikov, S. V. Zozulyakova, M. L. Chukhlovina, L. I. Polushkina, L. G. Zalkind
Pediatric Medical School, Leningrad

Activities of key enzymes of gluconeogenesis—phosphoenolpyruvate carboxykinase, fructose-1,6-diphosphatase, glucose-6-phosphatase as well as the content of glycogen were studied in liver tissue of thymectomized rats. Gluconeogenesis was inhibited in liver tissue of these rats. As thymus and adrenal cortex are firmly related, the inhibition of gluconeogenesis in liver tissue of thymectomized rats appears to occur due to a decrease in the glucocorticoid activating effect followed the inhibition of adrenal cortex functions and absence of thymus hormones directly responsible for carbohydrate metabolism.

УДК 616-006.68-092.9-07:616.36-008.949.4:615.357.453-033.1

К. И. Краулис, А. П. Дяшрюс, А. П. Улинскайте

АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ С РЕЦЕПТОРАМИ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ РОСТЕ КАРЦИНОСАРКОМЫ УОКЕРА

Лаборатория по изучению биологически активных веществ Института биохимии АН Литовской ССР, Вильнюс

Согласно современным представлениям, действие стероидных гормонов опосредуется цитозольными рецепторами, которые в комплексе с гормоном акцентируются ядерными структурами клеток. Перед транслокацией в ядро комплекс должен проходить стадию конформационных изменений, совокупность которых называется активацией [19]. Показано, что в бесклеточной системе активация рецепторов происходит посредством повышения температуры или ионной силы среды при участии цитозольных низкомолекулярных компонентов [5, 16]. Специфическое взаимодействие комплексов с ядерным материалом клетки инициирует последующие биохимические процессы, которые реализуют ответ клетки на гормон. Изменения содержания рецепторов или их сродства к ядерному материалу могут в известной степени определять проявление гормонального эффекта.

Метаболические процессы целостного организма, контролируемые глюкокортикоидными гормонами, варьируют в зависимости от разных физиологических факторов. Естественно предположить, что при различных патофизио-

логических состояниях организма могут произойти изменения физико-химических свойств рецепторов. Исходя из этих соображений, в настоящей работе сделана попытка охарактеризовать сходство и различия взаимодействия глюкокортикоидов с их рецепторами при формировании и росте карциносаркомы Уокера.

Методика

Исследования проводили на крысах-самцах Вистар. После деканитации животных печень для отмывания от крови интенсивно перфузировали *in situ* холодным 20 мМ трис-НСl-буфером рН 7,5, содержащим 20 мМ NaCl, 2 мМ дитиотрейтол, 1,5 мМ ЭДТА и 10 % глицерин. Далее все этапы выделения цитозоля проводили при 4 °С. Печень измельчали в стеклянном гомогенизаторе с тefлоновым пестиком при соотношении массы ткани и объема буфера 1:1. Гомогенат центрифугировали 1 ч при 105 000 g. После удаления липопротендиного слоя надосадочную жидкость использовали в качестве цитозоля. В качестве гормона применяли меченый синтетический глюкокортикоид 1,2(n)-³H-дексаметазон с удельной радиоактивностью 38 Ки/ммоль («Amersham», Англия).

Для определения специфического связывания гормона цитозоль инкубировали с ³H-дексаметазоном в присутствии или в от-

сутствие 1000-кратного количества холодного дексаметазона в течение 2 ч при 4 °С. Связанный ³H-дексаметазон разделяли твердофазной адсорбцией на угле («Serva», ФРГ), покрытом декстраном («Loba-Chemie», Австрия). Для этого в пробы цитозоля вносили по 0,1 мл 2,5 % охлажденной суспензии активированного угля в 0,25 % растворе декстрана. Пробы интенсивно встряхивали и уголь удаляли центрифугированием при 5000 g в течение 3 мин. Аликвоты надосадочной жидкости по 0,2 мл вносили в сцинтилляционные флаконы, содержащие по 10 мл сцинтилляционной жидкости. Для определения равновесной константы ассоциации ($K_{асс}$) и концентрации связывающих мест (n) к пробам цитозоля наряду с немеченым дексаметазоном добавляли возрастающие количества ³H-дексаметазона (0,025—5 нг). Расчет констант ассоциации и концентрации специфически связывающих мест производили в координатах Скэтчарда [17].

При определении связывания свободных и занятых эндогенным стероидом связывающих мест рецепторов цитозоль инкубировали с меченым гормоном соответственно 0,5 и 20 ч при 4 °С в присутствии или в отсутствие 1000-кратной концентрации немеченого дексаметазона [9].

Для изучения специфичности сродства рецепторов клеток печени крыс цитозоль инкубировали 2 ч с $5,3 \cdot 10^{-8}$ М ³H-дексаметазона в присутствии одного из немеченых гормональных препаратов: дексаметазона, кортикостерона, дезоксикортикостерона или прогестерона ($2,65$, $5,3$ и $26,5 \cdot 10^{-5}$ М). Относительное сродство белка к гормонам выражали в процентах, принимали за 100 % конкуренцию 5000-кратного избытка немеченого дексаметазона.

Для хроматографии цитозольных рецепторов на колонку с гидроксиланатитом, уравновешенную 20 мМ трис-НСl-буфером pH 7,5, содержащим 20 мМ NaCl, 2 мМ дитиотреитол, 1,5 мМ ЭДТА, 2 мМ фосфат калия, наносили аликвоты ³H-дексаметазон-рецепторного комплекса, обработанные суспензией угля-декстрана. Элюцию проводили с помощью линейного градиента концентрации фосфата калия (0,002—0,35 М) в том же буфере.

Активацию гормон-рецепторных комплексов проводили при 25 °С в течение 30 мин. Активированные и неактивированные формы комплексов разделяли с помощью хроматографии на колонке с ДНК-агарозой или методом осаждения неактивированных рецепторов протамина сульфатом [8].

При анализе скорости диссоциации ³H-дексаметазон-рецепторных комплексов аликвоты цитозоля инкубировали с 1000-кратным избытком немеченого дексаметазона при 25 °С. После охлаждения проб в течение 5 мин при 4 °С содержание рецепторных комплексов определяли методом твердофазной адсорбции. Для определения температурно-зависимой инактивации аликвоты цитозоля инкубировали определенные промежутки времени при 25 °С в присутствии или в отсутствие 10 мМ Na₂MoO₄, после чего проводили (2 ч) инкубацию проб с меченым ³H-дексаметазоном.

Для определения содержания кортикостерона свободного и связанного с транскортином плазму крови крыс фракционировали на сефадексе G-50. 1 мл плазмы крови наносили

на колонку (35×1,4 см) с сефадексом, уравновешенную 0,05 М натрийфосфатным буфером pH 7,5, содержащим 0,1 М NaCl. Фракции элюатов, содержащих соответственно связанный с транскортином или свободный кортикостерон, экстрагировали двукратно 10 мл метилхлорида. Метилхлорид выпаривали под вакуумом при температуре 30 °С. Содержание кортикостерона определяли с помощью сатурационного анализа. В качестве связывающего компонента в системе использовали транскортин плазмы крови крыс.

ДНК-агарозу готовили, согласно методу, приведенному ранее [18]. Для приготовления геля использовали препарат ДНК из тимуса телят («Sigma», США). Гранулированный гидроксиланатит готовили по методу, рассмотренному в работе [11], белок определяли, как описано ранее [7].

Радиоактивность образцов измеряли жидкостно-сцинтилляционным методом на счетчике SL-30 («Intertechnique», Франция) в диоксановом сцинтилляторе.

Результаты исследований

Как следует из рис. 1, на 4-й день роста опухоли общее содержание рецепторов в цитозоле клеток печени крыс снижалось. В последующем периоде роста опухоли уровень рецепторов сохранялся неизменным. Концентрация незанятых стероидом рецепторов на протяжении роста опухоли уменьшалась незначительно. Это свидетельствует об увеличении связывания гормона или перераспределении между рецептором и лигандом в цитозоле печени крыс. Снижение незанятых рецепторов было более выраженным на 14-й день роста опухоли. При нагрузке рецептором меньшими концентрациями меченого гормона профиль изменений общей концентрации и содержания незанятых рецепторов в основном не изменялся.

При изучении влияния изменений функциональной активности коры над-

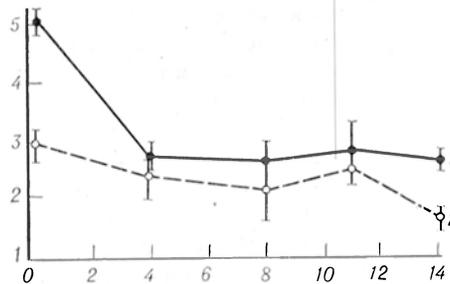


Рис. 1. Изменение общего содержания ³H-дексаметазон-рецепторных комплексов (1) и концентрации свободных рецепторов (2) в цитозоле печени крыс.

По оси абсцисс — дни после перевивки опухоли; по оси ординат — содержание ³H-дексаметазон-рецепторных комплексов (10⁻¹³ моль на 1 мг белка).

Таблица 1

Параметры связывания ^3H -дексаметазона (Д) рецепторами цитозоля печени здоровых животных и крыс-опухоленосителей

| Печень крыс | $K_{acc} \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ | Д · 10^{13} моль на 1 мг белка | Содержание белка, мг/мл |
|---------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Норма | $1,23 \pm 0,17$ | $5,59 \pm 0,20$ | $34,5 \pm 1,4$ |
| Опухоль (14-й день роста) | $0,46 \pm 0,09$ | $3,47 \pm 0,27$ | $37,3 \pm 4,3$ |
| <i>P</i> | $>0,01$ | $>0,001$ | $<0,05$ |

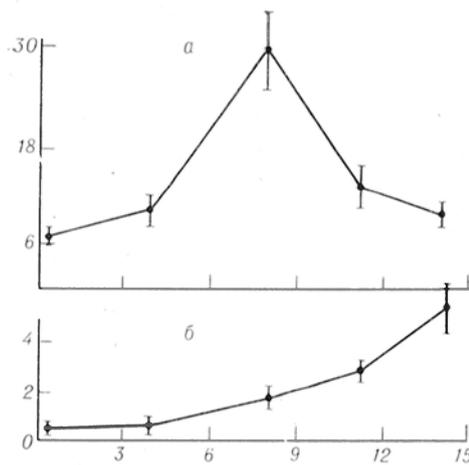


Рис. 2. Изменение концентрации связанного с транскортином (а) и свободного (б) кортикостерона в плазме крови крыс.

По оси абсцисс — дни после перевивки опухоли; по оси ординат — концентрация кортикостерона в плазме крови крыс (в мкг%).

почечников на степень насыщения рецепторов эндогенными кортикостероидами выявлено, что на 8-й день роста карциносаркомы Уокера концентрация связанного с транскортином кортикостерона в 4 раза превышала уровень, характерный для здоровых крыс (рис. 2). На 14-й день роста опухоли этот показатель снижается до исходного уровня. По мере роста опухоли концентрация свободного кортикостерона значительно повышалась. Есть основания предположить, что повышение концент-

рации эндогенных кортикостероидов, не связанных с белком, может быть предварительным условием изменения связывающих параметров цитозольных рецепторов при росте карциносаркомы Уокера.

Данные, представленные на рис. 3, свидетельствуют о том, что специфическое взаимодействие ^3H -дексаметазона с рецептором цитозоля клеток печени интактных крыс характеризуется кривыми с насыщением. Скэтчардовский анализ кривых показывает, что K_{acc} гормон-рецепторного взаимодействия и концентрация связывающих мест для дексаметазона в цитозоле печени интактных крыс составляют соответственно $1,23 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ и $5,6 \cdot 10^{-13}$ моль на 1 мг белка. Связывающая емкость рецепторов цитозоля печени на 14-й день роста опухоли снижается в среднем на 40 %, тогда как средство белка к гор-

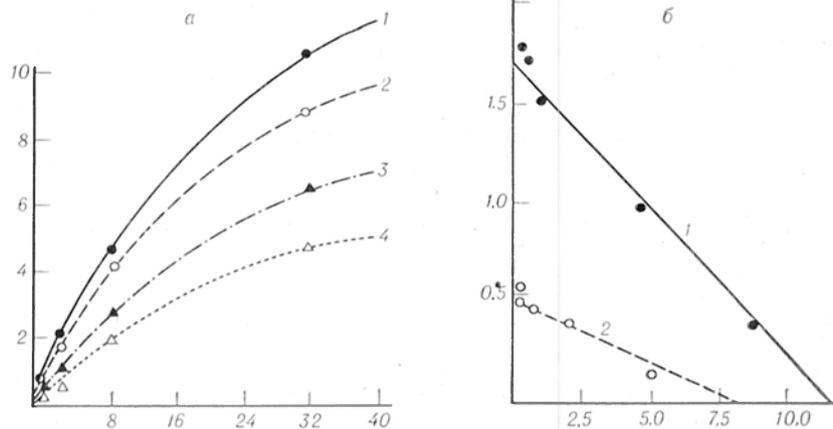


Рис. 3. Связывание ^3H -дексаметазона с рецепторами в цитозоле печени здоровых животных (1, 2) и крыс-опухоленосителей (3, 4) на 15-й день после роста опухоли.

а — зависимость связывания ^3H -дексаметазона цитозольными рецепторами от концентрации гормона. 1, 3 — общее связывание; 2, 4 — специфическое связывание. По оси абсцисс — свободный ^3H -дексаметазон; по оси ординат — связанный ^3H -дексаметазон, нМ. б — скэтчардовские графики связывания ^3H -дексаметазона рецепторами цитозоля печени здоровых животных (1) и крыс-опухоленосителей (2). По оси абсцисс — связанный ^3H -дексаметазон (в нМ); по оси ординат — отношение связанного ^3H -дексаметазона к свободному, нМ.

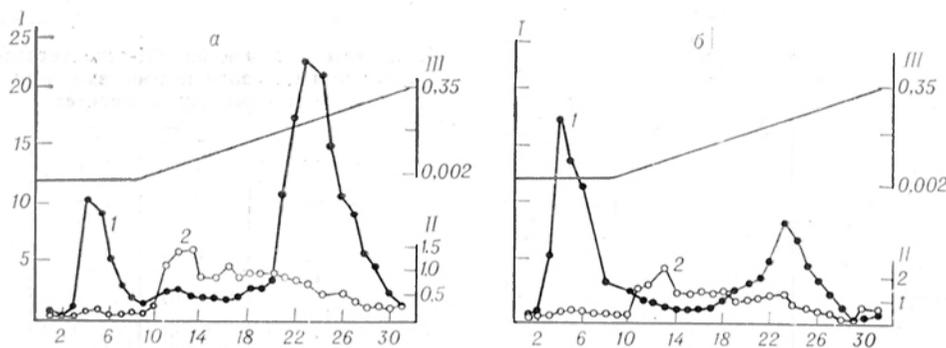


Рис. 4. Профили элюции ^3H -дексаметазон-рецепторных комплексов в цитозоле здоровых животных (а) и крыс-опухоленосителей (б) при хроматографии на гидроксиллапатите.

Колонки — $1,4 \times 10$ см, линейный градиент $0,002$ – $0,35$ М калий-фосфатного буфера рН 7,5. I — радиоактивность; 2 — белок. По оси абсцисс — номера фракций; по оси ординат: I — ^3H -дексаметазон $\cdot 10^{-13}$ [в имп(мин \cdot мл)]; II — белок (в мг/мл); III — K_2HPO_4 (в М).

мону практически не изменяется (табл. 1). Сходные результаты ранее были получены другими авторами при изучении рецепторов в цитозоле гепатом Зайдела и Новикова [1, 6, 10].

При хроматографии ^3H -дексаметазон-рецепторных комплексов на колонках с гидроксиллапатитом получали 2 пика связывания гормона (рис. 4). Первый из них элюируется при $0,002$ М, второй — при $0,15$ М калий-фосфатном буфере. Кривые элюции белков не соответствуют профилю распределения радиоактивности. Условия элюции рецепторов цитозоля крыс-опухоленосителей свидетельствуют о том, что в качественном отношении эти рецепторы, по-видимому, идентичны таковым здоровых крыс. Снижение радиоактивности во втором пике (на 66 %) соответствует данным, представленным на рис. 1.

Изучение гормональной специфичности средства стероидных гормонов показало, что по конкурентной способно-

сти, при вытеснении ^3H -дексаметазона комплексов в цитозоле здоровых крыс и крыс-опухоленосителей немеченые стероиды распределяются в следующей убывающей последовательности: дексаметазон, кортикостерон, прогестерон, дезоксикортикостерон (рис. 5). Гормональная специфичность средства рецепторов печени крыс-опухоленосителей отличается от таковой здоровых животных. Показано, что из ^3H -дексаметазон-рецепторных комплексов крыс-опухоленосителей немеченые стероиды вытесняют ^3H -дексаметазон примерно на 20 % меньше, чем из комплексов цитозоля печени животных.

На рис. 6 представлены данные о диссоциации ^3H -дексаметазон-рецепторных комплексов в присутствии 1000-кратного избытка немеченого кортикостерона в цитозоле печени интактных животных и крыс с опухолью при 25°C . Динамика диссоциации комплексов цитозоля здоровых крыс заметно отличается от таковой крыс-опухолено-

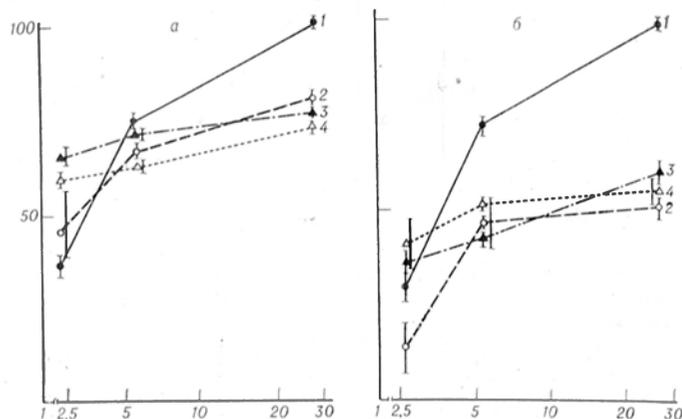


Рис. 5. Конкурентная способность немеченых гормонов при связывании с рецепторами цитозоля печени здоровых животных (а) и крыс-опухоленосителей (б).

По оси абсцисс — концентрация (в $\text{M} \cdot 10^{-5}$) немеченых гормонов в системе; по оси ординат — вытеснение ^3H -дексаметазона (в %). 1 — дексаметазон; 2 — кортикостерон; 3 — прогестерон; 4 — дезоксикортикостерон.

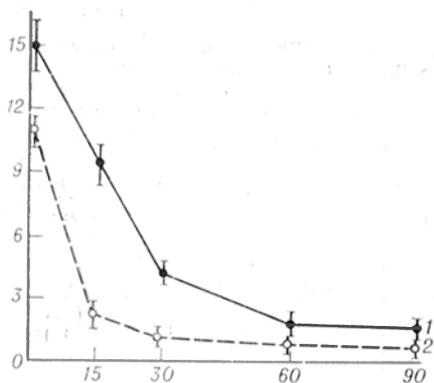


Рис. 6. Диссоциация ^3H -дексаметазон-рецепторных комплексов в присутствии немеченого дексаметазона в цитозоле здоровых животных (1) и крыс-опухоленосителей (2).

По оси абсцисс — время инкубации (в мин); по оси ординат — радиоактивность связанного ^3H -дексаметазона (10^{-13} имп на 0,1 мл в 1 мин).

сителей. В течение 15 мин в цитозоле печени здоровых животных и крыс-опухоленосителей диссоциирует соответственно 62 и 24 % комплексов. Более интенсивная диссоциация комплексов цитозоля животных-опухоленосителей отмечена на остальных отрезках времени. Преобразование данных (см. рис. 6) в координатах $\ln t$ позволило оценить константу скорости диссоциации для комплексов цитозоля здоровых животных и крыс-опухоленосителей. Эта величина была равна соответственно 0,042 и 0,084 мин^{-1} .

Известно, что транслокация гормон-рецепторных комплексов в ядро тесно связана с процессом активации комплексов. При сравнительном изучении температурно-зависимой активации ^3H -дексаметазон-рецепторных комплексов из цитозоля печени интактных крыс установлено, что около 60 % комплексов активируются, т. е. переходят в форму, взаимодействующую с

ДНК, тогда как комплексы из цитозоля крыс-опухоленосителей активируются на 20 % (табл. 2).

Известно, что рецепторы глюкокортикоидных гормонов характеризуются высокой лабильностью в отсутствие лиганда. На рис. 7 представлены кинетические данные о скорости термоинактивации рецепторов печени здоровых животных и крыс-опухоленосителей. В течение 30 мин при 25 °С 95 % рецепторов инактивируются в условиях низкой ионной силы. Аналогичный характер инактивации наблюдался и в случае инкубации в присутствии 0,15 М хлористого калия.

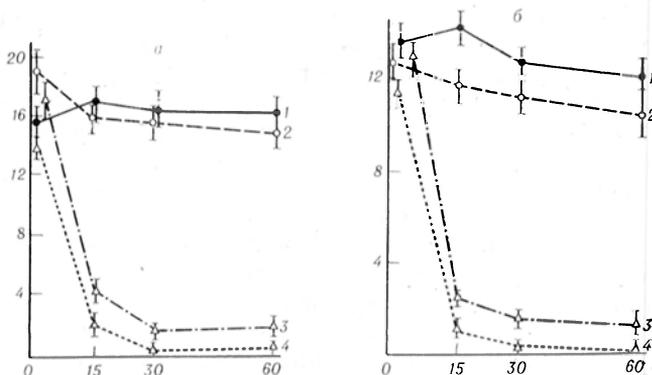
Преобразование данных рис. 7 в координатах $\ln t$ позволило определить время полураспада рецепторов печени здоровых крыс и крыс-опухоленосителей. Эта величина была равна соответственно 6,82 и 6,42 мин. Внесение в инкубационную среду 10 мМ Na_2MoO_4 препятствует инактивации рецепторов как в условиях низкой ионной силы, так и в присутствии 0,15 М хлористого калия. Исходя из кинетических данных и результатов изучения термостабильности рецепторов, можно предположить, что конформационная организация рецепторов в двух источниках цитозоля в основном примерно одинаковая.

Обсуждение результатов

При анализе результатов в координатах Скэтчерда выявлено, что концентрация связывающих мест рецепторов цитозоля печени крыс-опухоленосителей на 40 % ниже уровня рецепторов здоровых животных. Это, по-видимому, отражает снижение биосинтеза рецепторов или ускорение их транслокации в ядерные структуры печени. Содержание

Рис. 7. Инактивация цитозольных рецепторов в отсутствие лиганда клеток печени здоровых животных (а) и крыс-опухоленосителей (б) при 25 °С.

По оси абсцисс — время инкубации (в мин); по оси ординат — радиоактивность связанного ^3H -дексаметазона (10^{-3} имп на 0,1 мл в 1 мин). 1 — связывание ^3H -дексаметазона в присутствии 0,15 М KCl и 10 мМ Na_2MoO_4 ; 2 — то же в присутствии 10 мМ Na_2MoO_4 ; 3 — связывание ^3H -дексаметазона в условиях низкой ионной силы; 4 — то же в присутствии 0,15 М KCl .



Активация ^3H -дексаметазон-рецепторных комплексов в цитозоле печени здоровых животных и крыс-опухоленосителей (на 14-й день роста карциносаркомы Уокера; $M \pm m$)

| Метод определения активированных комплексов | Содержание ^3H -дексаметазон-рецепторных комплексов в цитозоле печени | | | |
|---|--|--|-----------------------|--|
| | здоровые крысы | | крысы-опухоленосители | |
| | всего, нмп/(мин·мл) | в том числе активированных, нмп/(мин·мл) | всего, нмп/(мин·мл) | в том числе активированных, нмп/(мин·мл) |
| Связание с ДНК-агарозой | 67 214 \pm 8 694 | 37 485 \pm 4 471 (56) | 66 674 \pm 6 045 | 13 702 \pm 2 563 (21) |
| <i>P</i> | | | <0,05 | >0,01 |
| Осаждение протамина сульфатом | 133 740 \pm 4 776 | 63 926 \pm 2 350 (48) | 122 416 \pm 3 992 | 19 958 \pm 2 187 (16) |
| <i>P</i> | | | <0,05 | >0,001 |

Примечание. Проведено 4 параллельных опыта при хроматографии ^3H -дексаметазон-рецепторных комплексов на ДНК-агарозе и 6 определений при осаждении протамин сульфатом.

незанятых стероидом рецепторов в цитозоле печени крыс-опухоленосителей на 8-й день роста опухоли значительно снижается. Хотя изменение содержания свободных связывающих мест происходит параллельно с общей концентрацией рецепторов, однако отношение свободных рецепторов к абсолютному их содержанию значительно повышается. Этот факт свидетельствует в известной степени о различии во взаимодействии глюкокортикоидов с рецепторными молекулами печени в случае интенсивного роста опухоли. Известно, что снижение глюкокортикоидов в плазме крови (при адреналэктомии) последовательно вызывает снижение насыщения рецепторов гормоном из эндогенного пула, что предотвращает транслокацию комплексов в ядро. В результате этого *in vitro* регистрируется нарастание содержания свободных связывающих мест для гормона в цитозольных фракциях. Поэтому можно предполагать, что перераспределение соотношения свободных и занятых стероидом рецепторов варьирует в зависимости от функциональной активности коры надпочечников и равновесия системы транскортин — кортикостерон [14, 15]. В этом, на наш взгляд, проявляется переклочение внеклеточных и внутриклеточных механизмов гуморальной регуляции в тканях, находящихся в сфере гормонального контроля. Такой принцип регуляции взаимодействия глюкокортикоидов с рецепторами на субклеточном уровне вполне приемлем в тех случаях, когда организм находится в физиологическом состоянии. Вышеиз-

ложенные изменения гормонального баланса следовало бы отнести к авторегуляторным механизмам, обеспечивающим адаптационные реакции при экстремальном состоянии организма, каким является опухолевый рост. При злокачественном росте взаимодействия глюкокортикоидов, по-видимому, более сложны. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что опухолевый рост сопровождается гиперпродукцией глюкокортикоидов, свободных от связи с транскортином. Следовало ожидать, что увеличение содержания кортикостерона в кровяном русле будет способствовать нарастанию фракции занятых стероидом рецепторов за счет снижения доли свободных форм рецепторов. Однако полученные данные свидетельствуют об увеличении соотношения свободных рецепторов к их общему содержанию. Механизм, сохраняющий равновесие между свободными и занятыми стероидом рецепторами, по-видимому, подавлен или извращен. Следует иметь в виду, что уменьшение общего содержания гормон-рецепторных комплексов, наблюдаемое в процессе интенсивного роста опухоли, отчасти может быть сопряжено с более интенсивной транслокацией активированных комплексов в ядерные фракции в условиях гиперпродукции свободных форм кортикостероидов в кровяном русле. Однако это предположение, по-видимому, следует исключить на основании полученных данных о подавлении процесса активации цитозольных гормон-рецепторных комплексов по мере роста опухоли.

При сопоставлении хроматографических свойств ^3H -дексаметазон-рецепторных комплексов клеток печени здоровых животных и крыс с карциносаркомой Уокера можно видеть, что радиоактивность из колонки с гидроксиплатитом элюируется в двух зонах концентрации калий-фосфатного буфера (0,002—0,15 М). Условия десорбции рецепторов в обоих хроматографических экспериментах в основном не различаются. Это хроматографическое свойство белка, по-видимому, отражает идентичность рецепторов печени здоровых животных и крыс с карциносаркомой Уокера.

Активация гормон-рецепторных комплексов является основным звеном в процессе транслокации гормона в ядрах. По современным представлениям акцепция гормон-рецепторных комплексов осуществляется посредством конформационной перестройки рецепторной молекулы вследствие перемещения положительных зарядов к поверхности белковой молекулы [13]. В нашей работе с помощью двух методов показано, что после температурно-зависимой активации ^3H -дексаметазон-рецепторных комплексов цитозоля здоровых крыс активированная часть комплексов составляет около 50 % от общего содержания, т. е. устанавливается равновесное соотношение между активированной и неактивированной формами рецепторов. Такое равновесие не удается сдвинуть в сторону активированных комплексов путем продолжения экспозиции при 25 °С. Аналогичный феномен был описан ранее [3]. Механизм, сохраняющий равновесие двух форм гормон-рецепторных комплексов в бесклеточной системе, неясен. Неизвестен и принцип активации гормон-рецепторных комплексов на субклеточном уровне целостного организма. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что в цитозоле печени крыс с карциносаркомой Уокера активация гормон-рецепторных комплексов нарушена или принцип ее регуляции качественно изменен по сравнению с нормальной. Некоторые авторы указывают на то, что в цитозоле печени присутствует низкомолекулярный ингибитор, ответственный за активацию гормон-рецепторных комплексов [4, 12]. Можно думать, что растущая в организме опухоль может влиять на ингибитор активации гормон-рецепторных комплексов.

Полученные нами результаты наряду с литературными данными позволяют предположить, что подавление активации комплексов может стать следствием последующих нарушений гормональной регуляции в транскрипции ДНК и биосинтезе индивидуальных белков.

Таким образом, результаты кинетических экспериментов и сравнительного исследования хроматографических свойств рецепторов указывают на изменение содержания рецепторов в количественном отношении в печени животного-опухоленосителя по сравнению с нормальными клетками печени. Однако совокупность отмеченных изменений (специфичность средства рецепторов к ряду гормонов, скорость инактивации, трансформации рецепторов в ДНК-акцептируемую форму при температурном воздействии) может рассматриваться как расстройство гормональной регуляции на субклеточном уровне в отдаленных органах хозяина. Такое положение биохимических явлений, по-видимому, можно трактовать как проявление системного действия растущей опухоли на организм в целом [2].

ЛИТЕРАТУРА

1. Димитриева Л. В., Волчек А. Г., Розен В. Б. и др. // Биохимия. — 1976. — Т. 41. — С. 1850—1858.
2. Шанот В. С. // Пат. физиол. — 1974. — № 3. — С. 3—12.
3. Atger M., Milgrom E. // J. biol. Chem. — 1976. — Vol. 251. — P. 4758—4762.
4. Bailly A., Sallas N., Milgrom E. // Ibid. — 1977. — Vol. 252. — P. 858—863.
5. Cake M. H. et al. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1976. — Vol. 71. — P. 45—52.
6. Defer N. et al. // FEBS Lett. — 1974. — Vol. 45. — P. 179—183.
7. Hartree E. F. // Ibid. — 1972. — Vol. 48. — P. 422—427.
8. Kalimi M. // Analyt. Biochem. — 1978. — Vol. 86. — P. 166—174.
9. Katzenellenbogen J., Johnson H. J. Jr., Carlson K. // Biochemistry (Wash.). — 1973. — Vol. 12. — P. 4092—4099.
10. Liu S. H., McNamara D. J., Webb T. E. // Biochem. J. — 1978. — Vol. 152. — P. 689—695.
11. Mazin A. I., Sulimova G. E., Vanyushin B. F. // Analyt. Biochem. — 1974. — Vol. 61. — P. 62—71.
12. Milgrom E. // Biochemical Action of Hormones. / Ed. G. Litwack. — New York, 1981. — Vol. 8. — P. 465—492.
13. Milgrom E. // Steroid Hormone Receptors: Structure and Function. / Eds. H. Eriksson, J.-A. Gustafsson. — Amsterdam, 1983. — P. 195—200.
14. Omrani G. R., Rosner W., Loeb J. N. // J. Steroid Biochem. — 1980. — Vol. 13. — P. 719—722.

15. Rosner W., Polimeni S. // Steroids. — 1978. — Vol. 31. — P. 427—438.
16. Salo B. et al. // Endocrinology. — 1980. — Vol. 106. — P. 1142—1148.
17. Scatchard G. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1949. — Vol. 51. — P. 660—673.
18. Schaller H., Nusstein C., Bonhoeffer F. J. et al. // Europ. J. Biochem. — 1972. — Vol. 26. — P. 474—481.
19. Schmidl T. J., Litwack G. // Physiol. Rev. — 1982. — Vol. 62. — P. 1131—1192.

Поступила 13.06.85

ANALYSIS OF GLUCOCORTICOID/RECEPTOR INTERACTIONS IN RAT LIVER TISSUE DURING GROWTH OF WALKER CARCINOSARCOMA

K. J. Kraujelis, A. P. Desrius, A. P. Ulinskaite
Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Lithuanian SSR, Vil'nyus

Specific glucocorticoid hormone receptors with $K_{ass} = 1,23 \cdot 10^8 M^{-1}$ and the content of binding sites $5,59 \cdot 10^{-13}$ moles per mg of protein

were found in liver cytosol of intact rats. During growth of Walker carcinosarcoma concentration of binding sites decreased approximately by 40 %, whereas the affinity of receptors to the hormone did not mainly altered. At the same time, a considerable decrease was noticed in the content of free binding sites not bound with endogenous corticosteroids. After thermoactivation about 50 % of 3H -dexamethasone receptor complexes acquired the ability to bind DNA, while in the same experimental conditions only about 20 % of the complexes were activated in cytosol of tumor-bearing rats. With growing of the tumor thermal inactivation of the hormone-receptor complexes was not practically altered both in presence and in absence of molybdate ions. In a solution with low ion strength at 25° a half-life dissociation of 3H -dexamethasone-receptor complexes was equal to 0.042 and 0.084 min⁻¹, respectively, in cytosols of healthy and tumor-bearing rats.

УДК 616.61-002-053.2-085.272.4-036.8-07:616.155.1+616.61]-008.939.15-39-074

В. А. Жмуров, В. И. Крылов, А. Д. Петрушина

ВЛИЯНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ И МИСКЛЕРОНА НА ПРОЦЕССЫ ДЕСТАБИЛИЗАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН ПРИ НЕФРИТАХ У ДЕТЕЙ

Тюменский медицинский институт

В патогенезе нефритов у детей существенное значение придают процессам дестабилизации клеточных мембран, обусловленных воздействием на биомембраны эндогенных фосфолипаз, вовлечением мембранных липидов в процессы перекисления, влиянием факторов гипоксии [3, 6, 8].

Исходя из данных предпосылок, в настоящей работе проведены исследования влияния антиоксидантов (α -токоферола и унитиола), а также мисклерона (клофибрата) на физико-химические показатели состояния цитомембран эритроцитов и нефрона. Токоферол и унитиол обладают широким спектром воздействия на организм, в том числе антиоксидантным, антифосфолипазным и антигипоксантным [5], мисклерон способен стимулировать пероксисомообразование, повышать содержание в организме каталазы [12], не оказывая при этом отрицательного влияния на функцию печени и почек [18, 19].

Методика

Обследовано 115 детей в возрасте от 5 до 15 лет, больных хроническим гломерулонефритом (53 больных с гематурической формой

заболевания и 62 — с нефротической). Морфологическое исследование почечной ткани проведено у 26 больных (у 7 обнаружены минимальные изменения в гломерулах, у 8 — пролиферативные, у 7 — мембранопротрофирующие и у 4 — фибропластические).

α -Токоферол назначали в периоде обострения заболевания в дозе 3 мг/кг, унитиол — 5 мг/кг, мисклерон — 30 мг/кг. Продолжительность курсов лечения составляла 30 дней.

В группу сравнения вошли 48 больных хроническим гломерулонефритом, которые не получали в составе комплексной терапии α -токоферол, унитиол и мисклерон.

Материалом для исследования служили венозная и капиллярная кровь, моча. Венозную кровь брали из периферической вены в пробирку с антикоагулянтом (гепарином) в количестве 5 мл. Эритроциты дважды промывали 0,9 % раствором хлорида натрия. Для получения мембран часть эритроцитов гемолизировали равным объемом дистиллированной воды, липиды экстрагировали смесью хлороформа с метанолом (2:1). В липидах определяли содержание дисновых конъюгатов спектрофотометрически по поглощению в области 232 нм [10], малонового диальдегида — по реакции с тиобарбитуровой кислотой [11], шиффовых оснований — по интенсивности флуоресценции раствора липидов в хлороформе с максимумом возбуждения флуоресценции при 360 нм и максимумом испускания в области 440 нм [9]. Перед каждой серией измерений прибор калибровали по стандартному раствору сульфата хинина (1 мкг/мл в 0,1 н. серной кислоте). Кроме того, в ли-

липидном экстракте определяли содержание лизофосфатидилхолина и фосфолипидов методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на силикагеле [17], а также токоферолов [16].

В цельных (интактных) эритроцитах определяли активность фосфолипазы A_2 методом токсического гемолиза эритроцитов в присутствии лецитина и ионов кальция [2]. Для определения содержания восстановленного глутатисма в эритроцитах последние гемолизировали сапонинном [14].

В капиллярной крови устанавливали активность каталазы по Баху и Зубковой [1] (активность фермента выражали в миллимолях H_2O_2 , разрушенной при инкубации с 1 мл крови за 1 мин), а также пероксидазную активность [13]. Метод основан на фотометрической регистрации снижения концентрации индигокармина, который окисляется H_2O_2 в присутствии пероксидазы. Для анализа использовали капиллярную кровь, разведенную в 1000 раз. Пероксидазную активность крови вычисляли по формуле Веберта — Рихтерика и выражали в микромолях индигокармина, который окислялся в присутствии 1 мл крови за 1 мин.

Мочу собирали в утренние часы (за 3 ч), центрифугировали для удаления клосток мочевого осадка, липиды мочи экстрагировали из надосадочной жидкости смесью хлороформ — метанол (2:1). После разделения фаз нижний хлороформный слой фильтровали и выпаривали под вакуумом до сухого остатка. В липидном экстракте определяли содержание диеновых конъюгатов [10], малонового диальдегида [11], шиффовых оснований [9], а также содержание лизофосфатидилхолина и фосфолипидов методом ТСХ на силикагеле по цветной реакции с малахитовым зеленым [4]. Содержание других классов липидов в липидном экстракте не анализировали. Кроме того, в моче устанавливали активность ката-

лазы [1], а также активность фосфолипазы A_2 методом [14].

Материалы исследований обработаны методом вариационной статистики по Фишеру — Стьюденту.

Результаты и обсуждение

Результаты исследований показали, что применение в комплексной терапии гломерулонефрита токоферола, унитиола и мисклерона способствовало более быстрому купированию экстраренальных проявлений заболевания (интоксикации, нарушений функции сердечно-сосудистой системы, отеочного синдрома), а также мочевого синдрома по сравнению с таковыми у больных, не получавших указанных препаратов.

Сравнительная характеристика влияния анализируемых препаратов на показатели перекисления липидов, активность ферментов и уровень антиоксидантов у больных гломерулонефритом представлена в табл. 1 и 2.

Как следует из табл. 1, применение α -токоферола в комплексной терапии приводило к значительному уменьшению содержания продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в мембранах эритроцитов, снижению активности фосфолипазы A_2 и уровня лизофосфатидилхолина. Кроме того, как показали результаты исследований, после лечения α -токоферолом увеличилось

Таблица 1
Биохимические показатели крови у детей, больных гломерулонефритом, на фоне применения α -токоферола, унитиола и мисклерона ($\bar{X} \pm m$)

| Анализируемый показатель | Здоровые дети | Больные дети до лечения | Больные дети после лечения | | | Больные группы сравнения |
|---|-------------------|-------------------------|----------------------------|---------------------|--------------------|--------------------------|
| | | | α -токоферолом | унитиолом | мисклероном | |
| Диеновые конъюгаты, ммоль на 1 мг липидов мембран эритроцитов | 9,95 \pm 0,99 | 21,86 \pm 3,33 | 11,71 \pm 1,61* | 9,82 \pm 1,02*** | 10,01 \pm 1,39** | 17,42 \pm 2,33 |
| МДА, ммоль на 1 мг липидов мембран эритроцитов | 8,43 \pm 0,82 | 30,35 \pm 0,37 | 13,58 \pm 1,47* | 11,40 \pm 2,00* | 14,40 \pm 2,09 | 21,42 \pm 3,36 |
| Шиффовы основания, ед. на 1 мл мембран эритроцитов | 72,2 \pm 1,10 | 324,0 \pm 25,0 | 130,4 \pm 17,60** | 94,4 \pm 13,5** | 131,4 \pm 25,0 | 225,6 \pm 32,0 |
| Фосфолипазная активность эритроцитов, % гемолиза | 10,02 \pm 0,55 | 22,05 \pm 1,89 | 9,33 \pm 0,64** | 11,74 \pm 0,14*** | 13,26 \pm 2,49 | 14,55 \pm 0,32 |
| Лизофосфатидилхолин мембран эритроцитов, ммоль/л | 0,18 \pm 0,04 | 0,36 \pm 0,06 | 0,10 \pm 0,09*** | 0,22 \pm 0,04 | 0,24 \pm 0,06 | 0,28 \pm 0,04 |
| Каталаза, ммоль/мл/мин | 7,72 \pm 0,07 | 5,67 \pm 0,39 | — | 6,95 \pm 0,37* | 6,91 \pm 0,29* | 6,18 \pm 0,18 |
| Пероксидаза, мкмоль/мл/мин | 241,06 \pm 13,6 | 114,71 \pm 11,5 | — | 183,81 \pm 11,1** | — | 135,58 \pm 11,4 |
| Глутатион восстановленный, ммоль на 1 л эритроцитов | 4,58 \pm 0,20 | 2,32 \pm 0,23 | 4,02 \pm 0,31 | 6,06 \pm 0,33*** | — | 3,38 \pm 0,18 |

Примечание. Здесь и в табл. 2 одна звездочка — $P < 0,05$ по отношению к группе сравнения, две — $P < 0,01$, три — $P < 0,001$.

Биохимические показатели мочи у детей, больных гломерулонефритом, на фоне применения α -токоферола, унитиола и мисклерона ($\bar{X} \pm m$)

| Анализируемый показатель | Здоровые дети | Больные до лечения | Больные после лечения | | | Больные группы сравнения |
|--|------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|---------------------|--------------------------|
| | | | α -токоферолом | унитиолом | мисклероном | |
| Диеновые конъюгаты, мкмоль/сут | 3,21 \pm 0,20 | 14,11 \pm 1,34 | 7,49 \pm 1,29* | 4,47 \pm 0,72*** | 6,70 \pm 0,61* | 11,74 \pm 1,75 |
| Малоновый диальдегид, мкмоль/сут | 0,73 \pm 0,10 | 1,69 \pm 0,33 | 0,81 \pm 0,12* | 1,07 \pm 0,21 | 0,60 \pm 0,03*** | 1,44 \pm 0,29 |
| Шиффовы основания, сд/мл | 2,70 \pm 0,22 | 12,60 \pm 2,42 | 6,67 \pm 0,75** | 7,36 \pm 0,80* | 7,67 \pm 1,61 | 10,60 \pm 1,13 |
| Общие фосфолипиды, мкмоль/сут | 15,02 \pm 0,18 | 68,28 \pm 3,07 | 16,00 \pm 0,71*** | 31,53 \pm 1,44 | 17,87 \pm 1,28*** | 34,36 \pm 1,83 |
| Лизофосфатидилхолин, мкмоль/сут | Отсутствует | 10,00 \pm 0,59 | 1,66 \pm 0,43*** | 1,25 \pm 0,10*** | 1,38 \pm 0,52*** | 5,12 \pm 0,03 |
| Фосфолипаза A ₂ , мкмоль/мл/мин | 3,81 \pm 0,49 | 34,73 \pm 2,19 | 6,92 \pm 0,99* | 5,71 \pm 1,10** | 13,78 \pm 2,58 | 12,19 \pm 2,01 |
| Каталаза, мкмоль/мл/мин | 0,40 \pm 0,05 | 4,08 \pm 0,45 | — | 1,03 \pm 0,18*** | 1,31 \pm 0,14* | 1,97 \pm 0,25 |
| Диурез, мл/сут | 1355 \pm 2,5 | 840 \pm 1,2 | 1120 \pm 2,0 | 1250 \pm 1,7 | 1205 \pm 1,7 | 1050 \pm 4,6 |

его содержание в мембранах эритроцитов ($2,27 \pm 0,16$ мкмоль/л после лечения по сравнению с $1,62 \pm 0,09$ мкмоль/л у больных группы сравнения). Унитиол оказывал аналогичное влияние на процессы ПОЛ, но в большей мере уменьшал содержание диеновых конъюгатов и шиффовых оснований фосфолипидов, при этом у больных существенно возросла активность каталазы и пероксидазы, а также содержание восстановленного глутатиона. Применение мисклерона сопровождалось уменьшением содержания диеновых конъюгатов и шиффовых оснований, возрастанием активности каталазы; активность фосфолипазы A₂ и содержание лизофосфатидилхолина существенно не изменялись.

Положительный эффект указанных препаратов отмечен и при исследовании мочи (см. табл. 2). Так, применение витамина Е приводило к уменьшению экскреции с мочой продуктов ПОЛ, фосфолипидов и лизофосфатидилхолина, активности фосфолипазы A₂. Применение унитиола более существенно снижало экскрецию диеновых конъюгатов, но незначительно влияло на экскрецию МДА и общих фосфолипидов. Мисклерон оказывал выраженное влияние на уменьшение экскреции диеновых конъюгатов и МДА, лизофосфолипидов и общих фосфолипидов, в то время как активность фосфолипазы A₂ у больных существенно не изменялась.

Результаты исследований свидетельствуют о том, что α -токоферол, унитиол и мисклерон у больных гломерулонеф-

ритом оказывают ингибирующее влияние на процессы ПОЛ. Однако воздействие указанных препаратов на различные этапы перекисления липидов дифференцировано. Проведенные исследования позволяют считать унитиол наиболее эффективным антиоксидантом, оказывающим воздействие на метаболические процессы разрушения липоперекисей. Однако преимуществом токоферолов является активное влияние на метаболизм лизоформ фосфолипидов, о чем свидетельствует наиболее низкое содержание лизофосфатидилхолина в мембранах эритроцитов у больных, получавших токоферол. У препаратов, содержащих SH-группы, данный эффект выражен в меньшей степени.

Антиоксидантный и антифосфолипазный эффект токоферолов и унитиола проявляется и на уровне почечной ткани, а мисклерон в свою очередь нормализует экскрецию диеновых конъюгатов и значительно уменьшает содержание в моче МДА и шиффовых оснований. Общим свойством α -токоферола и мисклерона является купирование при их применении фосфолипидурии, что косвенно отражает мембраностабилизирующий эффект указанных препаратов на уровне почечной ткани. Необходимо отметить, что мисклерон повышает активность каталазы, влияя тем самым на метаболизм перекиси водорода, накопление которой установлено при гломерулонефритах [8]. Наряду с этим α -токоферол, унитиол и мисклерон уменьшают содержание в моче лизофосфатидилхолина. Подобный эффект мисклерона обусловлен, вероятно,

ускорением метаболизма лизофосфатидилхолина, поскольку препарат в отличие от унитиола и α -токоферола не оказывает существенного влияния на активность в моче эндогенных фосфолипидов.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о стабилизирующем влиянии α -токоферола, унитиола и мисклерона на клеточные мембраны, в том числе почечной ткани, при гломерулонефритах у детей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Асагиани В. С. Ферментные методы анализа. — М., 1969.
2. Брокерхоф Х., Дженсен Р. Липолитические ферменты: Пер. с англ. — М., 1978.
3. Вельтищев Ю. Е., Юрьева Э. А., Балаantina Е. К. и др. // Актуальные проблемы детской нефрологии. — М., 1978. — С. 13—24.
4. Гончар М. В., Монастырский В. А. // Лаб. дело. — 1982. — № 1. — С. 29—31.
5. Журавлев А. И. // Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. — М., 1982. — С. 3—36.
6. Кожевников Ю. Н., Крылов В. И., Жмуров В. А., Петрушина А. Д. // Лаб. дело. — 1981. — № 6. — С. 340—341.
7. Крылов В. И., Кондакова Л. Д. // Вопросы ветеринарной арахно-энтомологии. — Тюмень, 1978. — Вып. 13. — С. 68—98.
8. Крылов В. И., Жмуров В. А., Кожевников Ю. Н. и др. // Вопр. охр. мат. — 1981. — № 4. — С. 26—28.
9. Меерсон Ф. З., Каган Б. Е., Прилипко Л. Л. и др. // Бюл. экпер. биол. — 1979. — № 10. — С. 404—406.
10. Стальная И. Д. // Современные методы в биохимии. — М., 1977. — С. 63—64.
11. Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г. // Там же. — С. 66—68.
12. Панченко Л. Ф., Герасимов А. М., Антоненков В. Д. Роль пероксисом в патологии клетки. — М., 1981.
13. Попов Т., Нейковска Л. // Гиг. и сан. — 1971. — № 10. — С. 89—91.
14. Тигаева А. Т., Балаболкин И. И. // Лаб. дело. — 1971. — № 10. — С. 618—620.
15. Тужилин С. А., Салузня А. И. // Там же. — 1975. — № 6. — С. 334—336.
16. Спиричев В. Б., Матусин И. И., Бронштейн Л. М. Витамины Е. // Экспериментальная витаминология. — Л., 1979. — С. 18—57.
17. Шталь Э. Хроматография в тонких слоях: Пер. с нем. — М., 1965.
18. Faed E. M., Qicen E. G. // Brit. J. Pharmacol. — 1979. — Vol. 7. — P. 407—410.
19. Mordasini R., Muller A., Klose G., Nidellhoff G. // Münch. med. Wschr. — 1978. — Bd 120. — S. 525—528.

Поступила 15.06.85

EFFECT OF ANTIOXIDANTS AND MYSCLERONE ON DESTABILIZATION OF CELL MEMBRANES IN CHILDREN NEPHRITES

V. A. Zhmurov, V. I. Krylov, A. D. Petrushina
Medical School, Tyumen

Effects of α -tocopherol, uนิธิol and miscalerone on lipid peroxidation, activity of phospholipases and the state of a body antioxidant systems were studied in 115 patients with glomerulonephritis. Administration of these drugs caused a decrease in the content of peroxides in blood and urine, a decrease in activity of endogenous phospholipases, an increase in the content of antioxidants as well as in the activity of antioxidant enzymes. Different effects of the preparations on various steps of lipid peroxidation as well as on the activity of phospholipases and antioxidant enzymes were shown.

УДК 616.24-036.11-07:[616.153.1:577.152.34+616.154:577.175.85]-074

Р. А. Зарембский, Н. А. Беляков, Л. К. Шершнева, С. В. Оболенский

СОСТОЯНИЕ КАЛЛИКРЕИН-КИНИНОВОЙ СИСТЕМЫ КРОВИ ПРИ ОСТРЫХ ЛЕГОЧНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЯХ

Институт усовершенствования врачей, Ленинград

Кинины, обладающие широким спектром биологического действия, играют важную роль в патогенезе ряда патологических процессов, в том числе воспалений, интоксикаций, травм, последствий массивной кровопотери и др. Установлено, что в экстремальных ситуациях нарушение метаболизма в тканях ведет к активации калликреин-кининовой системы (ККС) с последующими расстройствами микроциркуляции в жизненно важных органах [4, 10]. Легкие участвуют в изменениях содержания компонентов ККС в крови [5], однако до настоящего времени не опреде-

лена роль легких в регуляции активности ККС крови в критических ситуациях, в частности при массивной кровопотере и остром их повреждении.

В задачу настоящей работы входило определение роли легких в регуляции ККС путем исследования компонентов кининовой системы крови до и после прохождения ее через легкие.

Методика

Изучение компонентов ККС крови, притекающей к легким и оттекающей от них, выполнено у 16 собак с моделью геморрагиче-

ского шока и у 12 больных людей с острой легочной патологией.

Животных под внутривенным гексеналовым наркозом фиксировали на операционном столе и через бедренные сосуды катетеризировали правый желудочек сердца (приток к легким) и аорту (отток от легких). После гепаринизации (300 ЕД/кг) собак измеряли исходные показатели, проводили артериальное кровопускание, снижая давление в аорте до 5,3–6,65 кПа. На этом уровне гипотензии животных наблюдали в течение 90–120 мин, после чего проводили реинфузию аутокрови в вену. Артериальную и венозную кровь брали в полиэтиленовые пробирки после катетеризации сосудов, через 10 и 90 мин после кровопотери и через 90 мин после реинфузии.

Клиническую группу составили 12 больных реаниматологического профиля с острыми легочными повреждениями, куда вошли 2 человека с синдромом «шокового легкого» и 10 человек с острой пневмонией, у которых в течение первых 7 сут заболевания было проведено 510 исследований компонентов ККС в артериальной и венозной крови. У всех больных наличие патологического процесса в легких было подтверждено клиническими и рентгенологическими данными. С лечебной целью использовали экстракорпоральный метод детоксикации и оксигенации крови (гемосорбция через активированные угли марки СКН), при этом проводили катетеризацию верхней полой вены и лучевой артерии. Больные получали антибактериальную и инфузионно-трансфузионную терапию, десенсибилизирующие и общеукрепляющие средства, физиотерапию.

Кровь брали с интервалом 1–3 сут одномоментно из артерии и вены в полиэтиленовые пробирки с охлажденным (38 г/л) цитратом натрия в соотношении 9:1 и центрифугировали 15 мин при 1500 г.

Активность калликрина и содержание калликининогена в плазме крови определяли специфическим хроматографическим методом [2, 7], принцип которого заключается в частичной очистке фермента на ДЭАЭ-сефалексе А-50 при pH 7,0 и ионной силе буфера 0,02 с последующим измерением эстеразной активности калликрина по скорости гидролиза эфирной связи в этиловом эфире N-бисоил-L-аргинина (БАЭЭ·НСI). Содержание кининогена устанавливали биологическим методом по сокращению изолированного рога матки крысы [6]. Активность карбоксипептидазы N (кинипазы I) определяли химическим методом, используя в качестве субстрата гиппурил-L-лизин (ГЛ) [6]. Антитринитическую активность (АТА) находили спектрофотометрическим методом [8].

Результаты исследований обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента (P), а также непараметрических критериев (q).

Результаты и обсуждение

При анализе экспериментального материала по реакции на кровопотерю были выделены 2 группы животных: устойчивые и неустойчивые. В 1-ю группу вошло 10 собак, у которых в течение 1,5–2 ч артериальное давление

было стабильным. У этих животных после реинфузии не пострадала газообменная функция легких, о чем свидетельствовала неизменность величин p_aO_2 и p_aCO_2 . Во 2-ю группу было включено 6 животных, которым в период гипотензии оказалось необходимым проводить дробные вливания крови. В посттрансфузионном периоде у них отмечали нарушения газообменной функции легких (p_aO_2 снижалось с 13,1 до 9,1 кПа). У животных этой группы выявляли более выраженные морфологические изменения в легких (интерстициальный альвеолярный отек, микротромбозы, кровоизлияния).

В период кровопотери динамика показателей ККС в оттекающей от легких и притекающей к ним крови у всех животных была одинаковой. В крови, оттекающей от легких, выявлено возрастание активности калликрина на 52–83% от начального уровня (2-я и 1-я группы животных соответственно) и снижение уровня калликининогена до 57–71%, падение кининазной активности (до 37–50%) и содержания кининогена (до 48–57%).

Анализ компонентов ККС крови выявил определенные различия между показателями животных 1-й и 2-й групп после восполнения кровопотери. У животных 1-й группы не было отмечено выраженных изменений компонентов ККС в оттекающей от легких и притекающей к ним крови (кроме калликрина, активность которого была выше в притекающей к легким крови; табл. 1). В то же время у животных 2-й группы после реинфузии активность калликрина была выше в оттекающей от легких крови (табл. 2).

Известно, что легкие страдают в наибольшей степени именно в тот период, когда повышается концентрация метаболитов и физиологически активных веществ, а в венозную систему поступают активированные клетки из периферических отделов сосудистого русла, где ранее в период гипотензии кровоток был прерван [3]. В зависимости от индивидуальной устойчивости животных после гемотрансфузии патологические изменения в легких наступают либо сразу (что было выявлено у животных 2-й группы), либо через определенный латентный период.

Рост активности калликрина, вероятно, связан с активированием калликининогена в результате воздействия

Таблица 1

Содержание компонентов ККС в притекающей и оттекающей от легких крови у собак, устойчивых к кровопотере ($M \pm m$; $n=10$)

| Показатель | Притекающая к легким кровь | | | Оттекающая от легких кровь | | |
|-----------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| | исходный уровень | кровопотеря 90 мин | 90 мин после реинфузии | исходный уровень | кровопотеря 90 мин | 90 мин после реинфузии |
| Калликреин, мкмоль БАЭЭ/(с·л) | 275,7 \pm 15,30 (100) | 646,48 \pm 40,40* (234) | 415,58 \pm 72,84 (150) | 284,85 \pm 18,20 (100) | 481,86 \pm 47,40* (170) | 164,50 \pm 58,63 (58) |
| Кининоген, мг/л | 4,38 \pm 0,32 (100) | 3,14 \pm 0,31* (71) | 1,97 \pm 0,40* (45) | 4,74 \pm 0,38 (100) | 2,27 \pm 0,35* (48) | 1,70 \pm 0,34* (35) |
| Калликреиноген, мкмоль БАЭЭ (с·л) | 1380,20 \pm 51,50 (100) | 720,40 \pm 35,70* (52) | 830,32 \pm 57,20* (60) | 1520,35 \pm 44,30 (100) | 870,56 \pm 33,80* (57) | 696,24 \pm 49,36* (45) |
| Кининаза, мкмоль ГЛ/(с·л) | 3,11 \pm 0,70 (100) | 1,67 \pm 0,22* (54) | 2,02 \pm 0,29 (65) | 3,74 \pm 0,51 (100) | 1,99 \pm 0,31* (53) | 2,42 \pm 0,44 (65) |
| АТА, ИЕ/л | 175,18 \pm 11,28 (100) | 121,33 \pm 9,94 (69) | 169,0 \pm 8,35* (96) | 166,08 \pm 9,63 (100) | 116,28 \pm 8,85* (70) | 146,35 \pm 8,38 (88) |

Примечание. Здесь и в табл. 2 в скобках — показатель (в %). Звездочкой отмечено $P < 0,05$.

соответствующих факторов активации (гипоксия, ацидоз, усиление агрегации тромбоцитов).

В крови, оттекающей от легких, активность калликреина у животных 1-й группы была ниже, чем в притекающей крови, что подтверждает участие легких в метаболизме кининов. У животных 2-й группы отмечены явления активации ККС после прохождения крови через легкие. Об этом свидетельствуют более высокая активность калликреина в оттекающей от легких крови — $606,07 \pm 75,71$ мкмоль/(с·л), $P < 0,05$ [в притекающей — $282,83 \pm 57,84$ мкмоль/(с·л)], снижение содержания калликреиногена до 71 %, а уровня кининогена до 50 %, падение кининазной активности.

У больных с острыми повреждениями легких обращала на себя внимание статистически достоверная, более высокая активность калликреина в оттекающей от легких крови: $562,77 \pm 77,58$ мкмоль/(с·л) ($q < 5$ %; табл. 3). Исключение составляли 12 из 40 исследований, при которых наблюдалась более высокая активность калликреина в притекающей к легким крови по сравнению с оттекающей от них кровью (соответственно 484,75 и 277,92 мкмоль/(с·л); $P < 0,05$). У 7 больных это явление наблюдалось в течение отдельных периодов, связанных с улучшением метаболической функции легких после проведения экстракорпоральной сорбции и оксигенации крови (у 2 больных — в самом начале заболевания, у 1 — в период благоприятного разрешения процесса).

Отмечены различия при исследовании калликреиногена в оттекающей от легких и притекающей к ним крови — соответственно 7020 ± 240 и 6610 ± 260 мкмоль/(с·л); $q < 1$ %. Другие компоненты (кининоген, кининазная и антитриптическая активность) статистически достоверно не различались в притекающей и оттекающей от легких крови ($P > 0,05$; $q > 10$ %).

Анализ динамики изменения компонентов ККС крови у больных в течение 5—7 дней наблюдения на фоне обострения процесса в легких показал, что активность калликреина в 7 случаях снижалась, в других — возрастала. Следует отметить, что этот показатель не коррелировал с тяжестью состояния больных и указанные изменения протекали на общем высоком уровне ак-

Таблица 2

Содержание компонентов ККС в притекающей и оттекающей от легких крови у собак с осложнениями после кровопотери и реинфузии ($M \pm m$; $n=6$)

| Показатель | Притекающая к легким кровь | | | Оттекающая от легких кровь | | |
|-----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| | исходный уровень | кровопотеря 90 мин | 90 мин после реинфузии | исходный уровень | кровопотеря 90 мин | 90 мин после реинфузии |
| Калликреин, мкмоль БАЭЭ/(с·л) | 383,84 $\pm 48,64$ (100) | 656,58 $\pm 61,43^*$ (171) | 282,83 $\pm 57,84$ (74) | 444,46 $\pm 69,39$ (100) | 676,78 $\pm 55,69^*$ (153) | 606,07 $\pm 75,71$ (136) |
| Кининоген, мг/л | 3,59 $\pm 0,51$ (100) | 1,71 $\pm 0,45^*$ (48) | 1,63 $\pm 0,48^*$ (45) | 3,62 $\pm 0,39$ (100) | 2,05 $\pm 0,32^*$ (57) | 1,80 $\pm 0,47^*$ (50) |
| Калликреиноген, мкмоль БАЭЭ/(с·л) | 1020,30 $\pm 86,64$ (100) | 850,43 $\pm 38,44$ (83) | 723,36 $\pm 67,84^*$ (70) | 1178,44 $\pm 88,56$ (100) | 848,62 $\pm 62,34^*$ (71) | 906,42 $\pm 92,31$ (77) |
| Кининаза, мкмоль ГЛ/(с·л) | 3,54 $\pm 0,49$ (100) | 0,74 $\pm 0,21^*$ (21) | 1,47 $\pm 0,42^*$ (42) | 4,38 $\pm 0,56$ (100) | 1,60 $\pm 0,33^*$ (37) | 2,09 $\pm 0,47^*$ (48) |
| АТА, ИЕ/л | 189,58 $\pm 20,90$ (100) | 83,42 $\pm 20,10^*$ (44) | 136,50 $\pm 18,57$ (72) | 193,38 $\pm 19,26$ (100) | 109,96 $\pm 21,51^*$ (57) | 155,46 $\pm 9,13$ (80) |

тивности фермента. В этой связи понятна закономерная динамика содержания калликреиногена, уровень которого в оттекающей от легких крови снижался ($q < 5\%$). Кининазная активность, АТА достоверно не изменялись, а содержание кининогена имело тенденцию к снижению ($1,49 \pm 0,13$ мг/л — отток, $1,37 \pm 0,14$ мг/л — приток).

Таким образом, опыты на собаках показали, что массивная кровопотеря вызывает повышение активности калликреина в обоих кругах кровообращения. Кровопотеря приводит к неадекватному снабжению тканей кислородом и накоплению недоокисленных продуктов обмена, что создает условия для сдвига рН крови в сторону ацидоза и вызывает обратимое торможение кини-

назы. В условиях ацидоза возрастает активность кининогеназ и подавляется кининазная активность, что создает условия для высокой активности ККС.

Ранее было показано, что активирование ККС при шоке представляет собой важное патогенетическое звено тканевой альтерации, при этом снижение уровня кининогена обусловлено активацией калликреина [10].

Следует отметить, что в клинических наблюдениях динамика изменений ККС крови при острых легочных повреждениях была идентична той, которая характерна для животных 2-й группы. При этом активация калликреина происходила после прохождения крови через легкие, о чем свидетельствует более высокая активность фермента в от-

Таблица 3

Компоненты ККС крови у больных с острой легочной патологией ($M \pm m$; $n=40$)

| Компонент ККС | Притекающая кровь | Оттекающая кровь |
|-----------------------------------|----------------------|----------------------|
| Калликреин, мкмоль БАЭЭ/(с·л) | 396,07 \pm 70,64 | 562,75 \pm 77,58* |
| Кининоген, мг/л | 1,37 \pm 0,14 | 1,49 \pm 0,13 |
| Калликреиноген, мкмоль БАЭЭ/(с·л) | 6610,24 \pm 260,44 | 7020,64 \pm 240,65 |
| Кининаза, мкмоль ГЛ/(с·л) | 2,01 \pm 0,12 | 1,98 \pm 0,13 |
| АТА, МЕ/л | 728,09 \pm 38,21 | 776,26 \pm 42,29 |

* $q < 5\%$.

текающей от легких крови. В литературе нет сведений об активации ККС в легких у больных с острым процессом, подтвержденных клиренсом отдельных компонентов между притекающей к легким и оттекающей от легких кровью. Вместе с тем такая возможность рассматривается с учетом активности кининов в венозной крови. У детей при острой деструкции легких установлено снижение содержания кининогена, калликреиногена, ингибитора калликреина в сочетании с повышением активности калликреина, что свидетельствует об усилении кининогенеза [1]. У больных с острой пневмонией выявлена значительная активация ККС крови, что выражалось в снижении уровня кининогена, калликреиногена, кининазой активности и увеличении активности калликреина [9]. Полагают, что активация ККС является одной из причин, приводящих к переходу острой пневмонии в хроническую.

Таким образом, представленные результаты свидетельствуют о непосредственном участии легких в регуляции ККС крови. Легкие способны снижать активность ККС при умеренных нарушениях в органе; при выраженной альтерации легкие становятся источником и (или) активатором кининовой системы. Увеличение активности калликреина в оттекающей от легких крови является диагностическим показателем нарушения легочного барьера по предотвращению генерализованного действия кининов в организме, а также критерием повреждения этого органа.

УДК 616.153.915-39+616.153:577.161.3]-02:613.863]-092.9

П. П. Голиков, Б. В. Давыдов, С. Б. Матвеев

МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И МОБИЛИЗАЦИИ ЭНДОГЕННОГО АНТИОКСИДАНТА α -ТОКОФЕРОЛА ПРИ СТРЕССЕ

Клинико-биохимическая лаборатория экстренных методов исследования НИИ скорой помощи им. Н. В. Склифосовского Минздрава РСФСР, Москва

Различные стрессовые воздействия на организм животных и человека сопровождаются активацией перекисного окисления липидов (ПОЛ) [1,7—9,17]. Механизм такой активации при стрессе связывают с усилением функциональной активности гипофизарно-надпочечниковой системы, что приводит к усиленному выбросу катехоламинов и

глюкокортикоидов в кровяное русло [3, 16]. Наиболее хорошо изучена роль катехоламинов в активации ПОЛ. Показано, что избыток адреналина вызывает увеличение содержания свободных радикалов в крови и сердце [12, 15, 18]. Роль глюкокортикоидов в процессах ПОЛ при стрессе изучена в меньшей степени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Головки В. И. // Грудная хир. — 1983. — № 1. — С. 42—45.
2. Доценко В. Л., Саяпин В. Н., Пешкова Е. А., Яровая Г. Я. // Бюл. экспер. биол. — 1982. — № 8. — С. 117—120.
3. Зеляк В. И., Чумаков В. Н. // Вопр. мед. химии. — 1982. — № 2. — С. 70—75.
4. Лазарева С. А. // Физиология и патология органов дыхания. — Харьков, 1978. — С. 13—15.
5. Панченко А. Л. Роль легких в регуляции калликреин-кининовой системы плазмы крови. Автореф. дис., канд. мед. наук. — Барнаул, 1980.
6. Пасхина Т. С., Гуликова О. М., Егорова Т. П. и др. // Современные методы в биохимии. — М., 1968. — Т. 2. — С. 205—260.
7. Пасхина Т. С., Крикская А. В. // Современные методы в биохимии. — М., 1977. — С. 157—163.
8. Пасхина Т. С., Нартикова В. Ф. // Там же. — С. 188—191.
9. Ползик Г. Б. // Вопросы патологической физиологии в эксперименте и в клинике. — Алма-Ата, 1984. — С. 193—198.
10. Küche H., Scheuch D. W. // Z. med. Labor. Diagn. — 1982. — Bd 18. — S. 75—84.

Поступила 15.06.85

STATE OF BLOOD KALLIKREIN-KININ SYSTEM IN ACUTE LUNG IMPAIRMENTS

R. A. Zaremsky, N. A. Belyakov, L. K. Shershteva, S. V. Obolensky

Role of lungs in regulation of blood kallikrein-kinin system was studied under conditions of massive hemorrhage in dogs as well as in heavy lung impairments of patients—acute pneumonia, shock of lungs. These stressory effects were shown to correlate with the rate of loss in lung regulating activity towards the blood kallikrein-kinin system.

Влияние стресс-факторов на содержание продуктов ПОЛ и ТФ в плазме крови интактных и адреналэктомированных крыс

| Группа животных | ТФ, мкг/мл·мг | ДК, ΔD_{233} /мл·мг | ШО, I _{фл.} усл. ед/мл·мг |
|-------------------------|------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| Интактные | | | |
| Контроль | 12,24±1,35 (12) | 1,52±0,15 (12) | 0,92±0,08 (12) |
| стресс (1 ч) | 12,68±1,13 (4) | 1,65±0,06 (4) | 0,89±0,10 (4) |
| » (3 ч) | 18,78±2,12 (12)* | 2,06±0,14 (12)* | 1,19±0,09 (12)* |
| » (24 ч) | 24,98±1,93 (4)* | 1,94±0,12 (4)* | 0,71±0,08 (4) |
| адреналин | 16,26±2,25 (4) | 2,24±0,27 (4)* | 0,78±0,17 (4) |
| гидрокортизон | 17,37±0,89 (11)* | 1,98±0,12 (11)* | 1,79±0,15 (11)* |
| адреналин+гидрокортизон | 24,41±2,95 (4)* | 2,30±0,24 (4)* | 0,98±0,11 (4) |
| Адреналэктомированные | | | |
| контроль | 9,28±1,34 (4) | 1,19±0,32 (4) | 1,64±0,08 (4) |
| стресс (3 ч) | 10,73±1,31 (5) | 1,29±0,18 (5) | 1,58±0,23 (5) |
| адреналин | 17,19±1,46 (7)** | 3,35±0,24 (7)** | 0,99±0,12 (7)** |
| гидрокортизон | 11,84±0,78 (4) | 1,32±0,10 (4) | 1,67±0,26 (4) |
| адреналин+гидрокортизон | 14,68±2,53 (4) | 2,73±0,21 (4)** | 0,78±0,18 (4)** |

Примечание. В скобках — число животных. Одна звездочка — достоверность различий по отношению к контрольной группе интактных животных, две — то же адреналэктомированных крыс ($P < 0,05$).

При различных видах стресса происходит активация антиоксидантной системы организма [10, 11]. Однако механизмы мобилизации эндогенных антиоксидантов изучены недостаточно. Целью настоящей работы явилось исследование механизмов активации ПОЛ и мобилизации эндогенного липидорастворимого антиоксиданта α -токоферола (ТФ) при стрессе.

Методика

В работе использовано 75 крыс-самцов Вистар массой 150—250 г. Животные были разделены на 10 групп: 1 — интактная группа; 2 — интактные + стресс (1, 3 и 24 ч); 3 — интактные + адреналин; 4 — интактные + гидрокортизон; 5 — интактные + адреналин + гидрокортизон; 6 — адреналэктомированные; 7 — адреналэктомия + стресс (3 часа); 8 — адреналэктомия + адреналин; 9 — адреналэктомия + гидрокортизон; 10 — адреналэктомия + адреналин + гидрокортизон. В опытах использовали иммобилизационную модель стресса по Селье. У адреналэктомированных крыс исследования проводили на 5-й день после операции. Препараты вводили за 2 ч до взятия крови внутривенно: адреналин («Calbiochem», США) в дозе 0,5 мг/кг, гидрокортизон («Richter», ВНР) в дозе 5 мг/кг. Обработку образцов крови проводили при температуре 0—4 °С. Содержание ТФ в плазме крови определяли флуоресцентным методом [14]. Спектры флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре «Aminco — Bowman» (США) при $\lambda_{возб.} = 295$ нм, $\lambda_{фл.} = 330$ нм. Концентрацию ТФ определяли по калибровочной кривой, построенной по ТФ («Calbiochem», США). В том же гексановом экстракте определяли Шиффовы основания (ШО) ($\lambda_{возб.} = 360$ нм, $\lambda_{фл.} = 460$ нм) и диспозитивные конъюга-

ты (ДК) спектрофотометрически при 233 нм [5, 13]. Результаты выражали: для ТФ — в микрограммах на 1 мл·мг, для ДК — в ΔD_{233} в расчете на 1 мл/мг, для ШО — в I_{фл.} в условных единицах на 1 мл/мг (где в 1 мл дан объем плазмы), мг — количество общих липидов в 1 мл гексанового экстракта, ΔD_{233} — изменение оптической плотности при 233 нм, I_{фл.} — интенсивность флуоресценции. Общие липиды определяли гравиметрически [6]. Результаты обрабатывали методом вариационной статистики.

Результаты и обсуждения

Увеличение продолжительности стрессового воздействия приводит к накоплению первичных ДК и вторичных ШО продуктов ПОЛ в плазме крови интактных животных (см. таблицу). Так, если 1-часовая иммобилизация существенно не изменяла уровень продуктов ПОЛ в плазме, то 3-часовая вызвала достоверное увеличение ДК и ШО (на 35 и 44 % соответственно). Уровень ДК в плазме при 24-часовой иммобилизации был сходным с таковым при 3-часовой иммобилизации, а содержание ШО существенно не отличалось от контроля (см. таблицу).

Введение адреналина интактным животным вызывало достоверное увеличение только уровня ДК (на 47 %), а введение гидрокортизона приводило к достоверному увеличению в плазме уровней как ДК (на 30 %), так и ШО (на 94 %). При совместном введении этих препаратов содержание ДК увеличива-

лось на 51 %, а ШО не отличалось от контроля (см. таблицу).

Таким образом, установлено, что у интактных животных адреналин и гидрокортизон стимулируют накопление в плазме крови ДК, тогда как увеличение содержания ШО происходит под влиянием только гидрокортизона.

Для уточнения обнаруженных различий в воздействиях адреналина и гидрокортизона на содержание первичных и вторичных продуктов ПОЛ в плазме крови интактных животных было исследовано влияние этих препаратов на продукты ПОЛ у адреналэктомированных животных. Оказалось, что в отличие от интактных крыс в условиях недостатка эндогенных индукторов стресс-реакция иммобилизация животных в течение 3 ч не приводила к накоплению ни ДК, ни ШО в плазме (см. таблицу). Введение адреналина адреналэктомированным животным вызывало 3-кратное увеличение в плазме ДК по сравнению с содержанием таковых у адреналэктомированных крыс, а введение гидрокортизона не влияло на уровень ДК в плазме (см. таблицу). Содержание ШО у адреналэктомированных животных при введении адреналина уменьшалось на 35 % и не изменялось при введении гидрокортизона. Совместное введение препаратов адреналэктомированным животным увеличивало содержание ДК в 2,3 раза и уменьшало уровень ШО в 2 раза.

Таким образом, у адреналэктомированных животных введение адреналина значительно увеличивает содержание ДК в плазме крови и снижает содержание ШО, а введение гидрокортизона не влияет на содержание как первичных, так и вторичных продуктов ПОЛ. При совместном введении препаратов гидрокортизон достоверно предупреждает накопление ДК в плазме крови по сравнению с введением одного адреналина адреналэктомированным животным (см. таблицу).

При изучении механизмов мобилизации эндогенного антиоксиданта ТФ при стрессе оказалось, что с увеличением продолжительности стрессового воздействия в плазме крови интактных животных происходит нарастание содержания ТФ. При этом после 24 ч иммобилизации его содержание превышало контрольное значение в 2 раза (см. таблицу). Введение животным как адреналина, так и гидрокортизона увеличива-

ет содержание ТФ в плазме (на 33 и 42 % соответственно). При совместном введении этих препаратов уровень ТФ в плазме повышается на 99 %, т. е. наблюдается аддитивный эффект этих препаратов на мобилизацию ТФ в плазму крови интактных животных.

При адреналэктомии 3-часовая иммобилизация существенно не изменяла содержание ТФ в плазме. Введение адреналина или гидрокортизона адреналэктомированным животным повышало содержание ТФ в плазме. Адреналин обладал более выраженным эффектом. Совместное введение препаратов увеличивало содержание ТФ в плазме, но аддитивного эффекта не наблюдалось (см. таблицу).

Таким образом, в условиях стресса у интактных животных происходит мобилизация эндогенного антиоксиданта ТФ в плазму крови, при этом чем сильнее стрессовое воздействие, тем значительнее мобилизация ТФ. У адреналэктомированных животных при стрессе не увеличивается содержание ТФ в плазме крови. У интактных животных адреналин и гидрокортизон в равной степени увеличивали содержание ТФ в плазме, а при совместном введении проявляли аддитивный эффект на мобилизацию ТФ. При адреналэктомии адреналин вызывает более выраженную мобилизацию ТФ, чем гидрокортизон, а аддитивный эффект препаратов отсутствует.

Из литературных данных известно, что стресс приводит к усилению ПОЛ [1,7—9]. Согласно полученным данным, накопление продуктов ПОЛ вначале идет параллельно продолжительности стрессового воздействия. Можно было ожидать, что увеличение продолжительности стресса приведет к еще большему усилению ПОЛ. Однако при 24-часовой иммобилизации уровень продуктов ПОЛ был таким же, как при 3-часовом воздействии. Следовательно, активация ПОЛ происходит на начальных этапах стресса и не сопровождается дальнейшим усилением ПОЛ, несмотря на продолжающееся стрессовое воздействие. Причины такого ограничения ПОЛ, возможно, связаны с характером секреции катехоламинов и глюкокортикоидов, с одной стороны, и активацией антиокислительной системы, с другой. Об участии катехоламинов и глюкокортикоидов в механизмах активации ПОЛ свидетельствуют наши дан-

ные о том, что в условиях адреналэктомии стрессовое воздействие не активирует ПОЛ. Согласно литературным данным, максимальное увеличение содержания катехоламинов в плазме крови при иммобилизационном стрессе наблюдается в первые 2 ч воздействия [4], а глюкокортикоидов — к 3—4-му часу [2]. Введение интактным животным адреналина или гидрокортизона через 2 ч привело к увеличению содержания продуктов ПОЛ. Следовательно, катехоламины и глюкокортикоиды могут принимать непосредственное участие в активации ПОЛ при стрессе у интактных животных. Можно было ожидать, что введение адреналина или гидрокортизона адреналэктомизированным животным также будет вызывать активацию ПОЛ. Из данных настоящей работы следует, что адреналин увеличивает содержание первичных продуктов ПОЛ, а гидрокортизон не влияет на их уровень. По-видимому, для реализации эффекта гидрокортизона на ПОЛ необходимо наличие катехоламинов.

Обращает на себя внимание тот факт, что адреналин увеличивает уровень первичных продуктов ПОЛ и снижает содержание вторичных. Этот эффект хорошо выражен у адреналэктомизированных животных. Кроме того, под влиянием адреналина происходит наиболее существенная мобилизация ТФ. Возможно, что снижение уровня ШО обусловлено антиоксидантными свойствами ТФ, уровень которого увеличивается под влиянием адреналина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бречко В. В. // Пат. физиол. — 1983. — № 5. — С. 56—59.
2. Голиков А. П., Голиков П. П. Сезонные биоритмы в физиологии и патологии. — М., 1973. — С. 63—81.
3. Горизонтов П. Д., Белоусова О. И., Федотова М. И. Стресс и система крови. — М., 1983. — С. 5—36.
4. Кветнацкий Р., Белова Т. И., Опршалова З. и др. // Физиол. журн. СССР. — 1981. — Т. 67, № 4. — С. 516—523.
5. Костюк В. А., Поганович А. И., Лунец Е. Ф. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 4. — С. 125—127.
6. Колб В. Г., Камышников В. С. Справочник по клинической химии. — Минск, 1982. — С. 201.
7. Куликов В. Ю., Луценко М. Т., Колесникова Л. И. и др. // Бюл. экспер. биол. — 1980. — № 12. — С. 681—682.
8. Меерсон Ф. Э. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. — М., 1984. — С. 53—59.
9. Мелконян М. М., Араратян Э. А., Микаэлян Э. М., Мхитарян В. Г. // Журн. экспер. и клин. мед. — 1978. — № 4. — С. 25—30.
10. Мелконян М. М., Мхитарян В. Г., Мелик-Агаева Е. А., Рухкян А. А. // Биол. журн. Армении. — 1983 № 7. — С. 582—587.
11. Микаэлян Э. М., Мелконян М. М., Алексанян К. А., Мхитарян В. Г. // Журн. экспер. и клин. мед. — 1981. — № 6. — С. 577—584.
12. Сайфутдинов Р. Г. // Бюл. экспер. биол. — 1982. — № 10. — С. 78—79.
13. Csallay A. S., Ayaz K. L. // Lipids. — 1976. — Vol. 11. — P. 412—417.
14. Duggan D. E. // Arch. Biochem. — 1959. — Vol. 84. — P. 116—122.
15. Noronha-Dutra A. A., Steen E. M., Woolf N. // Basic. Res. Cardiol. — 1985. — Vol. 80. — Suppl. — P. 133—136.
16. Rona G. // J. molec. cell Cardiol. — 1985. — Vol. 17. — P. 291—306.
17. Shoji K., Miyahara K., Miyake K. et al. // J. jap. Atheroscler. Soc. — 1978. — Vol. 6. — P. 67—71.
18. Singel P. K., Dapur N., Dhillon K. S. et al. // Canad. J. Physiol. Pharmacol. — 1982. — Vol. 60. — P. 1390—1394.

Поступила 26.06.85

MECHANISMS INVOLVED IN ACTIVATION OF LIPID PEROXIDATION AND MOBILIZATION OF ENDOGENOUS ANTIOXIDANT α -TOCOPHEROL IN STRESS

P. P. Golikov, B. V. Davydov, S. B. Matveev
N. V. Sklifasovsky Institute of Urgent Medicine,
Moscow

Effect of various stress factors (immobilization, catecholamines and glucocorticoids) on lipid peroxidation (LP) and mobilization of α -tocopherol in rat blood plasma were studied. Immobilization stress caused an activation of LP in blood plasma, while content of tocopherol was increased in intact animals; in adrenalectomy activation of LP and mobilization of tocopherol were not observed. In intact rats adrenaline and hydrocortisone increased similarly the content of tocopherol in blood plasma, stimulated accumulation of diene conjugates (DC); an increase in the content of Schiff bases was found only after hydrocortisone administration; simultaneous administration of both these drugs led to an increase in DC content as well as the additive effect on tocopherol mobilization was found. In adrenalectomized rats the content of DC and tocopherol were distinctly increased and a decrease in the content of Schiff bases was found after adrenaline administration; hydrocortisone did not affect the content of both DC and Schiff bases, the level of tocopherol was increased only slightly; under conditions of simultaneous administration of these drugs hydrocortisone prevented accumulation of DC in blood plasma, caused by adrenaline; the additive effect on tocopherol mobilization was not observed. The data obtained suggest that glucocorticoids realized their effect on LP via catecholamines and the decrease in the content of Schiff bases, found after adrenaline administration, occurred due to tocopherol mobilization.

Д. Д. Сумароков

ВЛИЯНИЕ КИСЛОТНОЙ ЭКСТРАКЦИИ НА ОСТЕОИНДУКТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ КОСТНОЙ ТКАНИ

Кафедра биохимии Московского медицинского стоматологического института имени
Н. А. Семашко

Доказано значение для регенерации кости особого механизма — остеондукции, в которой участвуют факторы белковой природы. Подробно изучен морфогенетический белок кости, содержащийся в ней в количестве 0,1% и имеющий мол. массу 17 кДа [7, 8]. Другой белок (внеклеточный фактор матрикса) является гликопротеидом с мол. массой 14—22 кДа. Третий белок (интрамембранный фактор роста) имеет мол. массу 5 кД [9]. Оба последних фактора мало исследованы.

Все три фактора выделяют из предварительно деминерализованного костного матрикса, но режимы деминерализации, используемые разными авторами, не идентичны.

Экспериментальные и клинические исследования по костной пластике деминерализованным костным матриксом показывают, что успех операции зависит от природы используемого деминерализующего агента, так как разные кислоты неодинаково влияют на состав его органических компонентов.

Исходя из вышесказанного, сравнивали остеондуктивные потенции, состав органического матрикса и состав кислотного экстракта при использовании различных деминерализующих агентов, а именно ЭДТА, ТХУ и HCl.

Методика

Крысам-донорам костного материала вводили внутривенно за сутки до умерщвления ^{14}C -глицин, $^{45}\text{CaCl}_2$ и $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$. После декапитации у животных брали диафизы бедренных костей, очищали от мягких тканей и костного мозга и расщепляли вдоль на 8 частей. Часть костного материала подвергали биохимическому анализу — определяли процент включения радиоактивных изотопов, содержание гидроксипролина (ГОПР), гексозаминов (ГА), кальция и фосфатов. Остальной костный материал готовили к трансплантации по следующей схеме: а) промывали дистиллированной водой (1 мл на 1 мг ткани); б) обезжиривали в течение 24 ч при постоянном встряхивании смесью эфир—этанол 1:1 (2 мл на 1 мг ткани); в) деминерализовывали в течение 48 ч при $+4^\circ\text{C}$ либо в 1 н растворе ЭДТА, либо в 0,5 н растворе HCl, либо в

5% растворе ТХУ (0,5 мл на 1 мг ткани); ткань отмывали от избытка кислоты дистиллированной водой в течение 2 ч при встряхивании (2 мл на 1 мг ткани); д) стерилизовали в 70% этаноле 48 ч.

На каждом этапе проводили биохимический контроль материала по вышеуказанным критериям. Дальнейшим исследованиям подвергали костный материал и кислотные экстракты. В последних исследовали спектр поглощения в УФ-области (от 220 до 285 нм). Часть кислотных экстрактов объединяли по группам и проводили осаждение оптически активных соединений концентрированным раствором аммиака. После центрифугирования проверяли спектр поглощения надосадочных жидкостей, а осадки лиофилизировали. Осадок, полученный из ТХУ экстрактов, обрабатывали ацетоном для удаления следов ТХУ, затем растворяли в дистиллированной воде, подкисленной HCl. Два других осадка непосредственно растворяли в подкисленной воде (300 мг осадка в 2 мл H_2O). Полученные растворы подвергали колоночной хроматографии на сфадексе G-50 medium (колонок 950×11 мм). Элюцию проводили раствором 0,2 CH_3COOH (скорость 10 мл/ч). Хроматографирование каждого осадка проводили дважды, собирая по 3 мл элюата. Одновременно измеряли поглощение элюатов при 280 нм на детекторе "Uvicord-2" (ЛКВ, Швеция) и их электропроводность с помощью кондуктолайзера (ЛКВ, Швеция). В последующем определяли оптическую плотность элюата при 220 нм на спектрофотометре СФ-16.

Другую часть кислотных экстрактов также объединяли по группам и упаривали в токе жидкого азота в 5 раз. В конденсатах определяли содержание радиоактивных изотопов. Конденсаты наносили на колонки со смолкой HW-50 (кислотоустойчивая), по 1 мл (колонок 50×8 мм). Элюцию проводили 0,2 н раствором CH_3COOH со скоростью 6 мл/ч и собирали элюаты по 2 мл. Измеряли оптическую плотность элюатов при 220 и 285 нм, а также содержание в элюатах радиоактивных изотопов ^{45}Ca , ^{32}P и ^{14}C .

Для исследования остеогенетических потенций костный материал имплантировали в брюшные мышцы крыс реципиентов. Декапитацию проводили через 1, 2, 4, 6 и 12 нед. Об интенсивности остеондукции судили по содержанию в имплантатах Ca и P, а также через 2, 6 и 12 нед по включению в имплантаты ^{45}Ca и ^{32}P (изотоп вводили реципиентам за 24 ч до умерщвления) в виде $^{45}\text{CaCl}_2$ и $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$.

Содержание ГОПР определяли по методу [1], гексозаминов — по методу [3], Са-комплексометрическим титрованием с мурексидом [2], Р-колориметрическим титрованием с молибдатом аммония [3]. Включение изотопов исследовали по методу двойного счета [4]. Счет импульсов проводили на сцинтилляцион-

ном счетчике Mark II ("Nuclear Chicago", США).

Материалы обрабатывали статистически по критерию Фишера—Стьюдента.

Результаты

Результаты экспериментов показали, что деминерализованные ЭДТА-трансплантаты обладают слабой остеиндуктивной активностью, т. е. в течение 6 нед опыта они почти не включали ^{45}Ca и ^{32}P . Остеоиндукция в этой группе наблюдается лишь через 12 нед.

Трансплантаты других двух групп дают выраженный остеиндуктивный эффект и через 6 нед замещаются новообразованной костной тканью, а активно включать ^{45}Ca и ^{32}P начинают через 2 нед. Однако скорость замещения была несколько выше в группе с ТХУ.

Представляло интерес сопоставить данные биологического опыта с результатами исследования исходного состава трансплантатов и получаемых в процессе деминерализации кислотных экстрактов.

В таблице приведено содержание исследованных компонентов в ткани трансплантатов в процентах от их количества в исходной костной ткани.

Как видно из таблицы, все использованные деминерализующие агенты извлекают, кроме минеральных компонентов, некоторые ингредиенты органического матрикса: гликопротеидные компоненты и частично коллаген. Важно отметить, что между степенью извлечения ^{14}C -глицина и ГОПР нет прямой корреляции. Если ГОПР

Содержание исследуемых компонентов в деминерализованном различными способами костном матриксе (в % от исходного; $M \pm m$)

| Группа | ^{14}C глицин | ГОПР | ГА | ^{45}Ca | ^{32}P | Ca | P |
|--------|------------------------|-------------|-------------|------------------|-----------------|----|--------------|
| ЭДТА | 87.2 2.1 | 93.4 0.7 | 54.5 4.1 | 1.70 0.08 | 0.75 0.06 | — | 0.20 0.09 |
| НСI | 82.7 0.9 | 93.8 0.6 | 43.1 2.6 | 0.30 0.05 | 0.42 0.07 | — | — |
| ТХУ | 94.0 1.8 | 94.9 0.8 | 64.8 1.9 | 0.11 0.06 | 1.20 0.04 | — | 0.40 0.08 |

извлекается во всех группах примерно одинаково, то ^{14}C -глицин — с разной интенсивностью. Можно думать, что меченый глицин включен либо в негидроксилированный коллаген (про-токоллаген), либо находится в составе телопептидов или неколлагеновых белков.

Различия в характере извлеченных компонентов видны и при анализе экстрактов. Так, УФ-спектрофотометрия показывает, что ЭДТА-экстракты имеют максимум поглощения при 255 нм, а НСI- и ТХУ-экстракты — при 265 нм. После обработки кислотных экстрактов концентрированным раствором аммиака оптическая плотность полученной надосадочной жидкости была равна нулю.

Осадки при гель-фильтрации на сефадексе G-50 имеют разные хроматографические профили как при 280 нм, так и при 220 нм (рис. 1). Для всех осадков общим является пик II, выходящий в объеме около 80 мл, прояв-

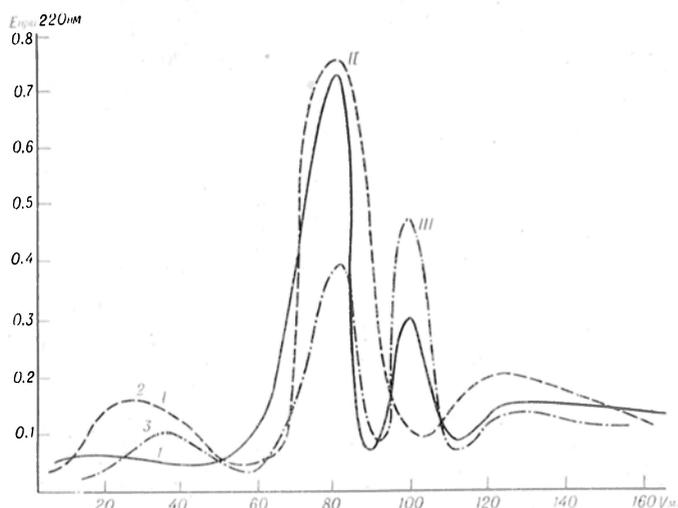


Рис. 1. Гель-фильтрация на сефадексе G-50 осадков, выделенных из экстрактов костной ткани.
1—3 — экстракция НСI, ЭДТА и ТХУ соответственно.

ляющийся как при 220 нм, так и 280 нм, дающий положительную биуретовую реакцию. При подщелачивании среды компоненты этого пика выпадают в осадок. Можно предположить, что это низкомолекулярные белки. Для осадков ЭДТА и ТХУ характерен малый пик (I), выходящий в объеме 20 мл (в осадках ЭДТА он существенно больше). Компоненты этого пика дают биуретовую реакцию и выпадают в осадок при подщелачивании. Этот пик проявляется как при 220 нм, так и 280 нм. Можно думать, что это белки с большей молекулярной массой. Для осадков ТХУ и HCl имеется общий пик — III, выходящий в объеме около 100 мл, проявляющийся лишь при 220 нм, причем в осадках ТХУ он выше, чем в HCl. Компоненты этого пика при подщелачивании в осадок не выпадают, но дают биуретовую реакцию. Пик выходит непосредственно перед солями. Можно предполагать, что это низкомолекулярные пептиды, не содержащие ароматических кислот.

При радиохроматографических исследованиях (рис. 2) удалось установить, что пик I содержит 60 % от общего количества изотопов ^{45}Ca в ЭДТА-экстрактах и 20 % в ТХУ-экстрактах. Остальной ^{45}Ca выходит во фракции солей (после пика III). В HCl-экстрактах существенных пиков с ^{45}Ca не обнаружено. Пик II во всех экстрактах содержит около 30 % P. Весь остальной ^{32}P обнаруживается

во фракции солей. Во II пике выявляется также [^{14}C]-глицин, примерно 70 % в ЭДТА- и ТХУ-экстрактах и 50 % в HCl-экстрактах. Около 10 % [^{14}C]-глицина обнаруживается в пике III. В HCl-экстрактах часть ^{45}Ca и [^{14}C]-глицин выходят в составе минорных фракций, практически не обладающих оптической активностью.

При сопоставлении данных гельфильтрации и радиохроматографии можно видеть, что пик I способен связывать изотоп ^{45}Ca , т. е. по-видимому, представляет собой Ca-связывающие белки, что соответствует данным литературы. Пик II — общий для всех изученных кислотных экстрактов, представляет собой, по-видимому, коллагеновые белки, которые содержат много [^{14}C]-глицина. Пик III, представленный низкомолекулярными ^{14}C -глицин-содержащими пептидами, обнаруживается в экстрактах только в тех случаях, когда деминерализованный использованными кислотами матрикс обладает остеиндуктивной активностью.

Для объяснения малой остеиндуктивной способности матрикса, деминерализованного ЭДТА, можно выдвинуть две основные гипотезы: а) ЭДТА извлекает один из известных остеиндуктивных факторов; б) в матриксе имеются ингибиторы остеиндукции, не извлекаемые ЭДТА, но экстрагируемые HCl и ТХУ.

Материалами проведенного исследования первая гипотеза не отвергается, но и не подтверждается. Ни существенных потерь изучаемых компонентов матрикса, ни дополнительных пиков в экстрактах ЭДТА не обнаружено.

Полученные результаты в некоторой степени подтверждают вторую гипотезу, так как в HCl- и ТХУ-экстрактах имеется пик III, отсутствующий в экстрактах ЭДТА. Не исключено, что этот пик представляет собой ингибиторы остеиндукции. Можно предположить, что остеиндуктивный фактор в нативной кости находится в неактивном, ингибированном состоянии и вещества пика III представляет собой эти ингибиторы.

Вне зависимости от этого предположения, результаты позволяют сделать вывод, что остеиндуктивные потенции костного матрикса зависят от природы деминерализующего агента.

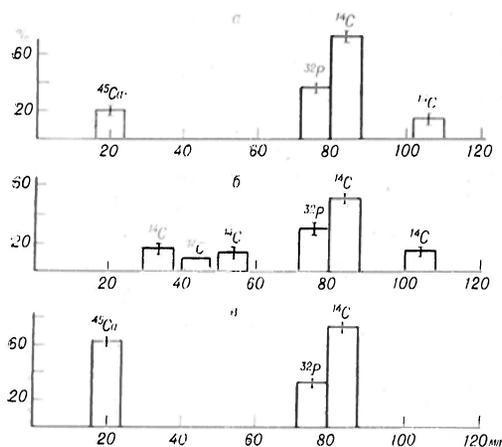


Рис. 2. Содержание изотопов ^{45}Ca , ^{32}P и [^{14}C]-глицина в элюатах экстрактов костной ткани при хроматографии на HW-50 (в % от исходного).

а-в — экстракция ТХУ, HCl и ЭДТА соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зайдес А. Д., Михайлов А. И., Пуценко О. И. // Биохимия. — 1964. — Т. 29. — С. 5—9.
2. Канторович Л. Е., Белинская Л. Д. // Лаб. дело. — 1965. — № 5. — С. 282—285.
3. Леонтьев В. К., Петрович Ю. А. Биохимические методы исследования в клинической и экспериментальной стоматологии. — Омск, 1976.
4. Озрина Р. Д., Петрович Ю. А., Сенченков Е. П., Швырков М. Б. // Укр. биохим. журн. — 1982. — № 1. — С. 69—72.
5. Петрович Ю. А., Шамсудинов А. Х., Сумароков Д. Д., Швырков М. Б. // Стоматология. — 1984. — № 5. — С. 12—15.
6. Фриденштейн А. Я., Лалыкина К. С. Индукция костной ткани и остеогенные клетки-предшественники. — М., 1973.
7. Urist M. R. et al. // Science. — 1983. — Vol. 220. — P. 680—686.
8. Urist M. R. // Pat 4455256, USA.

9. Mohan S., Linkhart Th., Farley J. // Calcif. Tissue int. — 1984. — Vol. 36. — Suppl. 1. — P. 139—145.

Поступила 29.06.85

EFFECT OF ACID EXTRACTION ON OSTEOINDUCTIVE ACTIVITY OF BONE TISSUE

D. D. Sumarokov

Chair of Biochemistry, Medical Stomatological School, Moscow

Rat bones demineralized in HCl and TCA exhibited distinct osteoinductive activity while the bones demineralized using EDTA did not show the activity. HCl- and TCA-extracts of bones differed from EDTA extracts by chromatographic and radiochromatographic profiles. At the same time, HCl- and TCA-extracts contained additional fraction. The substances involved in the fraction appear to be responsible for inhibition of the osteoinductive factor of bone tissue.

УДК 616.153.1:577.152.344.042.2]-074+615.373:616.153.1:577.152.344.042.2]-078.73].012

В. Ю. Басис, В.-А. В. Бумялис, Т. С. Котова

ОЧИСТКА α -1-ИНГИБИТОРА ПРОТЕАЗ ЧЕЛОВЕКА И ПОЛУЧЕНИЕ АНТИСЫВОРОТКИ, ПРИГОДНОЙ ДЛЯ ЕГО ИММУНОХИМИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Вильнюсский университет им. В. Капсукаса, Научно-производственное объединение «Фермент», Вильнюс, НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского, Москва

α -1-ингибитор протеаз (ИП) составляет основную долю антитрипсиновой активности крови [14]. Доказана связь генетически обусловливаемой недостаточности ИП с хроническими obstructивными заболеваниями легких [10], гепатитом и циррозом печени у новорожденных и грудных детей [22]. Изучается значение недостаточности ИП в патогенезе ревматоидного артрита [12], мембранно-пролиферативного гломерулонефрита [17] и других заболеваний, связанных с нарушением иммунных механизмов. Популяционные исследования ИП, проведенные в некоторых странах, характеризуют частоту его врожденной недостаточности на уровне 1:1500—1:2500 новорожденных [21].

Обычно ИП определяют энзиматически, используя методы, основанные на торможении расщепления синтетических субстратов трипсином [4, 9, 11], или иммунохимическими методами [14, 17, 22], основанными на радиальной иммунодиффузии [16].

Точное и селективное определение ИП возможно лишь иммунохимическими методами с использованием

специфических антисывороток [14]. Однако для получения моновалентной антисыворотки к ИП необходим иммунохимически чистый белок [3].

В литературе описано несколько способов очистки ИП с использованием методов ионообменной хроматографии [8, 15], аффинной хроматографии [18—20], а также металлохелатной хроматографии [15]. Недавно предложена методика промышленного выделения ИП [13]. Несмотря на то что ИП интенсивно изучают [7], известную трудность составляет получение гомогенных и особенно иммунохимически чистых препаратов ИП [14], пригодных для его иммунохимического определения.

В настоящей работе приведены данные о выделении чистого ИП человека и получении сыворотки, пригодной для иммунохимического определения ИП. Приведены также некоторые физико-химические характеристики выделенного белка.

Методика

Для выделения ИП использовали кровь здоровых доноров. Белки плазмы высаливали

Выделение и очистка α_1 -ингибитора протеаз из плазмы крови человека

| Стадия очистки | Объем, мг | Активность, мкмоль/мл/мин | Общая активность, мкмоль/мл | Белок, мг | Удельная активность, мкмоль/мин/мг | Очистка, раз | Выход, % |
|-----------------|-----------|---------------------------|-----------------------------|-----------|------------------------------------|--------------|----------|
| Исходная плазма | 305 | 0,273 | 83,20 | 18452,0 | 1,5 | 1 | 100 |
| Сульфат аммония | 240 | 0,261 | 62,64 | 9000,0 | 7,2 | 4,9 | 75,4 |
| ДЭАЭ-целлюлоза | 74 | 0,718 | 53,13 | 1628,0 | 32,6 | 22,0 | 64,0 |
| Гидроксилпатит | 48,6 | 0,41 | 19,92 | 41,8 | 474,1 | 320,4 | 23,8 |

сульфатом аммония при 50 % насыщения, осадок отбрасывали и проводили повторное осаждение белков надосадочной жидкости сульфатом аммония при 80 % насыщения рН 7,4 [24]. Осадок растворяли в 0,01 М фосфатном буфере рН 7,4, содержащем 1 мМ меркаптоэтанол (МЭ). Белковый раствор обессоливали на колонке с молселектом G-25 и наносили на колонку с целлюлозой DE-32, уравновешенную тем же буфером. Элюцию проводили линейным градиентом 0,2 М фосфатного буфера рН 6,0 с 1 мМ МЭ. Во фракциях определяли оптическую плотность при 280 нм на СФ-16 и активность ИП. Фракции, содержащие ИП, объединяли и проводили осаждение сульфатом аммония при 80 % насыщения рН 6,8. Полученный частично очищенный препарат ИП растворяли в 0,01 М фосфатном буфере рН 6,8 с 1 мМ МЭ при 4 °С, обессоливали на колонке с молселектом G-25 и наносили на колонку с гидроксилпатитом, приготовленным по методу, описанному ранее [5], и уравновешенную тем же буфером. Элюцию проводили линейным градиентом 0,11 М фосфатного буфера рН 6,8 с 1 мМ МЭ. Во фракциях определяли активность ИП и концентрацию белка [6]. Активные фракции объединяли и осаждали сульфатом аммония при 80 % насыщения рН 6,0. Осадок растворяли в ацетатном буфере (0,05 М) рН 6,0 с 0,15 М NaCl и 1 мМ МЭ. Раствор диализовали против того же буфера при 4 °С и получали препарат высокоочищенного ИП.

При необходимости дальнейшей очистки белок подвергали аффинной хроматографии на конканавалинсефарозе 4В. Элюцию ИП с колонки проводили путем добавления в буфер 0,1 М метил- α_1 -глюкопиранозид. Активные фракции объединяли, раствор диализовали против 0,01 М фосфатного буфера рН 7,6 с 1 мМ МЭ и лиофильно высушивали. Высушенный белок хранили при 4 °С.

Антитрипсиновую активность определяли по модифицированной нами методике [9], используя в качестве субстрата бензоил-D, L-аргинин-D-нитроанилид (БАПИНА). Перед определением растворяли в 2 мл диметилсульфоксида 43,5 мг БАПИНА и доводили до 100 мл 0,2 М трис-HCl буфером рН 8,2. К 0,5 мл раствора, содержащего ИП, прибавляли 1 мл буфера, 1 мл трипсина (4 мг % в 0,001 М HCl) и инкубировали смесь 10 мин при комнатной температуре. Затем добавляли 2 мл раствора БАПИНА и инкубировали 10—30 мин при 37 °С. В контрольные пробы вместо трипсина и ИП добавляли буфер или 0,001 М HCl. Реакцию останавливали 0,5 М HCl и измеряли оптическую плотность относительно контроля при 410 нм. Антитрипсиновую ак-

тивность рассчитывали по формуле (в мкмоль/мин/мл):

$$E = \frac{5000}{10,5} \cdot \frac{A_T - A_{AT}}{500 \cdot x}$$

где A_T — оптическая плотность раствора, содержащего трипсин; A_{AT} — оптическая плотность раствора, содержащего трипсин и ИП; 10,5 — миллимолярный коэффициент экстинкции п-нитроанилида; 5000 — определяемый объем раствора (в мкл); x — время инкубирования (в мин) при 37 °С.

Гомогенность и молекулярную массу ИП определяли методом диск-электрофореза в 10 % ПААГ с 2 % додецилсульфатом натрия (ДДСН) и 5 % МЭ [23]. Для калибровки использовали стандартные белки: α -лактальбумин, ингибитор трипсина, кислотную ангидразу, яичный альбумин (ЯА), бычий сывороточный альбумин (БСА), фосфорилазу В.

Антисыворотку к ИП получали двумя способами: 1) 1 мг электрофоретически чистого ИП растворяли в 1 мл 0,01 М фосфатного буфера рН 7,6, смешивали с 0,5 мл полного адьюванта Фрейнда и вводили кроликам внутримышечно в 4 точки в течение 2 мес с интервалом 2 нед; 2) кроликам подкожно в 4 точки вводили 5 мг ИП в полном адьюванте Фрейнда. Через 6 нед проводили внутривенную иммунизацию, вводя по 3 мг антигена в краевую ушную вену. Через 7 дней брали кровь.

Иммунохимический анализ [3] проводили методом радиальной иммунодиффузии (РИД) [25], методами Оухтерлони и иммуноэлектрофореза. Для исследования использовали овечью антисыворотку ко всем белкам человека (22/6), а также кроличьи моноспецифичные антисыворотки к альбумину, α_2 -макроглобулину и трансферрину. Все сыворотки получены в лаборатории по изучению структуры и функции антител Московского НИИЭМ им. Г. Н. Габричевского. В сравнительных исследованиях применяли кроличью антисыворотку к ИП человека фирм «Севак» (ЧССР) и «Беринг» (ФРГ).

Результаты и обсуждение

Сходство некоторых физико-химических свойств альбумина и ИП создает трудности при получении чистых препаратов ИП [18]. В таблице приведены данные по выделению и очистке ИП из 305 мл плазмы крови человека.

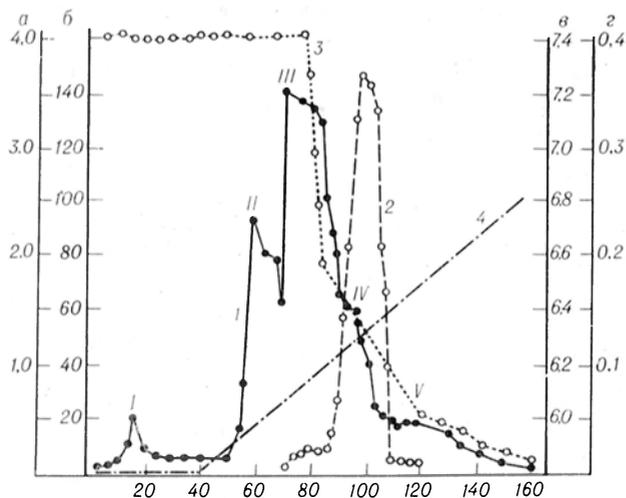


Рис. 1. Хроматография ИП на ДЭАЭ-целлюлозе.

По оси абсцисс — номер фракции; по осям ординат: *a* — концентрация белка (в мг/мл), *б* — активность α -антитрипсина (в мкмоль на 1 мл в 1 мин), *в* — рН, *г* — концентрация фосфатного буфера (в молях), 1 — концентрация буфера ($A_{280 \text{ нм}}$), 2 — активность ИП (мкмоль/мин·мл⁻¹), 3 — градиент рН фосфатного буфера, 4 — линейный градиент ионной силы фосфатного буфера

Количество белка после осаждения плазмы крови сульфатом аммония при 50—80 % насыщения [8] уменьшается примерно в 2 раза, однако, как показывают данные электрофореза, остаются альбумин и белки α_1 -фракции.

Профиль элюции белков с ДЕ-32 целлюлозы с использованием смешанного градиента ионной силы фосфатного буфера до 0,02 М и рН от 7,6 до 6,0 свидетельствует об извлечении белков 5 пиками (рис. 1). I пик присутствует лишь в тех случаях, когда для фракционирования применяют гемолизированную плазму; в нем выходят гемовые белки крови. Во II пике выходят белки с большой молекулярной массой, в основном трансферрин, что было отмечено ранее [19]. Как показали исследования с антисывороткой к альбумину, III и IV пики содержат альбумин, а ИП элюируется с колонки в IV пике. Некоторая асимметричность кривой антитрипсиновой активности объясняется фракционированием при различных рН и ионной силе разных молекулярных форм ИП, различающихся изоточками [19]. V пик содержит смесь из 4 белков, преобладающую часть которых составляет альбумин.

Для препаративной хроматографии колонку с ДЭАЭ-целлюлозой «Whatman DE 32» или ДЭАЭ целлюлозой фирмы «Reanal» уравнивали 0,08 М фосфатным буфером рН 6,8, а ИП элюировали с колонки 0,13 М фосфатным буфером рН 6,3.

Для отделения альбумина и других белков от ИП предлагали различные

методы [3, 8, 18—20], в том числе гель-хроматографию на акрилексе П-100 [2], однако многие из предложенных сорбентов мало доступны или представляют трудности для использования для препаративной очистки белка. Дальнейшая очистка ИП была проведена на гидроксилалпатите (ГАП), который сорбирует значительные количества альбумина и довольно просто может быть приготовлен из фосфатов калия и хлористого кальция [5].

ИП элюируется с ГАП линейным градиентом фосфатного буфера рН 6,8. Полного разделения белков не происходит (рис. 2), но, хотя пики ИП и альбумина перекрываются, фракции 3—10, как показали электрофоретические исследования, представ-

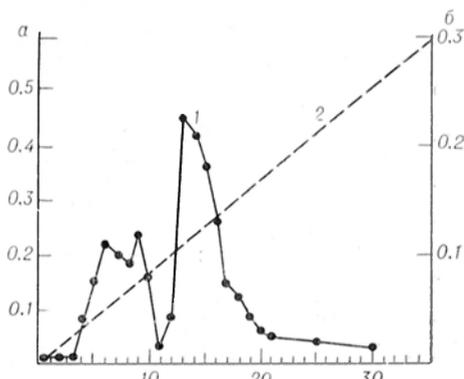


Рис. 2. Хроматография ИП на гидроксилалпатите.

По осям ординат: *a* — концентрация белка (в мг/мл), *б* — концентрация фосфатного буфера (в молях), 1 — ИП концентрация (в мг/мл), 2 — линейный градиент фосфатного буфера рН 6,8.

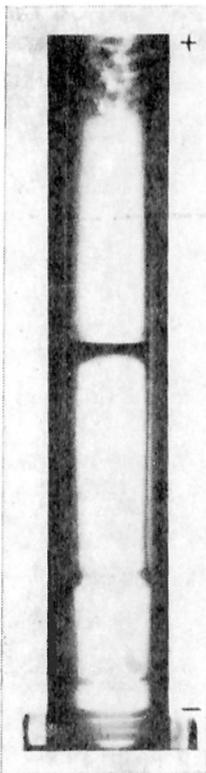


Рис. 3. Диск-электрофорез ИП в присутствии 0,1 % ДДСН в ПААГ.

Электрофорез проводили в течение 1 ч при 20 мА в 0,05 М Na-фосфатном буфере pH 7,1, на гель наносили 50 мкг белка.

ляют собой чистый ИП (рис. 3), а фракции 11—20 являются смесью ИП и альбумина. Следовательно, использование ГАП позволяет получить электрофоретически чистый ИП с выходом 23 %.

Молекулярную массу выделенного ИП определяли методом электрофореза в ПААГ с ДДСН. Полученная величина лежит в пределах вариабельности молекулярной массы ИП 45—54 кД [8, 20].

Выделенный ИП в концентрации 3 мг/мл образовывал отчетливую полосу преципитации только с антисыворотками к ИП, в то время как с антисыворотками к другим белкам препарат не давал полос преципита-

ции. В реакции с антисывороткой ко всем белкам человека (рис. 4) наблюдалась одна слабая полоса преципитации, что свидетельствует о низком титре антител к ИП в этой сыворотке. ИП фирмы «Sigma» в той же концентрации 3 мг/мл содержал значительную примесь альбумина, выявляемую при иммуноэлектрофорезе (рис. 5). Методом РИД было установлено, что в 1 мг препарата фирмы «Sigma» содержалось до 0,32 мг альбумина.

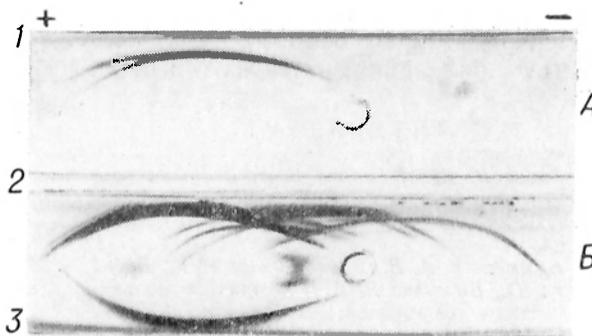
Антисыворотка, полученная после иммунизации кроликов электрофоретически чистым ИП, выявляла в сыворотке крови здорового человека отчетливую линию ИП и едва заметную полосу в зоне альбумина. Это свидетельствует о том, что препарат, использованный для иммунизации, все же содержал незначительную примесь альбумина, которая проявилась в процессе иммунизации (см. рис. 4).

С очищенным препаратом ИП полученная антисыворотка образует раздвоенную на конце полосу преципитации (см. рис. 4). Это раздвоение едва ли можно объяснить наличием примеси в препарате ИП, так как он не образует полос преципитации с антисыворотками к другим белкам человека, выявляемым в этой зоне, в частности с антисывороткой к альбумину. Поскольку аналогичное раздвоение линии преципитации мы наблюдаем и в препарате фирмы «Sigma» (см. рис. 5), а в преципитатах, образуемых полученной антисывороткой с сывороткой крови здорового человека (см. рис. 4), этого раздвоения нет, можно предположить, что в процессе очистки препарата происходят изменения физических свойств этого белка, приводящие к образованию молекул с измененной антигенной структурой.

При определении ИП в сыворотке крови больных методом РИД антисы-

Рис. 4. Иммуноэлектрофорез ИП и нормальной сыворотки человека.

Лунка А — ИП, выделенный в НПО «Фермент», лунка Б — нормальная сыворотка человека. 1 и 3 — антисыворотки к ИП, полученные в Вильнюсском университете; 2 — антисыворотка ко всем белкам человека (22/6). Электрофорез проводили в течение 1 ч при 24 мА в 0,06 М вероналовом буфере pH 8,0 с последующей иммунодиффузией в течение 16 ч при комнатной температуре.



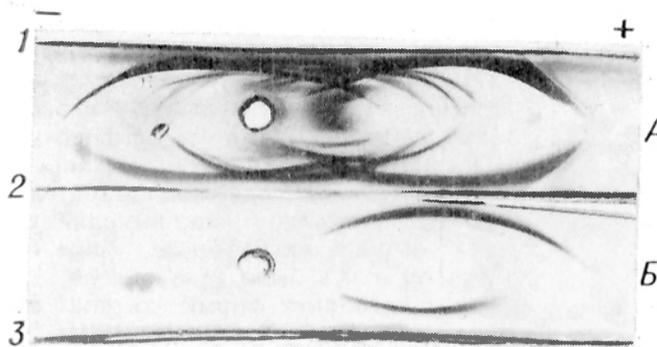


Рис. 5. Иммуноэлектрофорез ИП фирмы «Sigma» и нормальной сыворотки человека.

Лунка А — нормальная сыворотка человека; лунка Б — ИП фирмы «Sigma»: 1 — антисыворотка (Л) ко всем белкам человека, 2 — антисыворотка (22/6) ко всем белкам человека; 3 — антисыворотка к ИП (полученная в Вильнюсском университете).

воротку используют в разведении 1 : 20—1 : 30, при этом примеси не выявляются. Таким образом, полученную антисыворотку можно использовать для определения ИП без дополнительной адсорбции. Предложенная двухстадийная хроматографическая очистка ИП позволяет быстро и сравнительно просто выделить большие количества белка, пригодного для получения антисыворотки с целью иммунохимического определения ИП.

Однако при необходимости получения препарата ИП, обладающего как электрофоретической, так и иммунологической чистотой, требуется дополнительная его очистка на аффинных сорбентах. Очистка препарата ИП, имеющего в своей структуре белковую и углеводную части молекулы, на конканавалинсефарозе 4В, позволяет получить иммунологически чистый препарат ИП. Минорные примеси, выявляемые на иммуноэлектрофореграммах (см. рис. 4), в препаратах, полученных после хроматографической очистки на ДЭАЭ-целлюлозе и гидроксил-апатите, не выявлялись после дополнительной очистки на аффинном сорбенте — конканавалинсефарозе 4В.

Антисыворотка к ИП, полученная предложенным методом, была использована для скрининга врожденной недостаточности ИП у новорожденных [1] и для определения содержания ИП в сыворотке крови больных с хроническими заболеваниями легких и печени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Басис В. Ю., Бумялис В.-А. В. // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины. — Каунас, 1981. — С. 23—24.
2. Бумялис В.-А. В., Вайткявичюс Р. К., Басис В. Ю., Валулис Р. А. // Химия протеолитических ферментов. — Углич, 1979. — С. 100—101.
3. Иммунологические методы. / Под ред. Х. Фримеля: Пер. с нем. — М., 1979. — С. 1—600.
4. Кривштейн Т. А., Хватов В. Б. // Лаб. дело. — 1978. — № 4. — С. 234—237.
5. Atkinson A., Bradford P. A., Selmes S. P. // J. appl. Chem. Biotechnol. — 1973. — Vol. 23. — P. 517—529.
6. Bradford M. M. // Analyt. Biochem. — 1976. — Vol. 72. — P. 248.
7. Carrel R. W., Jeppsson J.-O., Vaughan L. et al. // FEBS Lett. — 1981. — Vol. 135. — P. 301—303.
8. Crawford J. P. // Arch Biochem. — 1973. — Vol. 156. — P. 215—222.
9. Dietz A. A., Rubinstein A. M., Hodges L. // Clin. Chem. — 1976. — Vol. 22. — P. 1754.
10. Endres P. // Atemwegs. Lungenkr. — 1980. — Bd 6. — S. 9—11.
11. Eriksson S. // Acta med. scand. — 1965. — Suppl. 432. — P. 1—85.
12. Geddes D. M., Breverton D. A., Welley M. // Lancet. — 1977. — Vol. 2. — P. 1049—1051.
13. Glaser Ch B., Chamorro M., Growley R. et al. // Analyt. Biochem. — 1982. — Vol. 124. — P. 364—371.
14. Kueppers F. // Lung Biology in Health and Disease. / Ed. C. Lenfant. — New York, 1978. — Vol. 13. — P. 23—74.
15. Kurecki T., Kress F., Laskowski M. // Analyt. Biochem. — 1979. — Vol. 99. — P. 415—420.
16. Mancini G., Carbonara A. O., Heremans J. F. // Immunochemistry. — 1965. — Vol. 2. — P. 235—254.
17. Mazodier P. // Peditric. — 1977. — Vol. 13. — P. 205—219.
18. Moroi M., Gamasaki M. // Sci. pap. Coll. gen. educ. Univ. Tokyo. — 1981. — Vol. 24. — P. 99—109.
19. Musiani P., Massi G., Piantelli M. // Clin. chim. Acta. — 1976. — Vol. 73. — P. 561—564.
20. Pannell R., Jahson D., Travis J. // Biochemistry (Wash.). — 1974. — Vol. 13. — P. 5439.
21. Sveger T., Laurell C.-B., Ljunggren K. // Profides of the Biological Fluids. — 1975. — P. 501—503.
22. Ward A. M., Underwood J. C. E. // J. clin. Path. — 1974. — Vol. 27. — P. 467—472.
23. Weber K., Osborn M. // J. biol. Chem. — 1969. — Vol. 224. — P. 4406—4412.
24. Wood W. J. // Analyt. Biochem. — 1976. — Vol. 73. — P. 250.

Поступила 22.07.85

PURIFICATION OF HUMAN α -I-INHIBITOR OF PROTEASES AND PRODUCTION OF ANTISERUM FOR THE PROTEIN IMMUNOCHEMICAL ESTIMATION

V. Yu. Basis, A. V. Bumyalis, T. S. Kotova

State University, Research-Industrial Association "Enzyme", Vil'nyus, G. N. Gabrichevsky
Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow

Human homogenous α -I-inhibitor of proteases was isolated and purified by means of chromatography on DEAE cellulose, hydroxyapatite and concanavaline Sepharose 4B. After immunization of rabbits specific monovalent antiserum towards

the inhibitor was produced. The antiserum was used in diagnosis of hereditary deficiency of α -I-inhibitor of proteases and for estimation of its content in newborns.

УДК 616.831-005.1-092.9-07:616.831-008.922.1

Л. Н. Маслов

НАРУШЕНИЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА МОЗГА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ВНУТРИМОЗГОВОМ КРОВОИЗЛИЯНИИ

Лаборатория радионуклидных методов исследования Сибирского филиала ВКНЦ АМН СССР, Томск

Высокая летальность и малая эффективность проводимой терапии при инсульте обуславливают настоятельную необходимость изучения патогенеза данной патологии. Между тем состояние биоэнергетики мозга при геморрагическом инсульте изучено недостаточно. Установлено, что при инсульте имеют место снижение мозгового кровотока и циркуляторная гипоксия [1, 6]. Последняя существенно нарушает метаболизм нервной ткани [9]. Показано, что угнетение окислительного фосфорилирования в нейронах может вызвать отек-набухание [4].

Целью данного исследования было изучение динамики нарушений биоэнергетики мозга при экспериментальном внутримозговом кровоизлиянии.

Методика

Эксперименты выполнены на белых беспородных крысах-самцах массой 200—250 г. Внутримозговое кровоизлияние моделировали путем введения 0,15 мл аутокрови через заранее стереотаксически вживленную иглу во внутреннюю капсулу правого полушария. Исследования проводили на ненаркотизированных животных через 1, 3, 24 и 48 ч после геморрагии. Сразу после деканитации мозг извлекали из черепа и помещали в стаканчик с охлажденной до 0 °С средой выделения следующего состава: 0,3 М сахараза, 0,005 М калиевая соль ЭДТА, 0,005 М трис-НСI-буфер рН 7,4. Мозг отмывали от крови, удаляли мозговые оболочки и гомогенизировали 1 мин в механическом гомогенизаторе (зазор 0,2 мм) при скорости вращения 250 об/мин в 10 мл среды выделения. Митохондрии (Мх) выделяли методом дифференциального центрифугирования [14].

Неразрушенные клетки и ядра осаждали центрифугированием при 3000 g в течение 10 мин. Осадок Мх промывали средой выделения и суспендировали в среде, содержащий 0,3 сахаразу, 0,2 мМ калиевую соль ЭДТА, 0,01 М трис-НСI-буфер рН 7,4. Все процедуры по выделению Мх мозга крыс производили при температуре от 0 до 2 °С в холодной комнате. Дыхание Мх регистрировали полярографически в термостатируемой кювете при 23 °С в среде, содержащей 0,3 М маннитол, 0,01 М КСI, 0,005 М КН₂РO₄, 0,3 мМ калиевую соль ЭДТА, 0,01 М трис-НСI-буфер рН 7,4. В качестве субстратов использовали сукцинат (10 мМ) или α -кетоглутарат (α -КГ; 10 мМ). Измеряли следующие параметры дыхания митохондрий: начальную скорость дыхания (V_0) — в среде с субстратом окисления, скорость дыхания в состояниях 3 (V_3) и 4 (V_4) по Чансу; V_3 — при добавлении 200 нмоль АДФ, $V_{ДНФ}$ — при добавлении 50 мкМ динитрофенола (ДНФ) [11]. Белок определяли по методу Лоури с дезоксихолатом натрия [8]. Контролем служили ложноперирированные животные, у которых Мх мозга выделяли через 7 сут после вживления иглы, но без геморрагии.

Полученные результаты обрабатывали статистически с применением непараметрического критерия Вилкоксона—Манна—Уитни [3].

Результаты и обсуждение

В ходе предварительных экспериментов было установлено, что скорость дыхания Мх из мозга ложноперирированных животных достоверно не отличается от таковой у интактных крыс ни в одном из метаболических состояний.

Как видно из таблицы, через 1 ч после инсульта по сравнению с ложноперирированными животными наблюдалось достоверное снижение началь-

Влияние экспериментального внутримозгового кровоизлияния на функциональную активность Мх мозга ($M \pm m$)

| Срок после инсульта, ч | Субстрат | Группа животных | Число исследований | V_0 | V_3 | V_4 | $V_{днф}$ | АДФ/Т | АДФ/О |
|------------------------|----------|-----------------|--------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------|-----------|
| 1 | ЯК | Контрольная | 16 | 22,3±1,59 | 76,3±4,76 | 23,2±1,51 | 66,7±4,5 | 223±15 | 2,10±0,43 |
| | | Опытная | 17 | 18,7±1,75* | 50,7±3,46** | 18,4±1,10* | 43,1±3,55** | 143±13** | 1,93±0,63 |
| | α-КГ | Контрольная | 13 | 12,8±0,79 | 41,6±2,90 | 14,7±1,12 | 50,3±5,50 | 145±9 | 3,12±0,63 |
| | | Опытная | 14 | 9,3±1,00** | 29,9±2,33** | 8,11±0,75** | 25,2±4,18* | 98±7** | 2,91±0,49 |
| 3 | ЯК | Контрольная | 12 | 21,7±1,48 | 63,7±3,51 | 21,3±1,42 | 68,5±5,7 | 215±14 | 2,09±0,57 |
| | | Опытная | 13 | 20,3±1,71 | 61,5±2,97 | 19,9±1,55 | 65,4±4,8 | 195±15 | 2,05±0,44 |
| | α-КГ | Контрольная | 11 | 11,7±0,69 | 38,7±2,56 | 13,2±1,66 | 42,2±5,49 | 142±8 | 2,91±0,52 |
| | | Опытная | 12 | 10,9±0,61 | 36,2±2,54 | 11,5±1,21 | 40,7±4,89 | 137±9 | 2,88±0,54 |
| 24 | ЯК | Контрольная | 11 | 21,3±1,46 | 57,5±3,49 | 16,0±2,09 | 69,3±8,38 | 198±16 | 2,08±0,39 |
| | | Опытная | 11 | 16,8±1,68** | 38,0±3,48** | 15,4±2,42 | 57,0±10,10 | 129±11** | 2,02±0,53 |
| | α-КГ | Контрольная | 10 | 8,9±1,26 | 31,9±4,26 | 11,1±1,75 | 39,7±5,44 | 121±11 | 2,85±0,50 |
| | | Опытная | 10 | 7,8±0,60 | 18,6±2,03** | 6,9±1,10* | 27,0±4,11* | 66±9** | 3,12±0,17 |
| 48 | ЯК | Контрольная | 11 | 22,5±2,30 | 63,5±4,27 | 18,7±2,43 | 69,0±10,9 | 207±17 | 1,98±0,37 |
| | | Опытная | 11 | 20,8±2,38 | 57,7±5,24 | 19,0±2,73 | 67,2±15,3 | 181±13 | 1,91±0,35 |
| | α-КГ | Контрольная | 10 | 11,7±1,20 | 39,7±3,03 | 8,2±1,10 | 39,1±5,22 | 145±12 | 2,96±0,48 |
| | | Опытная | 10 | 11,2±1,38 | 37,2±1,95 | 7,8±0,84 | 43,2±6,09 | 132±10 | 2,93±0,43 |

Примечание. Субстрат — янтарная кислота (ЯК) и α-КГ. Скорость дыхания (V_0 , V_3 , V_4 и $V_{днф}$) выражали в наноатомах кислорода на 1 мг белка в 1 мин, АДФ/Т — в наномолях АДФ на 1 мг белка в 1 мин, АДФ/О — в наномолях АДФ на 1 наноатом O_2 . Одна звездочка — $P < 0,05$, две — $P < 0,01$ по отношению к контролю.

ной скорости (V_0) дыхания Мх, скорости дыхания при добавлении в среду инкубации АДФ (V_3) и после ее фосфорилирования (V_4), а также при разобщении окислительного фосфорилирования под действием 2,4-ДНФ ($V_{днф}$). Указанное угнетение дыхания Мх наблюдалось как при окислении сукцината, так и при использовании в качестве субстрата α -КГ. Необходимо отметить, что в этот же срок имело место достоверное снижение скорости фосфорилирования АДФ (АДФ/Г) в пробах с обоими субстратами. Уменьшения эффективности окислительного фосфорилирования (АДФ/О) при этом не обнаружено.

Выявленные через 1 ч после экспериментального внутримозгового кровоизлияния (ЭВМК) изменения дыхательной активности Мх мозга могли явиться результатом компрессионной ишемии, возникающей в первые минуты после введения крови [6, 10].

Через 3 ч после интрацеребральной геморрагии достоверных различий между контролем и опытом в изучаемых показателях окислительного фосфорилирования (как при окислении янтарной, так и α -кетоглутаровой кислот) не обнаружено, что можно объяснить восстановлением мозгового кровотока в этот период [10].

Через 24 ч после ЭВМК снова наблюдали выраженные нарушения биоэнергетики нервной ткани (см. таблицу), однако характер их несколько отличался от тех изменений, которые имели место через 1 ч. Так, при окислении сукцината угнетение дыхания Мх происходило преимущественно в третьем метаболическом состоянии (V_3). В разобщенном состоянии ($V_{днф}$) не наблюдалось достоверного снижения скорости дыхания относительно контроля. При окислении α -КГ значительное угнетение потребления кислорода обнаруживалось как в третьем, так и в четвертом состояниях по Чансу. Снижение скорости фосфорилирования было отмечено в опытах с НАД-зависимым (α -КГ) и ФАД-зависимым (сукцинат) субстратами. Разобщения окислительного фосфорилирования в этот период не обнаружено.

Необратимых нарушений функционального состояния Мх через 1 и 24 ч после кровоизлияния не обнаружено, что обнадеживает в плане поиска пу-

тей адекватной коррекции возникших повреждений.

Через 48 ч после инсульта достоверных изменений дыхания Мх мозга по сравнению с таковым ложнооперированных животных не выявлено (см. таблицу).

Обнаруженные изменения функциональной активности Мх могли быть обусловлены изменениями мозгового кровотока и, следовательно, кислородного обеспечения мозговой ткани при экспериментальном кровоизлиянии. Так, в работах ряда исследователей [5, 6, 10] показано, что через 3 ч после ЭВМК мозговой кровотока возвращается к контрольным величинам, а через 24 ч развивается отек-набухание мозга и кровотока снижается до минимальных значений. В более отдаленные сроки у выживших животных наблюдалось восстановление кровотока до контрольных величин [6], что согласуется с нашими данными о нормализации энергетического метаболизма через 48 ч после ЭВМК.

Обнаруженные изменения функциональной активности Мх мозга после внутримозговой геморрагии не являются специфическими. Аналогичное угнетение дыхания Мх и снижение скорости фосфорилирования отмечены в ряде работ при компрессионной, декарпитационной ишемии, циркуляторной гипоксии мозга [13, 15]. В литературе нет единой точки зрения о природе фактора, вызывающего изменение функциональной активности Мх при ишемии. Большинство исследователей отводят ведущую роль в повреждении Мх свободным жирным кислотам и продуктам перекисного окисления липидов, накапливающимся в мозге при экспериментальном ишемическом инсульте [2, 7, 12]; они нарушают функциональную целостность митохондриальных мембран. Эти соединения угнетают дыхание Мх в третьем и разобщенном состояниях, снижают скорость фосфорилирования [2, 7, 13].

Таким образом, результаты исследований показывают, что экспериментальное внутримозговое кровоизлияние вызывает выраженные сдвиги в функциональном состоянии митохондриального мозга, проявляющиеся в угнетении дыхания в пробах с НАД⁺- и ФАД⁺-зависимыми субстратами и снижении скорости фосфорилирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белокуров Ю. П. // *Вопр. нейрохир.* — 1969. — № 2. — С. 39—43.
2. Владимиров Ю. А., Оленев В. И., Суслов Т. Б., Потапенко А. Я. // *Молекулярная патология мембранных структур.* — М., 1975. — С. 56—117.
3. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. — Л., 1973.
4. Гурвич А. М. // *Журн. невропатол. и психиатр.* — 1971. — № 8. — С. 1262—1266.
5. Плотников М. Б. // *Здравоохранение, медицина.* — Томск, 1980. — С. 49—53.
6. Саратиков А. С., Плотников М. Б., Плотникова Т. М. // *Пат. физиол.* — 1982. — № 2. — С. 136—138.
7. Сороковой В. И., Владимиров Ю. А. // *Молекулярная патология мембранных структур.* — М., 1975. — С. 11—55.
8. Сяткин С. П. // *Вопр. мед. химии.* — 1981. — № 1. — С. 136—138.
9. Хватова Е. М., Мартынов Н. В. *Метаболизм острой гипоксии.* — Горький, 1977.
10. Asano T., Sano K. // *J. Neurosurg.* — 1977. — Vol. 46. — P. 545—466.
11. Chance B., Williams G. R. // *Advanc. Enzymol.* — 1956. — Vol. 17. — P. 65—134.
12. Kogure K., Watson B., Busto R., Abe K. // *Neurochem. Res.* — 1982. — Vol. 7. — P. 437—454.
13. Lazarewicz J. W., Strosznajder J., Gromek A. // *Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Sci. Biol.* — 1972. — Vol. 20. — P. 599—606.
14. Moore C. L., Jöbsis F. F. // *Arch. Biochem.* — 1970. — Vol. 138. — P. 295—305.
15. Schutz H., Silverstein P. R., Vapalahti M. et al. // *Arch. Neurol.* — 1973. — Vol. 29. — P. 408—416.

Поступила 26.07.85

IMPAIRMENT OF BRAIN ENERGY METABOLISM IN EXPERIMENTAL INTRACEREBRAL HEMORRHAGE

L. N. Maslov

Siberian Branch of the All-Union Cardiological Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Tomsk

Intracerebral hemorrhage impaired the functional activity of rat brain mitochondria. After experimental insult the rate of succinate and α -ketoglutarate oxidation was decreased at the states 3 and 4 in brain mitochondria as well as in presence of 2,4-dinitrophenol. The rate of phosphorylation was also decreased in oxidation of both NAD- and FAD-dependent substrates.

УДК 615.246.9.033.07+616-008.949.4:615.246.9

Е. К. Плотникова, Н. Я. Головенко, В. Г. Зиньковский,
Н. Г. Лукьяненко, О. В. Жук, С. С. Басок

ТРАНСПОРТ И МЕТАБОЛИЗМ МЕМБРАНОАКТИВНОГО КОМПЛЕКСОНА В ОРГАНИЗМЕ МЫШЕЙ

Физико-химический институт им. А. В. Богатского АН УССР, Одесса

Выделение и изучение свойств мембраноактивных комплексонв природного происхождения дало возможность модифицировать их молекулы, а также получать новые синтетические аналоги: краун-эфиры, криптанды и др. [1]. Большинство этих веществ осуществляет транспорт катионов через биологические мембраны по градиенту электрического потенциала. Такие ионофорные свойства макрогетероциклов дают возможность использовать их как инструменты в изучении функций биомембран, а также предполагать их применение в качестве биологически активных веществ.

В этой связи особый интерес представляют краун-эфиры с фармакофорными группами (например, аминокислоты, пептиды и др.), так как действие «традиционных» биологически активных веществ, входящих в эти группы, может быть усилено в результате облегчения их транспорта че-

рез гистогематические барьеры и клеточные мембраны. Синтез многочисленных краун-эфиров и их аналогов, а также изучение их фармакологических свойств показали, что эти соединения обладают иммуномодулирующими свойствами с преимущественной стимуляцией клеточных реакций [2, 3], выраженной противосудорожной активностью с анксиолитическим и антигипоксическим эффектами [5], а также ноотропным действием [4]. Однако для мембраноактивных макрогетероциклов совершенно не изучены процессы транспорта, метаболизма и выведения из организма экспериментальных животных.

Для изучения особенностей распределения по органам и тканям мышей полифункциональных макрогетероциклов и их метаболитов нами синтезирован меченый N-(3 H-аминоацетил)-1-аза - 4,7,10,13 - тетраоксациклопентадекан хлоргидрат (АТЦХ).

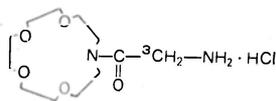


Рис. 1. Химическая формула АТЦХ.

Это соединение, как следует из формулы (рис. 1), представляет собой ацильное производное мембраноактивного комплексона (аза-15-краун-5), содержащее в качестве заместителя фармакофорный фрагмент — остаток глицина.

Методика

Опыты проведены на беспородных мышках-самцах с массой тела 18—22 г. Мембраноактивный макрогетероцикл с удельной радиоактивностью 0,04 Ки/моль вводили животным внутривенно и перорально в дозе 100 мг/кг. Через 2, 5, 10, 20, 30 мин, а также через 1, 2, 4, 6, 12 и 24 ч животных декапитировали, органы и ткани извлекали. Образцы плазмы крови и гомогенатов (1:5) в количестве 0,3 мл растворяли в 8 мл трипон-Х-100 толуольном сцинтилляторе и определяли содержание общего радиоактивного материала. Количество свободных метаболитов, связанных с белками, а также радиохроматографический анализ метаболитов осуществляли по предложенным ранее методам [6, 7].

Радиоактивность измеряли на приборе Вексман LC-100С при внешней и внутренней стандартизации образцов. Опытные данные анализировали в соответствии с алгоритмами [8, 9].

Результаты и обсуждение

Исследование распределения в органах и тканях мышей общего радиоактивного материала при внутрисосудистом введении АТЦХ показало быстрое поступление вещества в органы и ткани (табл. 1). Максимальная радиоактивность отмечена через 2 мин. Наиболее высокий уровень ^3H -продуктов обнаружен в почках, печени, плазме крови и селезенке животных. Кинетика содержания АТЦХ и его метаболитов в указанных органах и плазме крови мышей биэкспоненциальна (рис. 2). Быстрая фаза наблюдается в интервалах исследования от 2 до 30 мин. В этот период снижение концентрации АТЦХ в плазме крови достигает 0,15, в почках — 0,17 и печени — 0,27 исходного уровня радиоактивности. Постоянные скорости процесса элиминации равны соответственно 3,9; 3,5 и 2,6 ч^{-1} . Быстрая фаза распределения АТЦХ практически не от-

Таблица 1

Содержание (в имп. мин $^{-1}$, ч $^{-1}$, 10^3) ^3H -продуктов в органах и тканях мышей после внутривенного введения ^3H -АТЦХ ($M \pm m$; $n=6$)

| Орган | Время после введения | | | | | | | | | | | |
|-----------|----------------------|--------------|--------------|-------------|-------------|------------|-----------|-------------|-----------|-----------|-----------|--|
| | мин | | | ч | | | | | | | | |
| | 2 | 5 | 10 | 20 | 30 | 1 | 2 | 4 | 6 | 12 | 24 | |
| Печень | 13 100±562 | 11 500±802 | 9 290±625 | 5 480±562 | 4 400±1 050 | 2 310±690 | 1 760±366 | 880±445 | 1 840±942 | 1 250±211 | 990±147 | |
| Плазма | 13 300±985 | 6 670±578 | 3 800±194 | 3 040±291 | 1 800±176 | 1 210±123 | 1 760±936 | 1 010±517 | 787±162 | 675±111 | 501±44 | |
| Мозг | 1 980±481 | 5 500±2 590 | 1 400±464 | 908±153 | 2 620±879 | 1 210±675 | 810±445 | 1 080±240 | 980±324 | 957±185 | 2430±1200 | |
| Селезенка | 2 990±936 | 5 100±2 340 | 3 270±648 | 2 680±929 | 3 850±1 300 | 3 080±1240 | 916±610 | 1 900±1 060 | 1 920±515 | 1 400±340 | 1223±572 | |
| Мышцы | 4 540±1 200 | 3 220±410 | 3 030±135 | 3 170±168 | 2 030±170 | 1 410±243 | 743±134 | 196±30 | 275±51 | 330±125 | 240±73 | |
| Почки | 26 200±1 670 | 17 100±2 070 | 13 200±1 380 | 8 840±1 940 | 6 420±1 820 | 3 010±543 | 530±180 | 1 380±481 | 1 360±188 | 1 470±138 | 947±180 | |
| Легкие | 2 700±600 | 1 370±595 | 1 150±219 | 497±167 | 185±66 | 73±53 | 200±40 | 100±20 | 70±10 | 20±20 | — | |
| Сердце | 3 520±348 | 3 170±526 | 2 310±144 | 1 370±170 | 747±80 | 352±145 | 113±52 | 873±433 | 355±123 | 673±533 | 717±606 | |
| Жир | 3 970±2 500 | 2 015±438 | 2 220±546 | 3 700±1 440 | 1 280±110 | 2 210±770 | 50±10 | 300±140 | 140±40 | 215±105 | 90±70 | |

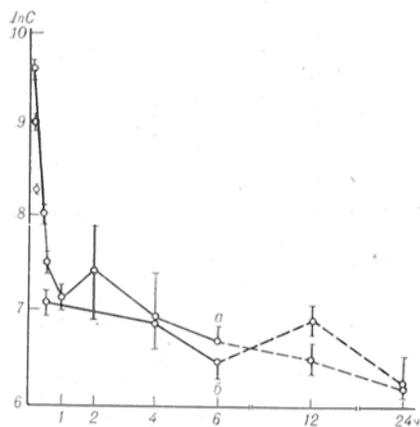


Рис. 2. Зависимость (In C) содержания ³H-продуктов от времени опыта в плазме крови мышей после внутривенного (а) и перорального (б) введения АТЦХ (100 мг/кг).

мечена в головном мозге животных, а наименьшая концентрация вещества обнаруживается в жировой и легочной тканях мышей. Нами не отмечено органа или ткани, функционирующих как «депо» мембраноактивного комплекса.

При пероральном введении АТЦХ его содержание в органах и тканях оказывается значительно ниже (ввиду отсутствия быстрой фазы распределения), чем при внутривенном (табл. 2). Такая закономерность характерна для многих лекарственных веществ.

Ранее было показано [6], что АТЦХ в организме мышей подвергается интенсивному метаболизму. Основные метаболиты АТЦХ, обнаруженные в моче, представляют собой свободные, экстрагируемые хлороформом производные. С учетом этого факта, а также того, что в клетках печени находятся ферменты, катализирующие метаболические превращения ксенобиотиков, были изучены некоторые сто-

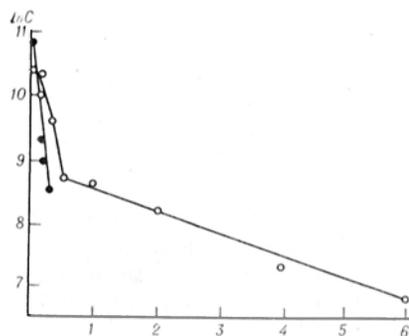


Рис. 3. Зависимость (In C) содержания в имп/мин · 10³ свободных метаболитов АТЦХ в плазме крови (черные кружки) и головном мозге (светлые кружки) мышей от времени опыта (ч) после внутривенного введения соединения.

роны распределения и обмена АТЦХ в этом органе. Для сравнения аналогичные исследования проведены и в плазме крови.

С этой целью были разработаны методы [6], позволяющие количественно (95 %) извлекать и разделять АТЦХ, а также его свободные, водорастворимые и связанные с белками метаболиты.

Достоверное наличие в плазме крови свободных метаболитов АТЦХ, определяющих быструю фазу кинетической схемы распределения, было отмечено только в интервале от 2 до 30 мин опыта (рис. 3). Снижение их концентрации осуществлялось с постоянной скоростью 7,9 ч⁻¹ (T_{0,5} = 5,3). Содержание АТЦХ и его свободных метаболитов в печени снижается двухфазно. Кинетика содержания АТЦХ и его свободных метаболитов в интервале первых 6 ч протекает согласно уравнению:

$$C (\text{имп} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}) \cdot 10^3 = 28,9e^{-1,27t} + 8,4e^{-0,39t}$$

Отличительной особенностью данной

Таблица 2

Содержание ³H-продуктов в органах и тканях мышей после перорального введения ³H-АТЦХ (100 мг/кг)

| Орган | Время после введения, ч | | | | |
|-----------|-------------------------|-------------|-------------|---------------|-------------|
| | 0,5 | 4 | 6 | 12 | 24 |
| Печень | 2 030 ± 160 | 2 100 ± 850 | 2 040 ± 680 | 3 000 ± 1 190 | 1 340 ± 550 |
| Плазма | 1 200 ± 200 | 986 ± 245 | 750 ± 93 | 988 ± 155 | 500 ± 120 |
| Мозг | 344 ± 137 | 440 ± 440 | 436 ± 144 | 460 ± 61 | 275 ± 132 |
| Селезенка | 443 ± 162 | 273 ± 116 | 150 ± 11 | 190 ± 64 | 380 ± 280 |
| Мышцы | 517 ± 103 | 399 ± 130 | 275 ± 150 | 960 ± 520 | 508 ± 95 |
| Почки | 1 240 ± 214 | 1 060 ± 415 | 380 ± 91 | 340 ± 50 | 410 ± 100 |
| Сердце | 275 ± 75 | 130 ± 110 | — | 220 ± 220 | 580 ± 580 |
| Жир | 190 ± 70 | 333 ± 164 | 320 ± 120 | 780 ± 780 | 40 ± 40 |

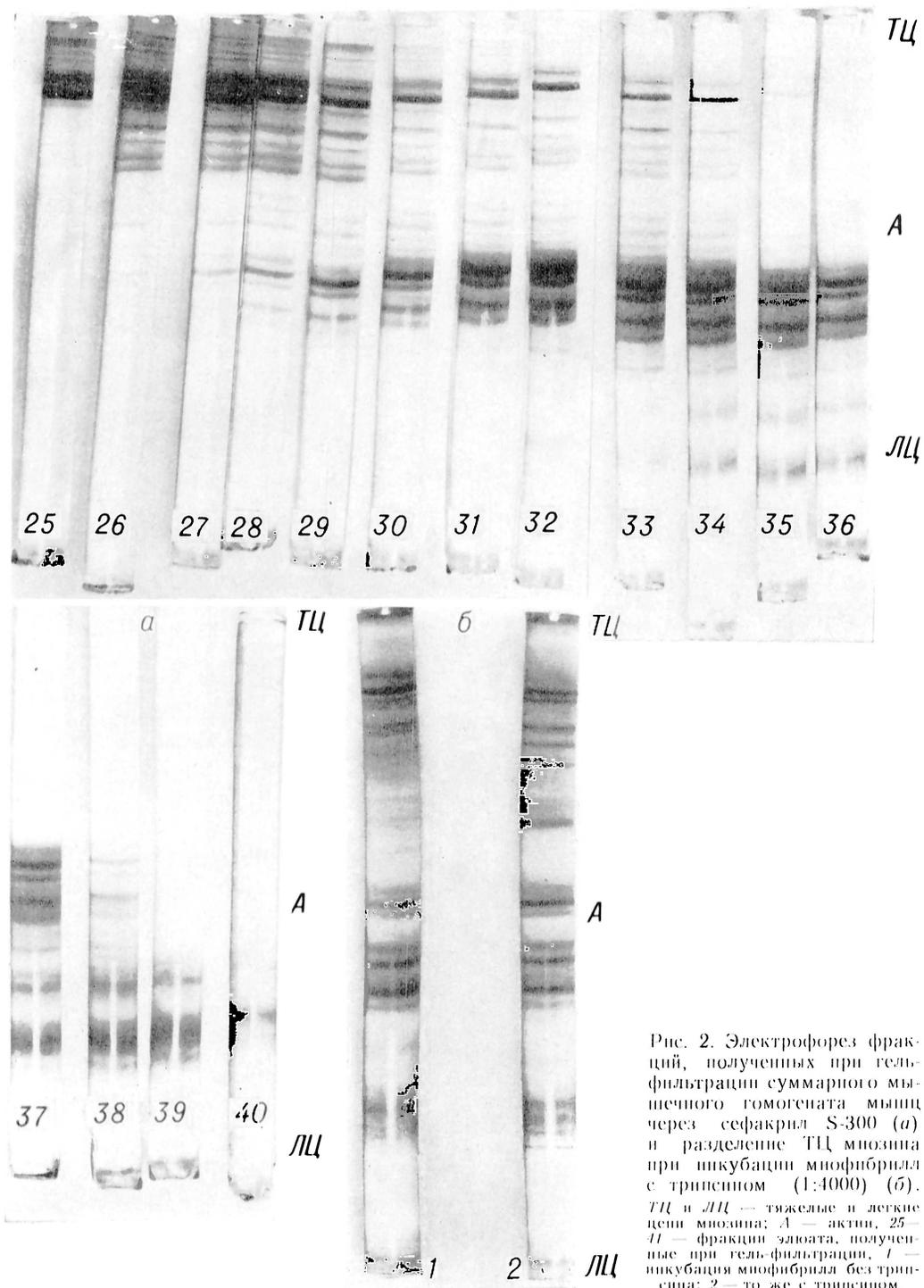
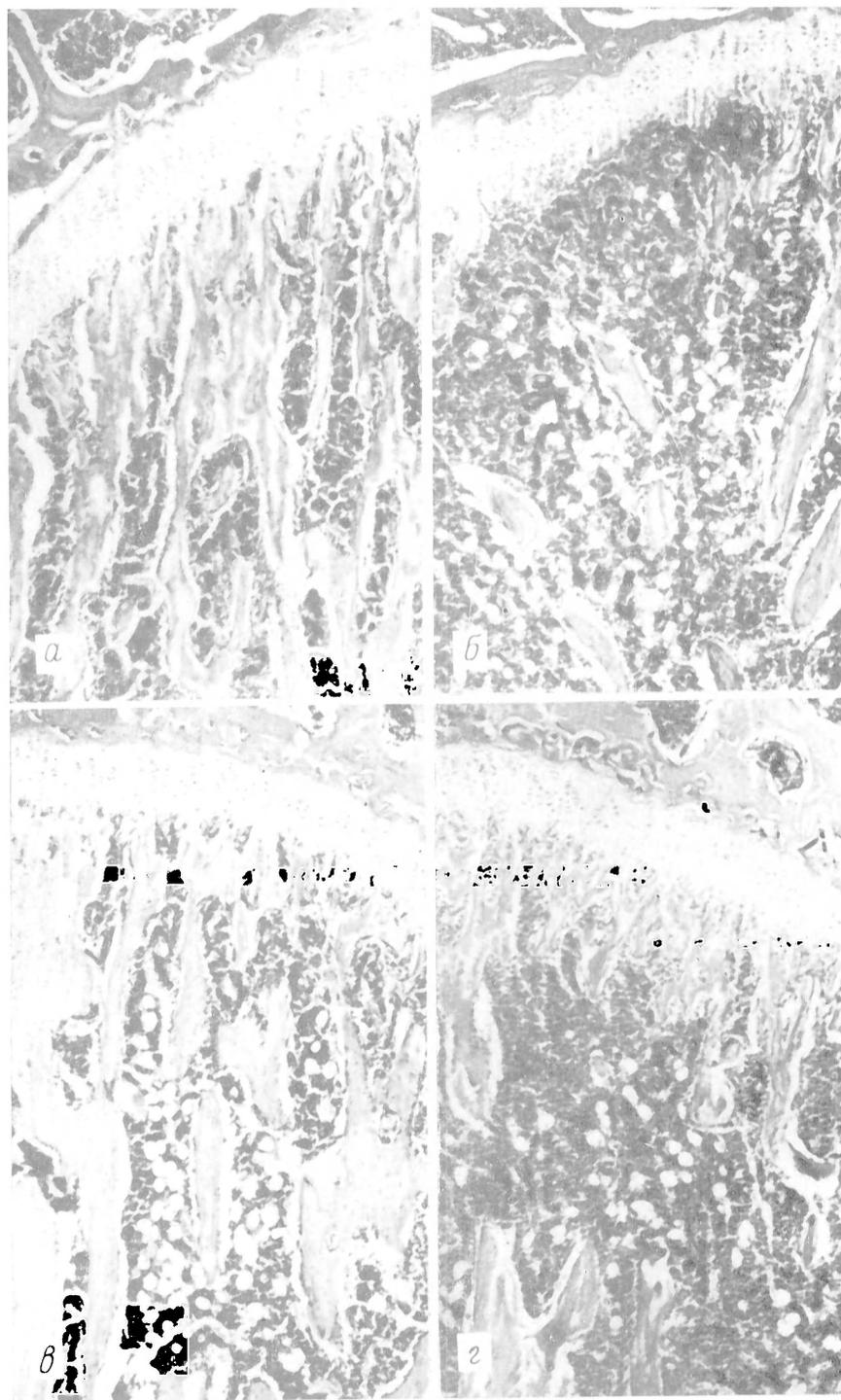


Рис. 2. Электрофорез фракций, полученных при гель-фильтрации суммарного мышечного гомогената мышц через сефакрил S-300 (а) и разделение ТЦ миозина при инкубации миофибрилл с трипсином (1:4000) (б). ТЦ и ЛЦ — тяжелые и легкие цепи миозина; А — актин; 25 — *И* — фракция элюата, полученная при гель-фильтрации; 1 — инкубация миофибрилл без трипсина; 2 — то же с трипсином.



ЭПР и губчатая кость метафиза большеберцовой кости крысы при введении $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ и $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

а — контроль; *б* — гипокinesия (толщина ЭПР уменьшена, первичная и вторичная спонгиозы сильно разрежены, объем их уменьшен); *в* — гипокinesия + $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ в дозе 1,25 мкг (толщина ЭПР уменьшена, объем первичной и вторичной спонгиоз близок к контролю); *г* — гипокinesия + $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ в дозе 0,15 мкг (толщина ЭПР, объем первичной и вторичной спонгиоз уменьшены).
Окраска гематоксилином и эозином. Ув.: 3,5 об., 7 ок.

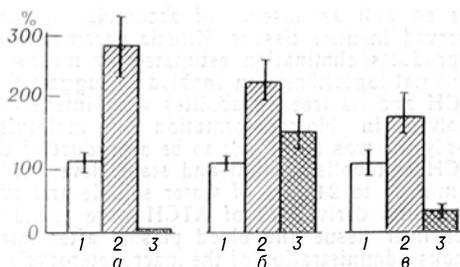


Рис. 4. Относительное содержание (в % от плазмы крови) ^3H -продуктов в плазме крови (1), печени (2) и головном мозге (3) мышей через 30 мин после инъектирования животным глицина (а), а также внутривенного (б) и перорального (в) введения АТЦХ.

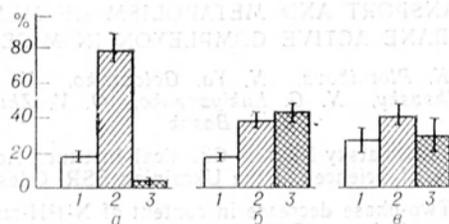


Рис. 5. Относительное содержание (в % от общей радиоактивности) ^3H -продуктов в хлороформных экстрактах (1), водной фазе (2) и белковой фракции (3) гомогенатов (1:5) печени мышей через 30 мин после инъектирования им глицина (а), а также внутривенного (б) и перорального (в) введения АТЦХ.

схемы распределения является высокое значение расчетной величины постоянной элиминации ($k=1,3 \text{ ч}^{-1}$), что предполагает интенсивное вовлечение свободных производных макрогетероцикла в дальнейшую биотрансформацию.

Обращает на себя внимание также высокое содержание в печени водорастворимых и связанных с белками производных макрогетероцикла. Стационарная концентрация указанных производных достигалась уже через 0,17 ч после внутривенного введения АТЦХ и сохранялась в течение суток.

Количество водорастворимых и связанных с белками ^3H -производных было аналогичным при обоих вариантах введения.

Наличие значительных количеств метаболитов АТЦХ в составе белков печени, так же как и его водорастворимых производных, позволяет сопоставить характер распределения изучаемого макрогетероцикла с аналогичными показателями при введении животным глицина.

На рис. 4 представлено относительное содержание ^3H -продуктов в плазме крови, головном мозге и печени мышей через 30 мин после внутривенного и перорального введения АТЦХ и ^3H -глицина в эквимолярных дозах.

Введение АТЦХ приводит к образованию значительных количеств ^3H -продуктов, связанных с белками печени. Концентрация их достоверно превышает ($P < 0,05$) содержание связанной с белками печени радиоактивности, обнаруживаемой после введения животным ^3H -глицина (рис. 5).

Приведенные выше данные и результаты дополнительной серии ис-

следований доказали, что после введения АТЦХ глицин в печени и плазме крови мышей в виде свободного метаболита не обнаруживается. Исходя из этого можно предположить, что последний не является метаболитом АТЦХ. Глицин не обнаружен и в хлороформных экстрактах мочи и кала мышей после введения им макрогетероцикла [6].

Следовательно, кинетика распределения АТЦХ в организме мышей характеризуется двухфазным снижением его содержания при отсутствии кумуляции, а также интенсивным метаболизмом и обменом между плазмой крови и органами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Богатский А. В. // Биорган. химия. — 1983. — № 11. — С. 1445—1482.
2. Богатский А. В., Назаров Е. И., Головенко Н. Я., Лукьяненко Н. Г. // Вестн. АМН СССР. — 1984. — № 11. — С. 8—12.
3. Богатский А. В., Филиппова Т. О., Бритва И. Э. и др. // Хим.-фарм. журн. — 1984. — № 10. — С. 1191—1193.
4. Воронина Т. А., Головенко Н. Я., Лукьяненко Н. Г. и др. // Всесоюзная конф. по химии микроциклов, 2-я: Тезисы докладов и сообщений. — Одесса, 1984. — С. 198.
5. Гарибова Т. Л., Карасева Т. Л., Тимофеева М. Э. и др. // Там же. — 1984. — С. 195.
6. Зиньковский В. Г., Плотникова Е. К., Жук О. В., Басок С. С. // Там же. — С. 185.
7. Плотникова Е. К., Жук О. В., Зиньковский В. Г. и др. // Там же. — С. 186.
8. Плохинский Н. А. Алгоритмы биометрии. 2-е изд. — М., 1980.
9. Фирсов А. А., Пиотровский В. К. // Фармакология. Химнотерапевтические средства. — М., 1984. — Т. 14. — С. 114—224.

Поступила 21.07.75

TRANSPORT AND METABOLISM OF MEMBRANE ACTIVE COMPLEXON IN MICE

E. K. Plotnikova, N. Ya. Golovenko, V. G. Zin'kovsky, N. G. Luk'yanenko, O. V. Zhuk, S. S. Basok

A. V. Bogatsky Physico-Chemical Institute, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Odessa

Two-phase decrease in content of N-(³H-aminoacetyl)-1-aza-4,7,10,11-tetraoxacyclopentadecane hydrochloride (ATCH) and of its metabo-

lites as well as absence of accumulation were observed in mice tissues. Kinetic parameters of ³H-products elimination estimated by means of sequential logarithmation enabled to suggest that ATCH and its free metabolites were intensively involved in biotransformation of molecules. ³H-glycine was found not to be a product of the ATCH metabolism. High and stable level (from 10 min up to 24 hrs) of water soluble and protein-bound derivatives of ATCH were found in mice liver tissue and blood plasma after intravenous administration of the macroheterocycle.

УДК 615.451.23.03:616.153:577.112.856]-034

Г. А. Ягодин, Е. В. Юртов, Т. В. Гусева

ИЗВЛЕЧЕНИЕ КОМПОНЕНТОВ ЛИПОПРОТЕИДОВ ЭМУЛЬСИЯМИ

Химико-технологический институт им. Д. И. Менделеева, Москва

В настоящее время в целях детоксикации организма наряду с широко применяемыми сорбционными методами (гемосорбция) исследуют экстракционные, как в традиционном варианте жидкостной экстракции, так и с использованием множественных эмульсий [4, 7]. В последнем случае экстрагируемое вещество переходит из крови в органическую фазу, а затем — в водную, диспергированную в ней с помощью поверхностно-активного вещества (ПАВ). При этом органическая фаза играет роль жидкой мембраны, разделяющей кровь и извлекающую водную фазу. Образующаяся при этом множественная эмульсия (рис. 1) состоит из извлекающей фазы *R*, заключенной в оболочку жидкой мембраны *S* с добавками ПАВ и распределенной в виде глобул размером 0,2—5,0 мкм в исчерпываемой фазе (*F*).

Эмульсия *R* в *S* (типа «вода в масле») может быть приготовлена с помощью ультразвука или мешалки с достаточно большим числом оборотов (~5000 об/мин).

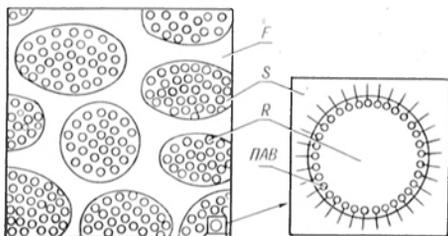


Рис. 1. Множественная эмульсия. Обозначения в тексте.

Ранее [7] нами было предложено использовать метод множественных эмульсий для экстракции холестерина (ХС) из крови. При этом в качестве органической мембраны применяли нетоксичные вазелиновое и вакуумное (ВМ-1, ВМ-5) масла. Совместимые с кровью мембраны позволили использовать во внутренней фазе эмульсии веществ, связывающие или растворяющие ХС, которые трудно применить при обычной экстракции, так как они оказывают неблагоприятное влияние на кровь при непосредственном контакте с ней.

Использование в качестве ПАВ нетоксичного сорбитанолсата позволило создать эмульсии «вода в масле», устойчивые в течение нескольких суток, что дало возможность использовать их в качестве эмульсионного экстрагента для извлечения ХС из крови.

Цель данной работы — изучение распределения компонентов липопротеидов (ЛП) при экстракции ХС во множественных эмульсиях с различным составом внутренней фазы. При этом наибольший интерес представляют эмульсии, извлекающие ХС из атерогенных β - и пре- β -ЛП и слабо затрагивающие антиатерогенные α -ЛП.

Методика

В экспериментах были использованы кровь свиньи и кролика, а также фракции ЛП плазмы крови кролика с алиментарной гиперхолестеринемией, полученные методом препаративного ультрацентрифугирования на центрифуге УЦП-65 [6].

В течение первых 18 ч флотации в растворе NaBr плотностью 1,006 г/мл (36 000 об/мин,

7—13 °С) выделяли ЛП очень низкой плотности (ЛПОНП), затем в течение 18 ч флотации в растворе NaBr плотностью 1,065 г/мл (36 000 об/мин, 7—13 °С) — ЛП низкой плотности (ЛПНП) и, наконец, в течение 24 ч флотации в растворе NaBr плотностью 1,21 г/мл (40 000 об/мин, 17—20 °С) — ЛП высокой плотности (ЛПВП).

Растворы ЛП подвергали диализу против большого объема изотонического физиологического раствора (0,14 М NaCl), $V_{\text{ЛП}} : V_{\text{NaCl}} = 1 : 20$. Пробы биологических жидкостей и растворов ЛП контактировали с эмульсиями в термостатированных делительных воронках (при 15 °С) в течение 1 ч при умеренном перемешивании и соотношении объемов фаз эмульсия: кровь, равном 1:2, или эмульсия: раствор ЛП, равном 1:1. По окончании экстракции фазы разделяли. Содержание компонентов ЛП в растворе и в плазме определяли до экстракции и после нее.

Содержание основных биохимических компонентов контролировали с помощью анализатора типа «Техникон».

Общий и свободный ХС анализировали по Ильки и Станковичене [2], белок (Б) — по Лоурн [2], фосфолипиды (ФЛ) и триглицериды (ТГ) — по методикам [2] и [5]. Результаты обрабатывали статистически с использованием t-распределения [1]. Каждая точка является результатом 5 независимых измерений.

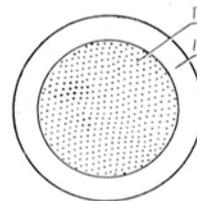
Эмульсии для экстракции ХС готовили с помощью двухлопастной мешалки и перед экстракцией обрабатывали буферным изотоническим раствором рН 7,4 так же, как и в работе [3].

Результаты и обсуждение

Опробованы различные составы внутренней извлекающей фазы: а) смесь этилового спирта, диэтилового эфира с водой (или изотоническим раствором); б) суспензии гликозидов в изотоническом растворе и его смесях с этиловым спиртом; в) раствор MnCl₂ и гепарина в буферном изотоническом растворе (рис. 2). Последний состав был выбран потому, что ЛПОНП и ЛПНП связываются в нерастворимый комплекс с гепарином в присутствии ионов Mn²⁺. Если бы эмульсия такого состава извлекала ХС из раствора ЛП, то этот факт свидетельствовал бы об экстракции ЛП из раствора в виде целых частиц.

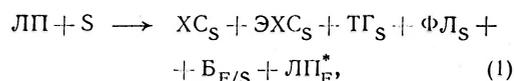
В ходе экспериментов было установлено, что эмульсия, содержащая во внутренней фазе раствор MnCl₂ и гепарин в буферном изотоническом растворе, не экстрагирует ХС из крови. Этот факт, а также отсутствие пропорциональности между количествами извлекаемых компонентов ЛП и их первоначальным составом в исходном растворе указывает на извлечение в

Рис. 2. Составы эмульсий для извлечения ХС. I. Внутренняя фаза (70—75 % об.). 1) 2,5 мМ раствор дигитонина (ДГТ); 2) 2,5 мМ раствор томатынна (ТОМ); 3) 5 % (об.) раствор (C₂H₅)₂O и 15 % (об.) раствор C₂H₅OH; 4) 0,08 М раствор MnCl₂ и 500 Ед/мл гепарина.



(1—4) — в буферном изотоническом растворе. II. Жидкая мембрана (25—30 % об.) (1—4) 2,5 % (об.) раствор сорбитанолеата в вазелиновом масле.

ходе экстракции не целиком ЛП, а только их компонентов. Таким образом, для всех эмульсий справедливо уравнение:



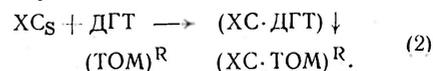
так как в водной фазе, вероятно, остаются видоизмененные, обедненные липидами частицы ЛП*, изучение свойств которых требует отдельного исследования.

Эмульсионные экстрагенты 1, 2 и 3 (см. рис. 2) способны селективно извлекать липиды (в частности, ХС) из крови, не изменяя основные биохимические показатели (табл. 1).

Так же, как и при экстракции ХС три-н-октиламинол, доля извлекаемого эмульсиями ХС зависит от прочности связи ХС в ЛП, причем степень извлечения ХС ($R_{\text{ХС}}$, %) возрастает в ряду $\alpha < \beta < \text{пре-}\beta$ -ЛП (табл. 2).

Для изучения распределения компонентов ЛП между эмульсиями и исходным раствором ЛП проводили экстракцию составами 1, 2 и 3 (см. рис. 2) из растворов ЛП. Полученные результаты приведены в табл. 3.

Как видно, эмульсии, содержащие во внутренней фазе гликозиды, селективно экстрагируют свободный ХС атерогенных ЛП, извлекая при этом также некоторое количество фосфолипидов и триглицеридов и незначительно затрагивая белок. Таким образом, при экстракции эмульсиями с гликозидами в области границы раздела фаз S/R (мембрана — внутренняя фаза) происходит связывание свободного ХС с образованием нерастворимого в воде аддукта:



Извлечение компонентов плазмы крови эмульсиями

| Проба плазмы | Компонент плазмы крови и его концентрация | | | | | | | | | | | |
|---|---|----------------|-----------------|------------------|--------------|----------------|-------------|-----------------|------------|---------|-----------------|-------------|
| | Cl ⁻ | K ⁺ | Na ⁺ | Ca ²⁺ | альбумин | Р _n | общий белок | общий билирубин | N мочевины | глюкоза | мочевая кислота | общий белок |
| | мг-экв/л | | | | мг на 100 мл | | % | мкМ | мм | | | |
| Исходная | 117+10 | 2,9+0,1 | 108+5 | 3,5+0,1 | 1,5+0,1 | 1,7+0,1 | 5,6+0,2 | 8,6+2,0 | 2,14+0,05 | 52+1 | 0,18±0,02 | 4,65±0,08 |
| После экстракции эмульсиями: с дигитонином | 114 | 2,8 | 106 | 3,5 | 1,4 | 1,6 | 5,5 | 8,6 | 2,14 | 52 | 0,18 | 3,18 |
| с томатонином | 115 | 2,9 | 107 | 3,5 | 1,5 | 1,8 | 5,4 | 8,0 | 2,16 | 51 | 0,18 | 3,36 |
| со спиртом и эфиром | 112 | 3,0 | 108 | 3,5 | 1,4 | 1,7 | 5,7 | 8,4 | 2,12 | 52 | 0,17 | 3,85 |

Т а б л и ц а 2

Извлечение ХС из плазмы крови кролика и растворов ЛП

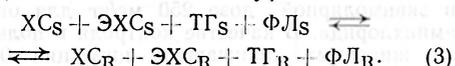
| Проба биологических жидкостей | Концентрация ХС, мм | | | | Степень извлечения ХС, % | | | |
|---|---------------------|-----------|-----------|-----------|--------------------------|----------|----------|----------|
| | плазма | ЛПОНП | ЛПНП | ЛПВП | плазма | ЛПОНП | ЛПНП | ЛПВП |
| Исходная | 8,68±0,08 | 3,73±0,05 | 3,93±0,05 | 0,62±0,03 | — | — | — | — |
| После контакта с эмульсиями: с томатонином | 6,32 | 2,38 | 2,97 | 0,52 | 27,0±0,8 | 36,2±0,8 | 24,4±0,8 | 16,1±0,8 |
| со спиртом и эфиром | 6,83 | 2,79 | 3,13 | 0,52 | 21,4 | 25,2 | 20,5 | 16,1 |

Извлечение компонентов ЛПЭ эмульсиями

| Класс ЛПЭ | Эмульсия (ср. рис. 2) | Степень извлечения компонентов ЛПЭ, % ($V_{\text{вод.}}:V_{\text{эмул.}} = 1:1$) | | | | |
|-----------|--------------------------|--|--------------|----------|------|--|
| | | общий ХС | свободный ХС | ФЛ | ТГ | Б |
| ЛПОНП | 1 | 31,4±0,8 | 82±3 | 26,5±0,8 | 18±3 | 15,0±0,8 |
| | 2 | 28,3 | 72 | 26,5 | 16 | 11,5 |
| | 3 | 23,8 | 22 | 38,5 | 21 | 13,0 |
| ЛПНП | 1 | 30,4±0,8 | 79±3 | 20,8±0,8 | 15±3 | 13,0±0,8 |
| | 2 | 27,3 | 73 | 19,5 | 17 | 14,5 |
| | 3 | 21,8 | 25 | 29,2 | 21 | 14,5 |
| ЛПВП | 1 | 14±1 | — | — | — | В пределах погрешности определения (±1,5%) |
| | 2 | 13 | — | — | — | |
| | 3 | 11 | — | — | — | |

Примечание. Прочерк — определение не проводили.

Эмульсии на основе смеси этилового спирта и диэтилового эфира экстрагируют все липиды примерно в одинаковой степени (к сожалению, ФЛ — довольно значительно), не извлекая заметно белок. По-видимому, использование в составе эмульсий добавок таких веществ, как лецитин, позволит уменьшить степень извлечения ФЛ. Распределение ХС, ЭХС, ТГ и ФЛ между внутренней фазой и мембраной для эмульсии, содержащей спирт и эфир, можно описать уравнением:



Таким образом, экстракция эмульсиями — процесс извлечения компонентов ЛПЭ, обусловленный либо образованием нерастворимых соединений во внутренней фазе, либо растворимостью во внутренней фазе и мембране экстрагируемых компонентов. Этот процесс сопровождается разрушением связей между белками и липидами в ЛПЭ и тем полнее, чем слабее эти связи.

Эмульсии, содержащие гликозиды, перспективно исследовать в целях извлечения свободного ХС из атерогенных ЛПОНП и ЛПНП, а эмульсии, содержащие спирт и эфир, — в целях уменьшения общего количества липидов в биологических жидкостях в случае гиперлипемии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Доерфель К. Статистика в аналитической химии: Пер. с нем. — М., 1969.

2. Рубин В. И., Ларский Э. Г., Орлова Л. С. Биохимические методы исследования в клинике. — Саратов, 1980.
3. Ягодина Г. А., Лопухин Ю. М., Юртов Е. В. и др. // А. с. 1066983 (СССР).
4. Ягодина Г. А., Юртов Е. В., Гусева Т. В. // Сорбционные методы детоксикации и иммунокоррекции в медицине. — Харьков, 1982. — С. 328—329.
5. Eggstein M. // Klin. Wschr. — 1966. — Bd 44. — S. 262—267.
6. Havel R. J., Eder H. A., Bragdon J. H. // J. clin. Invest. — 1955. — Vol. 34. — P. 1345—1353.
7. Yagodin G. A., Lopukhin Yu. M., Yurtov E. V. // ISEC'83. — Denver, 1983. — P. 385—386.

Поступила 25.07.85

EXTRACTION OF LIPID COMPONENTS BY MEANS OF EMULSIONS

G. A. Yagodin, E. V. Yurtov, T. V. Guseva

D. I. Mendeleev Chemico-Technological Institute, Moscow

Extraction of lipoprotein components from water solutions by means of emulsions similar to "water in oil" was studied, where either suspension of glycosides in buffer or water solution of diethyl ether and ethanol were used as an inner phase of the emulsion. The first type of extraction enabled to isolate selectively free cholesterol from lipoproteins and the second type—lipids, respectively. The rate of cholesterol isolation from lipoproteins of various classes, dependent on the strength of cholesterol binding in lipoproteins was increased as follows: $\alpha < \beta < \text{pre-}\beta$ -lipoproteins; the procedure allowed to isolate selectively cholesterol from atherogenous lipoproteins.

Д. А. Опарин, Т. И. Зиматкина, Ю. М. Островский

ПРЕИМУЩЕСТВА ОКСИТИАМИНБРОМИДА КАК СПЕЦИФИЧЕСКОГО ИНГИБИТОРА АКТИВНОСТИ ТИАМИНЗАВИСИМЫХ ФЕРМЕНТОВ

Отдел регуляции обмена веществ АН БССР, Гродно

Окситиамин — гидрохлорид-4-метил-3-[(2-метил-4-окси-5-пиримидинил)-5-(2-оксиэтил)тиазолийхлорида] — представляет собой один из наиболее важных антагонистов витамина В₁, применение которого в биохимических исследованиях позволяет избирательно ингибировать катализируемые витамином В₁ реакции путем угнетения активности ряда тиаминзависимых ферментов [5]. Кроме того, имеются предположения к использованию данного антивитамина в качестве лечебного средства при нарушениях липидного обмена [2], а также как канцеростатического агента, ухудшающего прививаемость и угнетающего развитие некоторых злокачественных опухолей у животных [3, 4, 8]. Однако широкое использование окситиамина в биохимических исследованиях ограничено тем, что данный антиметаболит у нас в стране не производится. Наиболее распространенные методы синтеза окситиамина в виде его хлористоводородной соли предполагают наличие в качестве исходного продукта тиаминхлорида [12, 13]. Поскольку отечественная промышленность выпускает витамин В₁ в основном в виде бромистоводородной соли, то получение окситиамина по вышеуказанным методикам сопряжено с рядом трудностей, а именно с необходимостью перевода тиаминбромид в тиаминосоединение, а затем — тиаминхлорид. Все это в конечном итоге снижает выход окситиамина и приводит к его загрязнению.

Целью настоящей работы явились разработка условий получения бромистоводородной соли окситиамина и проведение сопоставительного анализа его биологической активности с коммерческим окситиамином.

Методика

Синтез окситиамина осуществляют следующим образом: раствор 10 г тиаминбромида в смеси 100 мл 40 % НВг (ч. д. а.) и

100 мл воды кипятят в течение 10 ч. Полноту дезаминирования контролируют титриметрическим методом [6]. По окончании реакции раствор упаривают под уменьшенным давлением, к остатку добавляют 50 мл этанола и снова упаривают. После этого остаток растворяют в 100 мл метанола, фильтруют, к фильтрату добавляют 40 мл эфира и выдерживают раствор при 0 °С в течение 3 ч. Образовавшийся осадок отделяют, перекристаллизовывают из этанола и высушивают в вакуум-экстракторе над Р₂О₅. Выход гидрохлорида окситиамина (C₁₂H₁₇BrN₃O₂S) составляет 80—85 %. Т. пл. 197—200 °С, R_f 0,44 (н-бутанол — этанол — вода, 2 : 1 : 1, бумага "Fill-gak" № 11). Данные элементного анализа отвечают вычисленным значениям. ИК- и УФ-спектры окситиамина и коммерческого окситиамина идентичны.

Для сравнительного анализа использовали гидрохлорид окситиамина фирмы "Fergak" (ФРГ); остальные реактивы были отечественного производства.

Окситиамина вводили белым мышам-самцам (масса 23—25 г) в виде водного раствора однократно подкожно в дозе 253 мг/кг, в эквивалентной дозе 250 мг/кг для окситиамина. В качестве контроля использовали животных, получавших инъекции 0,85 % раствора NaCl. Животных содержали на полноценном рационе питания. В течение 12 ч перед декапитацией мыши не получали пищи.

Определение активности транскетолазы проводили по методу [9], иридатдегидрогеназы — по методу [10], содержание тиаминдифосфата устанавливали ферментативным способом [14]. Острую токсичность исследовали по методу Литчфилда и Вилкоксона в модификации Рота [1]. Полученные данные обрабатывали с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

При определении острой токсичности установлено, что окситиамина бромид оказывает меньшее токсическое действие (ЛД₅₀ = 2850 мг/кг) по сравнению с окситиамином (ЛД₅₀ = 1835 мг/кг). Это имеет важное значение в биохимических исследованиях, поскольку вследствие малого сродства окситиамина к тиаминпирофосфокиназе [11] соединение приходится вводить в больших дозах.

Сравнительная характеристика ингибирующей активности полученного окситиамина и коммерческого

Активность транскетолазы⁷ (в мкмоль седогентулозо-7-фосфата на 1 г ткани за 1 ч) через 3 сут, пируватдегидрогеназы (в мкмоль $K_3[Fe(CN)_6]$ на 1 г ткани за 20 мин через 3 ч и содержание тиаминдифосфата (в мкг на 1 г ткани) через 3 сут после введения бромисто- и хлористоводородных солей окситиамина ($M \pm m$; $n=6$)

| Ткань | Контроль | Окситиаминбромид | Окситиаминхлорид |
|-----------------------------|------------|------------------|------------------|
| Транскетолаза | | | |
| Печень | 437,8±14,5 | 311,1±9,7* | 249,6±12,1* |
| Ровь | 142,4±3,8 | 81,1±9,9* | 77,2±3,4* |
| Мозг | 107,5±4,5 | 95,9±3,4 | 95,6±3,1 |
| Пируватдегидрогеназа | | | |
| Печень | 119,4±8,9 | 39,6±3,9* | 36,1±3,0* |
| Тиаминдифосфат | | | |
| Печень | 4,3±0,2 | 4,7±0,3 | 3,6±0,3 |

* $P < 0,05$.

препарата в отношении важнейших тиаминзависимых ферментов — транскетолазы (КФ 2.2.1.1) и пируватдегидрогеназы (КВ 1.2.4.1) — в сроки максимального ингибирования этих ферментов под действием окситиаминхлорида [7] представлена в таблице. Как видно из приведенных данных, окситиаминбромид по характеру и степени своего действия на исследованные ферменты не отличается от коммерческого препарата. Окситиаминбромид, так же как и окситиаминхлорид, при введении в указанной дозе не изменял содержание тиаминдифосфата в печени животных.

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать вывод о целесообразности получения для биохимических исследований из тиаминбромида бромистоводородной соли окситиамина, преимуществами которой по сравнению с окситиаминхлоридом являются: более простой способ синтеза, высокий выход и чистота целевого продукта, меньшая токсичность при равной с коммерческим препаратом антивитаминой активности в организме.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беленький М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. — Л., 1963.
2. Буко В. У., Ларин Ф. С., Павленя А. К. // Вопр. питания. — 1977. — № 1. — С. 47—50.
3. Величко М. Г., Островский Ю. М. // Экспер. онкол. — 1984. — № 2. — С. 54—57.

4. Дьячкова Л. В., Шамаева Е. М., Платонова Г. Н. и др. // Вопр. мед. химии. — 1974. — № 2. — С. 203—207.
5. Островский Ю. М. Активные центры и группировки в молекуле тиамин. — Минск, 1975.
6. Островский Ю. М. // Экспериментальная витаминология. — Минск, 1979. — С. 176—223.
7. Островский Ю. М., Воскобоев А. И., Горенштейн Б. И. и др. // Биохимия. — 1979. — Т. 44. — № 9. — С. 1551—1557.
8. Требухина Р. В. Влияние окситиамина на активность транскетолазы в печени и опухоли крыс с саркомой 45. // Рукопись депонирована в ВИНТИ 14.04.83 г. — № 1991-83.
9. Bruns F. H., Dünwald E., Noltmann E. // Biochem. Z. — 1958. — Bd 330. — S. 497—507.
10. Gubler C. J. // J. biol. Chem. — 1961. — Vol. 236. — P. 3112—3120.
11. Johnson L. R., Gubler C. J. // Biochim. biophys. Acta. — 1968. — Vol. 156. — P. 85—96.
12. Matsukawa T., Hirano H., Yurugi S. // Meth. Enzymol. — 1970. — Vol. 18. — P. 141.
13. Rydon H. N. // Biochem. J. — 1951. — Vol. 48. — P. 383—384.
14. Ulrich I., Wittorf I. H., Gubler C. J. // Biochim. biophys. Acta. — 1966. — Vol. 113. — P. 595—603.

Поступила 25.07.85

ADVANTAGES OF HYDROXYTHIAMIN BROMIDE AS A SPECIFIC INHIBITOR OF THIAMIN-DEPENDENT ENZYMES

D. A. Oparin, T. I. Zimatkina, Yu. M. Ostrovsky
Department of Metabolism Regulation, Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Grodno

Production of hydrogenbromide salt of hydroxythiamin (Ht. HBr) from thiaminbromide was developed, its toxic and inhibitory properties towards transketolase and pyruvate dehydrogenase

were studied as compared with commercial preparation hydroxythiamin chloride (HT. HCl). As compared with HT. HCl, synthesis of HT. HBr was more simple, the higher yield and purity of

the end product were achieved. At the same time, the preparation was less toxic and exhibited the antivitaminous activity similar to the commercial chloride form.

УДК 616.153.441-074

Р. С. Тишенина

СОДЕРЖАНИЕ СОЕДИНЕНИЙ, РЕАГИРУЮЩИХ С 2-ТИБАРБИТУРОВОЙ КИСЛОТОЙ, В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ И БОЛЬНЫХ НЕКОТОРЫМИ ЭНДОКРИНОПАТИЯМИ

МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского

Одним из распространенных методов оценки образования вторичных продуктов свободно-радикального окисления липидов (перекисного окисления липидов) является определение концентрации малонового диальдегида (МДА). В основе метода лежит реакция МДА и 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК), в ходе которой при высокой температуре и кислой значении рН образуется окрашенный триметиновый комплекс ($\lambda_{\text{макс}}$ 532 нм), содержащий 1 молекулу МДА и 2 молекулы ТБК [1, 7, 11]. Хотя в реакцию с ТБК, кроме МДА, вступают и другие соединения, данный метод исследования считают адекватным [1, 5].

Предложена микрометодика, позволяющая определять концентрацию МДА в 20 мкл сыворотки в осажденном липид-белковом надмолекулярном комплексе по флуоресценции МДА [11, 12]. В клинической практике Японии этот метод получил широкое распространение [8—10].

В отечественной литературе имеется работа [6], в которой использован метод [11, 12]. Однако о концентрации реагирующих с ТБК соединений судили только на основании данных относительной флуоресценции [6], что не позволяет провести сопоставление полученных результатов с данными, опубликованными ранее [11]. Долгосрочный внутрилабораторный контроль качества при определении реагирующих с ТБК соединений в сыворотке крови человека не был осуществлен, что не позволяет судить о воспроизводимости и правильности полученных данных [2].

В работе были поставлены задачи: 1) выяснить возможность проведения долгосрочного внутрилабораторного

контроля качества на воспроизводимость при определении концентрации реагирующих с ТБК соединений в крови человека [11, 12]; 2) охарактеризовать возможные источники ошибок и способы их предотвращения при исследовании реагирующих с ТБК соединений; 3) определить содержание реагирующих с ТБК соединений в плазме крови здоровых людей и больных симптоматическим ожирением, обусловленным гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковыми заболеваниями.

Методика

Для проведения долгосрочного внутрилабораторного контроля на воспроизводимость использовали объединенную сыворотку крови людей. К одной части сыворотки добавляли ЭДТА- Na_2 (0,5 мг/мл), к другой — спиртовой раствор дибунола (1 мг/мл) в качестве антиоксиданта. Последний был любезно предоставлен нам Институтом химической физики АН СССР. После 30-минутного перемешивания обе порции сыворотки крови разливали в пластиковые пробирки, закрывали пробками и замораживали при -20°C .

Использовали препараты ТБК "Sigma" (США), фосфорновольфрамовой кислоты (ч.д.а.), ледяной уксусной кислоты, н-бутанола отечественного производства. В качестве стандарта был использован 1,1,3,3-тетраэтоксипропан — ТЭП ("Sigma", США). Для приготовления реактивов и проведения реакции использовали бидистиллированную воду.

Экстракцию реагирующих с ТБК соединений в бутанол осуществляли в течение 1 мин на вихревом смесителе Ritsch (ЛКВ, Швеция). Флуоресценцию бутанольных экстрактов измеряли на спектрофлуорометре MPF-4a ("Chitachi", Япония), при максимуме возбуждения 535 нм, максимуме флуоресценции 550 нм, ширине щелей 10, чувствительности 1, тонкой чувствительности 6 или 3. В пробы вносили по 20 мкл плазмы крови.

Обследовано 84 здоровых лица (обоих полов) в возрасте от 16 до 47 лет, не имеющих избытка массы тела и нарушений углеводного обмена; 186 пациентов с болезнью Иценко—Кушинга (лиц до лечения было 67, с рецидивом — 60, в период клинической ремис-

сии — 48, после двусторонней тотальной или субтотальной адреналэктомии по поводу болезни Иценко—Кушинга на фоне заместительной адекватной терапии — 11); с гипоталамическим ожирением — 65; с пубертатно-юношеским дисгипотитаризмом — 52; с первичным ожирением — 30.

Взятие крови осуществляли патошак из кубитальной вены, в пробирки, содержащие ЭДТА (1 мг/мл), с 9 до 10 ч утра. Пробирки помещали в ледяную баню, плазму отделяли от форменных элементов центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин на центрифуге с охлаждением (К-23, ГДР).

Результаты и обсуждение

Данные о зависимости интенсивности флюоресценции стандартных растворов ТЭП от его концентрации (в воде, этаноле или хлороформе) указывают на то, что ошибка параллельных определений была менее 0,5%, долгосрочная воспроизводимость, оцениваемая по коэффициенту вариации, составила 2,97% (при $n=52$).

Коэффициент вариации для контрольных сывороток разных серий колебался от 7,68 до 9,02%. При правильном хранении образцов плазмы крови и при однократном их использовании концентрация соединений, реагирующих с ТБК, в них не увеличивалась в течение 6 мес.

По нашим данным, существенны следующие факторы: а) 10% раствор фосфорновольфрамовой кислоты следует готовить за 3—4 дня до опыта, хранить при 4°C не более 2 нед, использовать в холодном виде; б) раствор ТБК необходимо готовить в день

опыта, на подогретой до 40°C бидистиллированной воде, добавляя ледяную уксусную кислоту непосредственно перед внесением в пробы при тщательном перемешивании; в) отделение центрифугированием липид-белкового надмолекулярного комплекса рекомендуется осуществлять после образования крупных хлопьев; г) все процедуры, в том числе и реакцию с ТБК, следует проводить в экстракционных пробирках одного и того же объема и диаметра, при закрытых пробках, избегать попадания прямых солнечных лучей на них; д) после термостатирования проб при 95°C пробирки необходимо охладить в ледяной бане в течение 7—10 мин; е) экстракцию реагирующих с ТБК соединений в бутанол следует осуществлять на вихревом смесителе в течение 1 мин, используя не менее 4 мл бутанола; ж) измерять флюоресценцию после завершения инкубации при 95°C следует не позже чем через 30 мин.

В таблице представлены данные о содержании реагирующих с ТБК соединений в плазме крови здоровых людей и больных симптоматическим ожирением, обусловленным гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковыми заболеваниями. У здоровых людей наши результаты исследований содержания реагирующих с ТБК соединений в крови соответствуют литературным данным [12]. Нами было подтверждено повышение концентрации МДА в крови людей старше 30 лет по срав-

Содержание реагирующих с ТБК соединений (МДА) в плазме крови здоровых людей и больных первичным и симптоматическим ожирением

| Группа обследуемых | Число обследованных | Содержание МДА | | |
|--|---------------------|----------------|----------------------|-------------------------------|
| | | нмоль на мл | нмоль на 1 г липидов | нмоль на 1 мг β-липопротеинов |
| Здоровые люди | 84 | 3,28±0,10 | 0,468 | 0,564 |
| в возрасте 15—20 лет | 35 | 3,09±0,15 | — | 0,566 |
| » » 21—30 » | 32 | 3,05±0,15 | — | 0,549 |
| » » 31—47 » | 17 | 3,64±0,15 | — | 0,591 |
| С первичным ожирением | 30 | 3,77±0,27° | 0,531 | 0,624 |
| С пубертатно-юношеским дисгипотитаризмом | 52 | 3,42±0,18* | 0,450 | 0,520 |
| С гипоталамическим ожирением | 65 | 4,51±0,17° | 0,586 | 0,673 |
| С болезнью Иценко—Кушинга: | | | | |
| до лечения | 67 | 5,15±0,14° | 0,687 | 0,660 |
| рецидив | 60 | 4,71±0,16° | 0,573 | 0,590 |
| ремиссия | 48 | 4,76±0,17° | 0,600 | 0,690 |
| после двусторонней адреналэктомии | 11 | 5,07±0,54° | 0,558 | 0,580 |
| С сахарным диабетом и ожирением | 20 | 5,31±0,26° | 0,620 | 0,620 |

Примечание. Достоверность различий ($P<0,05$) по сравнению с показателями здоровых. Звездочка — лица в возрасте от 15 до 20 лет, кружочек — вся группа.

нению с таковой людей моложе 20 лет [12].

У больных вторичным, симптоматическим ожирением содержание реагирующих с ТБК соединений было повышено. При пубертатно-юношеском диспитуитаризме также отмечено повышение концентрации МДА в крови по сравнению со здоровыми людьми соответствующего возраста, особенно в весенний период года.

При болезни Иценко — Кушинга концентрация реагирующих с ТБК соединений в крови была повышена у 60 % пациентов. Не отмечено нормализации этого показателя как в стадии частичной клинической ремиссии, так и после двусторонней тотальной или субтотальной адреналэктомии (при адекватной заместительной стероидной терапии). Следует отметить, что у некоторых больных с тяжелым течением заболевания концентрация в крови соединений, реагирующих с ТБК, не всегда повышена.

Глюкокортикоиды, секреция которых повышена при болезни Иценко — Кушинга, в зависимости от дозы могут оказывать как антиоксидантное, так и прооксидантное действие [4]. Сопоставление некоторых симптомов болезни Иценко — Кушинга (остеопороз, атрофия мышц, жировая дистрофия печени, изменения дистрофического характера кожи, нарушение репродуктивной функции, преждевременное старение и др.) с симптомами экспериментальных патологических состояний, сопровождающихся усилением перекисного окисления липидов, позволило предположить интенсификацию этого процесса при болезни Иценко — Кушинга. Выявленное повышение концентрации реагирующих с ТБК соединений в крови свидетельствует в пользу этого предположения.

Необходимо подчеркнуть, что вопрос о том, как выражать и как оценивать полученные данные, характеризующие направленность процессов ПОЛ при гиперлипидемиях, в литературе не получил своего разрешения. Так, автор данного метода Vagi [12] не считает необходимым соотносить величины концентрации МДА к концентрации общих липидов. Представляется, что вычисление коэффициентов соотношений концентрации МДА к концентрации общих липидов или β -липопротеидов сыворотки крови от-

ражают лишь способность 1 мг липидного комплекса к перекислению (табл. 1). При равной способности к перекислению 1 мг общих липидов (β -липопротеидов) в случае гиперлипидемии концентрация МДА в 1 мл крови будет выше, чем при нормоллипидемии. Следовательно, при прохождении гиперлипидемической крови через органы, первично незатронутые усилением процессов ПОЛ, повышенное содержание МДА может оказать патогенетическую роль. Возможно, что именно накоплением продуктов ПОЛ в крови можно объяснить присутствие (первичному или симптоматическому) ожирению многочисленные дегенеративные проявления.

Автор выражает благодарность сотрудникам института Химической физики АН СССР проф. Е. Б. Бурлаковой и канд. биол. наук Е. А. Нейфаху, руководителю отделения хирургической эндокринологии МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского проф. А. П. Калининну за помощь при выполнении данного исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М., 1972.
2. Государственная система обеспечения единства измерений: Метрология, термины и определения: ГОСТ 16263—70.
3. Журавлев А. И. // Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. — М., 1982. — С. 3—36.
4. Касавина Б. С., Ухина Т. В. // Бюл. экспер. биол. — 1980. — № 1. — С. 19—20.
5. Ланкин В. З., Поляков В. М., Гуревич С. М. // Липиды, структура, биосинтез, превращение и функции. — М., 1977. — С. 93—103.
6. Федорова Т. Н., Коршунова Т. С., Ларский Э. Г. // Лаб. дело. — 1983. — № 3. — С. 25—27.
7. Bernheim F., Bernheim M. L., Wilbur K. M. // J. biol. Chem. — 1948. — Vol. 174. — P. 257—262.
8. Goto V. // Lipid Peroxides in Biology and Medicine. — New York, 1983. — P. 295—303.
9. Salo V., Hotta N., Sakamoto N. et al. // Biochem. Med. — 1979. — Vol. 21. — P. 104—107.
10. Suematsu T., Abe H. // Lipid Peroxides in Biology and Medicine. — New York, 1983. — P. 285—293.
11. Yagi K. // Biochem. Med. — 1976. — Vol. 15. — P. 212—216.
12. Yagi K. // Lipid Peroxides in Biology and Medicine. — New York, 1983. — P. 223—241.

Поступила 28.07.85

CONTENT OF SUBSTANCES REACTING WITH 2-THIOBARBITURIC ACID IN BLOOD PLASMA OF HEALTHY PERSONS AND OF THE PATIENTS WITH SOME ENDOCRINOPATHIES

R. S. Tishenina

M. F. Vladimírsky Regional Clinical Institute, Moscow

After estimation of the substances reacting with 2-thioarbituric acid (malonic dialdehyde,

MDA) in human blood plasma using a long-term intralaboratory control of the procedure, increase in content of MDA was observed in blood plasma of patients with endocrinopathies, accompanied by obesity, particularly in the patients with Itsenko—Kushing disease (52 patients before treatment and 111 patients during various steps of complex treatment). The increase in MDA content in blood of these patients appears to occur due to activation of lipid free radical oxidation.

УДК 612.744.14-06:612.744.24

Т. П. Сээне, К. П. Алев, А. Я. Пэхме

ВЛИЯНИЕ ПОВЫШЕННОЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ НА СКОРОСТЬ ОБНОВЛЕНИЯ ТЯЖЕЛЫХ И ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ МИОЗИНА

Кафедра физиологии спорта Тартуского университета

Миозин, составляющий около 50 % от общего содержания белков скелетных мышц [8], относительно большой (мол. масса 500 кД) асимметричный гексамерный белок, построенный из 2 идентичных тяжелых цепей (ТЦ) с мол. массой около 200 кД и 2—3 легких цепей (ЛЦ) с мол. массой 14—27 кД [29]. Различают ЛЦ-1 и ЛЦ-3 (так называемые «щелочные» ЛЦ, расщепляемые при действии щелочей). Установлено что ЛЦ-1 существуют в двух формах — медленной и быстрой, которые различаются между собой по молекулярной массе и изоэлектрической точке. Расщепляемые при действии 5'5'-дитио-бис-2-нитробензойной кислоты (ДТНБ) ЛЦ-2 существуют в виде свободной и фосфорилированной форм [15, 29, 30]. При исследованиях ЛЦ-3 обнаружена лишь одна форма — быстрая. Существует ряд типов ТЦ, характерных для эмбрионов, новорожденных и взрослых особей. При изучении последнего отмечено наличие 2 быстрых форм и 1 медленной [31]. Убедительно доказано, что синтез ТЦ и ЛЦ миозина происходит на различных полисомах [9, 10, 26] и кодируется различными генами [19]. Показано также, что синтез ДТНБ и щелочных ЛЦ регулируется различными генами, а синтез ЛЦ-1 и ЛЦ-3 — одним и тем же [17, 20]. Обнаружено, что при электростимуляции быстрых мышц параллельно с повышением интенсивности синтеза быстрых форм ЛЦ происходит также активирование синтеза их медленных форм [22].

При тренировке животных [24], а также при истощающих нагрузках [2] происходят изменения в молекулярной структуре миозина, что связано как с изменением интенсивности синтеза, так и со скоростью деградации миозина [1, 28]. При этом важно отметить, что в скелетных мышцах интенсивность синтеза ТЦ миозина непосредственно после физической нагрузки снижается, а синтез ЛЦ усиливается. Большая пластичность скелетных мышечных клеток позволяет им адаптироваться к различным воздействиям среды не только на уровнях клеточной структуры и метаболизма, но также на молекулярном уровне сократительных белков [11]. Повышенная функциональная активность скелетных мышц вызывает изменения как в синтезе, так и в скорости деградации субъединиц миозина.

Целью настоящей работы было изучение изменений обновления ТЦ и ЛЦ миозина в условиях повышения функциональной активности скелетных мышц и в период отдыха.

Методика

В работе использовали крыс-самцов Вистар в возрасте 16—17 нед. Пищу, содержащую 12 % белка, 28 % углеводов, 9 % жиров и воду, животные получали *ad libitum*. Крысы плавали 6 ч при температуре воды $33 \pm 1^\circ\text{C}$; на 1 крысу приходилось 125 см² водной поверхности, глубина ванны составляла 40 см. ¹⁴C-лейцин (30 мКи/ммоль) вводили животным в течение 6 ч внутривенно (250 мКи на 100 г массы тела). Животных умерщвляли под легким эфирным наркозом и *m. gastropnemius* выделяли непосредственно после плавания (о), а также после 6, 18, 24 и 48 ч

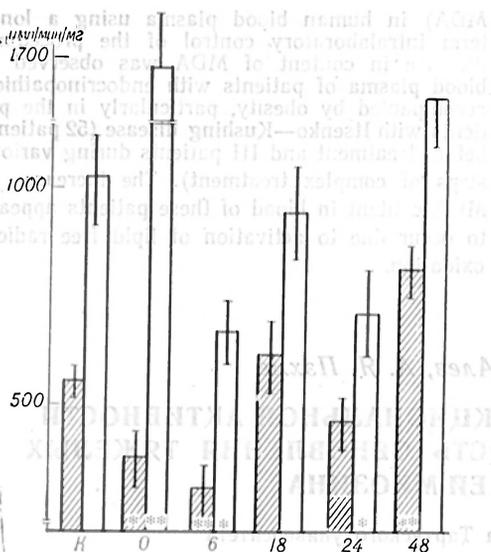


Рис. 1. Включение ¹⁴C-лейцина в ТЦ и ЛЦ мио-
зина.

По оси абсцисс — время после плавания (в ч); по оси ординат — активность ¹⁴C-лейцина. Здесь и на рис. 3 светлые столбики — ЛЦ миозина, заштрихованные — ТЦ миозина, К — контрольная группа (n=6); одна звездочка — $P < 0,05$, две — $P < 0,01$ по сравнению с показателями контрольной группы.

отдыха. Мышечную ткань очищали и гомогенизировали в калий-фосфатном буфере, содержащем 50 мМ КСl, 10 мМ K_2HPO_4 , 1 мМ ЕГТА, 1 мМ $MgCl_2$, 1 мМ дитиотреитол (рН 7,0). Саркоплазматическую фракцию получали центрифугированием гомогената мышц при $1000 \times g$ в течение 10 мин. Актмиозин выделяли [3] и инкубировали в 6% додецилсульфате натрия (ДСН) и 2% меркаптоэтаноле 90 мин при 60°C, а затем наносили на колонку ($2,5 \times 90$ см), заполненную сефакрилом $S=300$; ТЦ и ЛЦ миозина элюировали по методу, описанному ранее [27]. Дальнейшую очистку ТЦ и ЛЦ (ЛЦ-1 + ЛЦ-2 + ЛЦ-3) миозина проводили при помощи электрофореза в 10% ПААГ в присутствии ДСН [23]. Предпочтительным для определения скорости обновления мышечных белков следует считать применение одноступенчатого метода [27]. Во-первых, он позволяет выделить структурные и регуляторные белки из суммарного гомогената мышц или из любой другой фракции. Во-вторых, только одноступенчатый метод выделения различных мышечных белков позволяет определить относительную скорость их обновления. Как показывает электрофоретический анализ фракции ТЦ и ЛЦ миозина, а также актина, белки, полученные по вышеуказанной методике, были негомогенны. Отношение радиоактивности к содержанию белка показывает удельную активность (УА) актмиозина. Относительную удельную активность (ОУА) ТЦ и ЛЦ миозина рассчитывали, как отношение УА ТЦ и ЛЦ миозина и УА актмиозина. ОУА характеризует относительную скорость обновления соответствующего белка или его субъединиц [27]. Идентифицированные участки геля ТЦ и ЛЦ (ЛЦ-1 + ЛЦ-2 + ЛЦ-3) миозина вырезали, разрезали на кусочки (1—2 мм), нагревали в закрытом сцинтилляционном флаконе с

30% перекисью водорода при температуре 50°C до полного растворения геля. После охлаждения во флакон добавляли раствор сцинтиллятора и определяли радиоактивность ¹⁴C-лейцина при помощи жидкостного сцинтилляционного счетчика 1211 Минибета. Для определения протеолитической активности использовали препарат *m. gastrocnemius*, который очищали от жира и соединительной ткани, затем отмывали от крови в буфере гомогенизации. Гомогенизацию и подготовку ткани к инкубации проводили по методу [32]: 1 мл экстракта ткани инкубировали в конечном объеме (3 мл) при 37°C, содержащем: 1) 0,1 М цитрат натрия — НСl рН 3,8; 2) 0,1 М КСl, 1 мМ $CaCl_2$, 1 мМ NaN_3 , 0,01 М трис — малеат рН 7,0; ЕГТА использовали вместо $CaCl_2$ в контрольной пробе; 3) 1 мл миофибриллярной фракции инкубировали в 1 М КСl, 0,1 М трис-НСl рН 8,8. Через 60 мин реакцию останавливали добавлением 10% раствора ТХУ. Протеолитическую активность определяли по аутолитическому освобождению тирозина во время инкубации по модифицированной методике [18] и выражали в микрограммах тирозина на 1 мг белка в 1 мин. Содержание белка находили, как указано ранее [16] или с помощью биуретового метода [12].

Результаты и обсуждение

Известно, что интенсивность синтеза и скорость деградации различных мышечных белков варьируют в широком диапазоне. Данные, полученные различными исследователями об интенсивности синтеза ТЦ и ЛЦ миозина, часто бывали противоречивы, в основном по методическим причинам [14]. Как видно из рис. 1, у контрольных животных включение меченого лейцина в ЛЦ миозина в 2 раза превышает таковое в ТЦ. Во время физической нагрузки включение ¹⁴C-лейцина в ЛЦ существенно увеличивается, а в ТЦ снижается. В послерабочем периоде в течение первых 6 ч интенсивность синтеза ТЦ остается пониженной, затем постепенно увеличивается и к 48 ч отдыха существенно активируется. Включение ¹⁴C-лейцина в ЛЦ миозина в послерабочем периоде не изменяется.

Тот факт, что миофибриллярные белки имеют различную чувствительность к протеиназам, известен. Показано, что тиоловые протеиназы, которые активируются при нейтральных значениях рН ионами Ca^{2+} , катализируют гидролиз лишь тропонина I и T [13]. В то же время сериновые протеиназы в нейтральной среде катализируют разрушение как структурных, так и регуляторных белков [25, 33]. Если нативный актин нечувствителен

к действию трипсиноподобных сериновых протеиназ, то миозин чрезвычайно быстро разрушается [13]. Как видно из рис. 2 (см. вклейку) при инкубации миофибрилл с трипсином происходит разделение ТЦ миозина, в результате чего образуются 4 фракции в диапазоне 100—200 000 Д. В этих же условиях ЛЦ миозина и актин не деградируют. Как однократная, так и регулярная физическая нагрузка не изменяет чувствительности ТЦ к трипсину. 6-часовая мышечная деятельность вызывает повышение активности кислых протеиназ на 26 % ($P < 0,05$), а миофибриллярных щелочных протеиназ на 52 % ($P < 0,01$). Активность Ca^{2+} -активируемых нейтральных протеиназ существенно не изменяется. В течение первых 6 ч после нагрузки значительно увеличивается активность кислых протеиназ (49 %; $P < 0,05$), которая остается на повышенном уровне и к 24 ч восстановительного периода (35 %; $P < 0,01$). Активность Ca^{2+} -активируемых нейтральных протеиназ повышается после 24 ч отдыха. Полученные нами данные показали, что во время нагрузки в основном повышается активность щелочных миофибриллярных протеиназ. После нагрузки активируются кислые протеиназы и через сутки после нагрузки — Ca^{2+} -активируемые нейтральные протеиназы. Хотя активность щелочных протеиназ в скелетных мышцах связывают с миофибриллами (поскольку их наивысшая активность найдена именно в этой фракции мышц), считают, что это обусловлено артефактом гомогенизации [5]. Показано [21], что при введении крысам агентов, дегранулирующих тучные клетки, в скелетных мышцах теряется активность щелочных протеиназ. Щелочные протеиназы синтезируются в тучных клетках, из которых при гомогенизации они попадают во фракцию миофибрилл [5].

Полагают [5], что наряду с лизосомными протеиназами в начальной фазе деградации миозина участвуют и нелизосомные протеиназы. Поскольку количество лизосом в скелетных мышцах незначительно и ингибирование активности лизосомальных протеиназ не подавляет деградации миозина, предполагают, что первоначальная стадия деградации сократительных белков происходит без участия лизо-

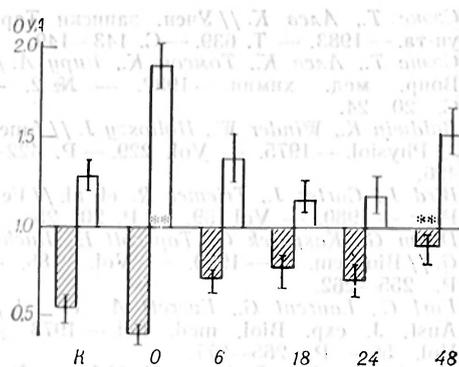


Рис. 3. Скорость обновления ТЦ и ЛЦ миозина по относительной удельной активности (ОУА).

сомных протеиназ [13]. Тот факт, что скорость обновления миозина в скелетных мышцах зависит от их функциональной активности, подтверждается более высокой скоростью обновления в тонических мышцах, чем в мышцах быстрого типа [7]. Из рис. 3 видно, что в скелетных мышцах скорость обновления ЛЦ происходит быстрее, чем ТЦ миозина. Во время плавания у животных ускоряется обновление ЛЦ-миозина, которое после физической активности остается на уровне контрольных животных (см. рис. 3). Скорость обновления ТЦ миозина как во время физической активности, так и в 1-е сутки после нее существенно не изменяется. Через 48 ч после нагрузки обновление ТЦ миозина ускоряется (см. рис. 3). Известно, что физическая активность вызывает изменения в энзиматической активности, скорости синтеза и деградации миофибриллярных белков [4, 6]. Повышение скорости обновления ЛЦ миозина во время повышенной функциональной активности мышц можно рассматривать как компенсаторную реакцию, важную для сохранения сократительных свойств мышц. В пользу этого предположения свидетельствует и тот факт, что именно во время физической нагрузки, когда отмечалось снижение интенсивности синтеза ТЦ, происходило противоположное изменение в синтезе ЛЦ, которые участвуют в регуляции энзиматической активности миозина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сээнэ Т., Алев К. // Всесоюзный симпозиум по физиологическим проблемам адаптации, 4-й: Тезисы. — Тарту, 1984. — С. 108—110.

2. Сээне Т., Алев К. // Учен. записки Тарт. ун-та. — 1983. — Т. 639. — С. 143—149.
3. Сээне Т., Алев К., Томсон К., Вирю А. // Вопр. мед. химии. — 1982. — № 2. — С. 20—24.
4. Baldwin K., Winder W., Holloszy J. // Amer. J. Physiol. — 1975. — Vol. 229. — P. 422—426.
5. Bird J., Carter J., Triemer R. et al. // Fed. Proc. — 1980. — Vol. 39. — P. 20—25.
6. Dohm G., Kasperek G., Tapscott E., Bucher G. // Biochem. J. — 1980. — Vol. 188. — P. 255—262.
7. Earl C., Laurent G., Everett A. et al. // Aust. J. exp. Biol. med. Sci. — 1978. — Vol. 56. — P. 265—277.
8. Harrington W., Rodgers M. // Ann. Rev. Biochem. — 1984. — Vol. 53. — P. 35—73.
9. Heywood S., Rich A. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1968. — Vol. 59. — P. 590—597.
10. Heywood S., Dowben R., Rich A. // Ibid. — 1967. — Vol. 57. — P. 1002—1007.
11. Howald H. // Int. J. Sports Med. — 1982. — Vol. 3. — P. 1—12.
12. Jacobs E., Jacov U., Sanadi D., Bradley L. // J. biol. Chem. — 1956. — Vol. 223. — P. 147—156.
13. Kay J., Siemankowski R., Greweling J. et al. // Acta biol. med. germ. — 1981. — Bd 40. — S. 1323—1331.
14. Loble G., Lovie J. // Biochem. J. — 1974. — Vol. 182. — P. 867—874.
15. Lowey S., Risby D. // Nature. — 1971. — Vol. 234. — P. 81—84.
16. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
17. Margossian S., Chantler P., Sellers J. et al. // Ibid. — 1984. — Vol. 259. — P. 13534—13540.
18. McDonald C., Chen L. // Analyt. Biochem. — 1965. — Vol. 10. — P. 175—177.
19. Meropi P., Huw A. // Cell. — 1977. — Vol. 12. — P. 491—499.
20. Nabeshima Y., Fjii-Kuriyama Y., Mura-Matsce M., Ogata K. // Nature. — 1984. — Vol. 308. — P. 333—338.
21. Park D., Parsons M., Pennington R. // Biochem. Soc. Trans. — 1973. — Vol. 1. — P. 730—733.
22. Pette D., Müller W., Leisner E., Erbova G. // Pflügers Arch. — 1976. — Bd 364. — S. 103—112.
23. Porcio M., Pearson A. // Biochim. biophys. Acta. — 1977. — Vol. 490. — P. 27—34.
24. Rupp G., Weicker H. // Int. J. Sports Med. — 1982. — Vol. 3. — P. 58—60.
25. Sanada Y., Yasogawa N., Kalunuma N. // J. Biochem. — 1978. — Vol. 83. — P. 27—33.
26. Sarkar S., Cooke P. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1970. — Vol. 41. — P. 918—925.
27. Schreurs V., Boekholt H., Koopmanschap R. // Acta biol. med. germ. — 1981. — Bd 40. — S. 1239—1241.
28. Seene T., Viru A. // J. Steroid. Biochem. — 1982. — Vol. 16. — P. 349—352.
29. Weeds A. // Plasticity of Muscle. — Berlin, 1980. — P. 55—68.
30. Weeds A., Pope B. // Nature. — 1971. — Vol. 234. — P. 85—88.
31. Whalen R., Sell S., Buller-Browne G. et al. // Ibid. — 1981. — Vol. 292. — P. 805—809.
32. Willemot J., Lalanne M., Berlinguet L. // Arch. Biochem. — 1969. — Vol. 133. — P. 359—365.
33. Yasogawa N., Sanada Y., Kalunuma N. // J. Biochem. — 1978. — Vol. 83. — P. 1355—1360.

Поступила 05.08.85

EFFECT OF AN AUGMENTED FUNCTIONAL ACTIVITY OF SKELETAL MUSCLES ON THE TURNOVER RATE OF HEAVY AND LIGHT CHAINS OF MYOSIN

T. P. Seene, K. P. Alev, A. J. Pekkme

Chair of Sport Physiology, State University, Tartu

Incorporation of ¹⁴C-leucine into light chains (LC) of myosin was distinctly increased and into heavy chains (HC) — decreased during physical exercises. Within first six hours after the exercises synthesis of HC maintained at the reduced level, then it was gradually elevated and distinctly activated after 48 hrs rest. Incorporation of ¹⁴C-leucine into LC of myosin was unaltered at the post-exercise period. During swimming turnover of LC myosin was accelerated and after physical activity it maintained at the level of controls. The rate of HC myosin turnover was not distinctly altered both during physical activity and within the first day after the loading. The rate of HC myosin turnover was augmented within 48 hrs after exercises.

К. А. Десятниченко, Ю. П. Балдин, А. А. Шрейнер, Ю. Н. Бахлыков,
С. П. Изотова

ВЛИЯНИЕ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ ФРАКЦИИ НЕКОЛЛАГЕНОВОГО БЕЛКА КОСТНОЙ ТКАНИ НА ОСТЕОГЕНЕЗ И КРОВЕТВОРЕНИЕ ПРИ УДЛИНЕНИИ КОНЕЧНОСТИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Курганский НИИ экспериментальной и клинической ортопедии и травматологии
Минздрава РСФСР

Исследуя механизмы активирующего влияния напряжения растяжения, создаваемого при дистракционном остеосинтезе по Г. А. Илизарову, на скорость регенерации, мы пришли к выводу, что его причиной, в частности, может быть создание условий для поступления в кровь белков костного матрикса, функцией которых является местная регуляция физиологического и репаративного роста, т. е. активация или торможение процессов пролиферации и дифференцировки клеток [4]. Это заключение хорошо согласуется с достижениями биологии в области изучения механизмов поддержания тканевого гомеостаза [8, 9, 11, 15, 16]. В целях проверки правильности такого предположения на экспериментальной модели, адекватно отражающей условия костеобразования при чрескостном дистракционном остеосинтезе, было предпринято настоящее исследование.

Методика

Эксперимент выполнен на 16 кроликах породы шиншилла с массой тела 2,0—2,2 кг, которым в стерильных условиях под анестезией накладывали на правую голень специально разработанный для этих животных вариант аппарата Г. А. Илизарова¹. На каждой из четырех его опор с помощью специального устройства² фиксировали по паре перекрещивающихся спиц, предварительно натягивая их с усилием 40—50 кг. Из разреза между средними опорами лобзиком надпиливали кортикальный слой и осуществляли ручную остеоклазию большеберцовой кости.

Для выяснения роли неколлагенового белка костного матрикса на образование дистракционного регенерата был получен солянокислый экстракт из измельченных и тщательно освобожденных от параоссальных тканей и костного мозга длинных трубчатых костей 4 взрослых кроликов. Методика экстрагирования и последующего фракционирования HCl-

экстракта посредством гель-проникающей хроматографии описана ранее [2, 4]. В данном эксперименте была использована высокомолекулярная фракция (ВМФ) экстракта, элюируемая из колонки с сефадексом G-50 с объемом выхода белков-маркеров, имеющих относительную молекулярную массу 30 000—40 000 Д. ВМФ концентрировали в диализных мешочках с помощью полиэтиленгликоля (мол. масса 20 000 Д).

Раствор ВМФ в 0,15 М NaCl вводили 8 кроликам подкожно, начиная с 4-го дня после операции в течение 4 сут из расчета 1 мг на 1 кг массы тела 1 раз в день. Остальным животным (контрольная группа) в те же сроки инъецировали равный объем физиологического раствора. В соответствии с отработанным в предварительном эксперименте режимом у первой пары кроликов дистракцию образованного в диастазе между отломками регенерата начинали через 7 дней после остеоклазии, однако у животного, получившего ВМФ, к этому сроку произошла осификация регенерата, что сделало невозможной дистракцию, и в дальнейшем ее начинали через 5 сут после операции, осуществляли в течение 2 нед, после чего животных умерщвляли.

Влияние ВМФ на остеогенез оценивали рентгенологически на 5-е сутки после остеоклазии и 7-е и 14-е сутки дистракции, а на кроветворение — гематологически, для чего до операции, на 3-и и 5-е сутки после нее, а также через 7 и 14 сут дистракции проводили анализ периферической крови. По результатам исследования лейкоцитарной формулы и общего содержания лейкоцитов рассчитывали показатель состояния (ПС), отражающий течение адаптивного процесса [3]. До операции и в последний день эксперимента пункцией метаэпифиза правой большеберцовой кости получали костный мозг, готовили мазки, которые окрашивали по Панненгейму, и подсчитывали парциальные цитомелогаммы.

Гематологические исследования были дополнены экспериментом на 56 белых беспородных мышах, которым в целях угнетения эритропоэза вводили суспензию отмыханных изотоническим раствором снеженных эритроцитов. За 2 инъекции с интервалом 48 ч мыши получали около $5 \cdot 10^9$ клеток. Угнетение эритропоэза констатировали по снижению содержания ретикулоцитов в периферической крови, после чего животным опытной группы вводили, как описано, ВМФ, а контрольной — 0,15 М NaCl. Определяли включение ³H-тимидина в костный мозг, селезенку, печень и поперечно-полосатые мышцы через 24 и 48 ч после введения ВМФ. Часть животных использовали, чтобы проследить изменения содержания ретикулоцитов в периферической крови в течение

¹ Шрейнер А. А., Балдин Ю. П., 1983, рацпредложение КНИИЭКОТ, № 55.

² Там же, № 56.

ние 10 сут с начала эксперимента. Для оценки различий гематологических показателей в опытной и контрольной группах применяли непараметрический U-критерий для независимых выборок (Вилкоксона—Манна—Уитни) [1].

Результаты и обсуждение

На рис. 1, а представлен элюционный профиль НСІ-экстракта из костной ткани кроликов при его фракционировании с помощью гель-фильтрации. При сравнении с экспериментами по фракционированию экстрактов из кости собак выявлено, что у кроликов содержание белка в растворе выше, ВМФ имеет несколько больший объем выхода из колонки (меньшую относительную молекулярную массу), более значительные по высоте пики минорных фракций. Мы сравнивали гомогенность нашего препарата с белковым экстрактом кости, применявшимся с аналогичной целью [18]. Для этого из аликвоты НСІ-экстракта осаждали белки этанолом, как описано ранее [18]. Затем растворили осадок в 0,15 М NaCl и подвергли гель-хроматографии в тех же условиях, что и материал, предназначенный для введения кроликам. На рис. 1, б показано, что препарат, применявшийся в

нашем опыте, значительно более гомогенен и, вероятно, оказывает меньшее неспецифическое действие.

Кролики относительно легко перенесли оперативное вмешательство, послеоперационный период протекал без осложнений, животные практически сразу пользовались оперированной конечностью. Аппарат обеспечивал в течение всего времени эксперимента жесткость фиксации отломков и не ограничивал функцию коленного и голеностопного суставов. Различий в поведении животных опытной и контрольной групп не отмечено.

Первые признаки регенерации костной ткани у кроликов, которым вводили ВМФ, обнаруживались рентгенологически через 7 дней distraction в виде облаковидных теней в диастазе и периостальной реакции на отломках. У 2 животных контрольной группы в этот срок рентгенологических проявлений репаративного остеогенеза не обнаружено. Через 14 дней distraction у кроликов опытной группы диастаз между отломками был заполнен тяжистым регенератом, состоящим из двух прилежащих к отломкам костных отделов, разделявшихся, как правило, срединной зоной просветления высотой 1—1,5 мм, пересекавшейся частыми трабекулярными тенями (рис. 2, а).

У 1 животного весь диастаз был заполнен гомогенной тканью регенерата без срединной зоны просветления (рис. 2, б). У животных контрольной группы на 14-й день distraction диастаз был заполнен регенератом продольно трабекулярной структуры, срединная зона пересекалась редкими тенями (рис. 2, в), у 1 кролика были обнаружены лишь слабые облаковидные тени регенерата у концов отломков (рис. 2, г). При суммарной оценке результатов анализа рентгенограмм можно утверждать, что под влиянием ВМФ, введенного парентерально в предdistractionном периоде, репаративное костеобразование протекало более активно, чем в контроле.

Гистологическое исследование distractionного регенерата у кроликов показало, что его структура не имеет принципиальных различий от ранее описанной [4, 6].

Значительные изменения в парциальной эритробластограмме подопытных животных (табл. 1) свидетельст-

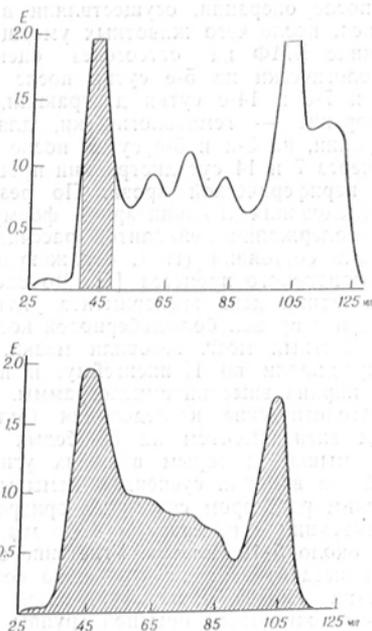


Рис. 1. Элюционные профили НСІ-экстракта из костной ткани кролика.

Сефадек G-50 (тонкий), колонка 60×1,5 см, элюирование 0,15 М NaCl, рН 6,8—7,0. а — нативный НСІ-экстракт. б — ресольubilизированный этанольный осадок НСІ-экстракта.

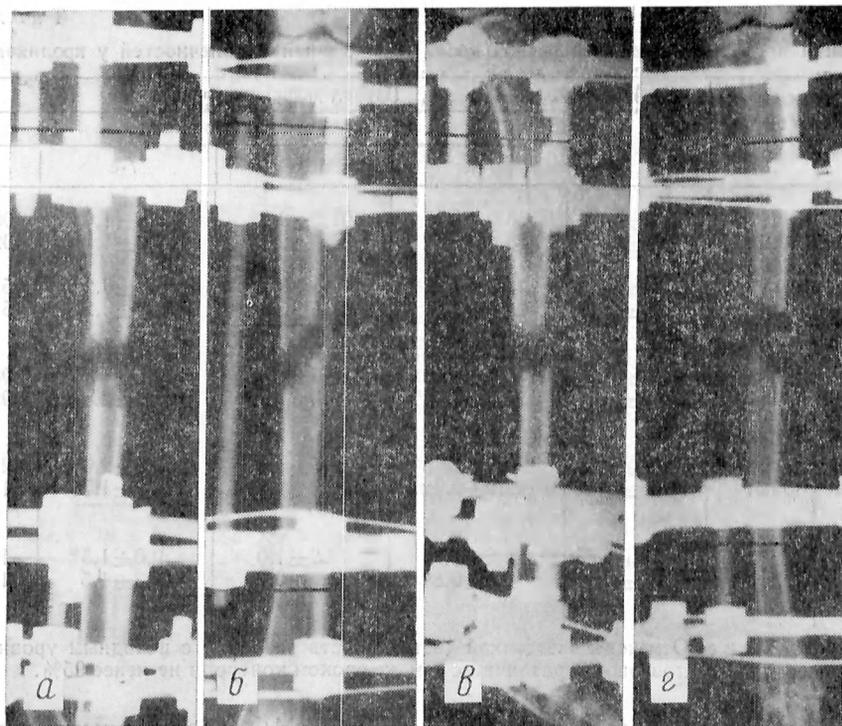


Рис. 2. Рентгенограммы большеберцовой кости кроликов после открытой остеоклазии на 14-й день distraction регенерата аппаратом Илизарова. а, б — опыт; в, г — контроль.

вуют о том, что усиление репаративного кроветворения было более выраженным на фоне введения ВМФ. Статистически достоверно повышено количество эритробластов, полихроматофильных и оксифильных нормобластов. Пул последних, очевидно, пополнился за счет более ускоренного дифференцирования базофильных нормобластов, число которых достоверно снизилось по сравнению с контролем.

Данные анализа периферической крови приведены в табл. 2. Как видно из таблицы, остеоклазия вызывает к 3-м суткам снижение содержания гемоглобина и уменьшение числа эрит-

роцитов. При этом существенно увеличивается содержание ретикулоцитов. Однократное введение ВМФ приводит к еще более выраженному снижению числа дифференцированных клеток красного ряда. Однако через 6 сут после последней инъекции растора белка костной ткани природо содержания эритроцитов и гемоглобина у животных опытной группы был значительно выше, чем у контрольных. Происхождение этих различий объясняет эксперимент, в котором мышам с подавленным эритропоэзом вводили ВМФ. Данные, полученные при включении ^3H -тимидина, свидетельствуют о

Таблица 1
Содержание эритроидных элементов в парциальной цитомиелограмме кроликов с открытой остеоклазией костей голени на 14-е сутки distraction (в %)

| Группа животных | Тип эритроидных ядерных клеток | | | |
|-----------------|--------------------------------|-----------------|--------------------|-----------------|
| | эритробласты | нормобласты | | |
| | | базофильные | полихроматофильные | оксифильные |
| Контроль | $0,8 \pm 0,12$ | $17,7 \pm 0,66$ | $71,4 \pm 0,62$ | $9,3 \pm 0,41$ |
| Опыт | $1,8 \pm 0,20$ | $10,2 \pm 0,90$ | $75,3 \pm 0,56$ | $12,0 \pm 0,84$ |
| P | $<0,05$ | $<0,001$ | $<0,05$ | $<0,05$ |

Изменения показателей периферической крови при удлинении конечностей у кроликов

| Показатель | Группа животных | Период эксперимента | | | | |
|--|-----------------|---------------------|----------------------|-------------|-------------|------------|
| | | до операции | сутки после операции | | | |
| | | | 3-и | 5-е | 7-е | 14-е |
| Содержание гемоглобина, г/л | Контроль | 102,0±3,0 | 86,0±1,4* | 91,2±3,0* | 96,8±1,0 | 105,3±7,1 |
| | Опыт | 98,5±2,5 | 86,4±1,6* | 85,5±2,5* | 100,2±1,2 | 102,4±6,0 |
| Содержание эритроцитов, 10 ⁶ клеток в 1 мкл | Контроль | 5,22±0,14 | 4,75±0,42 | 4,43±0,24* | 4,87±0,26 | 5,02±0,19 |
| | Опыт | 4,98±0,12 | 4,58±0,28 | 4,15±0,18* | 5,06±0,22 | 5,08±0,12 |
| Содержание ретикулоцитов, 10 ³ клеток в 1 мкл | Контроль | 73,4±8,0 | 148,4±45,6* | 192,8±16,3* | 105,9±19,3 | 90,2±37,1 |
| | Опыт | 76,5±9,3 | 136,3±21,2* | 183,8±12,0* | 107,9±20,4 | 95,5±41,5 |
| Содержание лейкоцитов, 10 ³ клеток в 1 мкл | Контроль | 11,70±1,30 | 13,97±1,75* | 12,47±1,39* | 15,35±2,08* | 12,95±2,68 |
| | Опыт | 11,96±1,42 | 14,12±2,08* | 12,81±1,42 | 12,32±1,76 | 11,63±1,81 |
| Показатель состояния | Контроль | 15,0±1,4 | 9,2±1,0* | 13,2±1,0 | 9,0±1,3* | 12,5±1,5 |
| | Опыт | 14,5±1,2 | 8,6±0,8* | 12,2±0,9 | 11,3±1,5 | 14,0±2,2 |

Примечание. Отмечены звездочкой достоверность различий с исходным уровнем не менее 95%, подчеркнута достоверность различий с тем же сроком контроля не менее 95%.

том, что испытуемый белок стимулирует синтез ДНК в костном мозге и селезенке, тогда как печень и мышца к нему индифферентны (табл. 3). Влияние ВМФ на кроветворение кратковременно и на 2-е сутки после его введения уже не проявляется, так же как и при стимуляции синтеза ДНК в костной ткани [4].

На рис. 3 представлены изменения содержания ретикулоцитов в периферической крови в течение 10 дней после воздействия на эритропоэз. Следствием гипертрансфузионной полициемии является уменьшение количества ретикулоцитов до 20—30 % от исходного уровня. Через 24 ч после вве-

дения ВМФ достоверных изменений не произошло, а через 48 ч зарегистрирован уровень ретикулоцитов, более чем в 3 раза превышающий исходный. Это повышение было кратковременным, и через 4 сут после введения ВМФ количество ретикулоцитов достоверно не отличалось от исходных величин.

На основании данных этого эксперимента можно заключить, что мишенями действия ВМФ являются клетки, способные к делению — стволовые и коммитированные: изменения в содержании дифференцированных клеток отстают во времени от влияния на синтез ДНК, но, по-видимому, им обу-

Таблица 3

Включение ³H-тимидина в мягкие ткани под влиянием парентерального введения ВМФ мышам с полициемией

| Ткань | Группа животных | Время после введения ВМФ | |
|--|-----------------|--------------------------|----------|
| | | 24 | 48 |
| Костный мозг, имп/мин/10 ⁶ клеток | Контроль | 1170±73 | 1050±70 |
| | Опыт | 1970±81* | 1280±84 |
| Селезенка, имп/мин/мг ткани | Контроль | 7730±40 | 7840±424 |
| | Опыт | 9800±10* | 8000±518 |
| Печень, имп/мин/мг ткани | Контроль | 1720±97 | 1650±103 |
| | Опыт | 2020±106 | 1790±123 |
| Поперечнополосатая мышца, имп/мин/мг ткани | Контроль | 232±41 | 196±46 |
| | Опыт | 204±35 | 218±25 |

* $P < 0,05$ по сравнению с контролем.

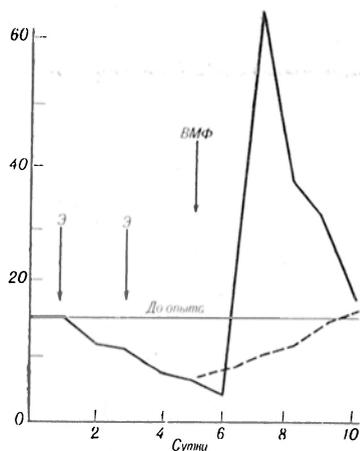


Рис. 3. Изменения содержания ретикулоцитов в периферической крови мышей на фоне введения сингенных эритроцитов в ВМФ костной ткани кроликов.

Стрелками обозначены дни введения эритроцитов (Э) и ВМФ или 0,15 М NaCl. Пунктир — контроль. По оси ординат — содержание ретикулоцитов на 1000 эритроцитов.

словлены. Это обстоятельство, по всей вероятности, объясняет и позднее появление различий в активности остеогенеза у животных опытной и контрольной групп. Рентгенологически оцениваются различия в степени минерализации регенерата, обеспечение которой является функцией дифференцированных клеток костной ткани.

Совпадение механизма действия ВМФ на кроветворение и костеобразование еще раз подтверждает наличие общей для кости и крови клетки-родоначальницы, сохраняющейся в постнатальном периоде и не утратившей способности к самоподдержанию.

Изменения белой крови после остеоклазии (см. табл. 2) характерны для состояния адаптационного стресса [17]. Увеличение общего количества лейкоцитов в периферической крови в сочетании со сдвигами в лейкоцитарной формуле приводит к статистически достоверному снижению ПС на 3-и сутки после операции. Однако уже на 5-е сутки ПС у животных обеих групп не обнаружено достоверных различий по сравнению с исходными уровнями, что свидетельствует о хорошей переносимости кроликами операции и активно развивающемся процессе срочной адаптации [10].

Дистракция, по-видимому, оказалась новым стрессором: у животных контрольной группы через неделю после ее начала снова значительно

увеличилось содержание лейкоцитов в периферической крови и существенно снизился ПС. Животные, получавшие инъекции ВМФ, оказались лучше подготовленными к новому состоянию напряжения — у кроликов опытной группы уровень лейкоцитов в крови был достоверно ниже, чем у контрольных животных, а снижение показателя состояния не достигало значимого уровня различий по сравнению с исходными данными. Более высокий ПС в опыте по сравнению с контролем к концу эксперимента позволил сделать заключение, что под влиянием ВМФ более успешно протекает процесс долговременной адаптации [3].

Таким образом, результаты исследования показали, что описанный ранее фактор, появляющийся в крови человека и животных после повреждения костей, стимулирующий костеобразование у реципиентов сыворотки такой крови [12—14], по своим физиологическим свойствам идентичен неколлагеновому белку костной ткани и, по всей вероятности, поступает в кровь из последней, для чего наиболее благоприятные условия создает чрескостный дистракционный остеосинтез по Г. А. Илизарову [9].

В практическом плане представляется возможным использование фармакологического эффекта этого белка для сокращения преддистракционного периода, уменьшения анемизирующего воздействия на организм скелетной травмы, интенсификации у ортопедо-травматологических больных адаптационных процессов. Его применение, возможно, окажется полезным при значительных удлиннениях конечностей, длительном применении дистракции при появлении признаков истощения репаративного потенциала.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гублер Е. В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. — Л., 1978.
2. Десятниченко К. С., Балдин Ю. П. // Съезд травматологов-ортопедов республик Закавказья, 5-й: Тезисы докладов. — Ереван, 1984. — С. 153—154.
3. Десятниченко К. С., Богомяков В. С., Балдин Ю. П., Швед С. И. // Чрескостный остеосинтез в ортопедии и травматологии: Напряжение растяжения и его роль в генезе тканей при лечении переломов длинных трубчатых костей и их последствий. — Курган, 1984. — С. 164—169.
4. Илизаров Г. А., Десятниченко К. С., Балдин Ю. П., Изотова С. П. // Проблемы

- чрескостного остеосинтеза в ортопедии и травматологии: Закономерности регенерации и роста тканей под влиянием напряжения растяжения. — Курган, 1982. — С. 103—110.
5. Илизаров Г. А., Имерлишвили И. А., Бахлыков Ю. Н. — Там же. — С. 27—33.
 6. Илизаров Г. А., Ледаев В. И., Имерлишвили И. А. // Чрескостный компрессионный и дистракционный остеосинтез в травматологии и ортопедии. — Курган, 1972. — Вып. 1. — С. 217—237.
 7. Коньшев В. А. Стимуляторы и ингибиторы роста органов и тканей животных. — М., 1974.
 8. Кетлинский С. А. Арх. анат. — 1980. — № 1. — С. 29—49.
 9. Лепехова И. П. Биохимические показатели в оценке гуморальных влияний на репаративную реакцию кости: Автореф. дис... канд. биол. наук. — Ташкент, 1979.
 10. Мерсон Ф. Э. Адаптация, стресс и профилактика. — М., 1981.
 11. Романова Л. К. // Условия регенерации органов у млекопитающих. — М., 1972. — С. 136—163.
 12. Соловьев Г. С., Колпаков В. В. // Тюменская обл. науч. конф. по химии и физико-химическим проблемам в нефтегазовой промышленности, 4-я. — Тюмень, 1973. — С. 44—45.
 13. Филимонов В. И., Лепехова И. П., Недоспасов В. О. и др. — Бюлл. eksper. биол. — 1977. — № 12. — С. 725—727.
 14. Эпштейн М. Ю. // Нов. хир. арх. — 1925. — Т. 6, кн. 4. — С. 449—456.
 15. Bullough W. S. // Humoral Control of Growth and Differentiation. / Ed. J. Lo Bue, A. S. Gordon. — New York, 1973. — Vol. 1. — P. 3—21.
 16. Carpenter G. // J. invest. Derm. — 1978. — Vol. 71. — P. 283—287.
 17. Selye H. The Stress of Life. — New York, 1956. — P. 325.
 18. Tornberg D. N., Basset C. A. L. // Clin. Orthop. — 1977. — Vol. 129. — P. 305—312.
 19. Zambotti V., Bolognani L. // Callus Formation. — Budapest, 1967. — P. 5—34.

Поступила 10.08.85

EFFECT OF HIGH MOLECULAR FRACTION OF NON-COLLAGENOUS PROTEIN FROM BONE TISSUE ON OSTEOGENESIS AND HEMOPOIESIS DURING EXPERIMENTAL CRUS ELONGATION.

K. S. Desyalnichenko, Yu. P. Baldin, A. A. Shreiner, Yu. N. Bakhlykov, S. P. Izolova

Institute of Experimental and Clinical Orthopaedics and Traumatology, Ministry of Public Health of the RSFSR, Kurgan

High molecular fraction of HCl-extract from mature homologous bone was parenterally administered, during the predistracted period, into 16 rabbits, crus of which was elongated by Ilizarov procedure. The treatment affected positively the adaptation process, hemopoiesis and the ossification of distraction regenerate. Administration of the high molecular protein fraction into mice with depressed hemopoiesis demonstrated that physiological effect of the fraction consisted in stimulating effect on proliferation of both bone tissue and red blood cells.

УДК 615.273.53:577.152.34]:615.451.2]:015.4:612.115.55

В. Н. Никандров, Н. С. Пыжова, В. И. Вотяков

ВЛИЯНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ НА ИНИЦИИРУЕМЫЙ СТРЕПТОКИНАЗОЙ ФИБРИНОЛИЗ

Белорусский НИИ эпидемиологии и микробиологии, Минск

Каталитические особенности продуцируемого β-гемолитическими стрептококками белкового активатора плазминогена — стрептокиназы — остаются недостаточно изученными. До сих пор единственным достоверно доказанным ее эффектом является способность взаимодействовать с плазминогеном человека и некоторых видов животных, в результате чего в системе образуется активный плазмин [8]. Таким путем реализуется процесс фибринолиза при добавлении стрептокиназы к системе, содержащей плазминоген. Однако данных, вскрывающих физико-химические механизмы иницирования стрептокиназой фибринолиза, крайне мало, несмотря на очевидность

теоретической и практической значимости этого процесса.

Известно, что в протеолизе, частным случаем которого является иницируемый стрептокиназой фибринолиз, важную роль играют свойства среды, в том числе природа растворителя [4].

В настоящей работе исследовано влияние ряда органических растворителей на иницируемый стрептокиназой фибринолиз.

Методика

В работе использованы метанол, этанол, 1-пропанол, 1-бутанол, 1-пентанол, 1,4-диоксан, диметилсульфоксид (ДМСО), NN-диметилформамид (ДМФА), фенол отечественного производства марок ч. д. а. и х. ч., глицерин и

ацетон производства VEB Laborchemie Apolda (ГДР). Все вещества были подвергнуты соответствующей дополнительной очистке.

Стрептокиназу выделяли непосредственно из культуральной жидкости после выращивания гемолитического стрептококка методом ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе, как описано ранее [9], с последующей очисткой на сефадексе G-100 [10]. Удельная активность полученных образцов фермента соответствовала 100 000 МЕ на 1 мг белка. Коррекцию активности осуществляли по Международному стандарту стрептокиназы—стрептодорназы (Лондон, ВОЗ). Активность стрептокиназы и концентрацию белка определяли соответственно по методам, приведенным в работах [15] и [14].

В настоящем исследовании использовали человеческий фибриноген (содержащий плазминоген) и человеческий тромбин отечественного производства. Фибриноген перед использованием переосаждали сульфатом аммония [11]. Концентрация плазминогена в фибриногене, определенная после полной активации стрептокиназой [16], составляла 3,5 казеинолитических единиц на 100 мг фибриногена.

Влияние органических растворителей на иницируемый стрептокиназой фибринолиз оценивали по лизису фибриновых пластин, в лунки которых вносили по 30 мкл раствора фермента (600 МЕ) в соответствующих растворителях. Концентрация растворителей составляла 0,1—50 об.%, концентрация белка 0,2—0,3 мг/мл. Для приготовления фибриновых пластин в чашках Петри на строго горизонтальной поверхности смешивали 9 мл раствора фибриногена (3 мг белка на 1 мл) и 0,2 мл раствора тромбина (100 ед/мл) [3] в 0,06 М фосфатном буфере рН 7,4. После нанесения исследуемых образцов фибриновые пластины инкубировали 20 ч при 37 °С на горизонтальной поверхности и учитывали зоны лизиса. Результаты исследований обрабатывали статистически [12].

Результаты и обсуждение

При частичной замене воды одноатомными спиртами наблюдалось усиление иницируемого стрептокиназой фибринолиза. Этот эффект усиливался в ряду метанол, этанол, 1-пропанол, 1-бутанол, 1-пентанол (рис. 1, табл. 1), отражая увеличение гидрофобности алифатического радикала. Этот эффект, например у этанола, практически не подавлялся ϵ -аминокапроновой кислотой (табл. 2) — специфическим ингибитором сорбции плазминогена на фибрине [17].

Влияние глицерина и фенола на иницируемый стрептокиназой фибринолиз было более сложным (рис. 2 и 3). В относительно невысоких концентрациях (до 10 %) глицерин несколько угнетал процесс, но при дальнейшем увеличении его содержания отмечалось усиление фибринолиза (см. рис. 2). Фенол в низких (до 1 %)

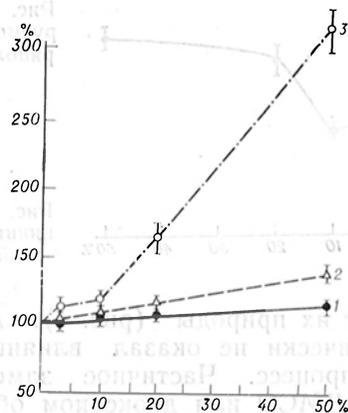


Рис. 1. Влияние метанола (1), этанола (2) и 1-пропанола (3) на иницируемый стрептокиназой фибринолиз ($n=6$).

Здесь и на других рис. 2—4: по оси абсцисс — концентрация исследуемого спирта (в об. %); по оси ординат — степень фибринолиза (в % к контролю, принятому за 100 %).

концентрациях усиливал фибринолиз, а в более высоких — вызывал резкое угнетение процесса (см. рис. 3).

Апротонные растворители также оказывали различное влияние на иницируемый фибринолиз в зависимости

Таблица 1

Влияние частичной замены воды на активность стрептокиназы (по интенсивности лизиса фибриновых пластин, $n=4$)

| Растворитель | Концентрация | | Активность стрептокиназы, тыс. МЕ |
|-----------------|--------------|------|-----------------------------------|
| | об. % | М | |
| Вода (контроль) | | | 100,0±3,0 |
| Метанол | 3,0 | 0,74 | 99,0±3,5 |
| Этанол | 3,0 | 0,51 | 100,4±5,2 |
| 1-Пропанол | 3,0 | 0,40 | 108,4±5,2 |
| 1-Бутанол | 3,0 | 0,47 | 110,7±2,2* |
| 1-Пентанол | 1,7 | 0,18 | 133,5±2,5* |

Примечание. Здесь и в табл. 2 звездочкой отмечены $P \leq 0,05$.

Таблица 2

Влияние ϵ -аминокапроновой кислоты в конечной концентрации 10^{-2} М на активность стрептокиназы в воде и 50% этаноле ($n=4$)

| Условия опыта | Активность стрептокиназы, тыс. МЕ на 1 мг белка |
|---|---|
| Бидистиллированная вода (контроль) | 100,2±3,5 |
| То же + ϵ -аминокапроновая кислота | 93,8±3,5 |
| 50% этанол | 138,0±5,2* |
| То же + ϵ -аминокапроновая кислота | 128,9±5,0* |

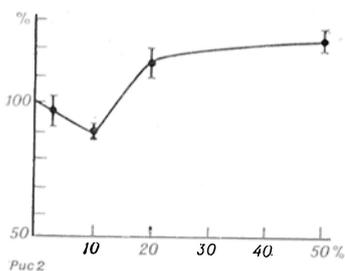


Рис. 2. Изменения иницируемого стрептокиназой фибринолиза в присутствии глицерина ($n=6$).

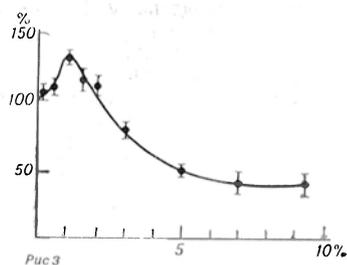


Рис. 3. Влияние фенола на иницируемый стрептокиназой фибринолиз ($n=6$).

сти от их природы (рис. 4). Ацетон практически не оказал влияния на этот процесс. Частичное замещение воды ДМСО или диоксаном обуславливало умеренную активацию фибринолиза. В испытанном диапазоне концентраций этих растворителей зависимость концентрация — эффект имела вид кривой с насыщением. Причем при использовании ДМСО состояние насыщения достигалось при меньших по сравнению с диоксаном концентрациях. Наиболее заметное влияние на изучаемый процесс из апротонных растворителей оказал ДМФА.

Изложенные материалы в целом свидетельствуют об активации иницируемого стрептокиназой фибринолиза при частичной замене воды органическими растворителями. Известно, что в некоторых органических соединениях (глицерин, хлороформ) возможна спонтанная активация плазминогена [2]. Однако в специально проведенных опытах с растворами органических растворителей без добавления стрептокиназы такого эффекта не обнаруживалось. Следовательно, можно полагать, что изменения иницируемого фибринолиза в этих условиях обусловлены непосредственным воздействием органических растворителей на этот процесс. Даже в апротонных растворителях наблюдалось заметное ускорение процесса, что обращает на себя внимание. Считается, что в случае многих гидролитических реакций более высокий заряд переходного состояния системы по сравнению с основным ее состоянием приводит к замедлению гидролиза в апротонных растворителях [4]. Имеются сообщения о том, что в ряде протонных органических растворителей эффективность протеолиза снижается, как полагают, вследствие уменьшения флуктуационной подвижности белкового субстрата [1]. В наших опытах лишь глицерин в концентрации 10 %

оказывал такое действие на иницируемый стрептокиназой фибринолиз. Возможно, этот процесс является в какой-то мере исключением и представляет частный случай.

Следует отметить, что иницированный стрептокиназой фибринолиз при замене воды алифатическими спиртами усиливался тем заметнее, чем большей была гидрофобность спирта по шкале Гильдебрандта или Спайдера [6]. Двухфазный характер действия фенола может объясняться тем, что в более низких концентрациях он действовал на процесс как и остальные спирты, а в более высоких — вызывал коагуляцию белков, вследствие чего реакция угнеталась. Эффект апротонных растворителей не коррелирует со степенью их гидрофобности или значениями диэлектрической проницаемости. Возможно, в этих растворителях, в соответствии с их структурой, проявлялись дополнительные эффекты. В этом отношении обращает на себя внимание заметная окисляющая способность ДМСО [7] и высокая растворимость в ДМФА высокомолекулярных пептидов [13] — возможных продуктов процесса в исследуемой системе.

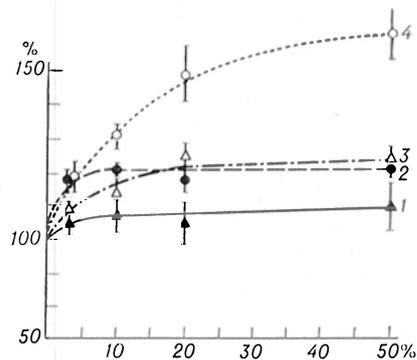


Рис. 4. Изменения иницируемого стрептокиназой фибринолиза при частичной замене воды апротонными растворителями: ацетоном (1), диоксаном (2), ДМСО (3), ДМФА (4); $n=6$.

Можно полагать, что обнаруженные эффекты связаны с разрушением органическими растворителями комплекса пламиноген — α_2 -антиплазмина. В результате этого пламиноген освобождается, приобретает способность к сорбции на фибрине и при преобразовании в плазмин осуществляет деградацию фибрина. Однако такая ситуация возможна лишь в том случае, если часть пламиногена находится в несорбированном на фибрине состоянии. Как известно, в противоположном случае пламиноген не образует комплекса с α_2 -антиплазмином [5]. Результаты опытов с добавлением ϵ -аминокапроновой кислоты, специфически подавляющей сорбцию пламиногена на фибрине [17], не подтверждали предположения о том, что органические растворители (например, этанол) влияют на фибринолиз в данной системе путем разрушения комплекса пламиноген — α_2 -антиплазмин. Указанная аминокислота не снимала активирующего влияния этанола. В этой связи представляется весьма вероятным прямое влияние органических растворителей на взаимодействие стрептокиназы с пламиногеном.

Авторы выражают благодарность Г. С. Давыдовой и Н. Л. Шатило за предоставленные образцы культуральной жидкости для выделения очищенной стрептокиназы и Т. С. Пасхиной за участие в дискуссии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абатуров Л. В., Лебедев Ю. О., Носова Н. Г. // Молекул. биол. — 1983. — № 3. — С. 543—567.
2. Андреев Г. В. Фибринолиз. Химия и физиология процесса. Клиническое применение фибринолизина. — М., 1967.
3. Антонов В. К. Химия протеолиза. — М., 1983.
4. Кудинов С. А. // Биохимия животных и человека. — Киев, 1982. — Вып. 6. — С. 73—84.

5. Лурье А. А. Хроматографические материалы. — М., 1978.
6. Методы исследования фибринолитической системы крови / Андреев Г. В., Карабасова М. А., Лютова Л. В. и др. — М., 1981.
7. Моррисон Р., Бойд Р. Органическая химия: Пер. с англ. — М., 1974.
8. Никандров В. Н. // Энзимология тромбозиса и стрептокиназа. — Минск, 1982. — с. 23—24.
9. Никандров В. Н. // Изв. АН БССР: Сер. биол. наук. — 1985. — № 3. — С. 64—67.
10. Никандров В. Н., Воробьева Г. В., Демидчик Н. В., Казюшц О. А. // Энзимология тромбозиса и стрептокиназа. — Минск, 1982. — С. 47—53.
11. Розенфельд М. А., Фатеева Л. А., Гончарь И. Д. // Биохимия. — 1983. — № 7. — С. 1135—1140.
12. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. — Минск, 1973.
13. Физер Л., Физер М. Реагенты для органического синтеза: Пер. с англ. — Т. 1. — М., 1970.
14. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
15. Mozen M. // Thrombosis and Bleeding Disorders. Theory and Methods. — Stuttgart, 1971. — P. 376—379.
16. Robbins K. C., Summaria L. // Meth. Enzymol. — 1970. — Vol. 19. — P. 184—186.
17. Wolf P. // Fibrinolysis and Urokinase. — London, 1980. — P. 43—53.

Поступила 22.08.85

EFFECT OF ORGANIC SOLVENTS ON THE STREPTOKINASE INITIATED FIBRINOLYSIS

V. N. Nikandrov, N. S. Ryzhova, V. I. Voltyakov
Byelorussian Institute of Epidemiology and Microbiology, Minsk

Proton-developing (ethanol, I-propanol, I-butanol, I-pentanol) and aprotion solvents (dioxane, dimethylsulfoxide, dimethylformamide) at concentrations 1.5-50 % activated the streptokinase-initiated fibrinolysis. Methanol and acetone were not effective. The rate of fibrinolysis, studied in presence of glycerol and phenol (used at 0.1-9.3 % concentrations), depended on concentrations of these reagents in samples. Efficiency of aliphatic alcohols was increased with elongation of hydrocarbonic chain. The activating effect of ethanol was not removed by ϵ -aminocaproic acid 10^{-2} M.

А. Д. Дмитриев, А. В. Теннов, М. Я. Цуцуйковская, Б. С. Беляев,
Е. А. Кизим, О. Ф. Дмитриева

РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ α - γ -ЭНДОРФИНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ЭНДОГЕННЫМИ ДЕПРЕССИЯМИ

Институт клинической психиатрии Всесоюзного научного центра психического здоровья АМН СССР, Москва

Опиоидные пептиды гипофиза — эндорфины способны наряду с модуляцией болевой чувствительности изменять различные физиологические, биохимические и электрофизиологические характеристики организма, а также влиять на довольно сложные поведенческие реакции [3, 4]. В связи с этим возможное участие эндорфинов в патогенезе и развитии различных неврологических, нейроэндокринных и психических заболеваний привлекает в настоящее время большое внимание. Наряду с изучением молекулярных механизмов биосинтеза, метаболизма и биологического действия эндорфинов весьма важным для клинического применения является совершенствование методик определения содержания эндорфинов в биологических жидкостях организма и выявление зависимостей между проявлениями определенных форм патологии и сопутствующими изменениями концентрации эндорфинов в организме, в первую очередь в периферической крови.

Вскоре после обнаружения эндорфинов в ряде лабораторий были получены антисыворотки к эндорфинам и разработаны методики определения эндорфинов с помощью радиоиммунологического анализа [7, 9]. Однако до последнего времени анализ содержания эндорфинов в плазме крови и спинномозговой жидкости человека ограничивался определением β -эндорфин-иммунореактивных соединений [6, 14, 15]. В то же время нарушения метаболизма α - и γ -эндорфинов при патологических состояниях могут представлять большой интерес в связи с их противоположным действием на поведенческие реакции активного и пассивного избегания [10] и наличием таких неординарных свойств, как, например, нейролептическая активность γ -эндорфина и его фрагментов, вплоть до дезэнкефалин- γ -эндорфина [5].

В настоящей работе проведена про-

верка пригодности полученных ранее антисывороток к α - и γ -эндорфинам [1] для определения содержания этих пептидов в периферической крови человека. Определены базальные уровни этих нейропептидов в плазме крови здоровых доноров. Проведена работа по выявлению содержания α - и γ -эндорфинов в плазме крови больных эндогенными психозами с выраженной депрессивной симптоматикой, что представляет интерес ввиду наличия данных об определенных нарушениях в гормональной системе гипоталамус — гипофиз — надпочечники, проявляющихся в аномальных результатах дексаметазонового теста у значительной части депрессивных больных [8, 12].

Методика

В работе применяли антисыворотки к α - и γ -эндорфинам, полученные при иммунизации кроликов конъюгатами эндорфинов с бычьим сывороточным альбумином [1]. Использовали синтетические α - и γ -эндорфины¹ (ВКНЦ АМН СССР), 2-меркаптоэтанол фирмы "Serva", NaN_3 и полиэтиленгликоль 6000 фирмы "Merck"; бычий сывороточный альбумин (фракция V) фирмы "Calbiochem". Остальную сыворотку к иммуноглобулинам кролика получили из Института микробиологии им. Гамалеи.

Для определения базального уровня α - и γ -эндорфинов в плазме крови были использованы образцы крови 18 здоровых доноров (12 мужчин и 6 женщин в возрасте от 18 до 37 лет). В исследование были также включены 18 больных эндогенными психозами с выраженной депрессивной симптоматикой (8 мужчин и 10 женщин в возрасте от 20 до 58 лет), находящихся на лечении в стационаре клиники Института клинической психиатрии ВКНЦ АМН СССР. Образцы крови объемом 10 мл брали натощак в 9--10 ч утра из локтевой вены в пробирки, охлажденные до 0°C и содержащие 0,2 мл 0,5 М ЭДТА. Кровь центрифугировали 20 мин при 1500 g и 0°C. К плазме добавляли 2-меркаптоэтанол до конечной концентрации 0,1% и пробы до анализа хранили при -70°C. Перед проведением

¹ Эндорфины были любезно предоставлены проф. М. И. Титовым (Лаборатория синтеза пептидов, ВКНЦ АМН СССР).

анализа их размораживали при 0° и центрифугировали 15 мин при 1000 g и 0°С.

Определение концентраций α - и γ -эндорфинов в образцах плазмы крови проводили радиоиммунологическим методом. Все образцы анализировали в трех параллельных пробах одновременно в одном опыте. Использовали антисыворотки и ^{125}I -пептиды, полученные, как описано ранее [1]. Антисыворотка № 80 (АС № 80) к α -эндорфину имела чувствительность около 10 пг в пробе. Перекрестная иммунореактивность составляла 2,6 % по отношению к β -эндорфину, 14 % по отношению к γ -эндорфину, 14,2 % по отношению к дезтирозил- γ -эндорфину и менее 0,02 % к лейцил- и метионин-энкефалинам. Антисыворотка № 49 (АС № 49) к γ -эндорфину имела чувствительность около 2 пг в пробе и перекрестную иммунореактивность 0,25 % к α -эндорфину, 4,4 % к β -эндорфину, 60 % к дезтирозил- γ -эндорфину и менее 0,02 % к лейцил- и метионин-энкефалинам. Инкубационная смесь объемом 1 мл содержала 0,05 M Na-фосфатный буфер pH 7,5, 0,15 M NaCl, 0,2 % бычий сывороточный альбумин, 0,02 % азид натрия, 0,1 мл специфической антисыворотки (в случае АС № 80 конечное разведение составляло 1 : 50 000, в случае АС № 49 — 1 : 100 000), 0,1 мл ^{125}I -пептида (около 20 000 имп/мин) и 0,2 мл (в случае анализа α -эндорфина) или 0,25 мл (в случае γ -эндорфина) анализируемого образца плазмы крови. В пробы, содержащие стандартные количества синтетических пептидов, добавляли соответствующие количества (0,2 мл или 0,25 мл) буфера с ЭДТА и 2-меркаптоэтанолом. Инкубацию проводили в 2 этапа: сначала неполную инкубационную смесь (без меченых пептидов) инкубировали 24 ч при 4°С, затем добавляли ^{125}I -пептиды и смесь инкубировали еще 48 ч при 4°С. Комплексы антиген—антитело осаждали добавлением к пробам 0,1 мл нейтральной сыворотки кролика в разведении 1 : 30 и 0,1 мл ослиной антисыворотки к иммуноглобулинам кролика в преципитирующей концентрации. Пробы инкубировали 30 мин при 4°С, добавляли в них по 0,6 мл охлажденного 8 % раствора полиэтиленгликоля 6000 и центрифугировали 30 мин при 1000 g и 4°С, надосадочные жидкости отделяли и радиоактивность в осадках определяли на программируемом счетчике "Gamma 4000" фирмы "Beckman". Коэффициент вариабельности радиоиммунологического определения эндорфинов составлял менее 10 %. Полученные результаты анализировали с использованием *t*-критерия Стьюдента. Корреляционный анализ проводили по программе мини-ЭВМ "Comprog 140".

Результаты и обсуждение

Для выяснения вопроса о возможности непосредственного (без предварительной экстракции) определения концентраций α - и γ -эндорфинов в образцах плазмы крови с помощью полученных ранее антисывороток [1] было исследовано влияние плазмы крови, обработанной для удаления пептидов активированным углем, на эффективность тестирования стандартных коли-

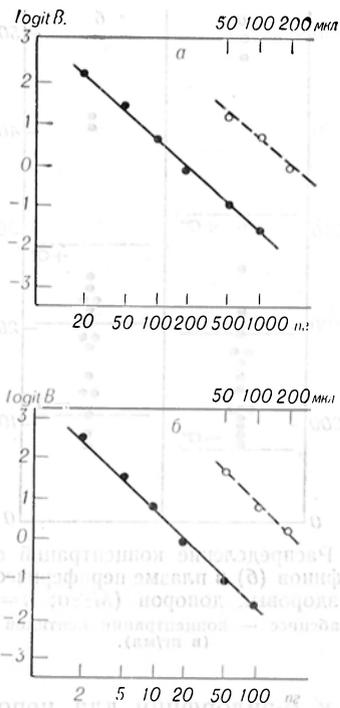


Рис. 1. Вытеснение меченых α - (а) и γ -эндорфинов (б) из комплексов со специфическими антисыворотками различными объемами плазмы крови здоровых доноров (пунктирная линия) и соответствующими синтетическими пептидами (сплошная линия).

По осям абсцисс: а — α -эндорфин (в пг в пробе); б — γ -эндорфин (в пг в пробе).

честв синтетических α - и γ -эндорфинов методом радиоиммунологического анализа. Установлено, что присутствие в инкубационной смеси до 400 мкл обработанной активированным углем плазмы крови здоровых доноров практически не влияет на результаты анализа.

При вытеснении меченых пептидов из комплексов со специфическими антителами различными количествами плазмы крови здоровых доноров были получены кривые конкурентного вытеснения, приведенные на рис. 1 в линеаризующих координатах $\logit B$ — $\log C$.

Параллельность конкурентных прямых, полученных при добавлении в пробу образцов плазмы или синтетических эндорфинов, свидетельствует о близкой родственности или полной идентичности присутствующих в плазме крови иммунореактивных соединений и соответствующих синтетических пептидов.

Проверенная таким образом пригодность АС № 80 к α -эндорфину и АС

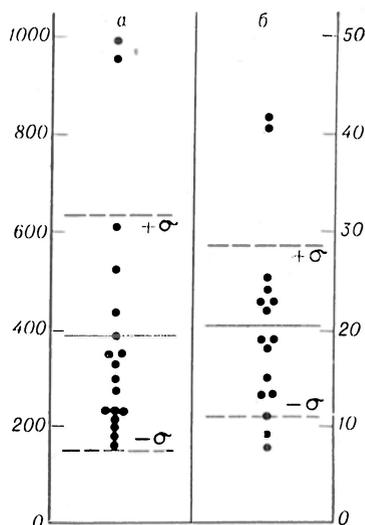


Рис. 2. Распределение концентраций α - (а) и β -эндорфинов (б) в плазме периферической крови здоровых доноров ($M \pm \sigma$; $n=18$).

По оси абсцисс — концентрация пептидов в плазме (в пг/мл).

№ 49 к γ -эндорфину для непосредственного определения α - и γ -эндорфинов в образцах плазмы крови позволила исследовать содержание соответствующих пептидов в образцах плазмы крови здоровых доноров. Образцы, хранившиеся при температуре -70°C , анализировали в двух независимых опытах с интервалом в 1 мес, причем изменения результатов в зависимости от времени хранения практически не наблюдалось.

Базальный уровень эндорфинов в плазме крови составил ($M \pm \sigma$): 392 ± 244 пг/мл для α -эндорфина и $20,6 \pm 9,1$ пг/мл для γ -эндорфина. Обращает на себя внимание довольно высокая (особенно у мужчин) индивидуальная вариабельность в концентрациях α - и γ -эндорфинов: 170—995 пг/мл в случае α -эндорфина и 8,3—41,5 пг/мл для γ -эндорфина (рис. 2).

При корреляционном анализе не обнаружено заметной связи между концентрациями α - и γ -эндорфинов в плазме крови и возрастом доноров ($r_\alpha = +0,08$ и $r_\gamma = -0,04$). Не было выявлено также достоверных различий в концентрациях α - и γ -эндорфинов у мужчин и женщин: $C_{\alpha, \varphi} = 309 \pm 64$ пг/мл, $C_{\alpha, \sigma} = 434 \pm 290$ пг/мл, $t = 1,4 < t_{st}$ и $C_{\gamma, \varphi} = 20,8 \pm 2,0$ пг/мл, $C_{\gamma, \sigma} = 20,5 \pm 11,0$ пг/мл, $t = 0,1 \ll t_{st}$.

Обнаружено, что концентрации α - и γ -эндорфинов в плазме периферической

крови тесно связаны друг с другом — коэффициент корреляции для группы здоровых доноров составил $+0,88 \pm 0,12$, $P < 0,001$. Этот факт хорошо согласуется с известным механизмом образования α -, β - и γ -эндорфинов из общего предшественника — проопиомеланокортина [11] и свидетельствует об общности механизмов регуляции синтеза, секреции и деградации этих пептидов.

Помимо определения базальных уровней α - и γ -эндорфинов в плазме периферической крови здоровых доноров, была сделана попытка выявить изменения в содержании α - и γ -эндорфинов в плазме крови психических больных с выраженной депрессивной симптоматикой. При анализе образцов крови 18 больных эндогенными депрессиями не было обнаружено достоверных изменений в концентрациях α - и γ -эндорфинов по сравнению с базальным уровнем ($C_\alpha = 376 \pm 126$ пг/мл, $t = 0,25$ и $C_\gamma = 23,7 \pm 8,7$ пг/мл, $t = 1,06$). Не обнаружено и значимой связи между содержанием α - и γ -эндорфинов в плазме периферической крови и тяжестью депрессивной симптоматики, оцененной по шкале Гамильтона ($r_\alpha = -0,17$ и $r_\gamma = +0,02$). Коэффициент корреляции между уровнями α -эндорфина и γ -эндорфина в плазме для депрессивных больных составил $+0,71 \pm 0,18$ и не отличался достоверно ($t = 0,8$) от значения, полученного для группы здоровых доноров.

Отсутствие достоверных различий в содержании α - и γ -эндорфинов в плазме крови больных эндогенными депрессиями и здоровых доноров согласуется с имеющимися данными об отсутствии изменений уровня β -эндорфина в плазме крови депрессивных больных [6, 2, 13], однако не может рассматриваться как окончательное свидетельство отсутствия нарушений механизмов регуляции синтеза, секреции и деградации эндорфинов при депрессиях, поскольку содержание эндорфинов в плазме периферической крови может не отражать локальные нарушения метаболизма эндорфинов, происходящие, например, в гипоталамусе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дмитриев А. Д., Голикова Ю. И., Кобылянский А. Г. и др. // Нейрохимия. — 1982. — № 1. — С. 66—74.

2. *Atexopoulos G. S., Inturrisi C. E., Lipman R. et al.* // Arch. gen. Psychiat. — 1983. — Vol. 40. — P. 181—183.
3. *Bohus B.* // Advanc. Biol. Psychiat. — 1980. — Vol. 5. — P. 7—19.
4. *De Wied D., Bohus B., Van Ree J. M., Urban I.* // J. Pharmacol. exp. Ther. — 1978. — Vol. 204. — P. 570—580.
5. *De Wied D., Van Ree J. M., Greven H. M.* // Life Sci. — 1980. — Vol. 26. — P. 1575—1579.
6. *Emrich H. M., Holtt V., Kissling W.* // Advanc. exp. Med. Biol. — 1979. — Vol. 116. — P. 307—317.
7. *Guillemin R., Ling N., Vargo T.* // Biochim. biophys. Res. Commun. — 1977. — Vol. 77. — P. 361—366.
8. *Gwirtsman H., Gerner R. H., Sternbach H.* // J. clin. Psychiat. — 1982. — Vol. 43. — P. 321—327.
9. *Jeffcote W. J., McLoughlin L., Hope J.* // Lancet. — 1978. — Vol. 2. — P. 119—121.
10. *Kovacs G. L., Bohus B., De Wied D.* // Neurosci. Lett. — 1981. — Vol. 22. — P. 79—82.
11. *Mains R. E., Eipper B. A., Ling N.* // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1979. — Vol. 74. — P. 3014—3018.
12. *Peselow E. D., Goldring N., Fieve R. R., Wright R.* // Psychopharmacol. Bull. — 1983. — Vol. 19. — P. 87—91.
13. *Pickar D., Cutler N. R., Naber D.* // Lancet. — 1980. — Vol. 1. — P. 937.
14. *Wardlaw S. L., Frantz A. G.* // J. clin. Endocr. — 1979. — Vol. 48. — P. 176—180.
15. *Wilkes M. M., Stewart R. D., Bruni J. F.*

et al. // Ibid. — 1980. — Vol. 50. — P. 309—315.

Поступила 13.11.85

RADIOIMMUNOLOGICAL PROCEDURE FOR ESTIMATION OF α - AND γ -ENDORPHINES IN BLOOD PLASMA OF HEALTHY DONORS AND OF PATIENTS WITH ENDOGENOUS DEPRESSION.

A. D. Dmitriev, A. V. Tenny, M. Ya. Tsul'sul'kovskaya, B. S. Belyaev, E. A. Kizim, O. F. Dmitrieva

Institute of Clinical Psychiatry, All-Union Research Centre of Physical Health, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Radioimmunological procedure enabled to estimate α - and γ -endorphins in human blood plasma without preextraction. Basal level of these neuropeptides in peripheric blood plasma of 18 healthy donors constituted: $C_{\alpha} = 392 \pm 244$ pg/ml and $C_{\gamma} = 20.6 \pm 9.1$ pg/ml. Content of these endorphines in blood plasma did not depend on age and sex. Concentration of α - and γ -endorphins were shown to correlate in peripheric blood ($r=0.88$); this suggests the overall mechanisms for regulation of their synthesis, secretion and degradation. At the same time, distinct differences in concentrations of α - and γ -endorphins in blood plasma were not found in groups of healthy donors and of patients with endogenous psychoses and pronounced depressive symptoms.

УДК 616.631.11-055.5/7-07:616.61-008.93:577.112.8531-074

Л. Ф. Никифоровская, Л. Н. Иванова

ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНЫ И ГЛИКАНОГИДРОЛАЗЫ В ПОЧКЕ КРЫС С НАСЛЕДСТВЕННЫМ НЕСАХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Институт цитологии и генетики СО АН СССР, Новосибирск

Известно, что главным эффектом антидиуретического гормона (АДГ) в почке млекопитающих является увеличение реабсорбции осмотически свободной воды. Существенным барьером для движения воды и рециркуляции электролитов между структурами мозгового вещества почки могут быть базальная мембрана и интерстициальная ткань, богатая мукоидными веществами. Согласно гипотезе А. Г. Гинецинского, одним из биохимических субстратов действия АДГ в почке млекопитающих является система гиалуронидазы — гиалуроновая кислота [3]. Наличие гликозаминогликанов (ГАГ) и гиалуронидазы в ткани почки было показано как гистохимическими, так и биохимическими методами [1, 6, 10, 16, 18, 31]. Появился ряд данных, подтвер-

ждающих участие ГАГ и гиалуронидазы в процессах транспорта воды в почке, регулируемого АДГ [5, 21, 22, 24, 33]. В связи с этим представлялось интересным изучить активность лизосомальных ферментов, участвующих в катаболизме ГАГ у крыс с наследственным дефектом синтеза АДГ, поскольку из предыдущих наших исследований стало очевидным, что состояние субстрата и активность ферментов в мозговом веществе почки млекопитающих заметно изменяются в зависимости от функционального состояния концентрирующего механизма [11, 12]. В настоящей работе определяли содержание ГАГ и активность гиалуронидазы, β -глюкуронидазы и N-ацетил- β -D-гексозаминидазы в корковом, наружном и внутреннем мозговых слоях поч-

ки крыс Браттлборо, характеризующихся полным отсутствием АДГ (у гомозигот) или частичным (у гетерозигот) снижением синтеза АДГ.

Методика

Крысы Браттлборо с наследственным гипоталамическим несахарным диабетом были любезно предоставлены Институтом физиологии Чехословацкой академии наук и разведены из этого стока в виварии ИЦиГ СО АН СССР. В опыт брали взрослых гетерозигот и гомозигот обоего пола. Для изучения ферментативной активности животных разделяли на две группы. Одну группу содержали в обычном водно-солевом режиме, другой вводили внутривенно питуитрин П дважды по 500 мкЕ на 100 г массы с интервалом 30 мин. Спустя 40 мин после повторного введения питуитрина крыс декапитировали. Почки отмывали от крови охлажденным физиологическим раствором через катетер, введенный в брюшную аорту, и разделяли на корковую зону и мозговое вещество, из которого иссекали сосочки. Для одного анализа материал объединили от 2—3 животных. Экстракты получали, как описано в литературе [18], диализовали их в течение ночи при 4°C против соответствующих буферов: 0,1 М ацетатный буфер, pH 3,8 — для определения суммарной активности гликаногидролаз и активности гиалуронидазы; 0,1 М ацетатный буфер, pH 4,85 — для β-гликуронидазы и 0,05 М натрийцитратнофосфатный буфер, pH 4,85 — для N-ацетил-β-D-гексозаминидазы. При определении суммарной активности гликаногидролаз и активности гиалуронидазы в качестве субстрата использовали натриевую соль гиалуроновой кислоты, полученную из почечных канатиков новорожденных [7] с последующей фенольной депротенизацией. Препарат содержал около 3 % белка, 45 % N-ацетилглюкозамина и 42 % уроновой кислоты. Активность гиалуронидазы выявляли в присутствии ингибитора β-гликуронидазы — слизиной кислоты в концентрации $2 \cdot 10^{-3}$ М [2]. Суммарную гликаногидролазную активность и активность гиалуронидазы определяли в условиях 4-часового гидролиза при 37°C по конечному продукту N-ацетил-D-глюкозамину и выражали в микрограммах аминасахара на 1 мг белка в пробе. N-ацетил-D-глюкозамин определяли, как описано в литературе [32]. В качестве субстрата для определения активности β-гликуронидазы [25] использовали п-нитрофенил-β-D-гликуронид, синтезированный в Институте химической кинетики и горения СО АН СССР по методу Боуринга и др. [19]. Данные о температуре плавления, удельном вращении и проценте основного вещества синтезированного препарата были близки к теоретическим. Инкубацию проб проводили при 37°C в течение 2 ч. Активность β-гликуронидазы выражали в микромолях п-нитрофенола, отщепленного от субстрата за 1 ч на 1 мг белка в миллилитрах. Активность N-ацетил-β-D-гексозаминидазы определяли с п-нитрофенил-β, 2-ацетиамидо - 2-дезоксид - D-глюкопиранозидом («Серва» ФРГ) по методу Вейсмана [37] в условиях 15-минутного гидролиза и выражали в микромолях п-нитрофенола на 1 мг белка в 1 мл за 1 ч. Для определения активности гли-

козидаз в экстракте почечной ткани были подобраны оптимальные условия анализа (оптимум pH, природа буфера, время инкубации, влияние на скорость реакции концентрации субстрата и экстракта). Удаление из экстракта низкомолекулярных примесей путем диализа сопровождалось относительным увеличением активности ферментов и не вызывало ее снижения при хранении экстрактов в течение последующих дней на холоде. Белок в экстракте определяли методом Лоури [29]. В качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин (Австрия).

Для изучения ГАГ в почечной ткани использовали питающих грызунов. Выделение и анализ ГАГ проводили по описанной ранее методике [9] с применением протеолитического фермента папаина [34], модифицированной карбазольной реакции Динне [17]. Количество ГАГ рассчитывали в миллиграммах на 1 г сухой обезжиренной ткани.

У всех животных регистрировали показатели потребления воды, концентрацию осмотически активных веществ в моче и плазме методом криоскопии [4]. Об интенсивности осмотического концентрирования судили по индексу осмотического концентрирования, т. е. отношению концентраций осмотически активных веществ в моче и плазме крови (U/P)osm.

Результаты и обсуждение

Известно, что гомозиготным крысам Браттлборо, полностью лишенным АДГ, свойственна полидипсия и полиурия, крайняя гипотоничность мочи [36]. Исследованные нами гомозиготы выпивали за 1 сут от 40 до 80 мл на 100 г массы, гетерозиготы — от 1,5 до 12 % от массы тела. Осмолярность мочи была резко снижена у гомозигот по сравнению с гетерозиготами (рис. 1). Концентрация осмотически активных веществ плазмы крови гетерозигот практически не отличалась от концентрации их у белых крыс и составляла соответственно $305 \pm 1,2$ и $303 \pm 2,0$ мосмоль/л. Осмолярность плазмы кро-

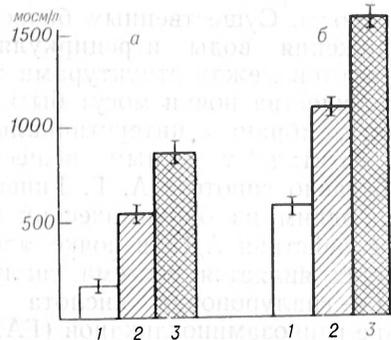


Рис. 1. Осмолярность мочи у крыс Браттлборо в контроле и после введения питуитрина П. а — гомозиготы, б — гетерозиготы. 1 — контроль; 2 — однократное введение гормона; 3 — двукратное введение гормона.

Активность гликаногидролаз сосочка почки гомозигот (D1) и гетерозигот (DZ) крыс Браттлборо в контроле и после введения питуитрина П

| Условия опыта | Общая активность гликаногидролаз | Гиалуронидаза | β -Глюкуронидаза | N-ацетилгексозами-нидаза |
|------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| | мкг N-ацетилглюкозамина на 1 мг белка | | мкМ п-нитрофенола на 1 мг белка | |
| Контроль (3) | 65,1 \pm 2,4 ^{xx} | 16,4 \pm 0,1 ^{xx} | 16,0 \pm 1,1 | 43,6 \pm 3,7 ^{xx} |
| D1: питуитрин П (3) | 80,8 \pm 2,3 ^{x,yy} | 21,3 \pm 2,5 ^{x,yy} | 19,6 \pm 0,3 _y | 55,2 \pm 4,1 _y |
| контроль (5) | 87,4 \pm 2,2 | 23,1 \pm 1,3 | 19,6 \pm 0,3 | 64,8 \pm 1,6 |
| DZ: питуитрин П (6) | 101,2 \pm 3,1 _y | 30,4 \pm 1,8 _{yy} | 20,8 \pm 1,0 _y | 74,0 \pm 4,8 _y |

Примечание. В скобках указано количество экспериментов, в каждом из которых объединен материал от 3 животных. Различия ферментативной активности между гомо- и гетерозиготами: x — $p < 0,01$, xx — $p < 0,001$; различия с контролем в каждой группе животных: y — $p < 0,05$, yy — $p < 0,01$.

тов — по зонам почки крыс Браттлборо распределены также неравномерно (см. рис. 2). Максимальное содержание ГАГ характерно для зоны сосочка как гетеро-, так и гомозигот, по направлению к корковому слою концентрация этих соединений резко падает. Вместе с тем у диабетических крыс содержание ГАГ в ткани почки было минимальным по сравнению с гетерозиготами и белыми крысами. Количество ГАГ в сосочке почки гомозигот составляло всего лишь 3,0—3,5 мг на 1 г сухой обезжиренной ткани, это примерно в 2,5—3,5 раза ниже по сравнению с количеством ГАГ в этой же зоне у гетерозигот и белых крыс. У гетерозигот, у которых лишь частично нарушена способность продуцировать вазопрессин и сохранена развитая концентрирующая функция, содержание ГАГ в зоне сосочка было снижено только на 20 % по сравнению с белыми крысами. Полученные результаты подтверждают гистохимические данные [15, 30, 35], согласно которым в интерстиции сосочка у гомозигот практически полностью редуцирована окраска ГАГ; они выявляются лишь преимущественно на апикальной поверхности эпителия собирательных трубок.

Таким образом, у гомозигот, лишенных эндогенного вазопрессина и неспособных вследствие этого концентрировать мочу, в сосочке почки — в зоне, где реализуется основное действие АДГ, снижено содержание ГАГ.

Введение крысам Браттлборо питуитрина П приводит к активации гликаногидролаз во всех зонах почки как у

гетеро-, так и у гомозигот, причем в сосочке почки стимулирующее влияние питуитрина было несравненно выше, чем в других функциональных зонах. Под влиянием экзогенного гормона на максимуме антидиуреза достоверно увеличивалась суммарная ферментативная активность, и это увеличение было за счет активации всех 3 исследованных ферментов (см. таблицу). Хотя уровень общей ферментативной активности в сосочке почки у диабетических крыс оставался ниже, чем у гетерозигот, процент его увеличения был приблизительно тем же.

Таким образом, сравнительное биохимическое исследование состояния фермент-субстратной системы в ткани почки гомо- и гетерозиготных крыс Браттлборо позволило выявить существенные различия. У гомозигот, страдающих гипоталамическим вазопрессин-зависимым несахарным диабетом, снижена концентрирующая функция почки, в интерстиции сосочка содержится мало ГАГ, но сохраняется достаточно высокая активность гликаногидролаз. Введение животным питуитрина П приводит к развитию антидиуреза и увеличению активности ферментов катаболизма ГАГ как у гетеро-, так и у гомозигот. Низкое содержание ГАГ в мозговом веществе почки у диабетических крыс объяснить пока трудно; можно предполагать как снижение их биосинтеза, так и усиление катаболизма. Снижение концентрации АГ, вероятно, не является прямым следствием ограничения синтеза ГАГ из-за отсутствия антидиуретической активности,

так как по гистохимическим данным длительное введение диабетическим крысам препарата АДГ (адиуретин СД, Spofa, ЧССР, 20 мкг на 100 г массы, 6 сут) не сопровождалось существенным нарастанием ГАГ сосочка почки [26]. С другой стороны, хроническая гипергидратация белых крыс приводила на 6-й день к снижению количества ГАГ структур во всем сосочке почки и сопровождалась реакцией всей эндокринной системы [13, 14]. Имея это в виду, можно предположить, что отсутствие ГАГ в структурах интерстиция сосочка почки у гомозигот обусловлено сложными гормональными взаимодействиями, поскольку у этих животных страдает вся эндокринная система, в том числе и кортикоидная функция надпочечников, имеющая отношение к регуляции синтеза ГАГ [20, 28]. Кроме того, снижение содержания ГАГ может быть обусловлено гидролизом их с последующим вымыванием продуктов гидролиза из интерстиция, поскольку ферментативная активность у диабетических крыс не подавлена. Базальная активность ферментов катаболизма АГ не зависит от уровня АДГ в крови, в то же время их активация, вероятно, находится под непосредственным контролем этого гормона. Ведение физиологических доз АДГ сопровождается одинаковым приростом уровня ферментативной активности сосочка почки как у гетеро-, так и у гомозиготных крыс Браттлборо, следовательно, у диабетических животных не страдает механизм активации гликаногидролаз.

Таким образом, полученные нами данные на гомозиготных крысах Браттлборо, лишенных эндогенного АДГ, дают возможность отчетливо продемонстрировать непосредственную связь антидиуретического эффекта, вызванного экзогенным гормоном, с активацией ферментной системы катаболизма ГАГ. Этот факт независимо от интерпретации данных о резком снижении ГАГ у диабетических крыс позволяет предполагать, что гликаногидролазы, активность которых контролируется АДГ, играют существенную роль в механизме его действия на почку млекопитающих.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баев А. А. // Докл. АН СССР. — 1967. — Т. 12. — С. 720—722.
2. Виха И. В., Приваленко М. П., Хорлиш А. Я. // Вопр. мед. химии, 1973, № 1. — С. 90—96.
3. Гинецкий А. Г. Физиологические механизмы водно-солевого равновесия. — М. — Л., 1964.
- 4—5. Гинецкий А. Г., Иванова Л. П. // Докл. АН СССР. — 1958. — Т. 119, № 5. — С. 1043—1045.
6. Иванова Л. П., Виноградов В. В. // Арх. анат. — 1962. — № 11. — С. 18—23.
7. Костенко С. С. // Вопр. мед. химии. — 1953, № 1. — С. 114—116.
8. Никифоровская Л. Ф. // Физиология и патология соединительной ткани. — Новосибирск, 1980. — С. 194—195.
9. Никифоровская Л. Ф. // Вопр. мед. химии. — 1971. — № 3. — С. 282—285.
10. Никифоровская Л. Ф., Виноградов В. В., Розин В. Г., Батенко Л. И. // Докл. АН СССР. — 1971. — Т. 200, № 4. — С. 986—989.
11. Никифоровская Л. Ф., Иванова Л. П. // Вопр. мед. химии. — 1981. — № 1. — С. 58—62.
12. Никифоровская Л. Ф., Мартынец Л. Д., Кононова А. Л. // Изв. Сибир. отд. АН СССР. — 1975. — Вып. 2, № 10. — С. 112—117.
13. Тернер А. Я. // Физиология и патология соединительной ткани. — Новосибирск, 1980. — С. 202.
14. Тернер А. Я., Батенко Л. И. Всесоюзная конф. по физиологии почек и водно-солевого обмена, 6-я: Материалы. — Новосибирск, 1981. — С. 263.
15. Тищенко Н. И. // Там же. — С. 269.
16. Allalouf D., Ber A., Sharon N. // Biochim. biophys. Acta. — 1964. — Vol. 83. — P. 278—287.
17. Bitter T., Muir H. M. // Analyt. Biochem. — 1962. — Vol. 4. — P. 330—334.
18. Bollet A. J., Bonner W. M., Nance J. L. // J. biol. Chem. — 1963. — Vol. 238. — P. 3522—3527.
19. Bowering W. D. S., Timell T. E. // J. Amer. chem. Soc. — 1960. — Vol. 82. — P. 2827—2830.
20. Calcagno M., Goyena H., Ambrambide E., de Urse C. A. // Exp. Cell Res. — 1970. — Vol. 63. — P. 131—137.
21. Castor P. M., Hreen J. A. // J. clin. Invest. — 1968. — Vol. 47. — P. 2125—2132.
22. Dicker S. E., Franklin C. S. // J. Physiol. (Lond.). — 1966. — Vol. 186. — P. 110—118.
23. Edwards B. R. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1982. — Vol. 394. — P. 414—423.
24. Farber S. J., Van Praag D. // Biochim. biophys. Acta. — 1970. — Vol. 208. — P. 219—226.
25. Fishman W. H., Kato K., Anstiss C. L. et al. // Clin. chim. Acta. — 1967. — Vol. 15. — P. 435—447.
26. Ivanova L. N., Goryunova T. E., Nikiiforovskaya L. F., Tischchenko, N. I. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1982. — Vol. 394. — P. 503—508.
27. Kinter L. B. // Ibid. — P. 448—463.
28. Koslowska K. // Digestion. — 1973. — Vol. 9. — P. 241—247.
29. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
30. McAuliffe W. G. // Amer. J. Anal. — 1980. — Vol. 157. — P. 17—26.

31. Murata K. // *Connect. Tissue Res.* — 1976. — Vol. 4. — P. 131—140.
32. Ressig J. L., Strominger J. L., Leboir L. F. // *J. biol. Chem.* — 1955. — Vol. 217. — P. 959—966.
33. Rowen D., Law R. O. // *Pflügers Arch.* — 1981. — Bd 390. — P. 152—155.
34. Schiller S., Slover G., Dorfman A. // *J. biol. Chem.* — 1961. — Vol. 236. — P. 983—987.
35. Tisher C. C., Bulger R. E., Vallin H. // *Amer. J. Physiol.* — 1971. — Vol. 220. — P. 87—94.
36. Vallin H., Schroeder H. A., Benirschke K., Sonol H. W. // *Nature.* — 1962. — Vol. 196. — P. 1109—1110.
37. Weissman B., Rowin G., Marchall J. et al. // *Biochemistry (Wash.)*. — 1967. — Vol. 6. — P. 207—214.

Поступила 13.11.85

GLYCOSAMINOGLYCANS AND GLYCANOHYDROLASES IN KIDNEY OF RATS WITH HEREDITARY DIABETES INSIPIDUS

L. F. Nikiforovskaya, L. N. Ivanova

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk

Distribution of glycanohydrolases activity (hyaluronidase, β -glucuronidase, N-acetyl- β -D-hexosaminidase) and glycosaminoglycans in different renal zones (papilla, external medulla, cortex) of homo- and heterozygous Brattleboro rats with hereditary defect of antidiuretic hormone synthesis was studied. Content of the glycosaminoglycans in kidney preparations of homozygotes was shown to be minimal as compared with other rodents;

at the same time, the activity of glycanohydrolases in the papilla of diabetic rats was comparatively high. Administration of the anti-diuretic hormone at physiological doses was followed by the same increase in the enzymatic activity in renal papilla of homo- and heterozygotes, while certain correlation between the urine osmolality and the degree of the enzymes activation was observed.

УДК 616.36-008.931:577.152.193.11-099-02:547.391.1

Ю. В. Котловский, Н. И. Гуткина, Л. М. Гуляева, А. И. Довгий,
Н. В. Андрианов, В. М. Мишин, В. В. Иванов

ВЛИЯНИЕ АКРИЛАТОВ НА СОДЕРЖАНИЕ И ИЗОФОРМНЫЙ СОСТАВ ЦИТОХРОМА P-450 МИКРОСОМ ПЕЧЕНИ КРЫС

Кафедра патологической физиологии Красноярского медицинского института; кафедра биохимии II ММИ, Отдел физиологии и патологии клетки Института клинической и экспериментальной медицины СО АМН СССР

В настоящее время недостаточно изучена роль микросомального метаболизма в проявлении токсического эффекта акрилатов (Ак). Так, установлено лишь, что эти промышленные мономеры, не изменяя общего содержания цитохрома P-450 — ключевого фермента системы микросомальных монооксигеназ (СММ), играющего важную роль в обезвреживающей функции организма животных, ингибируют окисление ряда соединений, происходящее при участии этого фермента [2, 5]. В то же время не выяснено влияние Ак на содержание цитохромов P-450_n и P-450_c, являющихся основными подфракциями цитохрома P-450 микросом печени крыс и определяющими токсичность большинства ксенобиотиков [17, 18]. Термин цитохром P-450 мы применяем для обозначения всех изоформ микросомального гемопротенида. P-450_n — большой гемопротенин, индуцируемый

фенобарбиталом, P-450_c — основной гемопротенин, индуцируемый 3-метилхолантеном [17]. Целью данной работы явилось изучение влияния Ак на содержание и изоформный состав цитохрома P-450.

Методика

Работа выполнена на белых беспородных крысах-самцах массой 150—200 г. Акриламид (АА), метилметакрилат (ММА), бутилметакрилат (БМА) вводили 1 раз в день на протяжении 3 дней внутрибрюшинно в дозах 0,4; 6,0 и 9,0 ммоль/кг соответственно. Животных умерщвляли через 24 ч после последнего введения ксенобиотиков. Микросомы печени крыс получали методом дифференциального центрифугирования. Подфракции цитохрома P-450 — P-450_n и P-450_c согласно классификации [17] выделяли из микросом печени крыс, индуцированных фенобарбиталом (ФБ) или метилхолантеном (МХ) в течение 4 дней [6, 7]. Микросомы обрабатывали холатом натрия, белок соллобиллизата высаливали полиэтиленгликолем-6000. Осадки фракций, осаждаемых

при концентрации полиэтиленгликоля 8—11 и 11—14 %, хроматографировали на 1,8-диаминооктилсепарозе 4В. Использовали электрофоретически гомогенные препараты цитохромов Р-450_н и Р-450_с с удельной активностью 12 и 17 нмоль на 1 мг белка соответственно.

Антисела против цитохромов Р-450_н и Р-450_с получали иммунизацией взрослых беспородных кроликов путем внутрикожного введения очищенных цитохромов Р-450_н и Р-450_с [8]. Сыворотку крови животных брали через 10 дней после разрешающего внутривенного введения антигена. Фракцию иммуноглобулина получали из сыворотки фракционированием сульфатом аммония. Белок определяли методом Лоури [10]. Общее содержание цитохрома Р-450 — по СО-пику в дифференциальном спектре восстановленного гемопротенида [13]. Спектрофотометрические измерения проводили на двухволновых спектрофотометрах "Hitachi 556" и "Hitachi 557". Наличие Р-450_н и Р-450_с подфракций цитохрома Р-450 в микросомах печени крыс, отравленных акрилатами, определяли по методу Оухтерлони [15].

Для количественного определения этих подфракций цитохрома Р-450 в нативных микросомных мембранах использовали метод ракетного иммунофореза, как описано ранее [16]. Очищенные цитохромы Р-450_н и Р-450_с и солюбилизованные микросомные мембраны подвергали иммунофорезу в 1% агарозном геле, содержащем антитела против цитохромов Р-450_н (10 мг на 1 мл агарозы), Р-450_с (2 мг на 1 мл агарозы). Пики преципитации окрашивали при помощи Кумасси.

Электрофорез белков микросом проводили в градиенте концентрации ПААГ (5—15 %) по методу, приведенному ранее [9], адаптированному для работы в пластинках геля. К суспензии микросом (20 мг/мл по белку) добавляли 4 объема буфера [9] (додецилсульфата — 2%; β-меркаптоэтанол — 5%; глицерина — 10%; 0,125 М трис-НСl, рН 6,8), после чего инкубировали 2 мин при 100 °С. На дорожку наносили 100 мкг белка микросом, производя их электрофоретическое разделение в режиме постоянного тока 50 мА. Молекулярную массу белков определяли, используя в качестве стандарта набор белков фирмы "Pharmacia Fine Chemicals" α-лакто-

альбумин (14 400 Д), ингибитор трипсина (20 700 Д), карбоангидразу (29 000 Д), овалбумин (43 000 Д), бычий сывороточный альбумин (67 000 Д) и фосфорилазу В (94 000 Д). Гели окрашивали Кумасси бриллиантовым голубым R-250. Денситометрирование проводили на приборе "Quesch-Scan" фирмы "Helen Frans", снабженном интегратором. Площади полученных пиков определяли в процентах к общей площади денситограммы, благодаря чему исключалась необходимость учета количества образца, нанесенного на полосу.

Результаты исследования

В инкубационной среде, содержащей микросомы (контрольная серия) или микросомы и один из Ак (АА, ММА или БМА) не отмечалось инактивации цитохрома Р-450 (табл. 1). Инактивация появлялась при добавлении к микросомам НАДФ·Н-генерирующей системы и была значительно большей через 5—15 мин инкубации по сравнению с контрольной серией, но гораздо меньшей по сравнению с опытами, где инкубационная смесь содержала микросомы, НАДФ·Н-генерирующую систему и один из Ак. Причем усиление инактивации обнаруживалось раньше при внесении АА (см. табл. 1). Наличие резкой инактивации цитохрома Р-450 под влиянием Ак только в присутствии НАДФ·Н указывает на связь этого эффекта с микросомальным метаболизмом изучаемых промышленных мономеров. Аналогичные данные были получены ранее для АА [14]. Приведенные результаты, таким образом, показывают, что метаболиты изучаемых Ак являются более токсичными, чем исходные молекулы.

Т а б л и ц а 1

Влияние АА, ММА и БМА на аутоинактивацию цитохрома Р-450 микросом печени крыс

| Серия | Процент инактивации к первоначальному содержанию цитохрома Р-450 (в наномолях на 1 мг белка за определенное время инкубации) | | | | | |
|-----------------------------------|--|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | 0 мин | 5 мин | 10 мин | 15 мин | 20 мин | 30 мин |
| МК | 0/2,0 | 0/2,0 | 0/2,0 | 0/2,0 | 0/2,0 | 0/2,0 |
| МК + один из Ак (АА, БМА или ММА) | 0/2,0 | 0/2,0 | 0/2,0 | 0/2,0 | 0/2,0 | 0/2,0 |
| МК + НАДФ·Н | 0/2,1 | 0/2,1 | 5,0*/2,1 | 9,0*/2,1 | 25*/2,1 | 30*/2,1 |
| МК + АА + НАДФ·Н | 0/2,2 | 18*/0/2,2 | — | 41*/0/2,2 | — | 41*/2,2 |
| МК + ММА + НАДФ·Н | 0/2,0 | — | 35*/0/2,0 | — | 50*/0/2,0 | 55*/0/2,0 |
| МК + БМА + НАДФ·Н | 0/2,2 | 0/2,2 | — | 20*/0/2,2 | — | 41*/2,0 |

Примечание. Пробы содержали 0,2 М трис-НСl, рН 7,56; 10 мМ MgCl₂; 1 мМ ЭДТА; 6—7 мМ АА, ММА или БМА, 2 мг/мл микросомального белка. Реакцию начинали добавлением 1 мМ НАДФ·Н и генерирующей системы (2; 4 мМ НАДФ·Н; 0,1 М глюкозо-6-фосфат, 2 ед/мл глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы) МК — микросомы печени крыс, индуцированных фенобарбиталом. Звездочками и кружочками обозначены данные, достоверно отличающиеся от результатов опытов серий (МК, МК + один из Ак) и (МК + НАДФ·Н генерирующая система) соответственно.

Таблица 2

Влияние Ак на общее содержание цитохрома Р-450 и уровень его подфракции — Р-450_в в микросомах печени крыс

| Серия | Общее содержание цитохрома Р-450, нмоль на 1 мг белка | Содержание Р-450 _в , % от общего содержания цитохрома Р-450 |
|----------|---|--|
| Контроль | 0,96 | 0 |
| АА | 0,79 | 1,8 |
| ММА | 0,85 | 5,2 |
| БМА | 0,96 | 2,3 |
| ФБ | 2,54 | 32,3 |
| ФБ + АА | 2,54 | 22,9 |
| ФБ + ММА | 2,20 | 33,6 |

Примечание. Гель содержал антитела против цитохрома Р-450_в (10 мг белка на 1 мл 1% агарозы). В качестве стандарта использовали от 7 до 0,44 нмоль Р-450_в. Общее содержание цитохрома Р-450 определяли по СО пику в дифференциальном спектре восстановленного гемопротейда, процентное содержание Р-450_в — иммунофоретически по методу [16].

Интересно, что в опытах *in vivo* Ак не вызывают инактивации цитохрома Р-450 ни при введении контрольным животным, ни крысам, предварительно индуцированным фенобарбиталом (ФБ) (табл. 2). Отсутствие инактивации гемопротейна в организме объясняется, очевидно, более эффективной

детоксикацией Ак в организме, например путем дополнительного включения ферментов других органелл клетки, в частности митохондрий, в которых часть эстерифицированного под влиянием КоА метакрилата метаболизируется до СО₂ [3].

Токсичность, мутагенность и канцерогенность самых различных ксенобиотиков, окисляющихся в системе микросомальных монооксигеназ, определяется не только количественным содержанием цитохрома Р-450, но и его изоформным составом [18]. Поэтому в дальнейшем мы исследовали влияние Ак на содержание цитохромов Р-450_в и Р-450_с. В микросомах контрольных животных эти подфракции не обнаруживались, что соответствует их очень низкому содержанию и согласуется с литературными данными [16, 17]. ММА (6 ммоль/кг), БМА (9 ммоль/кг) и АА (0,4 ммоль/кг) давали слабый индуцирующий эффект на цитохром Р-450_в. Не отмечалось существенного изменения этой подфракции цитохрома Р-45 и при совместном введении Ак с ФБ по сравнению с теми опытами, когда вводили один ФБ (см. табл. 2).

При определении содержания Р-450_с по Оухтерлони образовывалась линия преципитации между его антителами и самим очищенным цитохромом Р-450_с

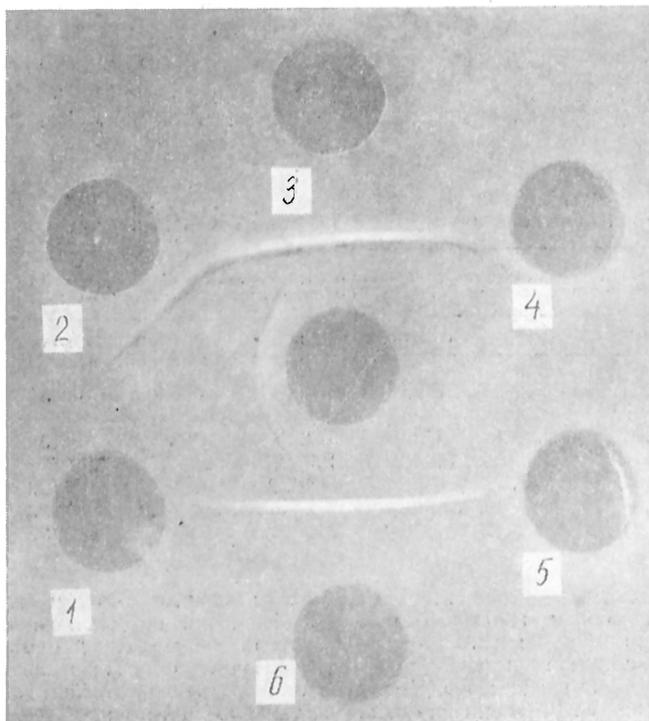


Рис. 1. Цитохром Р-450_с (тест двойной иммунодиффузии по Оухтерлони) в микросомах печени крыс, отравленных ММА, БМА и АА.

Центральная лунка содержит антитела (10 мг/мл) против цитохрома Р-450, лунки 3 и 6 — 0,1 нмоль цитохрома Р-450_с, лунки 1, 2 и 4 — 0,1 нмоль цитохрома, полученного от животных, которым вводили ММА, БМА и АА соответственно, лунка 5 — физиологический раствор.

Влияние Ак на распределение белков микросом печени крыс по молекулярной массе

| Серия | Отношение белков с различной молекулярной массой к общей площади денситограммы | | | | | | | |
|----------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|
| | 46 кД | 48 кД | 50 кД | 51 кД | 53 кД | 55 кД | 56 кД | 46—56 кД |
| Контроль | 9,4 | 2,9 | 2,0 | 3,1 | 1,5 | 2,0 | 2,3 | 23,2 |
| ММА | 10,4 | 1,0* | 2,0 | 2,3 | 1,7 | 1,3 | 3,2 | 21,9 |
| БМА | 11,4 | 0,7* | 1,6 | 3,0 | 1,5 | 1,0 | 3,5 | 22,7 |

Примечание. Звездочкой обозначены данные, достоверно отличающиеся от контроля. В каждой серии опытов использован препарат микросом, полученный от 10 животных.

(рис. 1). Не возникало преципитации между этими антителами против Р-450_с и микросомальным цитохромом, выделенным из животных, отравленных ММА, БМА и АА (см. рис. 1). При проведении ракетного иммуноэлектрофореза эти данные подтвердились. Следовательно, можно заключить, что интоксикация Ак оказывает незначительное влияние на содержание этих подфракций цитохрома Р-450.

При электрофоретическом анализе микросом наибольшее внимание было обращено на область электрофореграмм, содержащую белки с мол. массой от 47 000 до 60 000 Д (табл. 3), в ко-

торой обычно располагаются изоформы цитохрома Р-450 [11]. Результаты исследования денситограмм (рис. 2) показали, что общая площадь этой области в различных сериях опытов существенно не изменяется. Не отмечалось достоверных изменений в относительной площади микросомальных белков с мол. массой 50 000—52 000 Д и 55 000 Д, в которых обычно располагаются ФБ и МХ-индуцируемые подфракции цитохрома Р-450 [4, 17]. В то же время имеется сильное уменьшение относительной площади полосы белков с мол. массой 48 000 Д в сериях опытов с животными, отравленными ММА и БМА (см. табл. 3).

Попытки гель-электрофоретического исследования изоформного состава цитохрома Р-450 при отравлении мышей акрилатами предпринимались ранее [12]. Показано, что ММА и АА уменьшают содержание микросомального белка массой 47 000 Д. Нами получены данные о том, что ММА и БМА также уменьшают количественное содержание минорной подфракции цитохрома Р-450 с мол. массой 48 000 Д в микросомах печени крыс.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арчаков А. И., Девиченский В. М., Карузина И. И. // Биохимия. — 1968. — Т. 33. — С. 479.
2. Котловский Ю. В., Гришанова А. Ю., Иванов В. В. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 5. — С. 44—46.
3. Bratt H., Hathway D. E. // Brit. J. Cancer. — 1977. — Vol. 30. — P. 114—119.
4. Chen Y. T., Lang M., Jensen N. M. et al. // Europ. J. Biochem. — 1982. — Vol. 122. — P. 361—368.
5. Elovaara E., Kivisto H., Vainio H. // Arch. Toxikol. — 1983. — Bd 52. — S. 109—121.
6. Imai I. H. // J. Biochem. (Tokyo). — 1976. — Vol. 80. — P. 267—276.
7. Van der Hoeven T. A., Coon M. J. // J. Biol. Chem. — 1974. — Vol. 249. — P. 6302—6310.

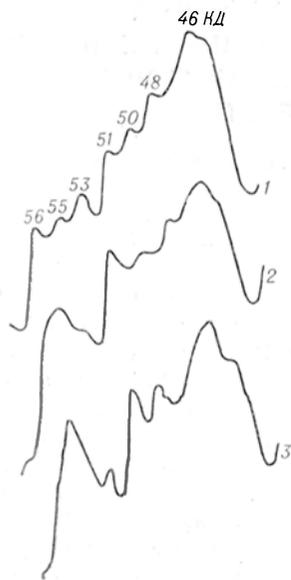


Рис. 2. Денситограммы электрофоретического разделения белков микросом печени крыс.

1, 2 и 3 — денситограммы, полученные от контрольных животных, отравленных ММА (6,0 ммоль/кг 1 раз в день в течение 3 дней) и БМА (9,0 ммоль/кг 1 раз в день в течение 3 дней). Мол. масса белков микросом печени крыс, полученных от 10 животных в каждой серии опытов, представлена в килодальтонах.

8. Kamataki T., Becher D. H., Neal R. A. // *Molec. Pharmacol.* — 1976. — Vol. 12. — P. 921—932.
9. Laemmli U. K. // *Nature.* — 1970. — Vol. 227. — P. 681—685.
10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // *J. biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
11. Lu A. Y. H., West S. B. // *Pharmacol. Rev.* — 1980. — Vol. 31. — P. 277—295.
12. Nilsen O. G., Toftgard R., Ingelman-Sundberg M., Gustafson J. A. // *Acta pharmacol. (Kbh.)*. — 1978. — Vol. 43. — P. 299—305.
13. Omura T., Sato R. // *J. biol. Chem.* — 1964. — Vol. 239. — P. 2370—2378.
14. Ortis E., Patel J. M., Kenneth C., Leibman C. // *Advanc. exp. Med. Biol.* — 1982. — Vol. 136. — P. 1227—1227.
15. Ouchterlony D. // *Handbook of Experimental Immunology* / Ed. D. M. Weir. — Oxford, 1967. — P. 655.
16. Pickett C. B., Jeter R. L., Morin J., Lu A. Y. H. // *J. biol. Chem.* — 1981. — Vol. 256. — P. 8815.
17. Thomas P. E., Reik J. M., Ryan D. E., Levin W. // *Ibid.* — P. 1044—1052.
18. Wilslocki P. G., Miva G. T., Lu A. Y. H. // *Euzymatic Basis of Detoxication.* — New York, 1980. — Vol. 1. — P. 135—182.

Поступила 22.11.85

EFFECT OF ACRYLATES ON THE CONTENT AND ISOZYME SPECTRUM OF CYTOCHROME P-450 IN RAT LIVER MICROSOMES

Yu. V. Kollovsky, N. I. Gutkina, L. M. Gulyaeva, A. I. Dovgy, N. V. Andrianov, V. M. Mishin, V. V. Ivanov

Medical School, Siberian Branch of the Academy of Medical Sciences of the USSR, Novosibirsk, N. I. Pirogov II Medical School, Moscow

Content of cytochrome P-450 was decreased in rat liver microsomes, pretreated with phenobarbital, after incubation with acrylamide, methyl methacrylate and butyl methacrylate in presence of NADPH *in vitro*. The phenomenon was not observed in the analogous experiments but carried out without NADPH, thus suggesting the microsomal metabolism of the acrylates. At the same time, after intraperitoneal administration of acrylamide 0.4 mmole/kg, methyl methacrylate 6.0 mmole/kg and butyl methacrylate 9.0 mmole/kg within 3 days into intact and protected with phenobarbital rats alterations in total content of cytochrome P-450 were not observed. All the acrylates studied exhibited the slight inducing effect on cytochrome P-450, but did not affect the cytochrome P-450_b. Methyl- and butyl methacrylates decreased distinctly the content of cytochrome P-450 isoenzyme with molecular mass of 48,000 daltons.

УДК 612.766.2-08:612.015.31:546.41+612.751.1:546.41]-06:612.015.6:577.161.22

И. Н. Сергеев, Н. В. Блажевич, А. С. Капланский, В. Н. Швец,
М. С. Балаковский, В. Б. Спиричев

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ 1,25-ДИОКСИВИТАМИНА D₃ И 24,25-ДИОКСИВИТАМИНА D₃ НА ГОМЕОСТАЗ КАЛЬЦИЯ И СОСТОЯНИЕ КОСТНОЙ ТКАНИ У КРЫС ПРИ ГИПОКИНЕЗИИ

Институт питания АМН СССР, Институт медико-биологических проблем Минздрава СССР, Москва

В поддержании гомеостаза Ca и структурной целостности костной ткани важная роль принадлежит гормональной системе витамина D, включающей в себя активные метаболиты холекальциферола — 1,25-диоксивитамин D₃[1,25(OH)₂D₃] и 24,25-диоксивитамин D₃[24,25(OH)₂D₃] [14—16, 20]. Функционирование 1,25(OH)₂D₃ в этой системе направлено на срочное восстановление гомеостаза кальция [10, 17], тогда как 24,25(OH)₂D₃, вероятно, регулирует использование Ca при нормальной обеспеченности этим минералом прежде всего в процессах оссификации [1, 8, 11, 12]. Изменение соотношения между образованием 1,25(OH)₂D₃ и 24,25(OH)₂D₃ может иметь существенное значение для срочной и долговременной адаптации обмена

на Ca при различных функциональных состояниях организма.

Ранее нами было показано, что у крыс при гипокинезии снижается продукция 1,25(OH)₂D₃ и увеличивается образование 24,25(OH)₂D₃ в почках, а также уменьшается накопление 24,25(OH)₂D₃ в слизистой оболочке тонкой кишки и костях [5]. Такие изменения в обмене витамина D₃ сопровождались снижением всасывания Ca в тонкой кишке, гипокальциемией, изменением химического состава костной ткани [18, 19]. Введение 24,25(OH)₂D₃ крысам в условиях гипокинезии корригировало гипокальциемию и усиливало минерализацию костной ткани [6, 18]. Использование 1-оксивитамина D₃ (1-OHD₃) — синтетического аналога 1,25(OH)₂D₃ — оказывало нормализую-

Влияние 1,25(OH)₂D₃ и 24,25(OH)₂D₃ на концентрацию Са, Р_i, ПТГ, КТ и активность ЩФ в сыворотке крови крыс при гипокинезии

| Группа животных | Препарат и доза | Са, мг на 100 мл | Р _i , мг на 100 мл | ПТГ, МЕ/л | КТ, пг/мл | ЩФ, Е/л |
|-----------------|--|-----------------------|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 1 | Контроль (0,1 мл ПГ) | 10,4±0,2 | 8,2±0,2 | 21,3±2,4 | 13,0±1,3 | 71,8±4,4 |
| 2 | Гипокинезия (0,1 мл ПГ) | 9,3±0,2 ^a | 8,6±0,3 | 11,5±4,1 ^a | 21,4±4,2 | 44,8±2,7 ^a |
| 3 | 1,25(OH) ₂ D ₃ (0,03 мкг) | 9,9±0,1 ^b | 9,0±0,4 | 15,8±2,1 | 14,6±1,4 | 38,0±2,4 ^a |
| 4 | 1,25(OH) ₂ D ₃ (0,15 мкг) | 11,2±0,3 ^b | 10,0±0,2 ^b | 11,3±2,3 ^a | 12,6±2,2 | 35,6±2,8 ^b |
| 5 | 24,25(OH) ₂ D ₃ (0,25 мкг) | 9,6±0,2 ^a | 8,4±0,4 | 10,8±3,4 ^a | 12,2±2,8 | 44,6±2,3 ^a |
| 6 | 24,25(OH) ₂ D ₃ (1,25 мкг) | 10,2±0,1 ^b | 8,6±0,3 | 9,5±1,8 ^a | 10,6±1,4 ^b | 49,2±2,0 ^a |
| 7 | 1,25(OH) ₂ D ₃ + + 24,25(OH) ₂ D ₃ (0,03+0,25 мкг) | 10,1±0,3 ^b | 8,5±0,4 | 5,2±1,5 ^a | 20,0±3,7 | 47,4±2,2 ^a |
| 8 | 1,25(OH) ₂ D ₃ + + 24,25(OH) ₂ D ₃ (0,03+1,25 мкг) | 10,3±0,2 ^b | 9,0±0,4 | 5,9±1,7 ^a | 15,9±5,0 | 51,8±1,6 ^b |

Примечание. Здесь и в табл. 2—4: а — достоверное отличие ($P < 0,05$) от показателя контрольных животных, б — то же от показателя животных при гипокинезии, в — то же от показателя обеих указанных групп. В скобках представлены дозы. В каждой группе исследовали по 8—10 животных. ПГ — пропиленгликоль.

шее действие только на концентрацию Са в крови, тогда как значимое действие этого препарата на костную ткань не удалось выявить [3].

В связи с этим в настоящей работе было проведено комплексное исследование кальциевого обмена и состояния костной ткани у крыс в условиях гипокинезии при профилактическом введении им дополнительных количеств активных метаболитов витамина D₃.

Методика

В опытах использовали крыс-самцов Вистар с исходной массой тела 240—280 г. Животные получали обеспеченный витамином D полусинтетический рацион, содержащий 0,6 % Са и 0,6 % Р [6]. Ежедневно в течение всего эксперимента животным вводили препараты 1α,25-диоксивитамина D₃, 24(R,S), 25-диоксивитамина D₃ и их сочетания¹. Используемые дозы 1,25(OH)₂D₃ и 24,25(OH)₂D₃ представлены в табл. 1. Меньшая из указанных доз каждого метаболита является физиологической для крыс [1]. Животных содержали в зажимных клетках 5 нед.

Концентрацию общего Са, неорганического фосфора (Р_i), активность щелочной фосфатазы (ЩФ) в сыворотке крови, содержание Са в почках и аорте, а также химический состав и плотность костной ткани исследовали ранее описанными методами [1, 6]. Концентрацию паратгормона (ПТГ) и кальцитонина (КТ) в сыворотке крови определяли радиоиммунным методом с использованием наборов RTH-Ria (Institut National des Radioelements,

¹ Препараты были синтезированы и любезно предоставлены ст. науч. сотр. НИО «Витамины» Н. А. Богословским.

Бельгия) и Ria-mat hCT-II ("Byk-Mallinckrodt", ФРГ) соответственно. Транспорт Са в тонкой кишке оценивали по способности изолированного проксимального отрезка кишки к всасыванию ⁴⁵Са методом невывернутого мешочка in vitro [4]. Гистоморфометрические параметры кости определяли методами, описанными в работе [7]. Все данные представлены как средняя арифметическая указанного количества определений со стандартной ошибкой.

Результаты

В условиях гипокинезии у крыс наблюдались резкое снижение прироста массы тела, умеренная гипокальциемия, уменьшение активности ЩФ и концентрации ПТГ, повышение концентрации КТ в сыворотке крови, меньшее всасывание Са в тонкой кишке (см. табл. 1 и 2). Изменения костей опорного скелета выражались в снижении плотности диафизов и эпифизов, уменьшение содержания в них Са, Р и оксипролина (ОП) (табл. 3). Эти изменения в большей степени были выражены в эпифизах. Отношение Са/Р снижалось, а Са/ОП увеличивалось. Гистоморфометрическими методами было выявлено значительное уменьшение объема первичной и вторичной спонгиозы метафизов бедренной и большеберцовой кости (что было обусловлено как укорочением костных балок, так и их разрежением), сужение эпифизарной пластинки роста (ЭПР) и снижение числа остеокластов (табл.

Влияние $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ и $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ на прирост массы тела, всасывание Са в тонкой кишке и содержание Са в почках и аорте крыс при гипокинезии

| Группа животных | Препарат и доза | Изменение массы тела, % | Транспорт Са, нмоль·см ⁻¹ ·ч ⁻¹ | Содержание Са, мг на 1 г сухой ткани | |
|-----------------|--|-------------------------|---|--------------------------------------|------------------------|
| | | | | в почках | в аорте |
| 1 | Контроль (0,1 мл ПГ) | +48,7±3,7 | 88,6±4,6 | 0,88±0,06 | 1,89±0,14 |
| 2 | Гипокинезия (0,1 мл ПГ) | -8,7±2,8 ^a | 61,1±3,3 ^a | 1,24±0,19 | 2,05±0,25 |
| 3 | $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (0,03 мкг) | -4,3±3,4 ^a | 76,2±8,4 | 1,18±0,22 | 1,92±0,20 |
| 4 | $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (0,15 мкг) | -11,7±4,1 ^a | 82,1±7,1 ^b | 1,63±0,30 ^a | 2,54±0,24 ^a |
| 5 | $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (0,25 мкг) | -1,5±4,5 ^a | 70,2±3,8 ^a | 1,23±0,17 | 1,99±0,20 |
| 6 | $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (1,25 мкг) | +2,7±3,1 ^b | 74,2±8,7 | 1,16±0,18 | 2,17±0,30 |
| 7 | $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ + $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (0,03+0,25 мкг) | +1,8±4,6 ^a | 73,6±3,1 ^b | 1,11±0,16 | 2,10±0,30 |
| 8 | $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ + $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (0,03+1,25 мкг) | -0,8±3,7 ^a | 81,6±9,0 | 1,27±0,24 | 1,96±0,36 |

4, см. рисунок *a* и *б* на вклейке). Содержание Са в почках и аорте крыс при гипокинезии имело тенденцию к увеличению (см. табл. 2).

Применение $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ и $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ не оказывало токсического действия, оцениваемого по изменению массы тела животных (см. табл. 2). Масса тела крыс, получавших $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, существенно не отличалась от таковой животных при гипокинезии, а при использовании $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ или композиции $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ и $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ была несколько выше. В конце опыта увеличение прироста массы тела этих животных по сравнению с таковым крыс при гипокинезии составило 7,2—11,4 %.

Нормализующее действие на обмен Са и состояние костной ткани наблюдалось при введении композиции $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ и $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, а также одного $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. В этих условиях содержание Са в сыворотке крови, его всасывание в тонкой кишке приближались к показателям контрольных животных (см. табл. 1 и 2). Активность ЩФ в сыворотке крови повышалась. Концентрация ПТГ была ниже, чем у контрольных животных, и уменьшалась по сравнению со сниженной концентрацией этого гормона у крыс при гипокинезии. Концентрация КТ достоверно не отличалась от таковой у контрольных животных (у крыс при гипокинезии она была повышенной). Содержание Са в почках и аорте не изменялось по сравнению с таковым у животных при гипокинезии. При ис-

пользовании композиции $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ и $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ в дозе 0,03 и 1,25 мкг концентрация P_1 несколько повышалась по сравнению с контролем.

Плотность диафизов и эпифизов бедренной кости, содержание в них Са и Р, отношение Са/Р восстанавливались до уровня контрольных животных (см. табл. 3). Содержание ОП было снижено в диафизах, но повышалось в эпифизах; при этом отношение Са/ОП оставалось несколько повышенным в диафазах и существенно не изменялось в эпифизах. Объем первичной и вторичной спонгиозы метафизов бедренной и большеберцовой кости значительно возрастал, однако ширина ЭПР не увеличивалась, а число остеокластов оставалось таким же, как у животных при гипокинезии (см. табл. 4 и рисунок, *в*).

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ в физиологической дозе (0,03 мкг) повышал концентрацию Са и одновременно P_1 в сыворотке крови, эффективно усиливал всасывание Са в тонкой кишке, снижал концентрацию КТ и не влиял на концентрацию ПТГ, активность ЩФ в сыворотке крови, содержание Са в почках и аорте (см. табл. 1 и 2). На костную ткань этот метаболит в физиологической дозе оказывал положительное действие: наблюдалось некоторое повышение плотности диафизов и эпифизов бедренной кости, увеличение содержания в них Са и Р, возрастание объема спонгиозы (особенно первичной), ширины ЭПР и количества остеокластов (см. табл. 3 и 4).

Таблица 3

Влияние $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ и $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ на плотность и химический состав диафизов и дистальных эпифизов бедренной кости крыс при гипокинезии

| Группа животных | Препарат и доза | Диафизы | | | | Эпифизы | | | |
|-----------------|---|-------------------------|---------------------|--------------------|-----------------------|-------------------------|---------------------|--------------------|-----------------------|
| | | плотность | Са | Р | оксипролин | плотность | Са | Р | оксипролин |
| 1 | Контроль (0,1 мл ПГ) | 1,68±0,01 | 477±7 | 260±3 | 37,1±1,0 | 0,99±0,02 | 211±5 | 121±4 | 23,4±1,0 |
| 2 | Гипокинезия (0,1 мл ПГ) | 1,48±0,015 ^a | 381±8 ^b | 225±5 ^a | 28,3±1,0 ^a | 0,74±0,04 ^a | 133±13 ^a | 79±7 ^a | 15,6±1,1 ^a |
| 3 | $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (0,03 мкг) | 1,57±0,03 ^b | 424±10 ^b | 233±4 ^a | 29,9±0,8 ^a | 0,82±0,03 ^a | 157±12 ^a | 91±7 ^a | 18,7±1,1 ^a |
| 4 | $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (0,15 мкг) | 1,43±0,01 ^a | 387±11 ^a | 223±5 ^a | 27,4±1,0 ^a | 0,69±0,025 ^a | 119±6 ^a | 72±5 ^a | 14,5±1,0 ^a |
| 5 | $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (0,25 мкг) | 1,61±0,01 ^b | 439±9 ^b | 274±4 ^b | 31,7±1,0 ^b | 0,85±0,035 ^a | 165±11 ^a | 94±7 ^a | 19,4±1,1 ^b |
| 6 | $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (1,25 мкг) | 1,63±0,01 ^b | 435±10 ^b | 241±4 ^b | 32,3±0,9 ^b | 0,90±0,04 ^b | 176±14 ^b | 101±9 | 20,7±1,2 ^b |
| 7 | $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ + $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (0,03+0,25 мкг) | 1,65±0,02 ^b | 447±8 ^b | 245±6 ^b | 32,4±1,0 ^b | 0,94±0,03 ^b | 194±10 ^b | 110±8 ^b | 22,3±0,5 ^b |
| 8 | $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ + $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (0,03+1,25 мкг) | 1,65±0,02 ^b | 454±12 ^b | 250±6 ^b | 32,7±1,1 ^b | 0,92±0,04 ^b | 192±15 ^b | 108±9 ^b | 23,3±1,4 ^b |

Примечание. Плотность выражена в граммах сухой, обезжиренной костной ткани на 1 см^3 , содержание кальция, фосфора и оксипролина — в миллиграммах на 1 см^3 .

Влияние $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ и $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ на объем спонгиозы, ширину ЭПР и число остеокластов в метафизе бедренной кости крыс при гипокинезии

| Группа животных | Препарат и доза | Объем всей спонгиозы, % | Объем первичной спонгиозы, % | Ширина ЭПР, мкм | Число остеокластов в первичной спонгиозе |
|-----------------|---|-------------------------|------------------------------|-----------------|--|
| 1 | Контроль (0,1 мл ПП) | $25,0 \pm 2,0$ | $45,0 \pm 2,6$ | $216 \pm 4,7$ | $84 \pm 8,0$ |
| 2 | Гипокинезия (0,1 мл ПП) | $8,0 \pm 0,7^a$ | $23,8 \pm 1,9^a$ | $156 \pm 2,5^a$ | $45 \pm 5,3^a$ |
| 3 | $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (0,03 мкг) | $17,2 \pm 1,6^b$ | $41,6 \pm 2,0^b$ | $177 \pm 6,2^b$ | $75 \pm 1,5^b$ |
| 4 | $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (0,15 мкг) | $12,1 \pm 2,2^a$ | $32,0 \pm 4,3^a$ | $182 \pm 3,8^b$ | $94 \pm 12,0^b$ |
| 5 | $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (0,25 мкг) | $14,0 \pm 1,7^a$ | $35,5 \pm 2,4^b$ | $166 \pm 4,3^a$ | $60 \pm 8,6^a$ |
| 6 | $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (1,25 мкг) | $20,0 \pm 2,0^b$ | $39,6 \pm 2,0^b$ | $172 \pm 4,6^b$ | $38 \pm 5,6^a$ |
| 7 | $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3 + 24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (0,03+0,25 мкг) | $12,8 \pm 1,6^b$ | $30,2 \pm 2,4^b$ | $164 \pm 4,7^a$ | $32 \pm 5,0^a$ |
| 8 | $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3 + 24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (0,03+1,25 мкг) | $18,7 \pm 1,9^b$ | $33,4 \pm 2,6^b$ | $171 \pm 1,3^b$ | $36 \pm 4,2^a$ |

При увеличении дозы $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ до 0,15 мкг наблюдалась тенденция к развитию гиперкальциемии и гиперфосфатемии (концентрация Ca и P_i достоверно превышала таковые у контрольных животных), при этом всасывание Ca в тонкой кишке повышалось в большей степени, чем у других животных. Концентрация ПТГ в сыворотке крови не изменялась, а КТ снижалась до уровня контрольных животных (см. табл. 1 и 2). Плотность диафизов и эпифизов бедренной кости несколько снижалась по сравнению с таковой у животных при гипокинезии, содержание Ca и P в диафизах не увеличивалось, а в эпифизах снижалось. Масса губчатого вещества оставалась уменьшенной, число остеокластов превышало их уровень у контрольных животных, ширина ЭПР частично восстанавливалась (см. табл. 3, 4 и рисунок, 2).

Обсуждение

Полученные данные свидетельствуют о том, что у растущих крыс в условиях длительной жесткой гипокинезии наблюдаются изменения кальциевого обмена и костной ткани: гипокальциемия, снижение всасывания Ca в тонкой кишке, тенденция к развитию нефро- и артериокальциноза, резкое угнетение роста и минерализации костей опорного скелета с развитием остеопороза губчатого вещества.

В этих условиях эффект физиологической дозы $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, по-видимому, обусловлен нормализацией всасы-

вания Ca в кишечнике и улучшением баланса этого минерала. Не исключено, что при угнетении роста костей и сниженной потребности в Ca действие $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ направлено преимущественно на костную ткань. Восстановление циркулирующей концентрации этого метаболита до физиологического уровня обеспечивает ремоделирование костной ткани на достаточно высоком и сбалансированном уровне, препятствуя тем самым развитию остеопороза.

При превышении физиологической дозы действия $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ на костную ткань определялось прежде всего его резорбирующей активностью. По-видимому, образование компактного и губчатого вещества в этих условиях также увеличивалось, но резорбция кости, очевидно, преобладала (снижение плотности костной ткани, увеличение количества остеокластов, уменьшение объема спонгиозы по сравнению с низкой дозой этого препарата). Всасывание Ca в тонкой кишке усиливалось пропорционально увеличению дозы этого метаболита. Такое действие $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ на слизистую оболочку тонкой кишки, а также его Ca-мобилизующая активность в костной ткани обусловили тенденцию к гиперкальциемии, гиперфосфатемии и способствовали усилению кальциноза почек и аорты у крыс при введении им высокой дозы препарата. Отсутствие ясно выраженного резорбирующего действия на кость $1\text{-OH}\text{D}_3$ у крыс при гипокинезии, отмеченное нами ранее [3], может быть объяснено недостаточной скоро-

стью его гидроксилирования в печени, возможно, вследствие снижения интенсивности метаболизма витамина D_3 в этих условиях [5].

Эффективное нормализующее действие $24,25(OH)_2D_3$ на костную ткань, особенно в повышенной дозе, по-видимому, было связано преимущественно со специфической активностью этого метаболита в отношении минерализации костной ткани. При использовании $24,25(OH)_2D_3$ значительно возрастало содержание Са и Р в костной ткани, тогда как концентрация ОП была сниженной. Вследствие этого отношение Са/ОП оставалось повышенным (как и в условиях «чистой» гипокинезии), тогда как отношение Са/Р не отличалось от контроля. Это свидетельствует о том, что количество и состав минеральной фазы костной ткани нормализуются при введении $24,25(OH)_2D_3$, в то же время скорость образования коллагенового матрикса восстанавливается в меньшей степени. Нормализация объема первичной и вторичной спонгиозы у крыс, получавших $24,25(OH)_2D_3$, происходила в основном за счет увеличения толщины и размеров костных балок, а не их числа, что, вероятно, было связано со стимулированием этим метаболитом D_3 прежде всего минерализации костной ткани. Такое оссифицирующее действие $24,25(OH)_2D_3$ предупреждало развитие остеопороза губчатой кости, однако ее структура становилась более грубой. В то же время $24,25(OH)_2D_3$ не восстанавливал ширину ЭПР и не влиял на количество остеокластов.

Эффективность $24,25(OH)_2D_3$ в отношении всасывания Са в кишечнике крыс при гипокинезии была достаточно высокой и с увеличением дозы этого метаболита повышалась. Такое действие $24,25(OH)_2D_3$ может быть обусловлено увеличением синтеза $1,25(OH)_2D_3$ при введении этого метаболита, его предварительным 1-гидроксилированием, а также взаимодействием с кишечными рецепторами $1,25(OH)_2D_3$ [6, 16]. Введение повышенной дозы $24,25(OH)_2D_3$ в отличие от $1,25(OH)_2D_3$ побочных действий в виде гиперкальциемии, гиперфосфатемии и кальциноза мягких тканей не вызывало, это обусловлено отсутствием у $24,25(OH)_2D_3$ выраженного резорбирующего действия на кость.

При введении композиции $1,25(OH)_2D_3$ и $24,25(OH)_2D_3$ крысам при гипокинезии достигается более полная нормализация обмена Са и состояния костной ткани, чем при использовании только одного из метаболитов. Вероятно, в этих условиях $1,25(OH)_2D_3$ усиливает всасывание Са в кишечнике и нормализует его уровень в крови и внеклеточной жидкости, тогда как $24,25(OH)_2D_3$ обеспечивает утилизацию Са в процессах оссификации. $1,25(OH)_2D_3$, по-видимому, обеспечивает также достаточную интенсивность резорбции образующейся кости, усиливая тем самым скорость ее ремоделирования и роста. Однако при превышении физиологической дозы $1,25(OH)_2D_3$, вероятно, усиливаются как образование костной ткани, так и ее резорбция при преобладании последней, поэтому остеопороз в этом случае более выражен, чем в условиях только гипокинезии.

По-видимому, нельзя исключить и возможности модулирующего эффекта $24,25(OH)_2D_3$ на действие $1,25(OH)_2D_3$ в костной ткани, связанного с торможением этим метаболитом резорбирующей активности $1,25(OH)_2D_3$ [2] и, следовательно, усиливающим оссифицирующее действие последнего у растущих животных. На это указывает то обстоятельство, что количество остеокластов не увеличивается при введении композиции $1,25(OH)_2D_3$ и $24,25(OH)_2D_3$.

Действие $1,25(OH)_2D_3$ и $24,25(OH)_2D_3$ на обмен Са и костную ткань крыс при гипокинезии могло быть обусловлено отчасти их влиянием на концентрацию ПТГ и КТ в сыворотке крови. Введение композиции метаболитов и одного $24,25(OH)_2D_3$, но не $1,25(OH)_2D_3$, снижало концентрацию ПТГ у гипокальциемических крыс при гипокинезии. Вероятно, это действие не связано с уменьшением секреции ПТГ вследствие нормокальциемии, так как повышение концентрации Са при введении $1,25(OH)_2D_3$ не давало такого эффекта. Следует отметить, что наибольшее ингибирование секреции ПТГ наблюдалось при совместном введении метаболитов D_3 . Подобное аддитивное действие $1,25(OH)_2D_3$ и $24,25(OH)_2D_3$ отмечалось ранее у рахитичных цыплят [15]. Кроме того, в паразитовидных железах было обнаружено рецепторное связывание как $1,25(OH)_2D_3$, так и

24,25(OH)₂D₃ [16]. Тем не менее механизм и значение такой регуляции секреции ПТГ остаются малопонятными.

Введение 1,25(OH)₂D₃ и 24,25(OH)₂D₃ снижало концентрацию КТ в сыворотке крови крыс при гипокинезии. Такой эффект 1,25(OH)₂D₃ может быть обусловлен его антагонистическим взаимодействием с КТ [9]; эффект 24,25(OH)₂D₃ в этих условиях, по-видимому, является следствием значительного нормализующего действия этого метаболита на костную ткань, осуществляющегося независимо от КТ.

Данные, полученные нами ранее [5, 6, 18, 18], а также результаты настоящего исследования позволяют сделать заключение, что изменение синтеза и (или) секреции кальцийрегулирующих гормонов [ПТГ, КТ, 1,25(OH)₂D₃, 24,25(OH)₂D₃] у крыс при продолжительной гипокинезии направлено на поддержание гомеостаза Ca и структуры костной ткани в соответствии с уровнем функционирования скелета в этих условиях. Профилактическое применение при гипокинезии 1,25(OH)₂D₃ и 24,25(OH)₂D₃ усиливает всасывание Ca в кишечнике и способствует сохранению достаточно высокой интенсивности моделирования и ремоделирования костной ткани растущих животных. Взаимодополняющее действие 1,25(OH)₂D₃ и 24,25(OH)₂D₃, вероятно, связано с их различной функциональной ролью в регуляции обмена Ca, роста и ремоделирования костной ткани, что указывает на целесообразность их совместного применения в условиях гипокинезии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеева И. А., Спиричев В. Б., Блажеевич Н. В. и др. // Вопр. мед. химии. — 1982. — № 5. — С. 71—78.
2. Арханчев Ю. П., Сергеев И. Н., Блажеевич Н. В. и др. // Там же. — 1984. — № 1. — С. 96—103.
3. Блажеевич Н. В., Спиричев В. Б., Ушаков А. С. и др. // Косм. биол. — 1982. — № 2. — С. 34—40.
4. Сергеев И. Н. Роль активных метаболитов витамина D₃ в регуляции обмена кальция и состояния костной ткани у крыс при гипокинезии: Автореф. дис... канд. биол. наук. — М., 1983.
5. Сергеев И. Н., Арханчев Ю. П., Линберг Л. Ф. и др. // Биохимия. — 1984. — Т. 49, № 4. — С. 590—598.
5. Сергеев И. Н., Блажеевич Н. В., Спиричев В. Б. и др. // Вопр. мед. химии. — 1982. — № 5. — С. 102—108.
7. Швец В. Н., Панкова А. С., Кабицкая

О. Е. и др. // Косм. биол. — 1985. — № 6. — С. 50—55.

8. Binderman I. // Endocrinology. — 1984. — Vol. 115. — P. 430—432.
9. Care A. D., Pickard D. W. // Vitamin D: Basic Research and its Clinical Application / Eds A. W. Norman et al. — 1979. — P. 289—296.
10. DeLuca H. F. // Monographs on Endocrinology. — Berlin, 1979. — Vol. 13.
11. Eaelstein S., Ornoy A. // Vitamin D: Basic Research and its Clinical Application / Eds A. W. Norman et al. — Berlin, 1979. — P. 381—389.
12. Goodman W. G. // Calcif. Tissue Int. — 1984. — Vol. 36. — P. 206—213.
13. Henry H. L. // Ann. Rev. Nutr. — 1984. — Vol. 4. — P. 493—520.
14. Miller B. E., Norman A. W. // Handbook of Vitamins. — New York, 1984. — P. 45—97.
15. Norman A. W., Henry H. L. // Vitamin D: Basic Research and its Clinical Application / Ed. A. W. Norman et al. — Berlin, 1979. — P. 571—578.
16. Norman A. W., Roth J., Orci L. // Endocr. Rev. — 1982. — Vol. 3. — P. 331—366.
17. Parfitt A. M. // J. clin. Invest. — 1984. — Vol. 73. — P. 576—586.
18. Ushakov A. S., Spirichev V. B., Sergeev I. N. // Physiologist. — 1982. — Vol. 25. — P. 845—848.
19. Ushakov A. S., Spirichev V. B., Sergeev I. N. et al. // Aviant. Space Environ. Med. — 1983. — Vol. 54. — P. 447—451.
20. Vitamin D: Molecular Biology and Clinical Nutrition / Ed. A. W. Norman. — New York, 1980.

Поступила 22.01.86

EFFECT OF 1,25-DIHYDROXYVITAMIN D₃ AND 24,25-DIHYDROXYVITAMIN D₃ ON HOMEOSTASIS OF CALCIUM AND BONE TISSUE IN HYPOKINESIA.

I. N. Sergeev, N. V. Blazheevich, A. S. Kaplansky, V. N. Shvets, M. S. Balakovskiy, V. B. Spirichev

Institute of Nutrition, Academy of Medical Sciences of the USSR, Institute of Medico-Biological Problems, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

Preventive administration of vitamin D₃ active metabolites 1,25(OH)₂D₃ and 24,25(OH)₂D₃ into growing rats, kept under conditions of long-term hard hypokinesia, normalized Ca metabolism and the state of bone tissue depending on the preparations dose and their combination. 1,25(OH)₂D₃ at a dose of 0.03 µg per an animal daily augmented effectively the Ca absorption in small intestine, corrected hypocalcemia, increased slightly the bone tissue density and the Ca and P content in the tissue as well as it elevated the volume of spongiosa, width of the epiphyseal growth plate (EGP) and the amount of osteoclasts. After an increase of the metabolite dose up to 0.15 µg hypercalcemia, hyperphosphatemia, intensive resorption of bone tissue, distinct increase in the osteoclasts content and ectopic calcification were observed. Administration of 1,35(OH)₂D₃ and 24,25(OH)₂D₃ combination (0.03 µg and 0.25 or 1.25 µg, respectively) or only 24,25(OH)₂D₃ at a dose of

1,25 µg caused a restoration of Ca absorption in intestine and of its level in blood as well as mineral composition, density of bone tissue, volume of primary and secondary spongiosa were normalized, while the EGP width and amount of osteoclasts remained decreased. Synergic effect of 1,25(OH)₂D₃ and 24,25(OH)₂D₃

in rats appears to depend on their various functions in regulation of Ca metabolism, in development and remodeling of bone tissue, thus indicating that these metabolites of vitamin D₃ should be used simultaneously under conditions of hypokinesia for prophylactic purposes.

УДК 616.314.17-008.1-07:616.314.17-008.939.15-39-074]-092.9

А. П. Левицкий, Н. П. Козлянина, В. Е. Скляр

ПРОЦЕССЫ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И АНТИОКСИДАНТНЫЕ СИСТЕМЫ В ТКАНЯХ ПАРОДОНТА КОШЕК

НИИ стоматологии Минздрава УССР, Одесса

Установлено, что в пародонте домашних кошек спонтанно возникает воспалительно-дистрофический процесс, который по комплексу клинико-морфологических проявлений напоминает пародонтит у человека [18].

Многочисленные исследования и существующие теории — бактериальные, в которых основное внимание в патогенезе заболевания уделяется микрофлоре полости рта, нейродистрофическая и сосудисто-нервная, согласно которым причиной пародонтита являются изменения сосудов (эндоваскулиты, периваскулиты, облитерация и атероматоз) — не дают ответа на вопрос: каким образом воспалительная реакция в десне провоцирует развитие атрофического процесса в костной ткани альвеолярного отростка?

Это побуждает исследователей искать решения проблемы на новых направлениях, учитывающих преимущественно тонкие механизмы развития патологических состояний. К таковым относятся и процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ), изучение которых представляет для стоматологии значительный интерес ввиду противоречивости имеющихся в литературе данных относительно лечения пародонтита: применение как антиоксидантов (α-токоферол, аскорбиновая кислота, дибунол) [2, 9—11, 21], так и прооксиданта (кислород) [12, 14, 15, 17] оказывало положительное влияние на ткани пародонта.

Методика

Исследования выполнены на 64 кошках массой 3,5—4 кг. Состояние тканей пародонта у животных оценивали на основании клинико-рентгенологических исследований [1]. В

зависимости от этого животные были разделены на 4 группы: 1-ю составили кошки с интактным пародонтом (контроль); 2-ю — животные с явлениями гингивита; 3-ю и 4-ю — соответственно кошки с пародонтитом легкой степени и средней тяжести. Животных после раush-наркоза умерщвляли методом тотального кровопускания. Для исследований брали ткань десны и альвеолярного отростка.

О состоянии перекисидации липидов в тканях пародонта судили по содержанию диеновых конъюгатов [16], малонового диальдегида (МДА) [24], а также по скорости процессов перекисидации, которую определяли следующим образом: в две центрифужные пробирки вливали по 1,5 мл насыщенного раствора тиобарбитуровой кислоты и добавляли по 1 мл гомогената исследуемой ткани. В одну пробирку немедленно добавляли 1 мл 30 % ТХУ, во вторую — ТХУ после 60 мин инкубации при 37 °С. Обе пробирки кипятили на водяной бане 30 мин, центрифугировали 15 мин при 3000 г и снимали показания на спектрофотометре СФ-26 при 532 нм. О скорости процессов перекисидации липидов судили по разности количества МДА до и после инкубации гомогената с тиобарбитуровой кислотой.

О состоянии антиоксидантных систем судили по концентрации α-токоферола [3], а также по активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФД; КФ 1.1.1.49) [6] и глутатионредуктазы (КФ 1.6.4.2) [23].

Липиды экстрагировали по Фолчу. Хроматографическое разделение их на фракции осуществляли по Штало [20] на хроматографических пластинах "Silufol UV-254" фирмы "Chemapol". Показания снимали на видеоденситометре «Телехром» (ФРГ). Содержание вещества рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{C_{ст} \cdot D_{оп}}{D_{ст}} \cdot 1000,$$

где C — количество вещества (в мг на 1 кг ткани), $C_{ст}$ — количество вещества в нанесенном на пластину эталонном растворе, $D_{ст}$ — показания прибора для эталонного раствора, $D_{оп}$ — показания прибора для опытной пробы.

Результаты и обсуждение

Как видно из представленных данных (табл. 1), в десне и альвеолярном

Содержание диеновых конъюгатов, МДА и скорость ПОЛ в десне и альвеолярном отростке кошек с различной выраженностью воспалительно-дистрофического процесса в пародонте

| Группа животных | Диеновые конъюгаты, мкмоль/кг | Маломольный диальдегид, мкмоль/кг | Скорость ПОЛ, нмоль/кг/с |
|------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Десна | | | |
| 1-я | 0,251±0,021 | 35,0±1,7 | (+) 2,20±1,42 |
| 2-я | 0,582±0,089 <i>P</i> <0,01 | 32,4±1,9 <i>P</i> <0,3 | (+) 7,78±2,38 <i>P</i> <0,05 |
| 3-я | 0,158±0,033 <i>P</i> <0,001 | 24,5±3,1 <i>P</i> <0,02 | (+) 0,25±0,26 <i>P</i> >0,1 |
| 4-я | 0,384±0,145 <i>P</i> >0,3 | 27,9±2,1 <i>P</i> <0,02 | (+) 1,84±0,41 <i>P</i> >0,8 |
| Альвеолярный отросток | | | |
| 1-я | 0,273±0,031 | 26,4±2,6 | (-) 0,26±0,21 |
| 2-я | 0,569±0,129 <i>P</i> <0,05 | 25,8±3,2 <i>P</i> >0,9 | (+) 10,40±2,83 <i>P</i> <0,002 |
| 3-я | 0,243±0,081 <i>P</i> >0,9 | 33,5±6,0 <i>P</i> >0,25 | (+) 0,27±0,09 <i>P</i> <0,05 |
| 4-я | 0,397±0,158 <i>P</i> >0,4 | 17,9±3,1 <i>P</i> <0,05 | (+) 0,19±0,61 <i>P</i> >0,4 |

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 величина *P* рассчитана по отношению к группе животных с интактным пародонтом.

отростке кошек с гингивитом увеличилось содержание диеновых конъюгатов и резко возросла скорость пероксидации липидов. При пародонтите же легкой степени оба показателя в ткани десны возвращались к уровню контроля, однако в альвеолярном отростке содержание диеновых конъюгатов снижалось, а скорость пероксидации липидов оставалась повышенной, т. е. полной нормализации процесса в костной ткани в отличие от десны не наблюдалось. Если повышение уровня ПОЛ в десне при гингивите можно в какой-то мере объяснить активацией фагоцитоза, то причины его повышения в костной ткани, как и механизм снижения уже при развивающемся пародонтите, остаются неясными. Последний может зависеть как от состояния антиоксидантных систем, так и от количества субстрата ПОЛ. Исследования активности ферментов глутатионовой антиоксидантной системы (ГАО) показали, что активность глутатионредуктазы в альвеолярном отростке по отношению к контролю снижалась при гингивите и возрастала при пародонтите легкой степени, в то время как в десне показатели не претерпевали достоверных изменений (табл. 2). Активность Г-6-ФД при гингивите снижалась в обеих тканях.

С получением этих данных стало ясно, что дальнейший их анализ возможен лишь с учетом процессов, происходящих в исследуемых тканях при развитии воспалительной реакции. Согласно гистохимическим исследованиям [4, 5], в базальном эпителии и шиповидных клетках десны при воспалении резко увеличивается содержание гликогена. Однако если в клетках эпителия глюкозо-1-фосфат (Г-1-Ф), реагируя с уридинтрифосфатом, образует уридиндифосфоглюкозу, идущую на синтез гликогена, то в фибробластах реализуется путь уроновой кислоты: уридиндифосфатглюкоза в результате поэтапного окисления 6-го атома углерода преобразуется в глюкуроновую кислоту. Последняя восстанавливается в L-гулоновую посредством реакции, зависящей от НАДФ·Н₂, образующегося в пентозном цикле. Снижение активности ферментов пентозного пути при гингивите способствует накоплению в тканях глюкуроновой кислоты и развитию отека. Напротив, проявление фагоцитарной активности лейкоцитов при воспалении сопровождается активацией пентозного пути [8]. Следовательно, в ходе развития самой воспалительной реакции уже создаются предпосылки для последующей активации системы ГАО и нормализации

Активность Г-6-ФД, глутатионредуктазы и содержание витамина Е в десне и альвеолярном отростке кошек при различном состоянии тканей пародонта

| Группа животных | Г-6-ФД, мккат/кг | Глутатионредуктаза, мккат/кг | Витамин Е, мг/кг |
|------------------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Десна | | | |
| 1-я | 11,2±1,2 | 11,6±1,5 | 8,77±1,46 |
| 2-я | 7,5±1,1 <i>P</i> <0,05 | 14,6±2,2 <i>P</i> >0,25 | 9,27±2,57 <i>P</i> >0,8 |
| 3-я | 17,6±3,1 <i>P</i> >0,05 | 15,6±1,4 <i>P</i> >0,05 | 18,9±3,01 <i>P</i> <0,01 |
| 4-я | 15,7±2,6 <i>P</i> >0,1 | 14,3±1,5 <i>P</i> >0,2 | 10,3±1,89 <i>P</i> >0,5 |
| Альвеолярный отросток | | | |
| 1-я | 15,2±2,5 | 3,0±0,3 | 15,8±2,04 |
| 2-я | 9,1±1,1 <i>P</i> <0,05 | 1,9±0,5 <i>P</i> <0,05 | 11,3±3,19 <i>P</i> >0,2 |
| 3-я | 7,9±1,2 <i>P</i> <0,02 | 4,7±0,6 <i>P</i> <0,05 | 14,0±1,22 <i>P</i> >0,4 |
| 4-я | 9,7±1,1 <i>P</i> <0,05 | 2,9±0,6 <i>P</i> >0,8 | 15,7±1,04 <i>P</i> >0,9 |

метаболизма клеток соединительной ткани, которые реализуются в десне при пародонтите легкой степени (см. табл. 2). Поскольку в альвеолярном отростке при пародонтите легкой степени активность Г-6-ФД по отношению к контролю продолжает снижаться, система ГАО, несмотря на компенсаторное повышение активности глутатионредуктазы, в костной ткани не

будет активироваться должным образом.

Рассматривая второй фактор, влияющий на состояние ПОЛ, следует отметить, что содержание основного субстрата ПОЛ — фосфолипидов — в тканях пародонта при изучаемой патологии остается постоянным. Наблюдаемое при этом увеличение количества холестерина и триглицеридов (табл. 3)

Таблица 3

Содержание фосфолипидов, холестерина и триглицеридов в десне и альвеолярном отростке домашних кошек при различном состоянии тканей пародонта (в мг/кг ткани)

| Группа животных | Фосфолипиды | Холестерин | Триглицериды |
|------------------------------|--------------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| Десна | | | |
| 1-я | 32 080±3 210 | 2970±260 | 20 030±4 510 |
| 2-я | 30 830±3 650 <i>P</i> >0,8 | 4100±380 <i>P</i> <0,05 | 19 660±4 770 <i>P</i> >0,9 |
| 3-я | 32 740±2 730 <i>P</i> >0,8 | 5040±680 <i>P</i> <0,01 | 28 940±5 040 <i>P</i> >0,2 |
| 4-я | 30 990±3 010 <i>P</i> >0,8 | 3740±330 <i>P</i> >0,05 | 15 430±3 960 <i>P</i> >0,4 |
| Альвеолярный отросток | | | |
| 1-я | 18 740±2 390 | 2180±220 | 6 190±1 240 |
| 2-я | 19 280±2 590 <i>P</i> >0,8 | 2080±390 <i>P</i> >0,8 | 8 940±2 050 <i>P</i> >0,25 |
| 3-я | 22 190±1 910 <i>P</i> >0,25 | 3820±630 <i>P</i> <0,05 | 17 770±3 560 <i>P</i> <0,02 |
| 4-я | 16 330±1 070 <i>P</i> >0,3 | 2670±390 <i>P</i> >0,05 | 16 950±4 750 <i>P</i> >0,05 |

свидетельствует об усилении жиросинтезирующего эффекта и возрастании поступления в ткани экзогенного жира (в составе хиломикрон и липопротеидов).

Снижение содержания МДА (см. табл. 1) подтверждает такое предположение, ибо реэстерификация холестерина в клетках ведет к образованию олеиновой кислоты [19] и замене в ходе развития патологического процесса полиненасыщенных жирных кислот олеиновой, продукты окисления которой слабо реагируют с тиобарбитуровой кислотой [13]. Однако замена полиненасыщенных жирных кислот более насыщенными повышает жесткость мембран, что, с одной стороны, способствует уменьшению отека ткани, с другой — развитию склеротических явлений при повторяющихся воспалениях десны. Поскольку транспорт в ткани холестерина и α -токоферола [22] взаимосвязан, повышение содержания последнего в десне при пародонтите легкой степени усиливает антирадикальную защиту межклеточного вещества и способствует нормализации метаболизма клеток. Биологический смысл увеличения количества холестерина состоит в уменьшении отека ткани в результате повышения вязкости мембран, увеличения толщины гидрофобной зоны последних и изменения в гидрофобной зоне концентрации полярных веществ [19].

Костная ткань, в отличие от покровных (эпителиальной и соединительной) непосредственно не подвергается воздействию неблагоприятных факторов внешней среды, и системы защиты в ней менее развиты. В связи с более низким содержанием клеточных элементов показатели, характеризующие содержание фосфолипидов, исходный уровень МДА и активность глутатионредуктазы, в костной ткани животных с интактным пародонтом по сравнению с таковыми в десне снижены. Повышение содержания холестерина (см. табл. 3) и снижение количества МДА (см. табл. 1) в альвеолярном отростке наблюдается на более поздних этапах развития патологического процесса, чем в десне.

Что касается витамина Е, обеспечивающего антирадикальную защиту межклеточного вещества, то его содержание в альвеолярном отростке животных с интактным пародонтом в

1,8 раза превышает уровень, зарегистрированный в десне (см. табл. 2). При гингивите эти различия уменьшаются, а при пародонтите легкой степени содержание α -токоферола в кости в 1,2 раза меньше, чем в ткани десны. Уменьшение количества α -токоферола в альвеолярном отростке снижает уровень антирадикальной защиты костной ткани в большей степени, чем это имеет место в десне. В результате этого скорость процессов перекисидации липидов в десне повышается при гингивите в 3,5, а в альвеолярном отростке — в десятки раз (см. табл. 1).

Наблюдаемое в ходе развития патологического процесса ослабление антиоксидантной защиты костной ткани по сравнению с таковой в десне способствует тому, что изменения, вызванные вспышкой ПОЛ при гингивите, имеют свое продолжение (или развитие) в костной ткани альвеолярного отростка и после затухания воспалительной реакции в десне.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барабаш Р. Д., Левицкий А. П., Коновец В. М. Пат. физиол. — 1977. — № 4. — С. 39—45.
2. Грошиков М. И., Неживенко Л. Н., Герасина О. В. и др. // Современные проблемы заболеваний пародонта. — М., 1976. — С. 173—178.
3. Данилевский Н. Ф. Патогенез, клиника и лечение пародонтоза / Клиническое и экспериментально-морфологическое исследование: Автореф. дис... д-ра мед. наук. — Киев, 1968.
4. Калмыкова С. Г. Определение качества кормовых жиров. — М., 1976.
5. Кодола Н. А., Хомутовский О. А., Центило Т. Д. Пародонтоз; ультраструктура десны и пульпы. — Киев, 1980.
6. Колесова Н. А., Данилевский Н. Ф. // Стоматология. — 1980. — № 6. — С. 4—7.
7. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. — М., 1971.
8. Кучеренко Н. Е., Германюк Я. Л., Васильев А. Н. Молекулярные механизмы гормональной регуляции обмена веществ. — Киев, 1986.
9. Лабори А. Регуляция обменных процессов: Пер. с франц. — М., 1970.
10. Никитина Т. В., Дедеян С. А. // Экспериментальная и клиническая стоматология. — М., 1979. — Т. 9. — Ч. 2. — С. 25—29.
11. Никитина Т. В., Дедеян С. А. // Съезд стоматологов Казахстана. 2-й: Материалы. — Алма-Ата, 1980. — С. 201—205.
12. Первичные радиобиологические процессы / Под ред. Н. В. Тимофеева-Ресовского. — М., 1973.
13. Сабурови Л. Б. // Стоматология. — 1978. — № 1. — С. 24—27.
14. Сабурова Л. Б., Хамадеева С. У. // Там же. — 1979. — № 4. — С. 53—56.

15. *Стальная И. Д., Гурашвили Т. Г.* // Современные методы в биохимии. — М., 1977. — С. 66—68.
16. *Сукачев В. А., Герасютенко В. И., Грицай Н. П.* и др. // Современные проблемы заболеваний пародонта. — М., 1976. — С. 319—321.
17. *Троицкая К. М.* // Стоматология. — 1975. — № 1. — С. 16.
18. *Тронова О. С., Ляхов С. Д.* // Проблемы терапевтической стоматологии. — Киев, 1968. — Вып. 3. — С. 55—58.
19. *Лопухин Ю. М., Арчаков А. И., Владимиров Ю. А., Коган Э. М.* Холестериноз. — М., 1983.
20. Хроматография в тонких слоях / Под ред. Э. Шталя: Пер. с нем. — М., 1965.
21. *Швец И. В.* // Терапевтическая стоматология. — Киев, 1972. — Вып. 7. — С. 155—158.
22. *Lewis L. A., Quaipe M. L., Page I. H.* // Amer. J. Physiol. — 1954. — Vol. 178. — P. 221—222.
23. *Wasserzug O., Szeinberg A., Sperling O.* // Monogr. Genet. — 1978. — Vol. 9. — P. 16—19.
24. *Zalkin H., Tappel A. L.* // Arch. Biochem. — 1960. — Vol. 88. — P. 113—117.

Поступила 23.04.86

УДК 612.3/8-06:612.332.74:547.963.21

Е. Я. Стан, А. П. Екимовский

ПЕПТИДНЫЙ БИОРЕГУЛЯТОР ИЗ КОРОВЬЕГО κ -КАЗЕИНА

Институт питания АМН СССР, Москва

Последнее время накапливаются факты о том, что регуляторную функцию наряду с традиционными пептидными регуляторами, гормонами и нейропептидами могут выполнять и продукты протеолиза белков, не являющихся в общепринятом смысле «профессиональными» предшественниками таких молекул [4, 14]. К подобным белкам относятся казеины молока, в структуре которых имеются аминокислотные последовательности, освобождаемые в процессе протеолиза в виде физиологически активных пептидов, способных влиять на деятельность центральной нервной системы (ЦНС), пищеварительную функцию и метаболический статус организма.

Так, впервые нами было показано, что продукт ограниченного протеолиза β -казеина молочной протеиназой, компонент 5 протеозо-пептонной фракции молока [17], при оральном введении оказывает регуляторное влияние на мозговое кровообращение [7]. Этот факт нашел свое объяснение, когда было установлено, что из β -казеина в процессе его протеолиза могут осво-

LIPID PEROXIDATION AND ANTIOXIDANT SYSTEMS IN CAT PARODONTIUM TISSUES

A. P. Levitsky, N. P. Kozlyanina, V. E. Sklyar

Institute of Stomatology, Ministry of Public Health of the Ukrainian SSR, Odessa

Lipid peroxidation and activity of antioxidant systems were studied in parodontium tissues of 64 cats; maximal activation of lipid peroxidation was detected in gingivitis both in gingiva and in alveolar process. Lipid peroxidation tended to normalization in gingiva only under conditions of light form of parodontitis, while in alveolar process — during parodontitis of middle severity. Deterioration of the antioxidant systems in bones during pathological state was more distinct as compared with gingiva; hence, metabolic alterations, occurred in response to activation of lipid peroxidation in gingivitis, were proceeded in bone structures of alveolar process and after the inflammation decrease in gingiva.

бождаться пептиды с опионоподобной активностью, названные β -казоморфинами [15, 18] и входящие в состав компонента 5.

В настоящее время известен широкий спектр физиологических активностей β -казоморфина. Этот пептид усиливает пищевое освобождение инсулина [24], соматостатина [25], панкреатического полипептида [23], повышает уровень пролактина в сыворотке крови [22] и, следовательно, увеличивает метаболический статус организма, выполняя роль локально действующего «пищевого гормона» [21]. Из пепсинового гидролизата α_s -казеина также был выделен пептид с опионоподобной активностью [26] и установлена его аминокислотная последовательность [20].

Ранее было обнаружено, что гликомакропептид (ГМП), освобождающийся из κ -казеина при створаживании молока, является сильным ингибитором желудочной секреции [12] и моторики [9]. Отмечена значительная гетерогенность ГМП и показано, что он находится в сильно ассоциированном

состоянии с молекулярной массой полимерной и мономерной форм соответственно 32 000 и 4000 [5]. Ингибиторная активность ГМП устойчива к действию пепсина, трипсина и химотрипсина [6, 11] и обусловлена не всей молекулой ГМП, а лишь его низкомолекулярным фрагментом [8]. В дальнейшем было показано, что в пепсиновом гидролизате κ -казеина присутствуют два ингибитора желудочной секреции [10]. Целью настоящего исследования является выделение из ферментативного гидролизата κ -казеина пептидного биорегулятора, способного изменять электрическую активность структур мозга.

Методика

В работе использовали свежее обезжиренное молоко, неочищенный свиной пепсин, сефадексы G-50 (тонкий) и G-10 ("Pharmacia", Швеция), биогель P-2,200—400 меш (BRL, США), сульфокатионит дауэкс 50W \times 2 с зернением 200—400 меш ("Dow", США).

Общий казеин получали из обезжиренного молока осаждением в изоточке при подкислении 1 н. HCl и дважды пересаждали в целях очистки от белков молочной сыворотки. κ -Казеин выделяли из общего фракционированшем в концентрированных растворах мочевины в кислой зоне pH, создаваемой серной кислотой [27], и дважды очищали от примеси α_s - и β -казеинов осаждением из 50 % этанола уксуснокислым аммонием.

Ферментативный гидролиз κ -казеина пепсином и получение исходного пептидного препарата осуществляли описанным методом [10]. Для дальнейшей очистки биологически активного пептида 100 мг исходного препарата пропускали через колонку сефадекса G-50, уравновешенную 0,01 М раствором аммиака. Выход материала с колонки на всех стадиях разделения регистрировали путем измерений электропроводности и поглощения света при 260 нм на приборе РЕППС-1М и самонисце КСФ-4. Полученные фракции лиофилизировали. Материал, вышедший с колонки сефадекса пиком IV, после лиофилизации наносили на колонку с биогелем P-2, уравновешенную 0,1 М уксусной кислотой. Материал, вышедший с колонки биогеля пиком IV-4, после лиофилизации растворяли в 4 мл стартового 0,2 М натрий-цитратного буфера pH 2,2 и наносили на колонку с дауэксом 50W \times 2. Колонку элюировали ступенчатым градиентом pH, создаваемым 0,2 М натрийцитратными буферами с pH 2,2, 3,25 и 4,25. Пик, выходящий в градиенте pH 3,6—4,25 пятым от начала хроматограммы (пик Д) в объеме 340—365 мл, лиофилизировали, растворяли в 3,5 мл дистиллированной воды и наносили на колонку биогеля P-2, уравновешенную дистиллированной водой. Материал, выходящий первым пиком (пик Д₁) во внутреннем объеме колонки, собирали и лиофилизировали. 0,5 мг материала пика Д₁ подвергали хроматографии высокого разрешения на жидкостном хроматографе фирмы "Waters". Весь остальной ма-

териал пика растворяли в 3 мл 0,01 М аммиака и в объеме 1 мл наносили на колонку сефадекса G-50, уравновешенную 0,01 М аммиаком. Материал, выходящий в наружном объеме колонки (пик Д_{1,1}), собирали и лиофилизировали. Выход этого материала 15—20 мг на 10 л обезжиренного молока. Аминокислотный состав физиологически активных фракций определяли на аминокислотном анализаторе Бэксман 121 после гидролиза в 6 н. HCl в атмосфере N₂ при 105 °C в течение 24 ч. Действие выделенных фракций на электрическую активность структур мозга оценивали по появлению и продолжительности всплеск высоковольтных (200—350 мкВ) и высокочастотных (15—20 Гц) колебаний электрического потенциала при внутривенном введении животным с живленными в различные структуры мозга электродами. Электрическую активность мозга регистрировали на энцефалографе фирмы «Альвар-Электроник».

Результаты и обсуждения

В литературе описаны способы выделения из ферментативных гидролизатов общего казеина [15] и α_s -казеина [26] биологически активных пептидов с опиподобной активностью, названных соответственно β -казеоморфином и α -казеиновым экзорфином.

Значительно ранее был описан простой способ выделения из пепсинового гидролизата κ -казеина ГМП [1], который тормозил желудочную секрецию [12] и моторику [9]. В дальнейшем этот способ был модифицирован [10], в результате чего увеличился выход исходного пептидного препарата и возросла его ингибиторная активность. Кроме того, в исходном пептидном препарате, полученном по последнему способу [10], появились пептидные фракции, способные изменять при подожном введении электрическую активность структур мозга у кроликов с живленными в различные области мозга электродами.

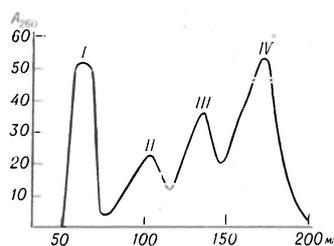


Рис. 1. Гель-фильтрация исходного пептидного препарата (100 мг в 2 мл) через сефадекс G-50 тонкий (колонка 1,5 \times 100 см), уравновешенный 0,01 М аммиаком.

Скорость фильтрации 25 мл/ч, детекция при 260 нм. Здесь и на рис. 2—6 оптическая плотность выражена в процентах поглощения.

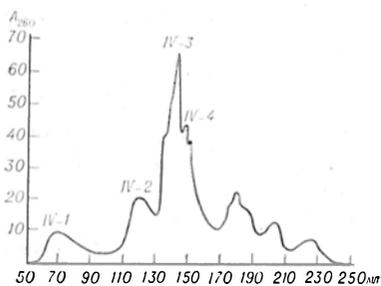


Рис. 2. Гель-фильтрация выделенного на сефадексе G-50 пика IV (100 мг в 2 мл) через биогель P-2 (колонка 1,5×100 см), уравновешенный 0,1 М уксусной кислотой.

Скорость фильтрации 35 мл/ч.

С целью выделения и дальнейшей очистки пептидного биорегулятора, изменяющего электрическую активность мозга, исходный пептидный препарат разделяли на колонке сефадекса G-50, где из него выделилось четыре пика (рис. 1). Материал пиков I и II не проявлял исследуемой физиологической активности, в то время как при введении животным материала пиков III и IV в дозах 50 и 150 мкг на 1 кг массы тела соответственно наблюдалось появление на электроэнцефалограмме (ЭЭГ) характерных всплесков колебаний электрического потенциала. Дальнейшему разделению подвергся материал пика IV, который при хроматографии на колонке с биогелем P-2 разделился на 7 фракций (рис. 2). Наибольшая физиологическая активность локализовалась во фракциях IV-1 и

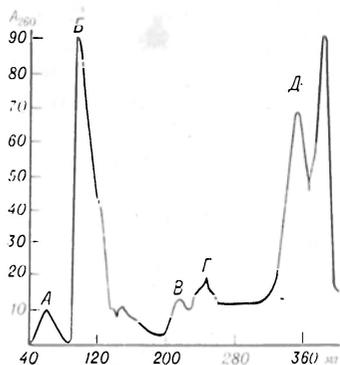


Рис. 3. Хроматография выделенного пика IV-4 на дауэксе 50W×2 (колонка 2,5×37 см), уравновешенном 0,2 М натрийцитратным буфером pH 2,2.

Пробу наносят в 4 мл стартового буфера и элюируют со скоростью 30 мл/ч в ступенчатом градиенте pH, создаваемом последовательной сменой натрийцитратных буферов: 0,2М, pH 2,2 — 140 мл; 0,2М, pH 3,25 — 120 мл; 0,2 М, pH 4,25 — 120 мл. Скорость элюции 30 мл/ч А—Д — пептидные фракции.

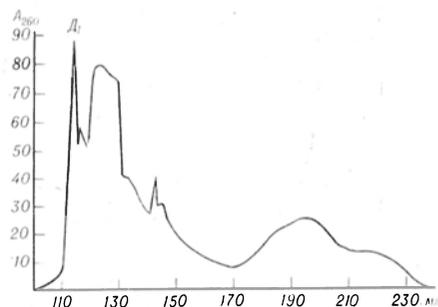


Рис. 4. Гель-фильтрация выделенного на дауэксе 50W×2 пика Д через биогель P-2 200—400 меш (колонка 1,5×100 см), уравновешенный дистиллированной водой.

Пробу наносят в 3,5 мл дистиллированной воды, скорость фильтрации 20 мл/ч.

IV-4. В связи с большой гетерогенностью фракции IV-1, в которой при хроматографии высокого разрешения обнаруживается около 30 пиков, она далее не исследовалась. Фракция IV-4 при хроматографии на дауэксе 50W×2 разделилась на ряд пиков (рис. 3). Из пика Д при хроматографии на колонке биогеля P-2 выделился острый пиком материал Д₁ (рис. 4), который оказывал четкое физиологическое действие в дозе 30 мкг на 1 кг массы тела. При аналитической хроматографии на колонке Zorbax C-8 в материале пика Д₁ обнаружилось четыре пика (рис. 5): пик 1, гидрофильный, с низкой оптической плотностью при 280 нм

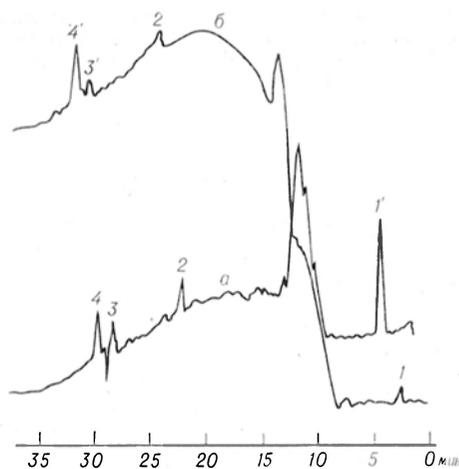


Рис. 5. Хроматография высокого разрешения выделенного на биогеле P-2 пика Д₁ (0,5 мг) на колонке Zorbax C-8 (4,6×250 мм) в системе: 0,01 М трифторуксусная кислота pH 2,0 и ацетонитрил.

Скорость потока 1,5 мл/мин; первые 8 мин в изократическом режиме, следующие 30 мин в ацетонитриловом градиенте от 2 до 70%. Детекция при 280 нм (а) и 206 нм (б). 1—4 — номера пиков.

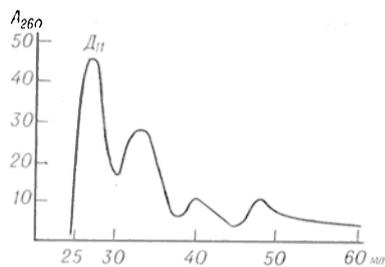


Рис. 6. Гель-фильтрация выделенного на биоге-
ле Р-2 пика D_1 через сефадексе G-10 (колонка
1,0×80 см), уравновешенный 0,01 М раствором
аммиака.

Пробу наносят в объеме 1 мл, скорость фильтрации
11 мл/ч.

и высокой при 206 нм и пики 2, 3 и 4 с более высоким поглощением при 280 нм, чем при 206 нм. Материал пика D_1 в связи с высоким содержанием солей не подвергался препаративному разделению на колонке Zorbax C-8, а обессоливался на колонке сефадекса G-10, где из него выделилось 4 пика (рис. 6). Пик, выходящий в наружном объеме колонки, пептид $D_{1,1}$, проявлял четкое физиологическое действие в дозе 20 мкг на 1 кг массы тела.

Из сравнения физиологической активности и аминокислотного состава выделенных фракций (см. таблицу) следует, что нарастание физиологической активности коррелирует с увеличением содержания тирозина во фрак-

Аминокислотный состав биологически активных пептидных фракций из пепсинового гидролизата κ -казеина (в г на 100 г пептида, рассчитанного из аминокислотного анализа)

| Аминокислота | Фракция | | |
|------------------------|---------------|-------|-----------|
| | III | IV-1 | $D_{1,1}$ |
| Аспарагиновая кислота* | 6,53 | 3,09 | 13,4 |
| Треонин | 7,5 | 5,03 | 6,4 |
| Серин | 5,8 | 6,12 | 6,5 |
| Глутаминовая кислота* | 14,26 | 12,25 | 16,5 |
| Пролин | 12,6 | 13,5 | 6,0 |
| Глицин | 3,95 | 2,19 | 5,0 |
| Аланин | 6,98 | 6,9 | 7,0 |
| Цистин | — | 0,85 | — |
| Валин | 4,75 | 4,56 | 4,1 |
| Метионин | 0,21 | 1,17 | 1,3 |
| Изолейцин | 4,16 | 4,33 | 3,5 |
| Лейцин | 6,78 | 4,05 | 7,2 |
| Тирозин | 0,78 | 0,62 | 2,2 |
| Фенилаланин | 2,35 | 3,57 | 4,5 |
| Лизин | 11,36 | 13,88 | 9,6 |
| Гистидин | 8,11 | 10,91 | 2,1 |
| Аргинин | 4,6 | 6,98 | 4,7 |
| Триптофан | Не определяли | | |

* Аминокислота -/- амид.

циях. Так, если фракции III и IV-1 имеют близкую удельную физиологическую активность и близкий уровень тирозина, то активность $D_{1,1}$ -пептида возрастает в 4 раза, а в аминокислотной гамме увеличивается содержание этой аминокислоты.

Наличие N-концевого остатка тирозина является важным признаком как для эндогенных опиоидоподобных пептидов — энкефалинов [19], так и для алиментарных экзогенных опиоидоподобных пептидов — β -казоморфинов [18]. Остаток тирозина не в N-концевом положении, а предшествуемый остатком аргинина, содержится и в α -казеиновом экзорфине [20]. Следовательно, можно полагать, что выделенный физиологически активный материал включает в себя фрагмент молекулы κ -казеина, локализованный в районе одного из остатков тирозина, имеющих в молекуле белка. Поскольку все остатки тирозина располагаются в пара- κ -казеиновой части молекулы, то физиологически активный пептид, по видимому, отличается от ранее выделенного ГМП, который не содержит ароматических аминокислот.

Изменения ЭЭГ-активности, аналогичные тем, которые возникают под влиянием выделенного пептида, наблюдаются в период пищевого насыщения, при инфузии в кровь аминокислот, а также при введении холецистокинина [2, 3, 13], который играет ключевую роль в развитии чувства насыщения [16]. Тот факт, что выделенный пептид вызывает изменения ЭЭГ-активности, аналогичные пищевому насыщению и действию холецистокинина, позволяет предполагать его участие в механизме насыщения.

Выделенный пептидный биорегулятор, являясь естественным продуктом переваривания одного из самых распространенных пищевых белков — казеина молока, может стать перспективным лекарственным препаратом для ослабления чувства голода в условиях лечения редуцированными диетами и, возможно, как успокаивающий препарат.

Возможная биологическая роль пептида в питании новорожденных, по видимому, направлена на регулирование потребления молока с целью предотвращения возможности перекармливания и связанной с этим перегрузки

как пищеварительной, так и белоксинтезирующей и выделительной систем новорожденных.

Авторы выражают благодарность В. В. Ульяшину (Институт биоорганической химии) за проведение высоко разрешающей жидкостной хроматографии выделенного препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Варсанович Е. А., Никольская Г. В., Черников М. П. // Вопр. питания. — 1974. — № 1. — С. 31—35.
2. Василевская Л. С., Журавлев Б. В., Судаков К. В., Шлыгин Г. К. // Физиол. журн. СССР. — 1979. — Т. 65. — С. 500—506.
3. Василевская Л. С., Журавлев Б. В. // Вопр. питания. — 1983. — № 4. — С. 57—61.
4. Галактионов С. Т., Цейгин В. М., Ленова В. И. // Биоорг. химия. — 1984. — Т. 10, № 1. — С. 5—16.
5. Стан Е. Я., Черников М. П. // Вопр. мед. химии. — 1974. — № 6. — С. 644—647.
6. Стан Е. Я., Никольская Г. В., Черников М. П. // Вопр. питания. — 1974. — № 3. — С. 44—47.
7. Стан Е. Я., Попова А. В., Черников М. П. // Там же. — 1979. — № 1. — С. 18—22.
8. Стан Е. Я., Черников М. П. // Вопр. мед. химии. — 1979. — № 3. — С. 348—352.
9. Стан Е. Я., Гройсман С. Д., Красильщиков К. Б., Черников М. П. // Бюл. экспер. биол. — 1983. — № 7. — С. 10—12.
10. Стан Е. Я., Екимовский А. П., Алейник С. И. и др. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 5. — С. 98—102.
11. Черников М. П., Стан Е. Я., Василевская Л. С., Шлыгин Г. К. // Вопр. питания. — 1979. — № 5. — С. 22—25.
12. Шлыгин Г. К., Василевская Л. С., Черников М. П., Никольская Г. В. // Бюл. экспер. биол. — 1971. — № 12. — С. 9—12.
13. Шумилина А. И. // Физиол. журн. СССР. — 1961. — Т. 47. — С. 3—10.
14. Янковский О. Ю. // Журн. эволюц. биохим. — 1985. — Т. 30. — С. 62—68.
15. Brantl V., Teschemacher H., Henschen A., Lottspeich F. // Hoppe — Seyler's Z. physiol. Chem. — 1979. — Bd 360. — S. 1211—1216.
16. Dockray G. J. // Regulatory Peptides of Gut and Brain. — London, 1982. — P. 253—258.
17. Eigel W. N. // Int. J. Biochem. — 1981. — Vol. 13. — P. 1081.

18. Henschen A., Lottspeich F., Brantl V., Teschemacher H. // Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. — 1979. — Bd 360. — S. 1217—1224.
19. Hughes J., Smith T. W., Kostertitz H. et al. // Nature. — 1975. — Vol. 258. — P. 577—579.
20. Loukas S., Varoucha D., Zioudrou C. et al. // Biochemistry. (Wash.). — 1983. — Vol. 22. — P. 4567—4573.
21. Morley J. E. // J. A. M. A. — 1982. — Vol. 247. — P. 2379—2380.
22. Nedvidkova J., Kasajirek E., Dlabac A., Felt V. // Exp. clin. Endocr. — 1985. — Vol. 85. — P. 249—252.
23. Schick R., Holland A., Fuente A. et al. // Acta endocr. (Kbh.). — 1983. Suppl. 253. — P. 80—81.
24. Schusdziarra V., Schick R., Feuele A. et al. // Endocrinology. — 1983. — Vol. 112. — P. 885—889.
25. Schusdziarra V., Schick R., Feuele A. et al. // Ibid. — P. 1948—1951.
26. Zioudrou Ch., Streaty R. A., Kleo W. A. // J. biol. Chem. — 1979. — Vol. 254. — P. 2446—2449.
27. Zittle C. A., Custer J. H. // J. Dairy Sci. — 1963. — Vol. 46. — P. 1183—1188.

Поступила 29.04.86

PEPTIDE BIOREGULATOR FROM COW K-CASEIN

E. Ya. Stan, A. P. Ekimovskiy

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

A number of peptides were isolated from pepsin hydrolyzate of cow k-casein by means of gel filtration on Sephadex G-50 and Biogel P-2, Dowex WX2 ion exchange chromatography in the pH step-wise gradient and dialysis using Sephadex G-10. The peptide material, after intravenous administration at a dose of 20 µg/kg of body mass, developed on electroencephalograms of various brain structures of starved rabbits the high amplitude, high frequent oscillations of electric potential corresponding to the effect of food satiation or to the action of cholecystokinin. Analysis of amino acid composition showed that the peptide fraction appears to be a fragment of para-k-casein moiety localized near one of Tyr residues containing in the protein molecule. Physiological effect of the peptide fraction was apparently related to regulation of satiation sense.

А. Д. Златопольский, М. А. Зайденберг, А. Е. Берман, В. И. Мазуров,
А. А. Карелин

ФРАГМЕНТИРОВАНИЕ ФИБРОНЕКТИНА ДЕМАСКИРУЕТ АКТИВНОСТЬ, СТИМУЛИРУЮЩУЮ СИНТЕЗ ДНК И РНК В КЛЕТКАХ ГРАНУЛЯЦИОННОЙ ТКАНИ *IN VITRO*

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Институт хирургии им. А. А. Вишневского АМН СССР, Москва

На ранних этапах заживления ран фибронектин и фибрин постунают в область раны и формируют гаптоактический для фибробластов временный каркас, по которому фибробласты движутся в область раны [6, 8, 11]. Сыграв свою роль, этот каркас растворяется, по-видимому, под действием протеиназ плазмы или вышедших из разрушенных клеток протеиназ [3, 5, 13]. Образующиеся при этом фрагменты фибронектина также, вероятно, могут стимулировать заживление ран, но уже по другому механизму, а именно путем стимулирования пролиферации фибробластов. В настоящей работе мы попытались проверить, стимулируют ли фибронектин и его фрагменты включение предшественников в нуклеиновые кислоты клеток грануляционной ткани *in vitro*.

Методика

В работе использовали белых крыс-самцов массой 150—170 г с экспериментальными ранами: полнослойный дефект кожи спины 2,5 × 2,0 см. Животных оперировали под эфирным наркозом. Биоптаты грануляционной ткани массой 100 мг, взятые из ран на 3—4-е сутки после операции, инкубировали в среде Уитто [12], содержащей фибронектин или его фрагменты (2—500 мг), 0,8 мкКи 5-метил-³H-тимидина (удельная радиоактивность 41 Ки/ммоль, СССР) или 0,6 мкКи 5-³H-уридина (удельная радиоактивность 31 Ки/ммоль, СССР) в пробе. Конечный объем инкубационной среды составлял 3 мл, длительность инкубации 5 ч при 37 °С и постоянном встряхивании.

После инкубации биоптаты ткани отделяли от среды центрифугированием, дважды промывали холодным раствором Кребс — Рингера, содержащим 1 % тимидин или уридин, гомогенизировали на холоду и в гомогенатах определяли содержание [1] и удельную радиоактивность ДНК и РНК. Фибронектин получали из сыворотки крови человека, как описано ранее [7]. Частичный протеолиз фибронектина осуществляли последовательно иммобилизованным на сефарозе плазмином и свободным трипсином, от которого затем избавлялись, пропуская реакционную смесь через сефарозу с иммобилизованным ингибитором трипсина из сои. Электрофоретический анализ проводили в градиенте полиакриламидного геля (5—15 %) в присутствии додецилсульфата Na.

На рис. 1 представлены результаты действия фибронектина и его фрагментов на удельную радиоактивность ДНК и РНК биоптатов. Из рисунка видно, что нативный фибронектин не только не увеличивает удельную радиоактивность ДНК и РНК, но даже несколько снижает ее (до 91 ± 8 % для ДНК и 83 ± 6 % для РНК) по сравнению с контрольной величиной. Фибронектин, подвергшийся частичному протеолизу, действует иначе, вызывая возрастание удельной радиоактивности ДНК и РНК. Стимулирующий эффект фрагментов на включение предшественников в ДНК и РНК возрастает с увеличением содержания вносимых в инкубационную среду фрагментов и достигает максимума при использовании 15—20 мкг фрагментов на пробу. Дальнейшее 10-кратное увеличение содержания фрагментов не оказывает влияния на включение предшественников в РНК и ДНК. Максимальное стимулирование фрагментами фибронектина синтеза ДНК и РНК составляет соответственно 165 ± 12 % и 127 ± 7 %. Подобный сти-

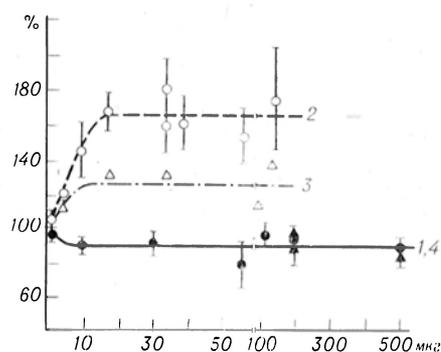


Рис. 1. Действие фибронектина и его фрагментов на включение меченых предшественников в ДНК и РНК.

По оси абсцисс — количество фибронектина или его фрагментов (в мкг); по оси ординат — удельная радиоактивность (в % от контроля). Удельная радиоактивность ДНК (1, 2) и РНК (3, 4) после действия нативного фибронектина (1, 4) и протеолитических фрагментов фибронектина (2, 3) оценивали по отношению к пробам, не содержащим фибронектина и его фрагментов, удельную радиоактивность ДНК и РНК которых принимали за 100 %.

мулирующий эффект мы наблюдали и в том случае, если вместо фрагментов протеолитического расщепления фибронектина под действием плазмина и трипсина использовали фибронектин, расщепленный в результате длительного (>3 мес) хранения при 3 °С. В этом случае 100 мкг частично расщепленного фибронектина повышали удельную радиоактивность ДНК до $205 \pm 36\%$ от контрольной. Таким образом, и в этом случае наблюдали стимулирующий эффект частично расщепленного фибронектина.

Повышение удельной радиоактивности РНК и ДНК под действием фрагментов фибронектина происходит, по-видимому, в результате стимуляции синтеза РНК и ДНК, отражающей усиление пролиферации фибробластов грануляционной ткани. На правомерность этого предположения указывает стимуляция синтеза ДНК в покоящихся фибробластах продуктами протеолиза фибронектина катепсином D [9]. Кроме того, митотическая активность фибробластов стимулируется выделяемыми из культуральной среды с фибронектином полипептидами с мол. массой 15—30 кД [10], которые, возможно, являются доменом фибронектина, связывающимся с коллагеном. Биттерман и соавт. [4] показали, что нативный фибронектин стимулирует вступление в митоз покоящихся фибробластов. Эти данные находятся в противоречии с результатами настоящей работы, а также с данными работы Хамфрис и Эяд [9]. Следует отметить, однако, что в экспериментах Биттерман и соавт. [4] активным началом, возможно, был не фибронектин, а продукты его ограниченного протеолитического расщепления, которые могли образоваться за время предынкубации клеток с фибронектином. На рис. 2 представлены результаты электрофоретического анализа по молекулярной массе продуктов расщепления фибронектина. Из рисунка видно, что продукты «автолиза» представлены главным образом тяжелыми компонентами (180—200 кД), а наибольший среди продуктов протеолиза имеет мол. массу 90 кД. Из этих данных следует, что активирование митогенной активности фибронектина происходит уже при отщеплении 2—3 доменов (в результате образуются фрагменты 180—200 кД). Скорее всего

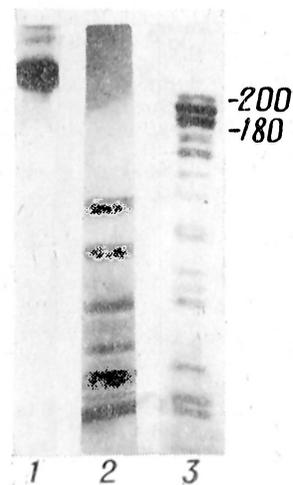


Рис. 2. Электрофоретическое разделение продуктов протеолиза фибронектина.

1 — нативный фибронектин; 2 — фибронектин, расщепленный последовательно плазмином и трипсином; 3 — фибронектин, расщепленный «автолитически». Для определения молекулярной массы использован набор стандартных белков с мол. массой 94, 67, 43, 30, 20,1, 14,4 кД.

эти 3 отщепляемых «автолитически» домена представляют собой два С-концевых (содержащий межцепевые S—S-связи и связывающий фибрин II) и один N-концевой (связывающий гепарин-I) домены, которые наиболее легко отщепляются от фибронектина при ограниченном протеолизе [2]. Остается неясным, однако, обладают ли активностью отщепляемые концевые домены или же большие фрагменты с мол. массой 180—200 кД.

Итак, полученные данные дают основание полагать, что фрагменты фибронектина могут ускорять заживление ран, стимулируя пролиферацию клеток грануляционной ткани. Эти фрагменты могут возникать в результате ограниченного протеолиза поступающего в рану фибронектина и растворения фибриново-фибронектинового каркаса. Причем, для появления митогенной активности, по-видимому, достаточно отщепления 2—3 доменов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жантиева Е. М., Богоявленская Н. В. // Вопр. мед. химии. — 1972. — № 5. — С. 545—549.
2. Златопольский А. Д., Мазуров В. И. // Там же. — 1985. — № 6. — С. 2—14.
3. D'Ardenne A. T., McGee T. O. D. // J. Path. — 1984. — Vol. 142. — P. 235—251.
4. Bitterman P. B., Rennard S. I., Adelberg S., Crystal R. G. // J. Cell Biol. — 1983. — Vol. 97. — P. 1925—1932.

5. Boughton R. A. // Cell Biochem. Funct. — 1985. — Vol. 3. — P. 79—91.
6. Clark R. A. F., Winn H. J., Dvorak H. F., Colvin R. B. // J. invest. Derm. — 1983. — Vol. 20. — N 6. — Suppl. — P. 26—30.
7. Engvall E., Ruoslahti E. // Int. J. Cancer. — 1977. — Vol. 20. — P. 1—5.
8. Fujikawa L. S., Foster C. S., Harrist T. J. et al. // Lab. Invest. — 1981. — Vol. 45. — P. 120—128.
9. Humphries M. J., Ayad S. R. // Biochem. Soc. Trans. — 1983. — Vol. 11. — P. 365.
10. Humphries M. J., Ayad S. R. // Nature. — 1983. — Vol. 305. — P. 811—813.
11. Repesh L., Fitzgerald T. J., Furcht L. T. // J. Histochem. Cytochem. — 1982. — Vol. 30. — P. 351—358.
12. Vitto J. // Biochim. biophys. Acta. — 1970. — Vol. 201. — P. 438—445.
13. Vaehri A., Alitalo K. // Cellular Controls in Differentiation / Eds C. W. Lloyd, D. A. Rees. — New York, 1981.

Поступила 21.06.86

УДК 616.153.915-39-074:547.854.5

В. Б. Гаврилов, А. Р. Гаврилова, Л. М. Мажуль

АНАЛИЗ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОДУКТОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПО ТЕСТУ С ТИОБАРБИТУРОВОЙ КИСЛОТОЙ

Институт фотобиологии АН БССР; Белорусский НИИ неврологии, нейрохирургии и физиотерапии; Сектор геронтологии АН БССР, Минск

В настоящее время количественное измерение продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в плазме крови приобретает важное диагностическое значение, так как активация ПОЛ играет существенную роль в развитии многих заболеваний, а также в ответной реакции организма на действие различных факторов внешней среды [1]. Наиболее широко для определения продуктов ПОЛ используют измерение окрашенных продуктов реакции сыворотки крови с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-тест) [4]. Популярность этого метода обусловлена его высокой чувствительностью, простотой осуществления и достаточной адекватностью получаемых результатов.

Метод основан на том, что при нагревании в кислой среде часть продуктов ПОЛ, относящихся к классу эндоперекисей, разлагается с образованием малонового диальдегида (МДА), связывание молекулы которого с двумя молекулами ТБК приводит к формированию окрашенного комплекса [10]. Взаимодействие ТБК с МДА, исходно содержащимся в липидных системах, и с другими летучими продуктами окисления липидов в количественном отношении играет незначительную роль [6]. Сложный механизм реакций, ведущих к образованию МДА из продукта-предшественника, накладывает ряд ограничений на проведение ТБК-теста. Кроме того, на протекание реакции в биологических средах оказывают влияние побочные факторы, к которым следует отнести локализацию продуктов ПОЛ в составе липид-белковых комплексов и взаимодействие ТБК с некото-

FRAGMENTATION OF FIBRONECTIN PRODUCED THE ACTIVITY STIMULATING DNA AND RNA SYNTHESIS IN THE CELLS OF GRANULATION TISSUE CULTURE

A. D. Zlatopol'sky, M. A. Zaidenberg, A. E. Ber-
man, V. I. Mazurov, A. A. Karelin

Institute of Biological and Medical Chemistry,
A. A. Vishnevsky Institute of Surgery, Academy
of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Human blood plasma fibronectin decreased slightly the incorporation of precursors into nucleic acids of granulation tissue culture cells. A slight fragmentation of fibronectin, where the fragments with 180-200 kD molecular mass were developed, led to occurrence of the activity 2-fold stimulating the DNA synthesis. After more effective proteolysis using plasmin and trypsin the stimulating effect of fibronectin fragments on synthesis of nucleic acids maintained and constituted $165 \pm 12\%$ and $127 \pm 7\%$ for DNA and RNA, respectively.

рыми веществами нелипидной природы, приводящее к появлению окрашенных продуктов [8]. Для преодоления указанных трудностей были предложены и продолжают разрабатываться различные модификации ТБК-теста, часть из которых уже перестала удовлетворять современным требованиям. В связи с этим имеется необходимость в критическом анализе используемых методик, учитывающем последние данные о механизме ТБК-реакции.

Во многих клинических лабораториях продолжают применять метод, основанный на депротенизации образца с помощью ТХУ, последующем кипячении безбелкового экстракта с ТБК и спектрофотометрической регистрацией окрашенного продукта по поглощению в области 532—535 нм [5]. Концентрацию ТБК-активных продуктов вычисляют, используя коэффициент молярной экстинкции комплекса МДА—ТБК при 535 нм, $\epsilon_{\text{МДА}} = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [11]. Применение ТХУ для закисления среды и одновременной депротенизации образца связано с устаревшим представлением о взаимодействии ТБК только с исходно имеющимся МДА. В действительности после добавления ТХУ более 90% всех ТБК-активных продуктов уходит в осадок в составе липид-белковых комплексов и не участвует в последующих реакциях с ТБК [13]. Неправильным является также использование в расчетах $\epsilon_{\text{МДА}}$, так как при измерении D_{535} не учитывается вклад в эту величину поглощения окрашенных комплексов ТБК с веществами нелипидной природы. По этой причине в литературе появляются данные, в

которых приводится многократно завышенное содержание ТБК-активных продуктов в сыворотке крови [3]. Таким образом, рассмотренный способ имеет низкие чувствительность и точность и не может быть рекомендован для дальнейшего применения.

В последние годы все большее признание получает метод K. Yagi [14], в соответствии с которым берут 0,05 мл крови, отделяют форменные элементы и из полученной плазмы осаждают липопротеиды с помощью фосфорновольфрамовой кислоты. ТБК-реакцию проводят с выделенным и ресуспендированным осадком липопротеидов; окрашенный продукт экстрагируют бутанолом и измеряют флуоресценцию экстракта. Количество ТБК-активных продуктов вычисляют в пересчете на МДА путем измерения флуоресценции продукта ТБК-реакции со стандартным количеством тетраметоксипропана или тетраэтоксипропана, разлагающихся с образованием МДА в ходе реакции. К достоинствам этого метода следует отнести прежде всего включение в реакцию основной части ТБК-активных продуктов, осаждающихся в составе липопротеидов. Кроме того, в результате бутанольной экстракции значительно улучшаются условия оптической регистрации окрашенного продукта. И наконец, флуориметрическое измерение продуктов реакции резко повышает чувствительность и специфичность определения, так как флуоресценция комплексов ТБК с нелипидными веществами имеет другие спектральные характеристики [8]. Вместе с тем рассмотренный метод является весьма трудоским, что можно объяснить проведением дополнительной операции осаждения и ресуспендирования липопротеидов. Широкое распространение этого метода ограничивается также необходимостью использования спектрофлуориметра.

Дальнейшее усовершенствование ТБК-теста для гомогенатов тканей предложено в работе [13], в которой предусматривается возвращение к инкубации с ТБК сразу всей исследуемой пробе, но проводить эту инкубацию с учетом установленной авторами рН-зависимости ТБК-реакции. Повышение чувствительности достигается в результате создания оптимальных условий для образования МДА из продуктов-предшественников, в ходе реакции. Чтобы увеличить точность спектрофотометрической регистрации окрашенных продуктов, оптическую плотность бутанольного экстракта измеряют при двух длинах волн (535 и 520 нм) и вычитают вклад неспецифического поглощения, определяя показатель $\Delta D = D_{535} - D_{520}$. Тем не менее получаемые по этому способу результаты трудно сопоставимы с более адекватным флуориметрическим измерением ТБК-активных продуктов.

Анализ литературных данных показал, что наилучшим вариантом проведения ТБК-теста можно считать инкубацию пробы с ТБК при оптимальном рН и последующую флуориметрическую регистрацию продукта реакции. При использовании более доступной спектрофотометрической регистрации определяемое содержание продуктов ТБК-реакции должно совпадать с результатами флуориметрических измерений и выражаться в стандартных единицах, а именно в пересчете на молярную концентрацию МДА.

В целях решения этих задач была исследована рН-зависимость ТБК-реакции с сыво-

роткой крови и установлены оптимальные условия спектрофотометрической регистрации продуктов реакции, позволяющие получать результаты, сопоставимые с флуориметрическим определением их содержания.

Методика

В работе использовали свежеприготовленную сыворотку, полученную из крови здоровых доноров. В реакционную смесь, содержащую 3 мл раствора H_3PO_4 с соответствующим рН и 1 мл 0,8 % ТБК («Реакхим», ч.д.а.), вносили 0,2 мл сыворотки. Регистрировали рН конечной смеси и инкубировали образец 45 мин на кипящей водяной бане. Затем смесь охлаждали до комнатной температуры и экстрагировали окрашенный продукт 5 мл *n*-бутанола. В каждом образце регистрировали оптическое поглощение и интенсивность флуоресценции, обусловленные наличием продуктов ТБК-реакции.

Оптическую плотность водяных растворов и бутанольных экстрактов измеряли на спектрофотометре UV-300 («Shimadzu», Япония). Интенсивность флуоресценции определяли на спектрофлуориметре JY3CS (Jobin Yvon, Франция) при $\lambda_{возб} = 515$ нм и $\lambda_{исп} = 554$ нм.

При проведении флуоресцентных измерений для приготовления стандартной пробы в реакционную смесь добавляли 0,2 мл $5 \cdot 10^{-6}$ М 1,1,3,3-тетраметоксипропана («Sigma», США), что соответствует содержанию 1 нмоль МДА в пробе. В контрольную пробу добавляли 0,2 мл H_2O . Концентрацию ТБК-активных продуктов рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{F_{и} - F_{к}}{F_{с} - F_{к}} \cdot \frac{1}{V}$$

(нмоль МДА на 1 мл сыворотки),

где $F_{и}$, $F_{с}$ и $F_{к}$ — соответственно интенсивность флуоресценции исследуемой, стандартной и контрольной проб; V — объем используемой сыворотки (0,2 мл).

Результаты

Известно, что рН-зависимость ТБК-реакции варьирует как для различных биологических тканей, так и при различных способах закисления среды [12, 13]. Поэтому было необходимо выявить диапазон рН-оптимума для наших условий проведения ТБК-реакции. Зависимость ТБК-реакции от рН при исследовании различных образцов сыворотки отличалась незначительно (рис. 1, кривые 1 и 2). В области рН 1,0—1,6 регистрировали максимальное количество образующихся продуктов, которое снижалось при рН более 1,6. Кроме того, при рН менее 1,3 исследуемые пробы после кипячения теряли прозрачность и одновременно ухудшалось разделение фаз при бутанольной экстракции окрашенных продуктов. В итоге светорассеяние бутанольных экстрактов, определяемое по поглощению при 620 нм, возрастало (см. рис. 1, кривая 3), что обычно приводит к завышению результатов. В соответствии с полученными данными для проведения ТБК-реакции с сывороткой крови был выбран оптимальный диапазон рН 1,3—1,6, который по нашей методике создавался при добавлении к пробе раствора H_3PO_4 с рН 1,15—1,45. В последующей работе для большей стабилизации рН инкубационной сме-

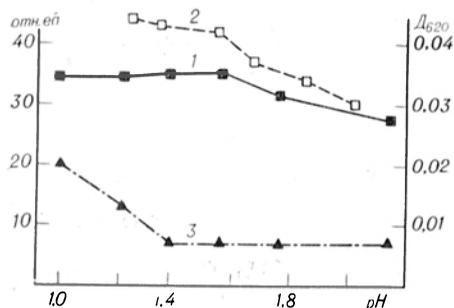


Рис. 1. Зависимость образования продуктов ТБК-реакции в сыворотке крови от pH инкубационной среды.

1 и 2 — интенсивность флуоресценции продуктов ТБК-реакции для двух различных сывороток крови; 3 — поглощение при 620 нм бутанольных экстрактов продуктов реакции из сыворотки крови 1. pH среды изменяли путем добавления 4–5 % раствора H_3PO_4 , доведенного до нужного значения pH с помощью конц. КОН.

По оси ординат: слева — интенсивность флуоресценции (в отн. ед.), справа — оптическая плотность D_{620} (в ед. опт. пл.).

си использовали только 2 % раствор H_3PO_4 с pH 1,3. Такая стабилизация pH, безусловно, улучшает воспроизводимость результатов, что важно при проведении серийных и межлабораторных исследований.

С помощью разработанного метода было измерено содержание ТБК-активных продуктов в сыворотке крови 29 здоровых доноров. Среднее содержание этих продуктов, определенное флуориметрически, составило $3,86 \pm 0,66$ нмоль МДА на 1 мл сыворотки и хорошо совпадало с аналогичной величиной $3,92 \pm 0,66$ нмоль МДА на 1 мл, приводимой в

литературе для измерений по методу К. Yagi [9].

Таким образом, оба сопоставляемых метода дают идентичные результаты, однако предлагаемый способ является менее трудоемким, поскольку в нем исключены стадии осаждения и последующего ресуспендирования липопротеидов. Большой объем сыворотки в наших исследованиях связан с необходимостью одновременной регистрации флуоресценции и оптической плотности исследуемых проб и может быть снижен до 0,05 мл при проведении только флуориметрических измерений.

Рассмотренный вариант осуществления ТБК-теста с использованием флуориметрической регистрации имеет самостоятельное значение и является предпочтительным. Однако в связи с указанными выше причинами весьма важно выяснить наиболее адекватный спектрофотометрический способ определения ТБК-активных продуктов. В последнее время для повышения точности измерения продуктов ТБК-реакции принято учитывать вклад неспецифического поглощения, который оценивают по величине оптической плотности в области коротковолновой и длинноволновой границы поглощения ТБК—МДА-комплекса [7, 13]. Для поглощения ТБК-активных продуктов в сыворотке крови были выбраны длины волны 510 и 580 нм [2]. Поэтому одновременно с величиной оптической плотности в максимуме поглощения (D_{535}) определяли показатели $\Delta D_{535-510} = D_{535} - D_{510}$ и $\Delta D_{535-580} = D_{535} - D_{580}$, а также степень мутности (D_{620}) для водных проб и их бутанольных экстрактов.

Как видно из таблицы, бутанольная экстракция приводила к многократному снижению мутности образцов. По этой причине после проведения экстракции более чем в 2

Взаимосвязь между показателями оптической плотности исследуемых проб (D_λ) и содержанием ТБК-активных продуктов (C) в сыворотке крови здоровых доноров ($n = 29$)

| Характеристика проб | Водные пробы после инкубации с ТБК | | |
|---|------------------------------------|----------------------|---------------|
| | D_{535} | $\Delta D_{535-580}$ | D_{620} |
| Показатели оптической плотности, D_λ | | | |
| Оптическая плотность, $\bar{X} \pm S$ | 0,092 ± 0,070 | 0,031 ± 0,014 | 0,051 ± 0,029 |
| Коэффициент пропорциональности, $K_\lambda = D_\lambda / C$, $10^6 M^{-1} cm^{-1}$ | 5,97 | 2,01 | |
| $K_\lambda / \epsilon_{MDA}$ | 3,80 | 1,29 | |
| Коэффициент корреляции между D_λ и C , r | 0,42 | 0,51 | |
| Уровень значимости корреляции, p | <0,05 | <0,01 | |

Продолжение

| Характеристика проб | Бутанольные экстракты водных проб | | | |
|---|-----------------------------------|----------------------|----------------------|---------------|
| | D_{535} | $\Delta D_{535-510}$ | $\Delta D_{535-580}$ | D_{620} |
| Показатели оптической плотности, D_λ | | | | |
| Оптическая плотность, $\bar{X} \pm S$ | 0,040 ± 0,008 | 0,008 ± 0,003 | 0,029 ± 0,005 | 0,005 ± 0,002 |
| Коэффициент пропорциональности, $K_\lambda = D_\lambda / C$, $10^6 M^{-1} cm^{-1}$ | 2,60 | 0,52 | 1,88 | |
| $K_\lambda / \epsilon_{MDA}$ | 1,67 | 0,33 | 1,21 | |
| Коэффициент корреляции между D_λ и C , r | 0,68 | 0,74 | 0,86 | |
| Уровень значимости корреляции, p | <0,001 | <0,001 | <0,001 | |

раза уменьшалось значение D_{535} . Для того чтобы исключить вклад светорассеяния из собственного поглощения продуктов реакции, было достаточно вычесть из D_{535} величину D_{580} , о чем говорит относительное постоянство показателя $\Delta D_{535-580}$ в обеих средах. Другой показатель $\Delta D_{535-510}$ в водной фазе чаще всего был чуть выше или ниже нуля и поэтому его в таблицу не вносили.

Для количественной оценки побочных факторов, влияющих на оптическое поглощение исследуемых проб, был рассчитан коэффициент пропорциональности (K_{λ} между измеряемыми оптическими показателями и молярной концентрации ТБК-активных продуктов в пробе. Отношение этого коэффициента к коэффициенту молярной экстинкции $\epsilon_{\text{МДА}}$ дает возможность определить вклад поглощения ТБК—МДА-комплекса в измеряемую величину оптической плотности для каждого показателя. Оказалось что регистрируемая величина D_{535} в зависимости от среды измерения в 1,7—3,8 раза превышала поглощение D_{535} , обусловленное собственно комплексом ТБК с МДА. Именно поэтому использование $\epsilon_{\text{МДА}}$ для расчета концентрации ТБК-активных продуктов по величине D_{535} является методически неадекватным. Не очень удачен вариант коррекции D_{535} путем вычисления показателя $\Delta D_{535-510}$, так как при этом измеряется лишь $1/3$ часть поглощения ТБК—МДА-комплекса и регистрируемые величины оптической плотности очень низки. Значительно лучше использовать показатель $\Delta D_{535-580}$, который меньше всего искажал истинное поглощение определяемых продуктов, превышая его на 20—30 %.

Взаимосвязь оптических показателей с содержанием ТБК-активных продуктов была исследована также с помощью корреляционного анализа. Коэффициенты корреляции для всех оптических показателей в бутанольном экстракте были существенно выше и статистически более значимы, чем для этих же параметров в водной фазе. Максимальную степень корреляции с содержанием ТБК-активных продуктов наблюдали для показателя $\Delta D_{535-580}$. Для перехода от измеряемого показателя $\Delta D_{535-580}$ к концентрации ТБК-активных продуктов методом наименьших квадратов было вычислено уравнение регрессии:

$$C = 0,81 + 106\Delta D,$$

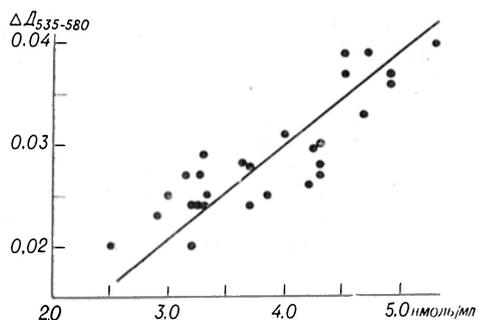


Рис. 2. Зависимость показателя оптического поглощения $\Delta D_{535-580}$ от содержания ТБК-активных продуктов для различных сывороток крови (экспериментальные точки).

Прямая линия — теоретическая прямая уравнения регрессии C по $\Delta D_{535-580}$. По оси абсцисс — концентрация ТБК-активных продуктов (C : в ммоль МДА на 1 мл сыворотки), по оси ординат — показатель $\Delta D_{535-580}$ (в ед. опт. пл.).

где C — концентрация ТБК-активных продуктов в наномолях МДА на 1 мл сыворотки, ΔD — показатель $\Delta D_{535-580}$ в бутанольном экстракте (в единицах оптической плотности). Соответствие между теоретической прямой и экспериментальными точками показано на рис. 2. Следует подчеркнуть, что численное значение коэффициентов в уравнении регрессии справедливо только для конкретных условий проведения ТБК-реакции при соблюдении всех концентраций и объемов вводимых реагентов, использованных в нашей работе. При изменении условий проведения ТБК-реакции концентрацию ТБК-активных продуктов в бутанольном экстракте можно определить (хотя и менее точно) с помощью коэффициента пересчета $K = 1,88 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ для оптического показателя $\Delta D_{535-580}$. В этом случае $C = \Delta D_{535-580} K \cdot l$, где C — концентрация продуктов в пересчете на МДА (в молях на 1 л); $\Delta D_{535-580}$ — показатель оптического поглощения бутанольного экстракта; l — длина кюветы (в сантиметрах).

Таким образом, на основании анализа литературы и проведенных исследований могут быть сформулированы принципы проведения ТБК-реакции с сывороткой крови, которые включают в себя следующее: инкубацию с ТБК всей исследуемой пробы при pH 1,3—1,6; экстракцию продуктов реакции бутанолом и спектрофлуориметрическое измерение их содержания. Более доступное, но менее точное спектрофотометрическое определение этих продуктов должно состоять в измерении показателя $\Delta D_{535-580}$ и последующем вычислении концентрации продуктов с помощью уравнения регрессии.

Разработанный с учетом этих принципов метод определения ТБК-активных продуктов не уступает по чувствительности и точности уже известному [14], однако он более прост в реализации и более универсален, так как позволяет получать стандартные результаты как при флуориметрической, так и при спектрофотометрической регистрации образующихся продуктов. Предлагаемый способ по сравнению с другим методом определения ТБК-активных продуктов, основанным на использовании ТХУ [5], имеет в 5 раз более высокую чувствительность, достигаемую за счет более интенсивного образования в ходе реакции конечного продукта [2]. Указанные преимущества позволяют рекомендовать разработанный метод для исследования патологических состояний, связанных с активацией процесса ПОЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. — М., 1982.
2. Гаврилов В. Б., Мажуль Л. М., Гацко Г. Г., Конев С. В. Способ количественного определения продуктов перекисного окисления в сыворотке крови. // А. с. 1179225 (СССР).
3. Гончаренко М. С., Латинава А. М. // Лаб. дело. — 1985. — № 1. — С. 60—61.
4. Колесова О. Е., Маркин А. А., Федорова Т. Н. // Там же. — 1984. — № 9. — С. 540—546.
5. Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г. // Современные методы в биохимии. — М., 1977. — С. 66—68.

6. Dahle L. K., Hill E. G., Holman R. T. // Arch. Biochem. — 1962. — Vol. 98. — P. 253—259.
7. Gutteridge J. M. C. // Analyt. Biochem. — 1977. — Vol. 82. — P. 76—82.
8. Gutteridge J. M. C., Tickner T. R. // Ibid. — 1978. — Vol. 91. — P. 250—257.
9. Nishigaki I., Hagihara M., Tsunekawa H. et al. // Biochem. Med. — 1981. — Vol. 25. — P. 373—378.
10. Pryor W. A., Stanley J. P., Blair E. // Lipids. — 1976. — Vol. 11. — P. 370—378.
11. Sinnhuber R. O., Yu T. C. // Food Technol. — 1958. — Vol. 12. — P. 9—13.
12. Tanizawa H., Sazuka Y., Takino Y. // Chem. pharm. Bull. — 1981. — Vol. 29. — P. 2910—2914.
13. Uchigama M., Mihara M. // Analyt. Biochem. — 1978. — Vol. 86. — P. 271—278.

Поступила 16.10.85

ANALYSIS OF THE PROCEDURES FOR ESTIMATION OF LIPID PEROXIDATION PRODUCTS USING THIOBARBITURIC ACID TEST

V. B. Gavrilov, A. R. Gavrilova, L. M. Mazhul
Institute of Photobiology, Institute of Neurology, Neurosurgery and Physiotherapy, Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Minsk

Main principles for carrying out of the thio-barbituric acid (TBA)-test of blood serum were characterized. These principles involved incubation of the sample at pH 1.3-1.6, extraction of the reaction products with butanol and spectrofluorimetric or spectrophotometric estimation. Content of TBA-active products in blood serum of healthy donors constituted 3.86 ± 0.66 nmol malonic dialdehyde per ml of blood serum as shown in fluorimetric estimation by means of the procedure developed.

УДК 616.391-008.64:577.161.3]-07:[616.127+616.74]-008.939.15-39-074

Ю. В. Архипенко, Л. М. Джанпаридзе, Д. В. Гуткин, И. И. Рожницкая,
В. Б. Спиричев

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ВИТАМИНА Е НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ И ТРАНСПОРТ Ca^{2+} В СЕРДЕЧНОЙ И СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦАХ

НИИ общей патологии и патологической физиологии АМН СССР, Институт питания АМН СССР, Москва

Известно, что дефицит основного естественного антиоксиданта α -токоферола закономерно приводит к активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) [1, 25], лабильзации лизосом [11] и развитию многообразных структурных повреждений в различных органах [13, 28]. Однако вопрос о выраженности этого типичного для недостаточности витамина Е комплекса изменений в сердечной мышце изучен недостаточно, а данных, позволяющих дать сравнительную количественную оценку нарушений, возникающих в сердечной и скелетной мышцах при Е-авитаминозе, в литературе нет. Вопрос этот является весьма существенным, так как давно известны нарушения функции скелетных мышц при авитаминозе Е [5, 6, 27], а для сердечной мышцы в последнее время обнаружены определенные нарушения сократительной функции, электрической стабильности и увеличение вероятности возникновения фибрилляции [2]. Биохимические механизмы этих изменений в сердце пока не изучены. Определенный интерес в практическом плане представляют исследования по-

вреждений миокарда при умеренных степенях Е-авитаминоза, а также сведения о профилактическом и терапевтическом эффекте применения α -токоферола при ряде патологий человека и животных [22—24].

Цель данной работы состояла в том, чтобы сопоставить степень активации ПОЛ, лабильзации лизосом и нарушения транспорта Ca^{2+} мембранами саркоплазматического ретикулума в скелетной и сердечной мышцах при недостаточности витамина Е.

Методика

Работу проводили на крысах-самцах Вистар с исходной массой тела 60—80 г, находившихся на полусинтетическом рационе, содержащем 22 % казеина, 60 % крахмала, 3 % линетолы, 7 % лярды, 3 % фильтровальной бумаги (в качестве клетчатки), 4 % солевой смеси и 0,1 % смеси витаминов, состав которых приведен в работе, опубликованной ранее [5].

Животные были разделены на 2 группы: 1-ю (контрольную) составили животные с оптимальной обеспеченностью витамином Е, к рациону которых добавляли dl- α -токоферилацетат в количестве 100 мг на 1 кг рациона, 2-ю (опытную) — животные, которым dl- α -токоферилацетат к рациону не добавляли.

Длительность содержания крыс на обоих рационах составила 2 мес.

О степени обеспеченности животных витамином Е судили по концентрации α -токоферола в сыворотке крови, определяемой спектрофлуорометрическим микрометодом [17], содержание α -токоферола в миокарде и скелетных мышцах устанавливали аналогичным методом после предварительного омыления [9, 26]. Гемолитическую стойкость эритроцитов, инкубируемых *in vitro* в изотонической среде, определяли по методу, приведенному ранее [18].

Содержание продуктов ПОЛ находили тремя методами. Концентрацию малонового диальдегида (МДА) в гомогенате тканей регистрировали по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой [20], в липидном экстракте, полученном из гомогенатов мышц по Фолчу [15], определяли спектрофотометрически концентрацию диеновых конъюгатов [10] и спектрофлуорометрически — концентрацию продуктов типа шиффовых оснований [14]. Активность лактатдегидрогеназы в плазме крови устанавливали описанным ранее методом [4]. Активность лизосомальных ферментов кислой фосфатазы и катепсина D определяли по методу, приведенному в работе [8]. Неседиментируемую активность находили в надосадке после центрифугирования мышечных гомогенатов при 60 000 g в течение 30 мин, — общую активность — после добавления в гомогенат тритона X-100. Скорость транспорта Ca^{2+} саркоплазматическим ретикулумом в гомогенате мышечных тканей определяли с помощью Са-селективного электрода [21] в среде, содержащей 10 мМ НЕРЕС, 100 мМ КСl, 15 мМ оксалат К, 4 мМ $MgCl_2$, 5 мМ NaN_3 .

Результаты обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

После содержания крыс в течение 2 мес на экспериментальных рационах масса тела животных 1-й и 2-й группы существенных различий не имела: в конце срока крысы весили 250—320 г, что согласуется с литературными данными об отсутствии существенного влияния дефицита витамина Е на рост

Таблица 1

Изменение содержания α -токоферола и гемолитической стойкости эритроцитов при недостаточности витамина Е

| Объект исследования | Концентрация α -токоферола | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------|
| | контроль | Е-авитаминоз |
| Сыворотка крови, мг на 100 мл | 0,85±0,16 | 0,08—0,04 |
| Миокард, мкг на 1 г ткани | 50,2±6,05 | 13,1±0,5 |
| Скелетная мышца, мкг на 1 г ткани | 45,4±2,7 | 8,44±1,0 |
| Гемолиз эритроцитов, % к полному | 2±0,75 | 78±11 |

Примечание. $P < 0,001$.

животных [19]. Как видно из табл. 1, концентрация α -токоферола в сыворотке крови животных, лишенных витамина Е, снижалась в 10 раз, в миокарде — в 3,4 раза, в скелетной мышце — в 5,4 раза; резко увеличивалась степень гемолиза эритроцитов, который является классическим тестом на дефицит витамина Е.

Данные, представленные в табл. 2, позволяют сопоставить содержание промежуточных и конечных продуктов ПОЛ в сердечной и скелетной мышцах контрольных животных и крыс с недостаточностью витамина Е. Из материала табл. 2 вытекают по меньшей мере два положения.

Во-первых, уже в контроле у животных с нормальной концентрацией α -токоферола содержание промежуточных и конечных продуктов ПОЛ в сердечной мышце значительно ниже, чем в

Таблица 2

Содержание продуктов ПОЛ в миокарде и скелетной мышце крыс при различной обеспеченности витамином Е

| Ткань | Продукты ПОЛ | Серия опытов | |
|-----------------|--|--------------|-------------------------|
| | | контроль | Е-авитаминоз |
| Миокард | Диеновые конъюгаты, $A_{232}/A_{208} \times 100$ | 2,57±0,21 | 3,42±0,24 |
| | МДА, мкмоль на 1 г ткани | 0,19±0,02 | 0,32±0,03 $P < 0,05$ |
| Скелетная мышца | Шиффовы основания, отн. ед. флуоресценции | 36,8±7,7 | 57,8±16,5 |
| | Диеновые конъюгаты, $A_{232}/A_{208} \times 100$ | 5,69±0,30 | 7,43±0,39 $P < 0,05$ |
| | МДА, мкмоль на 1 г ткани | 0,26±0,03 | 1,12±0,08 $P < 0,05$ |
| | Шиффовы основания, отн. ед. флуоресценции | 308±52 | 390±78 |

скелетной. Действительно, содержание в миокарде МДА на 30 %, диеновых конъюгатов примерно в 2 раза и, наконец, шиффовых оснований более чем в 8 раз ниже, чем в скелетной мышце (*musculus quadriceps femoris*). Оценивая этот факт, следует иметь в виду, что масса митохондрий на 1 г ткани и соответственно интенсивность окислительных процессов в сердечной мышце примерно в 5 раз выше, чем в скелетной [16]. Следовательно, наши данные свидетельствуют об обратной связи между интенсивностью дыхания и степенью развития процесса ПОЛ для двух исследованных типов мышечной ткани. На первый взгляд, это противоречит представлению о том, что индукция ПОЛ в липидном бислое клеточных мембран сопряжена с генерацией активных форм кислорода в дыхательной цепи митохондрий. Однако это противоречие, по-видимому, является кажущимся, так как большей интенсивности окисления и окислительного фосфорилирования в клетках мышечной ткани может соответствовать большая эффективность антиоксидантных систем. Такого рода данные были получены нами ранее, когда при сопоставлении правого и левого желудочков сердца крысы выяснилось, что миокард левого желудочка, имеющий большую интенсивность функционирования структур и более мощную систему митохондрий, обладает в то же время более активной системой антиоксидантных ферментов [3]. В резуль-

тате содержание продуктов ПОЛ в миокарде левого желудочка оказывается значительно ниже, чем в правом желудочке. Аналогичным образом можно объяснить также большую активность антиоксидантной системы в сердечной мышце по сравнению со скелетной [3, 7].

Таким образом, складывается представление, что сердце как жизненно важный и непрерывно функционирующий орган обладает одновременно высоким уровнем окислительного метаболизма и совершенной антиоксидантной защитой. Эта защита значительно эффективнее, чем в скелетных мышцах, и в результате стационарное содержание продуктов ПОЛ в сердце оказывается в несколько раз ниже, чем в скелетных мышцах.

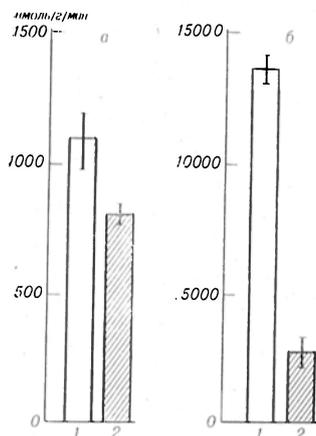
Второе положение, вытекающее из табл. 2, состоит в том, что недостаточность витамина Е приводит к активации ПОЛ, накоплению продуктов этого процесса в сердечной и скелетной мышцах. При этом активация ПОЛ в скелетной мышце, оцениваемая по такому важному показателю, как накопление МДА, оказалась также значительно более выраженной, чем в миокарде. Действительно, содержание МДА в сердце возрастало под влиянием дефицита α -токоферола на 60 %, а в скелетной мышце — более чем в 4 раза. По другим показателям активация ПОЛ в скелетной и сердечной мышцах при недостаточности витамина Е проявлялась в приблизительно оди-

Т а б л и ц а 3
Активность ферментов лизосом и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) при недостаточности витамина Е

| Объект исследования | Исследуемый показатель | Контроль | Е-авитаминоз |
|---------------------|---|------------|--------------|
| Плазма крови | ЛДГ, нмоль/(мин·мл) | 84,4±10,3 | 184,9±20,7** |
| | Кислая фосфатаза, нмоль/(ч·мл) | 152,5±18,7 | 152,4±18,5 |
| | Катепсин D, Ед/(ч·мл) | 0,24±0,04 | 0,26±0,07 |
| Миокард | Кислая фосфатаза, нмоль/(мин·г): общая | 247,1±11,3 | 262,4±17,4 |
| | неседиментируемая | 181,6±8,2 | 202,8±10,3 |
| | Катепсин D, Ед/(ч·г): общий | 83,7±4,9 | 93,4±5,0 |
| Скелетная мышца | неседиментируемый | 36,8±5,3 | 45,7±5,3 |
| | Кислая фосфатаза, нмоль/(мин·г): общая | 135,0±10,3 | 142,1±10,4 |
| | неседиментируемая | 106,9±8,2 | 140,3±9,2* |
| | Катепсин D, Ед/(г·мин): общий | 74,8±6,8 | 96,6±4,9* |
| | неседиментируемый | 29,6±3,6 | 32,8±2,9 |

* $P < 0,05$.

** $P < 0,001$.



Транспорт Са саркоплазматическим ретикулом сердца (а) и скелетной мышцы (б). 1 — контрольные животные; 2 — крысы с E-авитаминозом.

По оси ординат — скорость транспорта Ca^{2+} (в нмоль на 1 г ткани в 1 мин).

наковом накоплении диеновых конъюгатов и шиффовых оснований на 30—60 %. Тот факт, что преимущественная активация ПОЛ в скелетной мышце по сравнению с сердечной проявилась лишь в содержании МДА, но не реализовалась по другим продуктам, вероятно, обусловлен тем, что продукты ПОЛ с диеновой конъюгацией (главным образом гидроперекиси полиненасыщенных липидов) обладают меньшей устойчивостью, чем МДА, а для образования конечных продуктов ПОЛ типа шиффовых оснований требуется большее время, чем то, который организм располагал при данной длительности содержания на лишенной витамина E диете.

Итак, в плане настоящей работы наиболее существенным является то, что недостаточность витамина E закономерно приводит к активации ПОЛ как в скелетной, так и в сердечной мышце, но в последнем случае эта активация выражена меньше, что может быть обусловлено меньшим снижением и более высокой концентрацией α -токоферола, а также большей эффективностью ферментных систем антиоксидантной защиты в миокарде E-авитаминозных крыс по сравнению со скелетными мышцами.

Данные, представленные в табл. 3, свидетельствуют о том, что при воспроизводимой нами степени авитаминоза E существенно (более чем в 2 раза) возрастает активность цитоплаз-

матического фермента лактатдегидрогеназы в плазме крови. Этот факт является показателем интенсификации процессов (прежде всего ПОЛ), повреждающих клеточные мембраны в тканях при E-авитаминозе. Как видно, существенного увеличения активности лизосомальных ферментов в крови при этом не наблюдается. В миокарде изменения активности этих ферментов недостоверны, а в скелетной мышце наблюдается достоверное увеличение активности неседиментируемой фракции кислой фосфатазы — по существу вся активность этого фермента перемещается в цитозольную фракцию клетки, что может служить указанием на определенную лабильность лизосом.

Таким образом, при использованной нами степени авитаминоза E в сердечной мышце закономерно наблюдается активация ПОЛ по накоплению МДА, но не определяются признаки лабильности лизосом, тогда как в скелетной мышце четко выражены оба эти явления.

На заключительном этапе работы была осуществлена количественная оценка захвата Ca^{2+} саркоплазматическим ретикулом в гомогенатах мышечных тканей крыс с различной обеспеченностью витамином E. Данные, представленные на рисунке, отражают известный факт, что захват Ca^{2+} мощной системой саркоплазматического ретикула скелетной мышцы является на порядок более интенсивным, чем тот же процесс в сердечной мышце. Вместе с тем эти данные показывают, что недостаточность витамина E снижает мембранный транспорт Ca^{2+} в скелетной мышце в 4 раза, а в сердечной — лишь на 30 %. Необходимо отметить, что выбранный нами способ регистрации транспорта Ca^{2+} [21] позволяет использовать в эксперименте очень малые навески тканей (до 0,1 г), что дает возможность оценить параметры процесса индивидуально. Одновременно снижаются и затраты времени. При этом качественная картина не страдает, поскольку в более ранней работе [1] было показано, что в выделенной фракции саркоплазматического ретикула из скелетных мышц нарушение транспорта Ca^{2+} при авитаминозе E происходит в той же степени, что и в данной работе при исследовании гомогенатов.

В целом изложенное однозначно свидетельствует о большей защищенности сердечной мышцы от недостаточности витамина Е по сравнению со скелетной. Этот факт, по-видимому, соответствует наблюдению, что даже при длительном общем голодании не наблюдается атрофии сердечной мышцы и выраженных явлений сердечной недостаточности. Вместе с тем результаты недавних исследований свидетельствуют о том, что биохимические изменения, обнаруженные в сердечной мышце (снижение концентрации витамина Е, активация ПОЛ, нарушение мембранного транспорта Ca^{2+}) физиологически значимы [2]. Они закономерно сопровождаются снижением сократительной функции, падением порога фибрилляции сердца и, наконец, увеличением вероятности возникновения самой фибрилляции при острой ишемии сердца.

Эти данные дают основание полагать, что даже при умеренном дефиците витамина Е могут возникать существенные для организма нарушения обмена, функции и особенно электрической стабильности сердца, в связи с чем такого рода умеренная форма недостаточности витамина Е требует своевременного выявления и коррекции.

Авторы признательны В. Б. Ритову за помощь при регистрации транспорта Ca^{2+} и обсуждение результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Архипенко Ю. В., Газдаров А. К., Каган В. Е. и др. // Биохимия. — 1976. — Т. 41, № 10. — С. 1898—1902.
2. Джaparидзе Л. М., Белкина Л. М., Досмагамбетова Р. С. и др. // Вопр. питания. — 1986. — № 3. — С. 25—30.
3. Каган В. Е., Савов В. М., Диденко В. В. и др. // Бюл. экспер. биол. — 1984. — № 6. — С. 641—768.
4. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. — М., 1980.
5. Спиричев В. Б., Бронштейн Л. М., Матусис И. И. // Экспериментальная витаминология / Под ред. Ю. М. Островского. — Минск, 1970. — С. 18—58.
6. Шатерников В. А. // Витамины / Под ред. М. И. Смирнова. — М., 1974. — С. 125—151.
7. Advances in Studies on Heart Metabolism / Eds. C. M. Calderera, P. Harris. — Bologna, 1982.
8. Barret A. J. // Lysosomes. A Laboratory Handbook / Ed. J. T. Dingle. — Amsterdam. — 1972. — P. 46—135.

9. Benito O., Lumen B. et al. // Nutr. Res. — 1982. — Vol. 2. — P. 73—83.
10. Bolland J. L., Koch H. P. // J. Chem. Soc. — 1945. — Vol. 7. — P. 445—447.
11. Bond J. S., Bird J. W. // Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.). — 1974. — Vol. 146. — P. 608—612.
12. Brubacher G. // Bibl. Nutr. Dieta. — 1979. — Vol. 28. — P. 176—183.
13. Dahlin K. G., Chan A. C., Benson E. S., Hegarty P. V. G. // Amer. J. clin. Nutr. — 1978. — Vol. 31. — P. 94—99.
14. Dillard C. J., Tappel A. L. // Lipids. — 1973. — Vol. 8. — P. 183—189.
15. Folch J., Lees M., Moane-Stanley G. H. // J. biol. Chem. — 1957. — Vol. 226. — P. 497—509.
16. Green D., Golberrger R. // Amer. J. Med. — 1961. — Vol. 30. — P. 666—678.
17. Hansen L. G., Warwich W. J. // Amer. J. clin. Path. — 1969. — Vol. 51. — P. 538.
18. Jager F. G. // Nutr. et Dieta. — 1968. — Vol. 10. — P. 215.
19. Jager F. G. // Nutr. Metab. — 1972. — Vol. 14. — P. 7.
20. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. // Analyt. Biochem. — 1979. — Vol. 95. — P. 351—358.
21. Pagani E. D., Solaro R. Y. // Methods in Pharmacology. — New York, 1984. — Vol. 5. — P. 49—61.
22. Roneus B., Yonsson L. // Zbl. vet. Med. — 1984. — Bd 31. — S. 441—453.
23. Sokol R. Y., Balistrery W. F., Hoofnagle J. H., Yones E. A. // Amer. J. clin. Nutr. — 1985. — Vol. 41. — P. 66—72.
24. Speer M. E., Bliefeld C., Rodolf A. J. et al. // Pediatrics. — 1984. — Vol. 74. — P. 1107—1112.
25. Tappel A. L. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1972. — Vol. 203. — P. 12—28.
26. Taylor S. L., Lambden M. P., Tappel A. V. // Lipids. — 1976. — Vol. 11. — P. 530—538.
27. The Vitamins / Eds. N. H. Sebrell, R. S. Harris. — New York, 1972.
28. Van Vleet J. F., Ferrans V. J., Ruth G. R. // Lab. Invest. — 1977. — Vol. 37. — P. 188—200; 201—211.

Поступила 05.02.86

EFFECT OF VITAMIN E DEFICIENCY ON LIPID PEROXIDATION AND Ca^{2+} TRANSPORT IN HEART AND SKELETAL MUSCLES.

Yu. V. Arkhipenko, L. M. Dzaparidze, D. V. Gudkin, I. I. Rozhitskaya, V. B. Spirichev

Institute of General Pathology and Pathophysiology, Institute of Nutrition, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

10-fold decrease of α -tocopherol content in blood serum, distinct increase in hemolysis of erythrocytes and activation of lactate dehydrogenase in blood plasma were found in rats kept on a vitamin E deficient diet within 2 months as compared with control. Content of α -tocopherol was decreased in myocardium 3.4-fold and in skeletal muscles — 5.4-fold. Lipid peroxidation was activated in myocardium and skeletal muscles under conditions of vitamin E deficiency. Content of diene conjugates and Schiff bases was increased by 30-60% in these tissues; content of malonic dialdehyde — the

secondary product of lipid peroxidation — was increased in myocardium by 60 % and in skeletal muscles — 4-fold. Activity of lysosomal enzymes was altered only slightly in myocardium, whereas in skeletal muscles unsedimented activity of acid phosphatase was distinctly increased. The activation of impairing factors

observed led to deterioration of Ca^{2+} transport functions of membranes in myocardium by 30 % and in skeletal muscles — 4-fold. The data obtained suggest that heart muscle is better protected against vitamin E deficiency as compared with skeletal muscle. Physiological importance of these results is discussed.

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 577.152.14.088.1 + 612.015.11:577.152.14]-088.1

Т. Т. Березов, Е. В. Лукашева, И. П. Смирнова

К ВОПРОСУ ОБ ОПРЕДЕЛЕНИИ АКТИВНОСТИ ОКСИДАЗ L-АМИНОКИСЛОТ

Кафедра биохимии Университета дружбы народов им. Патриса Лумумбы

Практическое использование оксидаз L-аминокислот до последнего времени сдерживалось ввиду малой доступности основного источника этих ферментов — змеиного яда. Однако к настоящему времени известен ряд продуцентов оксидаз L-аминокислот микробного и грибного происхождения, которые могут служить надежным, доступным и дешевым источником этих ферментов [4, 12, 16, 17, 22, 24—26].

Оксидазы L-аминокислот уже находят применение для аналитических и медицинских целей [1, 15, 16, 18], в процессе производства α -кетокислот [25], для получения D-изомеров аминокислот [10] из рацемических DL-форм.

Отличительной особенностью всех известных оксидаз L-аминокислот является их чрезвычайно высокая стереоспецифичность по отношению к L-изомерам аминокислот. На D-изомеры аминокислот эти ферменты не действуют. Это позволяет проводить аналитическое определение концентрации L-изомеров в присутствии D-изомеров аминокислот.

Определение активности оксидаз L-аминокислот может быть осуществлено различными способами. Причем оказывается, что данные о ферментативной активности, полученные различными методами, могут сильно различаться. Поэтому в данной работе на примере L-лизин- α -оксидазы-фермента

с узкой субстратной и стереоспецифичностью обсуждаются описанные в литературе методы определения активности оксидаз L-аминокислот и предлагаются некоторые новые способы определения этого показателя.

Методика

В работе были использованы L-лизин и пероксидаза из хрена («Reanal», ВНР), NAD \cdot H $_2$ («Boeinger», ФРГ), глутаматдегидрогеназа («BDH», Англия), α -кетоглутарат и каталаза (Serva, ФРГ), феназинметасульфат (ФМС; «Sigma», США). Ферроцианид калия и о-данизидин (СССР) были очищены перекристаллизацией, L-лизин- α -оксидаза получена из водного экстракта культуры *Trichoderma sp.* по методике [2], реактив Несслера ч. д. а., остальные реактивы квалификации о. с. ч.

Метод А. Стандартная реакционная смесь для определения скорости ферментативной реакции по поглощению кислорода содержала 0,1 М натрий-фосфатный буфер рН 7,4, 1 мМ L-лизин, 10^{-3} — 10^{-2} Е/мл гомогенного препарата L-лизин- α -оксидазы. Конечный объем 1 мл. Скорость реакции определяли при 25 °С с помощью электрода типа Кларка.

Метод Б. Стандартная реакционная смесь для определения скорости ферментативной реакции с помощью пероксидазы и о-данизидина содержала 0,05 М натрий-фосфатный буфер рН 7,4, 1 мМ L-лизин, $2,5 \cdot 10^{-7}$ М пероксидазу, $2 \cdot 10^{-4}$ М о-данизидин, 10^{-4} — $6 \cdot 10^{-3}$ Е/мл L-лизин- α -оксидазы. Конечный объем 2 мл. Реакционную смесь после иницирования реакции добавлением L-лизин- α -оксидазы инкубировали при 25 °С в кювете спектрофотометра ($l=1$ см). За ходом реакции следили по увеличению оптической плотности при 460 нм с помощью спектрофотометра «Specord М-40» (ГДР). Коэффициент экстинкции принимали равным $1,1 \cdot 10^4$ М $^{-1}$ см $^{-1}$. В кювету сравнения

Чувствительность различных методов определения ферментативной активности L-лизин- α -оксидазы

| Метод | Концентрация L-лизин- α -оксидазы в реакционной смеси, М |
|-------|---|
| А | 10^{-3} — 10^{-3} |
| Б | 10^{-4} — $6 \cdot 10^{-3}$ |
| В | 10^{-3} — 10^{-2} |
| Г | $2 \cdot 10^{-5}$ — $2 \cdot 10^{-3}$ |
| Д | 10^{-3} — 10^{-2} |
| Е | $5 \cdot 10^{-3}$ — $5 \cdot 10^{-2}$ |

добавляли те же компоненты, за исключением L-лизина.

Метод В. Вместо оданизидина в работе по данному методу использовали другой субстрат пероксидазы — ферроцианид калия в концентрации 10^{-2} М. Остальные компоненты реакционной смеси были взяты в тех же концентрациях, что и в методе Б. За ходом реакции следили по увеличению оптической плотности при 420 нм. Коэффициент экстинкции принимали равным $1 \cdot 10^3$ М $^{-1}$ см $^{-1}$. В кювету сравнения вносили те же компоненты, что и в рабочую кювету, кроме L-лизина.

Метод Г. Стандартная реакционная смесь для определения скорости ферментативной реакции по накоплению аммиака содержала 0,1 М натрий-фосфатный буфер рН 7, 4,1 мМ L-лизин, 0,6 Е/мл глутаматдегидрогеназы, 2 мМ α -кетоглутарат, 0,7 мМ НАД \cdot H $_2$, $2 \cdot 10^{-5}$ — $2 \cdot 10^{-3}$ Е/мл L-лизин- α -оксидазы. Конечный объем составлял 2 мл. За ходом реакции следили при 25 °С по увеличению оптической плотности при 340 нм. Коэффициент экстинкции принимали равным $6,22 \cdot 10^4$ М $^{-1}$ см $^{-1}$. В кювету сравнения вносили те же компоненты, кроме L-лизина.

Метод Д. Определение скорости ферментативной реакции по образованию α -кето- ϵ -аминокапроновой кислоты осуществляли по методу [15].

Метод Е. Стандартная реакционная смесь для определения скорости ферментативной реакции по накоплению Δ^1 -пиперидин-2-карбоксилата содержала 0,05 М натрий-фосфатный буфер рН 7,4, 1 мМ L-лизин, $5 \cdot 10^{-3}$ — 10^{-2} Е/мл L-лизин- α -оксидазы. Конечный объем составлял 2 мл. За ходом реакции следили по увеличению оптической плотности при 270 нм. Коэффициент экстинкции принимали равным 200 М $^{-1}$ см $^{-1}$. В кювете сравнения отсутствовал L-лизин. Для увеличения скорости реакции в некоторых экспериментах в реакционную смесь добавляли 170 Е/мл каталазы.

Результаты и обсуждение

В реакции окислительного дезаминирования L-лизина, катализируемой L-лизин- α -оксидазой, поглощается растворенная в воде кислород и образуется ряд продуктов реакции: NH $_3$, α -кето- ϵ -аминокапроновая кислота и H $_2$ O $_2$. Регистрация концентраций этих продуктов в процессе ферментативной реакции является основой для разработки различных методов определения активности L-лизин- α -оксидазы.

Одним из наиболее удобных способов определения активности оксидаз L-аминокислот является полярографический (метод А). Этот метод позволяет следить непосредственно за ходом ферментативной реакции, не осложненной последующими неэнзиматическими превращениями продуктов реакции. Метод прост, не требует использования каких-либо дополнительных реактивов, однако чувствительность его не-

высока, поскольку требует наличия сравнительно высоких концентраций фермента (табл. 1).

Во многих работах использовали манометрический метод, основанный на определении убыли кислорода [4, 12, 24, 26]. Этот метод может давать заниженные значения ферментативной активности, так как при высоких скоростях расходования кислорода скорость растворения O $_2$ воздуха в реакционной смеси является лимитирующей стадией. Однако скорость поглощения кислорода, определенная манометрическим и полярографическим методами, может иногда совпадать [13].

Измерение скорости ферментативной реакции по накоплению перекиси

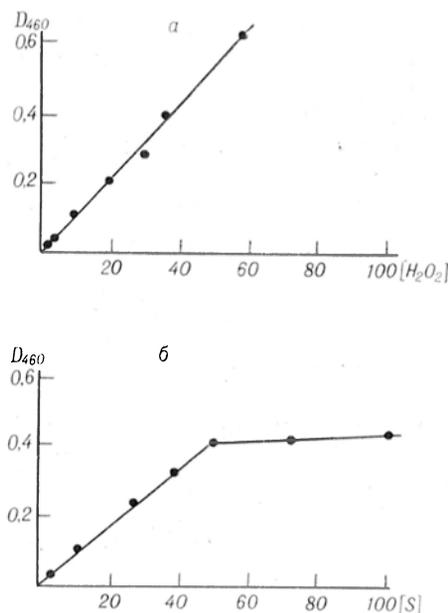


Рис. 1. Зависимость оптической плотности реакционной смеси после окончания реакции при 460 нм от исходной концентрации (мкМ) перекиси водорода (а) и L-лизина (б) при использовании метода Б.

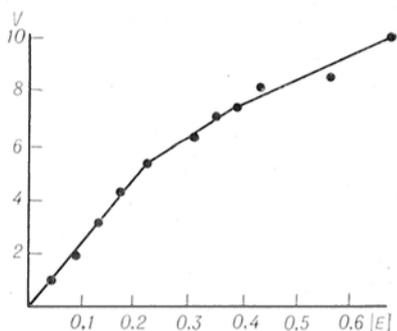


Рис. 2. Зависимость скорости реакции (в $\mu\text{кмоль} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$) от концентрации (мкг/мл) L-лизин- α -оксидазы при использовании метода Б.

водорода (метод Б) позволяет быстро и с большей чувствительностью, чем метод А, определять ферментативную активность оксидаз L-аминокислот. В качестве субстратов пероксидазы можно использовать различные соединения. В данной работе был использован о-дианизидин.

Из зависимости оптической плотности продукта окисления о-дианизидина в присутствии пероксидазы от исходной концентрации перекиси водорода (рис. 1, а) был вычислен коэффициент экстинкции, равный $\epsilon_{460} = 1,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Зависимость оптической плотности реакционной среды после окончания реакции от исходной концентрации L-лизина приводит к аналогичным значениям для коэффициента экстинкции (рис. 1, б). Линейная зависимость оптической плотности от концентрации L-лизина наблюдается до значения $5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. Представленная на рис. 2 кривая может быть использована в качестве стандартной калибровочной при определении концентрации L-лизина с помощью L-лизин- α -оксидазы.

Изучение зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации L-лизин- α -оксидазы при использовании метода Б показало (см. рис. 2), что линейная зависимость наблюдается до концентрации фермента $2 \cdot 10^{-5} \text{ мг/мл}$ ($6 \cdot 10^{-4} \text{ Е/мл}$). Такой вид кривой может определяться невысокой растворимостью окрашенного продукта окисления о-дианизидина в водной среде при рН 7,4. Поэтому при использовании метода Б необходимо работать с низкими концентрациями оксидазы L-аминокислот; в противном случае данные о ферментативной активности будут заниженными.

Чувствительность метода Б может быть значительно повышена при сильном подкислении реакционной среды, так как тригидрохлоридная соль окрашенного продукта имеет значительно более высокий коэффициент молярной экстинкции, равный $\epsilon_{460} = 4,81 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [21]. Однако подобная процедура подкисления лишает метод Б важного преимущества, в частности возможности непрерывного слежения за кинетикой ферментативной реакции.

Для определения скорости катализируемой L-лизин- α -оксидазой реакции в настоящей работе, кроме о-дианизидина, был использован другой субстрат пероксидазы — ферроцианид калия (метод В). Этот кинстический метод обладает меньшей чувствительностью (см. табл. 1), поскольку коэффициент экстинкции конечного окрашенного продукта — ферроцианида калия — составляет $1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Недостатком метода является наличие значительного спонтанного окисления ферроцианида калия в условиях проведения эксперимента.

В работе была использована также возможность определения ферментативной активности L-лизин- α -оксидазы по количеству образовавшегося в реакционной смеси аммиака. Оказалось, что способ определения концентрации аммиака с помощью реактива Несслера не позволяет непрерывно следить за ходом реакции, так как при взаимодействии L-лизина с реактивом Несслера развивается интенсивное окрашивание при 420 нм, мешающее измерению истинной концентрации аммиака. В связи с этим для контроля за концентрацией аммиака было предложено использовать систему, содержащую, кроме L-лизина и L-лизин- α -оксидазы, также глутаматдегидрогеназу, НАД $\cdot\text{H}_2$ и α -кетоглутарат (метод Г). Показано (см. табл. 1), что указанный метод обладает более высокой чувствительностью по сравнению со всеми другими использованными в работе методами и позволяет непрерывно следить за ходом ферментативного процесса.

Из литературных данных известно, что для определения ферментативной активности оксидаз L-аминокислот по накоплению в реакционной среде α -кетокислот можно использовать 3-метил-2-бензотиазолонгидразонгидрохлорид (МБТГ) [15] и 2,4-динитрофенилгид-

Интересным представляется также вопрос о том, с какими скоростями действуют оксидазы L-аминокислот в естественных условиях в органах и тканях, поскольку ранее [20] высказывалось предположение, что в клетках оксидазы L-аминокислот связаны с электронно-транспортными системами, способными в значительной мере ускорять процесс окисления восстановленного кофактора. Выяснение этих вопросов требует проведения дополнительного исследования.

Таким образом, в настоящей работе было исследовано несколько способов определения активности оксидаз L-аминокислот. Определены интервалы концентраций фермента, которые могут использоваться в каждом из этих способов. Показано, что измерение ферментативной активности по накоплению восстановленного кофактора дает в отличие от других методов завышенные результаты. Наиболее чувствительными являются методы, основанные на измерении концентрации аммиака при помощи глутамат-дегидрогеназного метода и на определении концентрации перекиси водорода при помощи пероксидазы и о-дианизида.

ЛИТЕРАТУРА

1. Березов Т. Т. // Вестн. АМН СССР. — 1984. — № 8. — С. 11.
2. Хадзев С. Х., Лукашева Е. В., Смирнова И. П., Березов Т. Т. // Вопр. мед. химии. — 1985. — № 5. — С. 130.
3. Bright H. J., Porter J. T. // The Enzymes. — New York, 1975. — Vol. 12. — P. 421.
4. Burton K. // Biochem. J. — 1952. — Vol. 50. — P. 258.
5. Coles C. J., Edmondson D. E., Singer T. P. // J. biol. Chem. — 1977. — Vol. 252. — P. 8035.
6. Frost A. A., Pearson R. G. // Kinetics and Mechanism. — New York, 1961. — P. 49.
7. Guilbault G. G., Hrabankowa H. // Analyt. Chem. — 1970. — Vol. 42. — P. 1779.
8. Guilbault G. G., Lubrano G. J. // Analyt. chim. Acta. — 1974. — Vol. 69. — P. 183.
9. Guilbault G. G., Nagi G. // Analyt. Lett. — 1973. — Vol. 6. — P. 301.
10. Hafner E. W., Wellner D. // Proc. nat.

- Acad. Sci. USA. — 1971. — Vol. 68. — P. 987.
11. Johansson G., Edstrom K., Ogren L. // Analyt. chim. Acta. — 1976. — Vol. 85. — P. 55.
 12. Knight S. G. // J. Bact. — 1948. — Vol. 55. — P. 401.
 13. Koyama H. // J. Biochem. (Tokyo). — 1982. — Vol. 92. — P. 1235.
 14. Kusakabe H., Kodama K., Kuninaka A. et al. // Agricult. Biol. Chem. — 1979. — Vol. 43. — P. 1749.
 15. Kusakabe H., Kodama K., Kuninaka A. et al. // Ibid. — 1980. — Vol. 44. — P. 387.
 16. Kusakabe H., Kodama K., Kuninaka A. et al. // J. biol. Chem. — 1980. — Vol. 255. — P. 976.
 17. Kusakabe H., Midorikava Y., Fujishima T. // Agricult. biol. Chem. — 1984. — Vol. 48. — P. 181.
 18. Kusakabe H., Sugi M., Kodama K. et al. // Ibid. — 1979. — Vol. 43. — P. 1371.
 19. Malmstadt H. V., Hadjiioannou T. P. // Analyt. Chem. — 1963. — Vol. 14. — P. 14.
 20. Meister A., Wellner D., Scott S. J. // J. nat. Cancer Inst. — 1960. — Vol. 24. — P. 31.
 21. Moller K. M., Ottolenhi P. // C. h. Lab. Carlsberg, 1966. — Vol. 35. — P. 369.
 22. Pelmont J., Arland G., Rossat A. M. // Biochimie. — 1972. — Vol. 54. — P. 1359.
 23. Singer T. P., Kearney E. B. // Arch. Biochem. — 1950. — Vol. 29. — P. 190.
 24. Stumpf P. K., Green D. E. // J. biol. Chem. — 1944. — Vol. 53. — P. 387.
 25. Szwajcer E., Brodelius P., Mosbach K. // Enzyme Microb. Technol. — 1982. — Vol. 4. — P. 409.
 26. Thayer P. S., Horovitz H. N. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 192. — P. 755.
 27. Yasuda M., Tanizawa K., Toyama S., Soda K. // J. appl. Biochem. — 1980. — Vol. 2. — P. 510.

Поступила 23.12.85

ON ESTIMATION OF L-AMINO ACID OXIDASES ACTIVITY

T. T. Beresov, E. V. Lukasheva, I. P. Smirnova
Chair of Biochemistry, P. Lumumba State University, Moscow

Activity of L-amino acid oxidases was studied using several procedures. Optimal concentrations of L-lysine- α -oxidase, suitable for each procedure, were established involving highly purified preparations of the enzyme from *Trichoderma sp.* Estimation of the enzymatic activity carried out by means of calculation of the reduced cofactor accumulated led to two-fold exceeding of the results. The most sensitive procedure was based on evaluation of ammonium content in the reaction catalyzed by glutamate dehydrogenase and the procedure where peroxidase and o-dianizidine were used.

Р. Т. Тогузов, Ю. В. Тихонов, А. М. Пименов, Т. Е. Новикова,
И. С. Мейснер

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПУРИНОВЫХ И ПИРИМИДИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ В СОСТАВЕ КИСЛОТОРАСТВОРИМЫХ ФРАКЦИЙ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ОБРАЩЕННО-ФАЗНОЙ ИОН-ПАРНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Отдел биохимии Межфакультетского лабораторного комплекса 2-го МОЛГМИ им.
Н. И. Пирогова, Москва

В настоящее время наиболее распространенным и перспективным методом количественного анализа пуриновых и пиримидиновых метаболитов является высокоэффективная жидкостная хроматография, которая применяется в различных модификациях: анионообменной [1], обращенно-фазной [14] и ион-парной [7].

Проблема одновременного анализа состава предшественников нуклеиновых кислот и их метаболитов заключается в использовании различных механизмов разделения для разных групп соединений: нуклеотиды разделяют по степени фосфорилирования и природе азотистых оснований с помощью анионообменной хроматографии [3, 9], а нуклеозиды и азотистые основания — по степени гидрофобности методом обращенно-фазной хроматографии [4, 5, 8].

В последнее время для анализа соединений пуринового и пиримидинового ряда стали применять методы обращенно-фазной ион-парной хроматографии с использованием различных модификаторов подвижной фазы (ион-парных реагентов), в частности для анализа адениновых нуклеотидов [11], олигонуклеотидов [2, 10], а также более полного класса рибонуклеотидов [7]. В то же время ион-парная модификация обращенно-фазной хроматографии, которая основывается на образовании с помощью соответствующего противоиона заряженных функциональных группировок на гидрофобной (C_8 или C_{18}) стационарной фазе колонки [6], имеет очень широкие возможности для одновременного разделения всего спектра пуриновых и пиримидиновых производных. В некоторых работах [6, 12] была решена задача одновременного разделения нуклеозидов, дезокси-нуклеозидов и их

монофосфатов этим методом, однако применяемые условия хроматографического разделения не позволили определить ди- и трифосфаты нуклеозидов.

Цель настоящей работы — подбор и оптимизация условий для одновременного разделения на обращенно-фазной ион-парной хроматографической системе рибонуклеотидов, нуклеозидов и азотистых оснований путем их градиентного элюирования, а также демонстрация возможностей разработанного метода на примерах анализа кислоторастворимых фракций венозной крови человека и тимуса мышей.

Методика

Работу проводили на хроматографической системе «Waters» (США), включающей в себя адсорбционный детектор М 441 ($\lambda=254$ нм), спектрофотометрический детектор М 480 ($\lambda=280$ нм), насосы моделей М 45 и М 510, градиентное устройство М 660, инжектор U6K и двухканальный самонисец — электронный интегратор «Date Module 730».

Разделение проводили на системе с радиальным уплотнением «Z-Module» на пластиковых колонках «NovaPak C_{18} » («Waters») с размером частиц 5 мкм. Длина колонки 10 см, диаметр 8 мм.

В исследовании использовали соль $NH_4H_2PO_4$ («Prolabo», Франция). Ацетонитрил марки х. ч. (Союзреактив) для приготовления элюента очищали кипячением (3—5 ч) с обратным холодильником при добавлении перманганата калия (10 г/л) с последующей перегонкой. Достигаемая в результате степени очистки при $D_{254}=0,05-0,10$.

В качестве противоиона использовали тетрабутиламонийфосфат (ТБАФ) торговой марки «PISA» (Waters, США).

Подвижную фазу готовили на бидистиллированной воде, пропущенной через патрон с активированным углем в системе «NORGANIC» («Waters», США). Готовый буферный раствор перед использованием пропускали через фильтр G1 0,45 мкм («Waters») и дегазировали в стеклянной колбе под вакуумом в течение 20 мин.

В работе использовали стандартные рибонуклеотиды, нуклеозиды и азотистые основания

(Sigma), США и «Reanal», Венгрия). Стандарты для калибровки готовили аналогично биологическим образцам. Калибровку хроматографической системы проводили по методу внешнего стандарта. В хроматограммах биологических образцов пики идентифицировали по времени удерживания и отношению поглощения $\Lambda_{254}/\Lambda_{280}$.

Получение кислоторастворимой фракции. Наиболее распространенным и удобным способом извлечения кислоторастворимых продуктов из тканевых гомогенатов является метод экстракции хлорной кислотой с последующим осаждением хлората калия раствором КОН [13], причем концентрация, объем и кратность обработки кислотой варьируют у разных авторов в широких пределах.

В нашей работе исследуемые органы животных извлекали, погружали в фарфоровую ступку с жидким азотом, затем взвешивали и пестиком измельчали до порошкообразного состояния. Гомогенат ткани получали в гомогенизаторе Поттера с 10-кратным объемом (по отношению к навеске) 1 н. HClO_4 . Полученный гомогенат центрифугировали 10 мин при 6000 об/мин в центрифуге К-23 (ГДР). Надосадок нейтрализовали конц. раствором КОН до pH 7,0 и выдерживали в течение 1 сут при 4°C. [1], после чего осадок отделяли коротким центрифугированием, а надосадочную жидкость хранили при -45°C.

Кровь здоровых доноров и больных с инфарктом миокарда брали из локтевой вены в предварительно охлажденные пробирки с цитратом натрия и обрабатывали 5-кратным объемом 1 н. HClO_4 . Дальнейшее центрифугирование, нейтрализацию и хранение кислоторастворимых фракций венозной крови осуществляли, как описано для тканевых гомогенатов.

Результаты и обсуждение

Эффект одновременного разделения заряженных и нейтральных соединений достигается при частичной модификации гидрофобной стационарной фазы колонки группировками, несущими заряд и способными к ионообменному взаимодействию. Степень модификации стационарной фазы таким образом будет существенным фактором относительной степени удерживания нейтральных и заряженных соединений.

Добавление противоиона (ТБАФ) в элюирующий раствор приводит к адсорбции молекул противоиона на C_{18} — фазе колонки в результате гидрофобных взаимодействий, описываемых уравнением, приведенным в работе [6]:

$$C_s = \alpha \cdot C_m^\beta,$$

где C_s и C_m — концентрация ТБАФ соответственно в стационарной и подвижной фазах; α , β — коэффициенты, определяемые данным соотношением

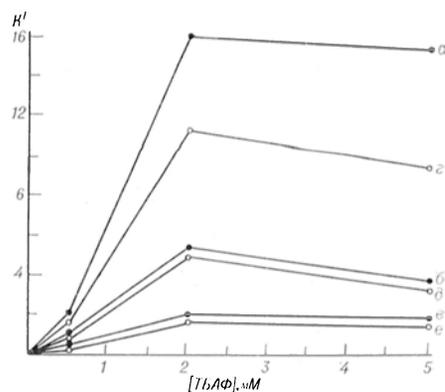


Рис. 1. Зависимость k' адениновых и гуаниновых нуклеотидов от концентрации ион-парного реагента (ТБАФ) в подвижной фазе, содержащей 15% ацетонитрила.

а — АТР; б — АДР; в — АМР; г — АМР; д — АМР; е — АМР; з — АМР.

органического растворителя в солевом буфере.

Увеличение содержания органического растворителя в подвижной фазе приводит к усилению степени гидрофобных взаимодействий элюента с полиалкильными «хвостами» адсорбированного в стационарной фазе противоиона и к соответствующему уменьшению его концентрации на насадке колонки, описанному уравнением в работе [6]:

$$\alpha \sim e^{-C},$$

где C — концентрация органического растворителя в подвижной фазе.

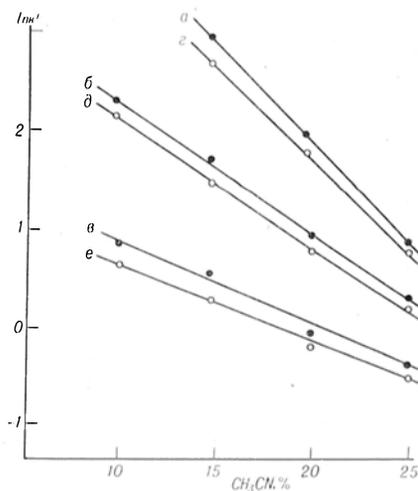


Рис. 2. Зависимость $\ln k'$ цитозинных и уридинных нуклеотидов от процентного содержания ацетонитрила в подвижной фазе при концентрации ион-парного реагента в подвижной фазе 0,002 М.

а — УТР; б — УДР; в — УДР; г — УДР; д — УДР; е — УДР.

Варьирование концентрации противоиона и органического растворителя подвижной фазы дает возможность выявить закономерности удерживания рибонуклеотидов, нуклеозидов и азотистых оснований на колонке с обращенной фазой C_{18} . С этой целью были проведены исследования времени удерживания пуриновых и пиримидиновых рибонуклеотидов в зависимости от содержания противоиона (ион-парного реагента) — ТБАФ и концентрации ацетонитрила (CH_3CN) в подвижной фазе, результаты которых представлены на рис. 1 и 2. Отмечается значительное повышение коэффициента удерживания (k') пуриновых рибонуклеотидов при концентрации ТБАФ в подвижной фазе от 0 до 2 мМ и вы-

ход на плато при дальнейшем увеличении концентрации ТБАФ до 5 мМ (см. рис. 1).

Аналогичная картина наблюдается для пиримидиновых рибонуклеотидов, а также при изменении процента ацетонитрила в элюенте. Увеличение процентного содержания ацетонитрила в подвижной фазе приводит к пропорциональному уменьшению $\ln k'$ пиримидиновых нуклеотидов (см. рис. 2).

Анализ изменений k' моно-, ди- и трифосфатов рибонуклеозидов в исследуемых диапазонах значений ТБАФ и процентного содержания CH_3CN (0—5,0 мМ и 10—25 % соответственно) позволили сделать следующие выводы: 1) наибольшее время удерживания рибонуклеотидов наблюдается при кон-

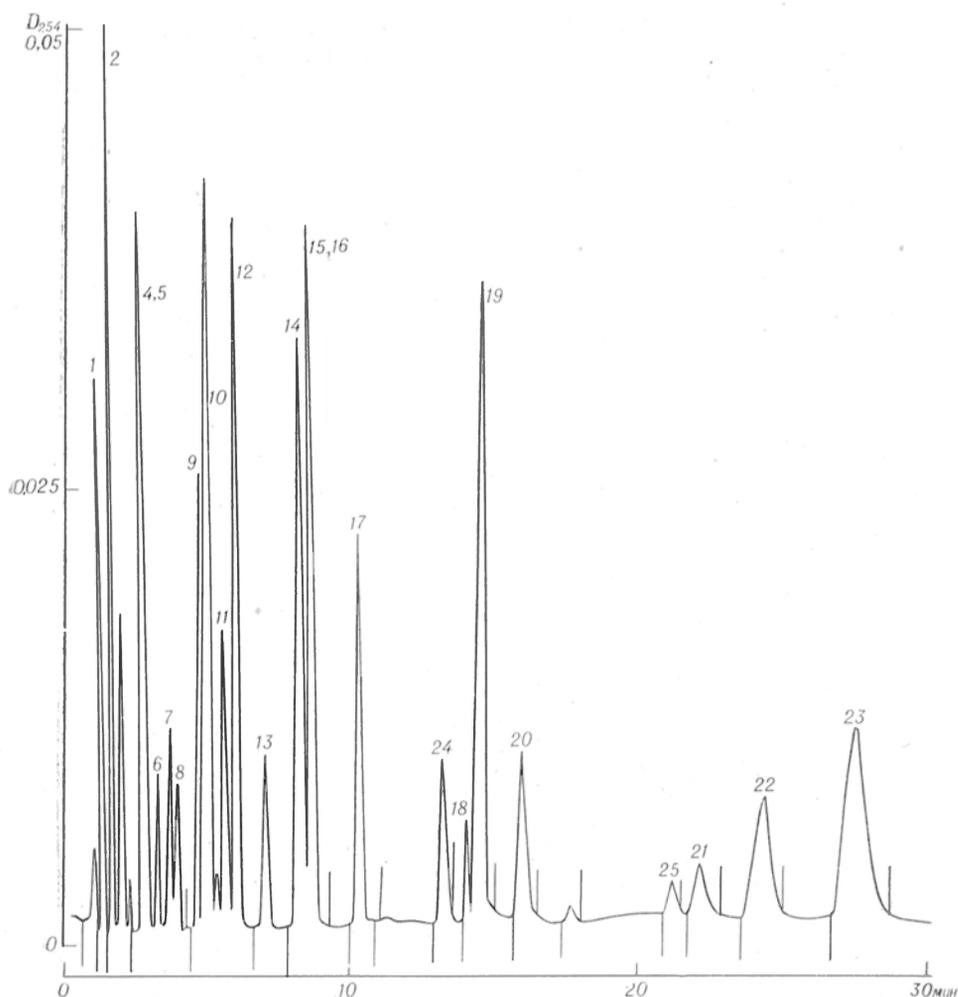


Рис. 3. Хроматографическое разделение искусственной смеси азотистых оснований, нуклеозидов и нуклеотидов.

Здесь и на рис. 4 и 5: 1 — Cyt, 2 — Ura, 3 — Cyt, 4 — Gua, 5 — Hyp, 6 — Xan, 7 — Thm, 8 — Urd, 9 — Ade, 10 — Ino, 11 — Uric A, 12 — dThd, 13 — Ado, 14 — UMP, 15 — GMP, 16 — IMP, 17 — AMP, 18 — GDP, 19 — UDP, 20 — ADP, 21 — GTP, 22 — UTP, 23 — ATP, 24 — CDP, 25 — CTP. Условия разделения см. в тексте.

центрации ТБАФ в подвижной фазе 2,0 мМ; 2) порядок выхода рибонуклеотидов (степень их удерживания) определяется числом фосфатных группировок, что может косвенно свидетельствовать об анионообменном механизме их удерживания; 3) использование изократического режима разделения (постоянное процентное содержание ацетонитрила в подвижной фазе) не позволяет одновременно разделить моно-, ди- и трифосфаты нуклеотидов: при низкой концентрации ацетонитрила (10 %) не вымываются трифосфаты, при более высокой (20—25 %) — не разделяются моно- и дифосфаты рибонуклеозидов. Кроме того, использование изократических условий элюирования при содержании ацетонитрила более 10 % в подвижной фазе не обеспечивает удовлетворительного разделения нуклеозидов и азотистых оснований.

Таким образом, на основании анализа полученных результатов были выявлены оптимальные условия для одновременного градиентного элюирования рибонуклеотидов, нуклеозидов и оснований на обращенно-фазной ион-парной системе C_{18} (рис. 3): раствор А — 10 мМ $NH_4H_2PO_4$, 2 мМ ТБАФ рН 7,0; раствор Б — 15 % CH_3CN + 85 % раствор А. Градиент 0—100 % раствор Б, 10 мин, далее изократический режим в течение 15 мин, уравнивание раствором А в течение 10 мин.

Необходимо отметить, что время уравнивания колонки начальным буфером можно использовать для тонкой регулировки времен удерживания и селективности разделения азотистых оснований, нуклеозидов и их монофосфатов. Увеличение времени уравнивания колонки приводит к возрастанию концентрации противоиона на

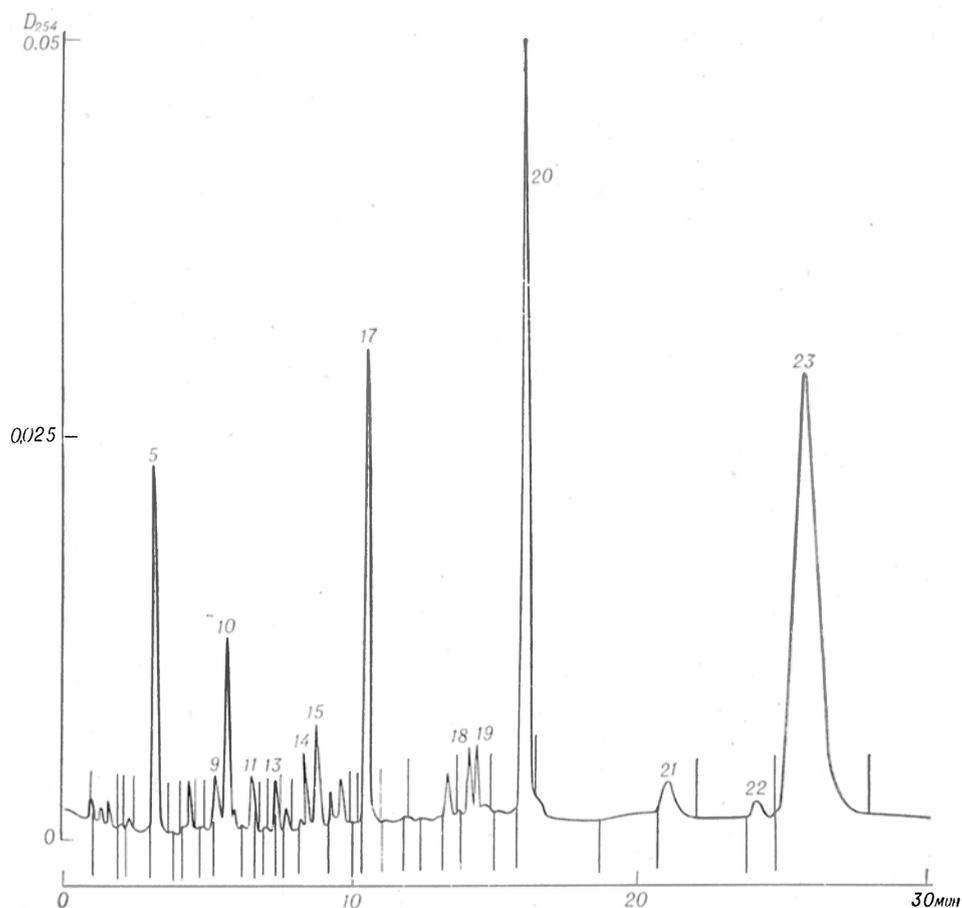
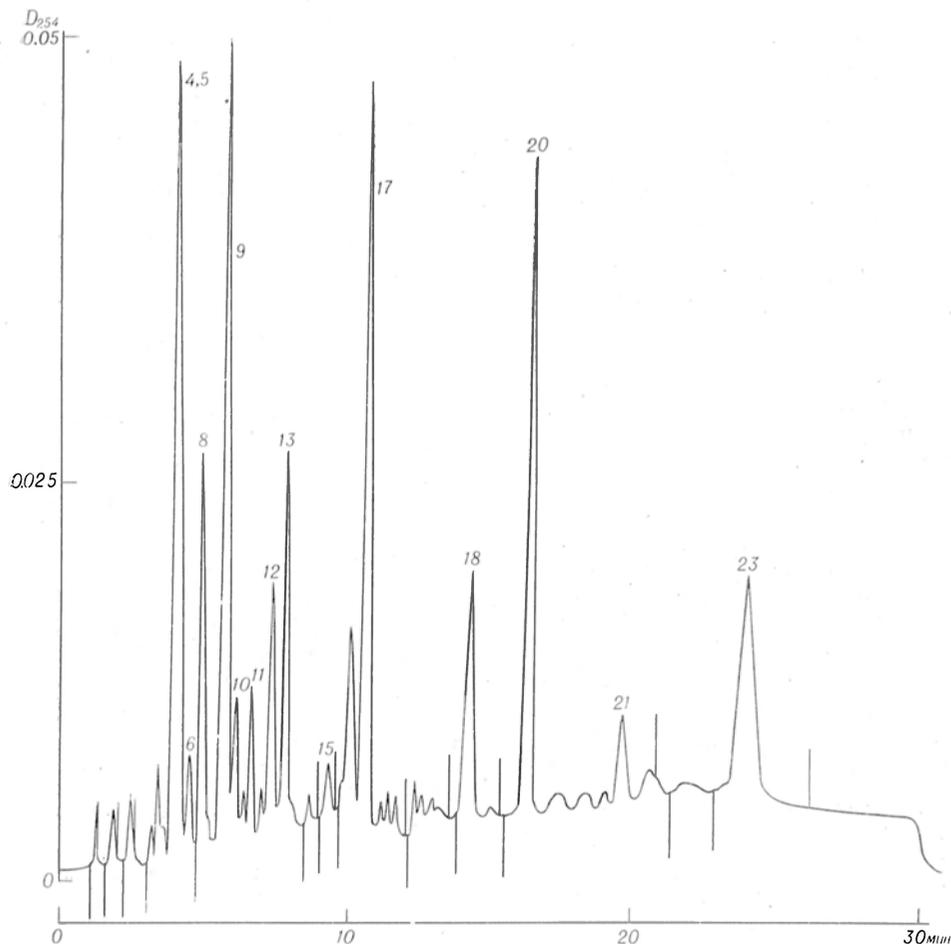


Рис. 4. Хроматограмма кислоторастворимой фракции венозной крови больного с трансмуральным инфарктом миокарда.



Содержание пуриновых и пиримидиновых производных в венозной крови (в мкмоль на 10 мл) здоровых доноров и больных с трансмуральным инфарктом миокарда ($M \pm m$)

| Соединение | Здоровые лица | Больные ТМИМ |
|------------|---------------|--------------|
| ATP | 45,5±4,8 | 37,0±5,2 |
| ADP | 17,3±2,3 | 30,1±3,9 |
| AMP | 3,2±0,6 | 9,5±2,3 |
| Ado | 0,72±0,02 | 0,31±0,01 |
| Ade | 0,41±0,01 | 0,35±0,04 |
| GTP | 1,37±0,21 | 1,04±0,32 |
| GDP | 0,62±0,09 | 0,93±0,12 |
| GMP | 0,26±0,03 | 0,42±0,06 |
| IMP | 0,61±0,07 | 0,91±0,10 |
| Ino | 0,17±0,02 | 0,68±0,09 |
| Hyp | 0,04±0,01 | 3,24±0,43 |
| Xan | 0,14±0,02 | 0,17±0,04 |
| Uric A | 3,38±0,05 | 7,75±0,76 |
| UTP | 0,57±0,11 | 0,14±0,03 |
| UDP | 0,02±0,01 | 1,28±0,15 |
| UMP | 1,76±0,03 | 1,42±0,23 |
| Urd | 0,24±0,06 | 0,28±0,05 |
| Ura | 0,03±0,01 | 0,06±0,02 |
| Cyd | 0,89±0,12 | 0,19±0,03 |
| Cvt | 0,03±0,01 | 0,37±0,06 |
| dThd | 0 | 0,31±0,04 |
| Thm | 0 | 0,12±0,03 |

Рис. 5. Хроматограмма кислоторастворимой фракции тимуса мышей СЗНА.

стационарной фазе, что по-разному сказывается на удерживании монофосфатов, с одной стороны, и нуклеозидов и азотистых оснований, с другой. На времена удерживания ди- и трифосфатов условия уравнивания колонки влияют в значительно меньшей степени.

Разработанная методика была использована для анализа состава кислоторастворимых фракций венозной крови доноров и больных с трансмуральным инфарктом миокарда при их поступлении в клинику кафедры внутренних болезней № 4 II ММИ. Полученные результаты приведены на рис. 4 и в таблице.

Обращает на себя внимание появление в крови больных тимина (dThm) и тимидина (dThd). В метаболизме пуриновых соединений наблюдаются резкие изменения: дефосфорилирова-

ние адениновых и гуаниновых нуклеотидов с одновременным накоплением инозина (Ино), гипоксантина (Нур) и конечного продукта обмена пуринов — мочевой кислоты (Uric A).

На рис. 5 в качестве примера применения данного метода разделения приведена хроматограмма кислоторастворимой фракции тимуса мышей (линия СЗНА).

Таким образом, предложенный метод одновременного хроматографического разделения пуриновых и пиримидиновых соединений позволяет проводить изучение формирования их пулов в органах и тканях при экспериментальной и клинической патологии.

ЛИТЕВАТУРА

1. Блохин Д. Ю., Потешных А. В. // Биорган. химия. — 1983. — Т. 9. — С. 673—677.
2. Вульфсон А. И., Якимов С. А. // Там же. — С. 365—374.
3. Корбух И. А., Стукалов Ю. В., Зимакова Н. И., Преображенская М. Н. // Там же. — С. 1644—1649.
4. Anderson F. S., Murphy R. S. // J. Chromatogr. — 1976. — Vol. 121. — P. 251—259.
5. Assenza R. S., Brown P. R. // J. Liquid Chromatogr. — 1980. — Vol. 3. — P. 41—48.
6. Caronia T. P., Crawther I. B., Hartwick R. A. // Ibid. — 1983. — Vol. 6. — P. 1673—1691.
7. Darwish A. A., Prichard R. G. // Ibid. — 1981. — Vol. 4. — P. 1511—1524.
8. Krstulovic A. M., Brown P. R., Rosie D. M. // Analyt. Chem. — 1977. — Vol. 49. — P. 2237—2247.

9. Harmsen E., de Jong I. W., Serruys P. W. // Clin. chim. Acta. — 1981. — Vol. 115. — P. 73—84.
10. Haupt W., Pinogoud A. // J. Chromatogr. — 1983. — Vol. 260. — P. 419—428.
11. Ingerbretsen O. C., Bakken A. M., Segatal I., Farstad M. // Ibid. — 1982. — Vol. 242. — P. 119—126.
12. Perrone A. P., Brown P. R. // Ibid. — 1984. — Vol. 307. — P. 53—58.
13. Riss T. L., Zorich N. L., Williams M. D., Richardson A. // J. Liquid Chromatogr. — 1980. — Vol. 3. — P. 133—158.
14. Zakaria M., Brown P. R., Grushka E. // Advances in Chromatography. / Ed. A. Zlatkis. — 1981. — P. 451—474.

Поступила 19.12.85

DETERMINATION OF PURINE AND PYRIMIDINE DERIVATIVES IN ACID SOLUBLE FRACTION OF TISSUES BY REVERSE-PHASE ION-PAIR HPLC

R. T. Toguzov, Yu. V. Tikhonov, A. M. Pimenov, T. E. Novikova, I. S. Meisner

Chair of Biochemistry, Central Research Laboratory, N. I. Pirogov II Medical School, Moscow

Simultaneous separation of the main ribonucleotides, nucleosides and bases was carried out using tetrabutyl ammonium phosphate (TBA) hexaerons with a reversed-phase (C₁₈) packing material. Chromatographic properties of purine and pyrimidine metabolites in radially compressed NovaPak C₁₈ system was studied at various concentrations of acetonitrile and TBA in the mobile phase. The optimal conditions for gradient separation of nucleotides, nucleosides and bases were evaluated. The procedure was used for analysis of blood from healthy persons and patients with acute myocardial infarction.

УДК 616.153.1:577.152.2731-074:543.257.1

Л. В. Белоусова, С. Н. Федосов, Е. Л. Москвитина, Л. П. Гринио,
В. С. Рафанов

ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ КРЕАТИНКИНАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Кафедра биохимии МГУ, Институт общей патологии и патологической физиологии АМН СССР, Москва

Повышение активности сывороточной креатинкиназы (КФ 2.7.3.2) регистрируется значительно часто при ряде патологических состояний, таких, как наследственные мышечные дистрофии, гетерозиготное носительство патологического гена X-сцепленных мышечных дистрофий, полимиозит, инфаркт миокарда, хронический алкоголизм, отравление спотворными [3, 9], в силу чего является важным параклиническим показателем при дифференциальной диагностике этих заболеваний.

Методы определения активности фермента основаны на регистрации изменения концентрации участников катализируемой реакции $\text{АДФ}^{3-} + \text{креатинфосфат}^{2-} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{АТФ}^{4-} +$

$+$ креатин. В клинической биохимии для определения активности креатинкиназы в настоящее время используют в основном два метода — спектрофотометрический [6, 9, 15, 16] и колориметрический [3, 4, 8, 9].

В нашей работе использовали рН-метрический метод определения активности этого фермента. Принцип рН-метрического метода был впервые описан в 1962 г. [13]. Метод основан на том, что при щелочных значениях рН реакция АТФ с креатином сопровождается выделением H^+ . При исследовании обратной реакции — взаимодействия АДФ с креатинфосфатом — наблюдается поглощение H^+ .

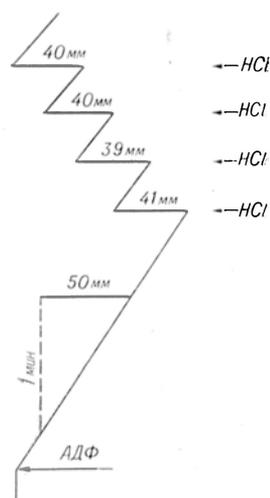
Методика

В используемой нами методике скорость креатинкиназной реакции измеряли по поглощению H^+ , регистрируя изменение рН среды при помощи рН-метра (рН-262) с регистрирующим потенциометром КСП-4, что позволяет определять начальную скорость реакции и проследивать ее кинетику. Этот метод прост, удобен в обращении, имеет высокую точность, не требует дополнительных реактивов, необходимых для спектрофотометрического метода, не нуждается в контроле на аденилаткиназную активность, так как последняя не сопровождается выделением или поглощением протона.

Использованная нами установка широко применяется для измерения активности многих ферментов, катализирующих реакции с поглощением или выделением H^+ : АТФазы ретикулума [2], АТФазы митохондрий [1], креатинкиназы митохондрий [6] и сыворотки [7].

В данной работе активность креатинкиназы в сыворотке крови определяли в термостатированной кювете при $30^\circ C$ в реакционной среде объемом 4 мл следующего состава: 10 мМ трис-НСI, рН 7,4, 10 мМ КСI, 10 мМ креатинфосфат, 3 мМ Mg $(CH_3COO)_2$, 1 мМ дитиотреитол. Все растворы, необходимые для составления реакционной среды, могут храниться в замороженном состоянии в течение 3—4 нед. В реакционную среду добавляли 0,05—0,2 мл сыворотки (в зависимости от активности в ней фермента), содержащей 1 мМ дитиотреитола, выдерживали 1—2 мин и затем начинали реакцию добавлением АДФ (конечная концентрация 1 мМ). Скорость реакции записывали в течение 1—5 мин, затем пробы титровали, добавляя в среду несколько раз по 20 мкл 0,01 н. НСI. Добавление НСI в среду необходимо производить при постоянной скорости реакции (см. рисунок) или после полного завершения последней, так как изменение скорости реакции в процессе титрования будет приводить к ошибке в определении титра НСI.

Ниже дан пример записи (см. рисунок) и расчета активности в конкретной пробе.



Пример записи хода реакции. Стрелками указано добавление АДФ и НСI (по 20 мкл 0,01 н.).

Активность креатинкиназы в сыворотке крови больных миопатией Дюшенна

| Обследуемый | Возраст, годы | Стадия заболевания | Активность креатинкиназы, МЕ/л | |
|-------------|---------------|--------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| | | | индивидуальные показатели | в среднем для данной стадии |
| К. | 3 | I | 2300 | 5550 ± 877 |
| Ф. | 3 | | 6500 | |
| С. | 3 | | 4800 | |
| Ш. | 4 | | 7400 | |
| Ф. | 5 | | 6600 | |
| Х. | 5 | II | 2900 | 2667 ± 348 |
| Б. | 6 | | 2000 | |
| В. | 6 | | 2900 | |
| Л. | 6 | | 1900 | |
| Т. | 6 | | 1500 | |
| П. | 6 | | 2500 | |
| Б. | 6 | | 1000 | |
| К.* | 6 | | 1000 | |
| Р.* | 7 | | 5000 | |
| Д.* | 7 | | 5500 | |
| Г.* | 7 | | 4600 | |
| З. | 7 | | 700 | |
| Е. | 7 | | 3600 | |
| А. | 7 | | 3300 | |
| М. | 7 | | 590 | |
| Ц.* | 8 | 6200 | | |
| П. | 8 | 2700 | | |
| Ш. | 8 | 800 | | |
| Х.* | 9 | 5600 | | |
| Л. | 9 | 1700 | | |
| Б. | 9 | 1200 | | |
| В. | 10 | 2850 | | |
| Л. | 10 | 1000 | | |
| М. | 11 | 800 | | |
| Б. | 10 | III | 550 | 525 ± 53 |
| Е. | 10 | | 380 | |
| С. | 11 | | 450 | |
| Ш. | 11 | | 500 | |
| К. | 13 | | 400 | |
| М. | 15 | | 750 | |

* Лица, у которых активность креатинкиназы выше, чем у остальных с этой стадией заболевания.

$$\begin{aligned} \text{Активность} &= \frac{50 \text{ мм/мин} \cdot 20 \cdot 10^{-2} \text{ мкг-экв } H^+}{0,2 \text{ мл} \cdot 40 \text{ мм}} = \\ &= 1,25 \frac{\text{мкг-экв } H^+}{\text{мин} \cdot \text{мл}} = 1250 \frac{\text{мкг-экв } H^+}{\text{мин} \cdot \text{л}} \end{aligned}$$

где 50 мм/мин — отклонение пера самописца во время протекания каталитической реакции за 1 мин на начальном линейном участке кинетической кривой; 0,2 мл — объем добавленной сыворотки; 40 мм — среднее отклонение пера самописца при добавлении 20 мкл 0,01 н. НСI.

Результаты специально поставленных экспериментов показали, что поглощение 1 мкг-экв H^+ сопровождается вовлечением в реакцию 1 мкмольа АДФ. Следовательно, активность может выражаться в микромолях АДФ на 1 л в 1 мин, что соответствует 1 международной единице на 1 л. При определении активности

потенциометрическим методом стандартное отклонение результатов при высокой активности фермента в сыворотке составляет 3—10 %. При низкой активности ошибка возрастает до 10—15 %.

Результат и обсуждение

Описанная методика была использована для определения активности креатинкиназы в сыворотке крови у больных с миопатией Дюшенна, у здоровых детей того же возраста, а также у матерей — носителей патологического гена. Как показывают данные таблицы, прогрессирование заболевания от I к III стадии сопровождается снижением активности креатинкиназы, что соответствует литературным данным [3, 10, 14]. Мы выделили 5 человек (отмечены в таблице звездочкой) с заболеванием II стадии, у которых активность креатинкиназы была существенно выше, чем у большинства больных с этой стадией заболевания; средний показатель для этой группы (5550 ± 88) оказался равным средней активности креатинкиназы больных I стадии. При динамическом наблюдении нам удалось отметить сравнительно более мягкое течение миодистрофического процесса у больных этой группы. Выявленная нами корреляция свидетельствует о возможности прогнозирования скорости прогрессирования заболевания по уровню активности креатинкиназы. У 10 здоровых детей 3—14 лет значения креатинкиназной активности оказались достаточно низкими (63 ± 8 МЕ/л). Они никогда не превышали 100 МЕ/л и никогда не попадали в диапазон колебаний активности этого фермента у больных миопатией. У 15 вероятных носителей патологического гена 28—40 лет повышение активности креатинкиназы выявлялось в 83 % случаев и составляло 271 ± 30 МЕ/л. Полученные нами результаты хорошо сопоставимы с данными авторов, использовавших другие методики [10, 12].

ЛИТЕРАТУРА

1. Акименко В. К., Минков И. Б., Бакеева Л. Е. и др. // Биохимия. — 1972. — Т. 37, № 2. — С. 348—359.
2. Болдырев А. А., Лебедев А. В., Ритов В. Б. // Там же, 1969. — Т. 34, № 1. — С. 119—124.
3. Гейне В., Пленерт В., Рихтер И. Лабораторная диагностика в детском возрасте: Пер. с нем. — М., 1982.
4. Гринио Л. П. // Вопр. мед. химии. — 1964. — № 1. — С. 70—73.
5. Курянов В. В., Елизарова Г. В., Сакс В. А. // Биохимия. — 1981. — Т. 46, № 5. — С. 930—941.
6. Липская Т. Ю., Темпл В. Д., Белоусова Л. В. и др. // Там же. — 1980. — Т. 45, № 7. — С. 1155—1166.
7. Федосов С. Н., Белоусова Л. В., Гринио Л. П. // Всесоюзный симпозиум по медицинской энзимологии: 4-й: Тезисы. — Алмата, 1983. — С. 267.
8. Четверикова Е. П. // Лаб. дело. — 1977. — № 2. — С. 94—97.
9. Bais R., Edwards J. B. // CRC Crit. Rev. clin. Lab. Sci. — 1982. — Vol. 18. — P. 291—335.
10. Barthelmai W., Dikbas G., Wullner S. // Hum. Genet. — 1969. — Vol. 8. — P. 115—133.
11. Dreyfus J. C., Schapira G., Schapira F. // J. clin. Invest. — 1954. — Vol. 33. — P. 794—797.
12. Hanefeld F., Reuter K., Worm A. // European Meeting of Child Neurology. — Sienna, 1985. — P. 125—136.
13. Kuby S., Nollman E. // The Enzyme / Eds. P. D. Boyer et al. — New York, 1962. — Vol. 6. — P. 515.
14. Munsat T. I., Baloh R., Peason C. M. et al. // J. A. M. A. — 1973. — Vol. 226. — P. 1536—1543.
15. Oliver I. T. // Biochem. J. — 1955. — Vol. 61. — P. 116—122.
16. Rosalki S. B. // J. Lab. clin. Med. — 1967. — Vol. 69. — P. 696—705.

Поступила 29.07.85

НЕКРОЛОГ

УДК 577.1+6+6-008.9-074]:92 Сидоренков

ПАМЯТИ ЗАСЛУЖЕННОГО ДЕЯТЕЛЯ НАУКИ РСФСР ПРОФЕССОРА И. В. СИДОРЕНКОВА

11 ноября 1985 г. ушел из жизни видный ученый, педагог, член КПСС с 1940 г., заслуженный деятель науки РСФСР, доктор биологических наук, профессор Иван Васильевич Сидоренков.

И. В. Сидоренков родился в 1908 г. в крестьянской семье.

В 1931 г. после окончания Смоленского медицинского института он был оставлен на кафедре биохимии в аспирантуре, после кото-

рой работал ассистентом, затем доцентом этой кафедры.

В годы Великой Отечественной войны И. В. Сидоренков служил в санитарно-эпидемиологическом отряде 6-й Гвардейской армии в должности врача-специалиста, а затем начальником этого отряда. За боевые заслуги он был награжден орденами Красной Звезды, Отечественной войны II степени и 3 медалями — «За боевые заслуги», «За оборону Сталинграда», «За победу над Германией».

После демобилизации в 1945 г. И. В. Сидоренков становится доцентом, а затем заведующим кафедрой биохимии (с 1948 г.) Оренбургского медицинского института. С 1960 по 1985 г. он заведует кафедрой биохимии Куйбышевского медицинского института им. Д. И. Ульянова.

И. В. Сидоренков был крупным ученым, возглавившим новое направление в изучении биохимии атеросклероза, создавшим свою научную школу, ставшую известной в Советском Союзе и за рубежом. Под его руководством выполнено 6 докторских и 35 кандидатских диссертации. В отечественной и зарубежной печати им опубликовано 120 работ, на кафедре выпущено 5 сборников научных трудов и 4 методических руководства по биохимии, биоорганической химии, физической и коллоидной химии, клинической биохимии.

И. В. Сидоренков был делегатом всех всесоюзных биохимических съездов, членом первой делегации советских биохимиков в США, участвовал в работе конгресса по клинической биохимии в Швеции, был делегатом V Международного биохимического конгресса, Национального биохимического конгресса и I-го Национального съезда в Болгарии, участником многочисленных союзных и международных симпозиумов.

В 1964 г. им было организовано Куйбышевское отделение Всесоюзного биохимического общества, бессменным председателем которого являлся Иван Васильевич. Под руководством И. В. Сидоренкова на кафедре проводилась большая работа по подготовке квалифицированных кадров преподавателей. Ученики Ивана Васильевича, бывшие его аспиранты, успешно работают в Уфе, г. Устинове, Ульяновске, Оренбурге, Воронеже, Благовещенске и других городах.

Наряду с педагогической и научной работой И. В. Сидоренков выполнял и большую административную работу. Он был проректором и ректором сначала Оренбургского, а затем Куйбышевского медицинских институтов. Им вложено много сил и труда для улучшения учебной, научной, идейно-воспитательной работы в возглавляемых институтах.

Многообразна и общественная деятельность И. В. Сидоренкова. Он неоднократно избирался членом бюро райкома КПСС, председателем областного комитета защиты мира, группы по распространению политических и научных знаний, членом парткома института.

Труд И. В. Сидоренкова отмечен высокими правительственными наградами — орденами Трудового Красного Знамени, «Знак Почета», Октябрьской Революции. Ему присвоено почетное звание заслуженного деятеля науки РСФСР.

И. В. Сидоренков щедро отдавал свои знания ученого, талант организатора и мудрость учителя воспитанию и подготовке молодых специалистов.

Иван Васильевич работал до последнего дня, жил заботами кафедры. Он был мудрым, добрым и мужественным человеком. Таким он сохранится навсегда в памяти его сотрудников, соратников и учеников.

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

- | | | |
|---|----|--|
| <i>Черныдыева И. Ф., Титов В. Н.</i> Апопротеины эфферентного транспорта холестерина в крови (обзор) | 2 | <i>Chernyadyeva, I. F., Titov, V. N.</i> Apoproteins mediating efferent cholesterol transport in the circulation |
| <i>Меграбян З. Б., Налбандян Р. М.</i> Медьсодержащие аминоксидазы кровеносных сосудов (Обзор) | 13 | <i>Megrabyan, Z. B., Nalbandyan, R. M.</i> Copper-containing amine oxidase of blood vessels |
| <i>Кульчицкий О. К.</i> Влияние гепатэктомии на аденилатциклазную систему печени крыс разного возраста | 19 | <i>Kulchitsky, O. K.</i> Effect of hepatectomy on the adenylate cyclase system in rats of different age |
| <i>Мхитарян Л. С.</i> Ионтранспортная система и некоторые компоненты структуры сарколеммы в условиях острой ишемии миокарда | 21 | <i>Mkhitarian, L. S.</i> The system of ion transport and some components of the sarcolemma structure in acute ischemia of myocardium |
| <i>Якушев В. С., Миронова Е. В., Курипка В. И.</i> Баланс кальция при некрозе миокарда и значении стресса в его нарушении | 25 | <i>Yakushev, V. S., Mironova, E. V., Kuripka, V. I.</i> Balance of calcium in myocardium necrosis and role of stress in the balance deterioration |
| <i>Подосинников И. С., Зозулякова С. В., Чухловина М. Л., Полушкина Л. И., Залкинд Л. Г.</i> Влияние тимэктомии на активность ключевых ферментов глюконеогенеза в печени крыс | 29 | <i>Podosinnikov, I. S., Zozulyakova, S. V., Chukhlovina, M. L., Polushkina, L. I., Zalkind, L. G.</i> Effect of thymectomy on activity of key enzymes of gluconeogenesis in rat liver tissue |
| <i>Крауцелис К. И., Дещирус А. П., Улинскайте А. П.</i> Анализ взаимодействия глюко- | | <i>Kraujelis, K. I., Desrius, A. P., Ulinskaitė, A. P.</i> Analysis of glucocorticoid/receptor |

- кортикоидов с рецепторами клеток печени крыс при росте карциносаркомы Уокера
 Жмуров В. А., Крылов В. И., Петрушина А. Д. Влияние антиоксидантов и мисклерона на процессы дестабилизации клеточных мембран при нефритах у детей
 Зарембский Р. А., Беляков Н. А., Шершнева Л. К., Оболенский С. В. Состояние калликреин-кининовой системы крови при острых легочных повреждениях
 Голиков П. П., Давыдов Б. В., Матвеев С. Б. Механизмы активации перекисного окисления липидов и мобилизации эндогенного антиоксиданта α -токоферола при стрессе
 Сумароков Д. Д. Влияние кислотной экстракции на остеоиндуктивную активность костной ткани
 Басис В. Ю., Бумялис В.-А. В., Котова Т. С. Очистка α -1-ингибитора протеаз человека и получение антисыворотки, пригодной для его иммунохимического определения
 Маслов Л. Н. Нарушение энергетического метаболизма мозга при экспериментальном внутримозговом кровоизлиянии
 Плотникова Е. К., Головенко Н. Я., Зинковский В. Г., Лукьяненко Н. Г., Жук О. В., Басок С. С. Транспорт и метаболизм мембраноактивного комплексона в организме мышей
 Ягодина Г. А., Юртов Е. В., Гусева Т. В. Извлечение компонентов липопротеидов эмульсиями
 Опарин Д. А., Зиматкина Т. И., Островский Ю. М. Преимущества окситиаминбромиды как специфического ингибитора активности тиаминзависимых ферментов
 Тишенина Р. С. Содержание соединений, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой, в плазме крови здоровых людей и больных некоторыми эндокринопатиями
 Сэне Т. П., Алев К. П., Пэхме А. Я. Влияние повышенной функциональной активности скелетных мышц на скорость обновления тяжелых и легких цепей миозина
 Десятниченко К. С., Балдин Ю. П., Шрейнер А. А., Бакхлыков Ю. Н., Изотова С. П. Влияние высокомолекулярной фракции неколлагенового белка костной ткани на остеогенез и кроветворение при удлинении конечности в эксперименте
 Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Вотьяков В. И. Влияние органических растворителей на инициируемый стрептокиназой фибринолиз
 Дмитриев А. Д., Теннов А. В., Цуцук-овская М. Я., Беляев Б. С., Кизим Е. А., Дмитриева О. Ф. Радиоиммунологическое определение содержания α - и γ -эндорфинов в плазме крови здоровых доноров и больных эндогенными депрессиями
 Никифоровская Л. Ф., Иванова Л. Н. Гликозаминогликаны и гликогидролазы в почке крыс с наследственным несахарным диабетом
 Котловский Ю. В., Гуткина Н. И., Гуляева Л. М., Довгий А. И., Андрианов Н. В., Мишин В. М., Иванов В. В. Влияние акрилатов на содержание и изоформный состав цитохрома P-450 микросом печени крыс
- interactions in rat liver tissue during growth of Walker carcinosarcoma
 Zhmurov, V. A., Krylov, V. I., Petrushina, A. D. Effect of antioxidants and miscaleron on destabilization of cell membranes in children nephrites
 Zarembsky, R. A., Belyakov, N. A., Shershneva, L. K., Obolensky, S. V. State of blood kallikrein-kinin system in acute lung impairments
 Golikov, P. P., Davydov, B. V., Matveev, S. B. Mechanisms involved in activation of lipid peroxidation and mobilization of endogenous antioxidant α -tocopherol in stress
 Sumarokov, D. D. Effect of acid extraction on osteoinductive activity of bone tissue
 Basis, V. Yu., Bumyalis, A. V., Kotova, T. S. Purification of human α -1-inhibitor of proteases and production of antiserum for the protein immunochemical estimation
 Maslov, L. N. Impairment of brain energy metabolism in experimental intracerebral hemorrhage
 Plotnikova, E. K., Golovenko, N. Ya., Zin'kovsky, V. G., Luk'yanenko, N. G., Zhuk, O. V., Basok, S. S. Transport and metabolism of membrane active complexon in mice
 Yagodin, G. A., Yurtov, E. V., Guseva, T. V. Extraction of lipid components by means of emulsions
 Oparin, D. A., Zimatkina, T. I., Ostrovsky, Yu. M. Advantages of hydroxythiamin bromide as a specific inhibitor of thiamin-dependent enzymes
 Tishenina, R. S. Content of substances reacting with 2-thiobarbituric acid in blood plasma of healthy persons and of the patients with some endocrinopathies
 Seene, T. P., Alev, K. P., Pekhme, A. I. Effect of an augmented functional activity of skeletal muscles on the turnover rate of heavy and light chains of myosin
 Desyatnichenko, K. S., Baldin, Yu. P., Shreiner, A. A., Bakhtlykov, Yu. N., Izotova, S. P. Effect of high molecular fraction of non-collagenous protein from bone tissue on osteogenesis and hemopoiesis during experimental crus elongation
 Nikandrov, V. N., Ryzhova, N. S., Voltyakov, V. I. Effect of organic solvents on the streptokinase initiated fibrinolysis
 Dmitriev, A. D., Tennov, A. V., Tsutsul'kovskaya, M. Ya., Belyaev, B. S., Kizim, E. A., Dmitrieva, O. F. Radioimmunological procedure for estimation of α - and γ -endorphins in blood plasma of healthy donors and of patients with endogenous depression
 Nikiiforovskaya, L. F., Ivanova, L. N. Glycosaminoglycans and glycanohydrolases in kidney of rats with hereditary diabetes insipidus
 Kotlovsky, Yu. V., Gutkina, N. I., Gulyaeva, L. M., Dovgy, A. I., Andrianov, N. V., Mishin, V. M., Ivanov, V. V. Effect of acrylates on the content and isozyme spectrum of cytochrome P-450 in rat liver microsomes

- Сергеев И. Н., Блажевич Н. В., Капланский А. С., Швец В. Н., Балаковский М. С., Спиричев В. Б.* Сравнительное изучение влияния 1,25-дигидроксивитамина D₃ и 24,25-дигидроксивитамина D₃ на гомеостаз кальция и состояние костной ткани у крыс при гипокинезии 100
- Левицкий А. П., Козлянина Н. П., Скляр В. Е.* Процессы перекисного окисления липидов и антиоксидантные системы в тканях пародонта кошек 107
- Стан Е. Я., Екимовский А. П.* Пептидный биорегулятор из коровьего κ-казеина 111
- Златопольский А. Д., Зайденберг М. А., Берман А. Е., Мазуров В. И., Карелин А. А.* Фрагментирование фибронектина демаскирует активность, стимулирующую синтез ДНК и РНК в клетках грануляционной ткани *in vitro* 116
- Гаврилов В. Б., Гаврилова А. Р., Мажуль Л. М.* Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой 118
- Архипенко Ю. В., Джапаридзе Л. М., Гуткин Д. В., Рожницкая И. И., Спиричев В. Б.* Сравнительная оценка влияния недостаточности витамина Е на перекисное окисление липидов и транспорт Ca²⁺ в сердечной и скелетной мышцах 122

Методы биохимических исследований

- Березов Т. Т., Лукашева Е. В., Смирнова И. П.* К вопросу об определении активности оксидаз L-аминокислот 127
- Тогузов Р. Т., Тихонов Ю. В., Пименов А. М., Новикова Т. Е., Мейснер И. С.* Определение пуриновых и пиримидиновых производных в составе кислоторастворимых фракций органов и тканей методом высокоэффективной жидкостной обращенно-фазной ион-парной хроматографии 133
- Белюсова Л. В., Федосов С. Н., Москвитина Е. Л., Гринио Л. П., Рафанов В. С.* Потенциометрический метод определения активности креатинкиназы в сыворотке крови 138

Methods of Biochemical Investigations

- Beresov, T. T., Lukasheva, E. V., Smirnova, I. P.* On estimation of L-amino acid oxidases activity 127
- Toguzov, R. T., Tikhonov, Yu. V., Pimenov, A. M., Novikova, T. E., Meisner, I. S.* Determination of purine and pyrimidine derivatives in acid soluble fraction of tissues by reverse-phase ion-pair HPLC 133
- Belousova, L. V., Fedosov, S. N., Moskvitina, E. L., Grinio, L. P., Rafanov, V. S.* Potentiometric procedure for estimation of the creatine kinase activity in blood serum 138

Некролог

Obituary

Техн. редактор *Л. И. Агафонова*

Корректор *Л. Ф. Карасева*

Сдано в набор 26.11.86. Подписано в печать 19.12.86. Формат 70×108^{1/16}. 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. 14,42 Тираж 1596 экз. Цена 1 р. 30 к. Заказ 3322

Ордена Трудового Красного Знамени
Издательство «Медицина», Москва 101838, Петровверигский 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 577.158:616.13-004.6:547.262:611.73-092.9

Физико-химические особенности α -глицерофосфатдегидрогеназы при гиперхолестеринемии, сочетанной с введением этанола. Гильмнирова Ф. Н., Кириллова В. Я.

Глицерофосфатдегидрогеназа (α -глицерол-3-фосфат: НАД-оксидоредуктаза, КФ 1.1.1.8), как известно, занимает ключевую позицию в сопряжении процессов гликолиза, глюконеогенеза, синтеза глицеролипидов. При атеросклерозе наиболее глубокие нарушения происходят в углеводном и липидном обменах. Несмотря на очевидную значимость α -глицерофосфатдегидрогеназы в сопряжении углеводно-липидного метаболизма, до настоящего времени фермент мало изучен. В литературе имеются единичные указания об отклонении функциональной деятельности α -глицерофосфатдегидрогеназы при экспериментальном атеросклерозе.

Глицерофосфатдегидрогеназа из мышечной ткани кроликов была получена путем фракционного осаждения сульфатом аммония. Очистка фермента от низкомолекулярных компонентов и балластных белков осуществлялась общепринятыми способами (перееосаждением сульфатом аммония, центрифугированием, диализом и т. д.). Гомогенность выделенных ферментных препаратов подтверждалась методом аналитического ультрацентрифугирования, а также электрофоретически в полиакриламидном геле.

Проведенные исследования показали, что α -глицерофосфатдегидрогеназа характеризуется при гиперхолестеринемии и этаноловой нагрузке целым рядом особенностей, которые могут быть суммированы следующим образом. На этапах выделения и очистки фермент при патологии отличается от нормы запаздыванием в формировании кристаллов, величиной их, стабильностью и др. Сравнительное изучение ферментов показывает повышение удельной активности при гиперхолестеринемии, снижение при воздействии этанола и нормализацию при совместном введении этанола и холестерина. Активация фермента при гиперхолестеринемии сопровождалась сдвигом оптимума рН в кислую сторону относительно нормы, уменьшением диапазона колебаний температуры, в пределах которой фермент активен. При этаноловой нагрузке фермент более термостабилен, имеет низкую энзиматическую активность, оптимум рН смещен в щелочную сторону. Совместное введение обоих спиртов сопровождается взаимной коррекцией изолированного эффекта на функциональные проявления и физико-химические параметры данного фермента.

Иллюстраций 4. Библиография: 9 названий.

(Рукопись деп. в ВИНТИ 3.10.85, № 6992-В85).

УДК 616.69-008.8-055.1:577.15

Сорбитолдегидрогеназная активность спермы здоровых и страдающих крипторхизмом муж-

чин. Волкова Н. П., Логинов В. А., Мушкамбаров Н. Н., Омельчук И. И., Кирптовский И. Д.

Исследовали активность сорбитолдегидрогеназы (СоДГ) в клетках и семенной плазме 9 здоровых и 18 больных крипторхизмом мужчин. Активность СоДГ обнаружена как в клеточной, так и в жидкой фракции спермы здоровых и больных лиц. Величина активности значительно варьирует в каждой группе обследованных. При этом она не коррелирует с содержанием в сперме сперматозоидов и обнаруживается при олиго- и азооспермии. Вероятно, это связано с тем, что основным источником определяемой активности являются не сперматозоиды, а их предшественники — сперматогенные клетки, также содержащиеся в сперме.

Активность СоДГ в жидкой части спермы коррелирована с активностью фермента в клеточной фракции. Учитывая относительно низкую стабильность сперматогенных клеток, можно предположить, что фермент в семенной плазме оказывается в результате разрушения клеток. В этом случае содержание СоДГ в плазме следует рассматривать как показатель стабильности клеток.

В группе мужчин с крипторхизмом средняя активность СоДГ в клеточной фракции в 1,75 раза ниже, а в семенной плазме несколько выше, чем в группе здоровых лиц. Видимо, это отражает ухудшение состояния, в том числе снижение стабильности, сперматогенных клеток при крипторхизме.

Оперативное низведение семенников, проведенное в раннем возрасте, улучшает показатели СоДГ-теста, хотя превращение сперматогенных клеток в сперматозоиды может оставаться нарушенным. Найдена корреляция между возрастом больного на момент операции (Y) и активностью СоДГ в клеточной фракции спермы через длительный срок после операции (X), выражаемая зависимостью: $Y = 600 \cdot e^{-0,07X}$ ($r = -0,8$).

Содержание тестостерона, пролактина, соматотропного гормона у больных оставалось в пределах нормы, в то время содержание лютеинизирующего гормона и особенно фолликулостимулирующего гормона было существенно повышено. Между активностью СоДГ в сперме больных крипторхизмом и концентрацией гормонов в плазме крови корреляционная связь не обнаружена. По всей видимости, при крипторхизме нарушены как прямое влияние гонадотропинов на сперматогенез, так и обратное влияние семенников на секрецию ФСГ и ЛГ.

Таким образом, по полученным данным, активность СоДГ может служить показателем состояния сперматогенных клеток — предшественников сперматозоидов.

Таблиц 2. Иллюстрация 1. Библиография: 16 названий.

(Рукопись деп. в ВИНТИ 3.10.85, № 6991—В85)