

ТОМ XXXIII

ВЫПУСК 2

МАРТ — АПРЕЛЬ

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. Я. 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 П. Н. (Ленинград)
ПАСХИНА Т. С. (Москва)	ЯСАИТИС А. А. (Вильнюс)

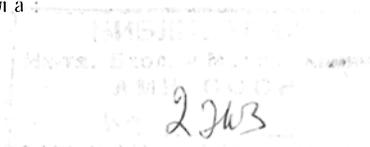
Адрес редакции журнала:

Москва, 109801, Солянка, 14

АМН СССР

Тел. 297-16-44

Зав. редакцией Л. А. Фирсова



Ю. Е. Вельтицев, Э. А. Юрьева, Е. С. Воздвиженская

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ МЕМБРАННЫХ ГЛИЦЕРОФОСФОЛИПИДОВ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Московский НИИ педиатрии и детской хирургии Минздрава РСФСР

Физиологические характеристики и многообразные функции клеточных мембран связаны с их белковыми компонентами, однако множество данных свидетельствует о важной роли, которую играют в обеспечении функций клеток мембранные липидные соединения. Главенствующее положение среди этих соединений занимают фосфолипиды, прежде всего глицерофосфолипиды: фосфатидилэтанолламин, фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол и ряд их производных.

Как структурные компоненты клеточных мембран фосфолипиды определяют их вязкость (текучесть), способность клеток к миграции, фагоцитозу, пиноцитозу и слипанию. В зависимости от строения полярных «головных» групп глицерофосфолипидов изменяется их структурно-функциональное назначение. Изменения жирно-кислотного состава фосфолипидов также влияют на физические свойства мембран: увеличение количества насыщенных жирных кислот резко повышает «жесткость» мембраны, преобладание ненасыщенных жирных кислот ведет к нарастанию текучести.

С фосфолипидами связаны проницаемость мембран для воды и различных молекул, активный транспорт ионов, обеспечиваемый системой мембранных АТФаз. Активность ряда ферментов (цитохромоксидазы, мембранных дегидрогеназ, 5-нуклеотидазы и др.) снижается, если из мембран удаляются фосфолипиды, при добавлении которых она восстанавливается. Фосфолипиды выполняют функции связующего звена между мембранными рецепторами и системой аденилатциклазы [2, 4, 14, 17, 33, 34].

За последние годы предметом специ-

альных исследований стали новые классы фосфолипидов, физиологическое значение которых не совсем ясно. К ним относятся так называемые «длинноцепочечные фосфолипиды» на основе двухатомного спирта — этиленгликоля. Другой класс, привлечший к себе внимание, — так называемые «фосфолипиды», в состав которых вместо ортофосфорной включена фосфоновая кислота. Продукты распада мембранных фосфолипидов оказывают повреждающее воздействие на структуру и функции мембран, а также клеток в целом. Образующиеся соединения обладают значительной биологической активностью, многие из них высокополярны или даже гидрофильны. Отдельные метаболиты фосфолипидов выделены в чистом виде, что позволило установить характер их биологического воздействия, другие остаются малоизученными, однако имеющиеся данные свидетельствуют об актуальности их исследования, особенно при патологии.

Существенные изменения мембранных фосфолипидов обуславливаются такими процессами, как перекисное окисление, N-ацилирование, трансацилирование, действие фосфолипаз.

Продукты перекисного окисления фосфолипидов. Продукты воздействия на фосфолипиды свободных радикалов кислорода, содержащих добавочный электрон, появляются в результате реакций биологического окисления, спонтанных или катализируемых ферментами. Свободные радикалы кислорода (супероксидный анион, перекись водорода, гидроксильный радикал и синглетный кислород) образуются при таких разных условиях, как отравление этиловым спиртом, четыреххлористым углеродом, воздействие ионизирующей радиации, гипоксия. Они обнаружива-

ются в зонах некроза при инфаркте миокарда и в стенках сосудов при атеросклерозе, при эндогенной активации НАДН и НАДФ·Н₂-дегидрогеназы, ксантиноксидазы и т. д. Воспалительные заболевания и активация процессов фагоцитоза сопровождаются накоплением токсических форм кислорода в тканях. Образование перекисей фосфолипидов в мембранах сопровождается нарушением их молекулярной организации. Дезорганизация мембран ведет к снижению их текучести, потере подвижности мигрирующих клеток и гибели клеток. Измененные молекулы фосфолипидов приобретают повышенную гидрофильность за счет появления в их цепях полярных группировок (гидроперекисные, карбонильные, эпоксидные и др.), которые легко взаимодействуют с другими полярными группировками и молекулами воды. Гидрофильность перекисных ассоциатов (кластеров) повышает проницаемость мембран для ионов кальция, натрия, водорастворимых неэлектролитов.

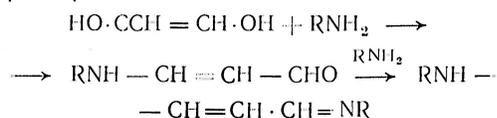
Показано [1, 2, 8, 9], что перекисные реакции ведут к нарушению активного транспорта ионов кальция через клеточные мембраны. Перекиси липидов, синтезирующиеся при воздействии свободных радикалов кислорода на полиненасыщенные жирные кислоты, как на эстерифицированные (в составе фосфолипидов), так и на свободные, освобождаемые под действием фосфолипаз, образуют ряд продуктов, биологическая роль которых находится в стадии изучения: алканы (этан, пентан), алканыли (малоновый диальдегид и другие насыщенные альдегиды), алкеныли (4-гидрокси-ненасыщенные альдегиды). Альдегиды, образующиеся в результате перекисного окисления липидов, подавляют синтез ДНК, некоторые из них (4-гидрокси-пент-2-ен-1-ал) обладают противоопухолевой активностью, как показано в эксперименте на животных. Такие альдегиды, как гидроксипоноеналь, угнетают активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, аденилатциклазы и в очень низких концентрациях блокируют хемотаксис [34].

Содержание малонового диальдегида в пищевых продуктах давно используют в качестве критерия прогоркания. Накопление альдегидов снижает ценность этих продуктов и придает

токсичность, а по данным ряда авторов, также канцерогенность и мутагенные свойства. Ими заинтересовались и медицинские лаборатории в связи с доказательством роли в повреждении клеток и при биологических и патохимических процессах, связанных с перекисным окислением. В результате реакции с первичными аминогруппами альдегиды образуют соединения типа шиффовых оснований:



Ненасыщенные альдегиды в реакциях с аминогруппами образуют энаминали и подвергаются реакции самокомпенсации альдольного типа с образованием связи с белком типа 1-амино-3-иминопропенон, обладающих выраженной флюоресценцией:



Наиболее активно образуются энаминали с аминогруппами глицина, гистидина, триптофана, тирозина и аргинина. Образование шиффовых оснований и эминалией может вести к синтезу биологически инертных веществ, таких, как липофусцин. Вероятно, в этом проявляется своеобразная защитная реакция на локальное образование избытка альдегидов. Кожный пигмент липофусцин является одним из продуктов реакции альдегидов с белками и имеет спектр флюоресценции, аналогичный 1-амино-3-иминопропенонам [26].

В процессах перекисного окисления липидов могут участвовать специфические системы ферментов — циклооксигеназы и липооксигеназы, однако в этом случае речь идет об окислении свободных жирных кислот, освобождающихся при деградации мембранных фосфолипидов.

Если ранее основное внимание было приковано к циклооксигеназному пути метаболизма арахидоновой кислоты, в результате которого образуются простагландины E₂, F_{2α}, D₂, эндоперекиси простагландинов, простаглицлины и тромбоксаны, то в последнее время стал известен другой путь метаболизма арахидоната, катализируемый липооксигеназой [29]. Если простагландины и тромбоксаны играют важную

роль как биорегуляторы, то продукты липоксигеназного метаболизма арахидоновой кислоты и лейкотриены имеют существенное патофизиологическое значение, образуясь в клетках воспаления или клетках-мишенях при атопической аллергии.

Продукты N-ацилирования глицерофосфолипидов. Выявлены условия биосинтеза и получены характеристики биологической активности продуктов N-ацилирования фосфолипидов. Реакции ацилирования катализируются кальцийзависимой трансацилазой, фосфолипазой A₁ или лизофосфолипазой, которые обеспечивают перенос O-ацильных групп в основном или, возможно, исключительно из α-положения фосфатидилэтанолamina (ФТЭА) и фосфатидилхолина на аминогруппу ФТЭА, его плазмалогенового аналога или на соответствующие лизофосфолипиды. Кардиолипин в присутствии ионов кальция также участвует в образовании N-ацилэтаноламинофосфатида (N-ацил-ФТЭА) в качестве основного поставщика линолевой кислоты в реакции N-ацилирования ФТЭА под действием трансацилазы. Из N-ацил-ФТЭА под действием микросомальной фосфодиэстеразы (фосфолипазы D) образуется N-ацилэтаноламин (N-ацил-ЭА). N-ацил-ЭА подвергается последующему гидролизу под действием амидазы, особенно в ткани мозга, до свободной жирной кислоты и этаноламина. N-ацил-ФТЭА совсем не подвергается воздействию фосфолипазы C, а фосфолипаза D гидролизует как N-ацил-ФТЭА, так и его плазмалогеновый аналог, но не действует на ФТЭА или фосфатидилхолин. Небольшие количества N-ацил-ФТЭА найдены в мозге животных, биологическая активность и метаболизм этого соединения исследованы в ткани печени [21]. При воспроизведении инфаркта миокарда у собак путем перевязки коронарной артерии в очаге поражения обнаружены значительные количества N-ацилэтаноламинов (до 590 нмоль на 1 г ткани), N-ацилэтаноламинофосфатидов, N-ацилэтаноламин-лизофосфатидов (4—6 % липидного фосфора). В неповрежденных участках сердца эти липиды не обнаруживались.

Образование N-ацил-ЭА сопровождается снижением содержания ФТЭА в ткани сердца собаки, поврежденного инфарктом. Это явление прогрессиру-

ет в зоне инфаркта в течение 6 нед при одновременном накоплении в ткани лизофосфолипидов. N-ацилирование ФТЭА установлено не только в миокарде при его ишемии, но и в клетках других тканей при их дегенерации (эритроциты быка, гранулированные клетки эпидермиса млекопитающих). Наибольшей биологической активностью обладают N-ацил-ЭА, которые снижают проницаемость внутренних мембран митохондрий сердца, печени, мозга, вызванную высокими концентрациями кальция и (или) кальций-рилизинг-агентами, такими, как оксалацетат, N-этиламин и пальмитил-коэнзим-A. Более высокие концентрации N-ацил-ЭА (120 мкг на 1 г ткани) подавляют энергозависимую аккумуляцию кальция и снижают мембранный потенциал. Действие N-ацил-ЭА на митохондрии указывает на то, что он функционирует как протектор клеток, подвергшихся ишемическому повреждению, и, возможно, как фактор защиты от других повреждающих агентов, которые способствуют резкому повышению содержания ионов кальция в цитоплазме клеток [19]. Кроме того, N-ацил-ЭА дает противовоспалительный эффект [27, 31]. Противовоспалительная активность N-ацил-ЭА в 5—15 раз выше, чем этаноламина или этаноламина, ацилированного по ОН-группе, а метилированные производные этаноламина еще менее эффективны. Эти свойства N-ацил-ЭА подтверждают, что указанные компоненты могут играть важную роль в регуляции метаболизма поврежденных тканей при ишемии и воспалении [28].

Продукты трансацилирования глицерофосфолипидов. Высокоактивным метаболитом фосфолипидов является производное лецитина — так называемый «фактор активации тромбоцитов» (ФАТ). Это быстроразрушаемый липид, синтезируемый базофилами, макрофагами, нейтрофилами, эозинофилами. По структуре ФАТ представляет собой 1-алкил-2-ацетил-sn-глицеро-3-фосфохолин [35]. Ферменты синтеза ФАТ — ацетилтрансфераза, алкилсинтетаза и холинфосфотрансфераза — наиболее активны в легких, селезенке, печени и почках. ФАТ — мощный биологически активный фактор, имеющий широкий спектр биологической активности и действующий в концентрациях 10^{-10} — 10^{-11} М.

Установлено [11], что при инкубации ФАТ с плазмой происходит быстрое (1—1,5 мин) включение его в состав липопротеинов, причем обнаруживается его свойство обмениваться между липопротеинами и тромбоцитами. Кроме того, показано, что липопротеины высокой плотности имеют специфические места связывания ФАТ (апопротеины А-1), существуют также участки неспецифического связывания ФАТ. Связывание ФАТ с липопротеинами низкой плотности имеет неспецифический характер.

Внутривенное введение ФАТ приводит к существенному подавлению реакции эстерификации холестерина, катализируемой лецитин-холестеринацилтрансферазой, поэтому ФАТ может играть важную роль в регуляции обмена холестерина. Первоначально ФАТ рассматривали как фактор агрегации тромбоцитов, но позднее выяснилось, что это соединение способствует агрегации нейтрофилов, моноцитов, а при внутривенном введении кроликам или обезьянам вызывает резкую нейтропению, базофилопению, тромбоцитопению. Связываясь со специфическими рецепторами нейтрофилов, ФАТ стимулирует их миграцию, окислительный метаболизм, образование продуктов липоксигенации арахидоновой кислоты, в частности лейкотриенов [30]. В концентрации 10^{-9} М ФАТ стимулирует мембранный транспорт кальция в тромбоцитах кролика [24]. Блокатор кальциевых каналов верапамил в концентрации 100 или 200 мкг/мл подавляет стимулируемое ФАТ поглощение кальция. Обнаружено стимулирующее влияние на синтез ФАТ иммуноглобулинов класса Е в тучных клетках, в перитонеальных макрофагах, в почках; обсуждается влияние ФАТ и его аналогов на синтез и метаболизм фосфолипидов, освобождение фактора IV и тромбоксана из тромбоцитов [25]. Выяснено сильное влияние ФАТ на систему кровеносных сосудов: его значительная гипотензивная активность, превышающая активность брадикинина, ПГЕ₂ или ПГФ₂ [12]. Полагают, что ФАТ может играть важную роль в регуляции артериального давления [30]. Внутривенное введение ФАТ сопровождается повышением уровня адреналина, норадреналина и тромбоксана В₂ в плазме и увеличением проницаемости сосудов. С патофизиологи-

ческой точки зрения представляют интерес работы, посвященные влиянию ФАТ на гладкую бронхолегочную мускулатуру при бронхиальной астме у человека, его роли при шоковых состояниях и воспалении. ФАТ вызывает сокращение мышц кишечника и бронхов, спазм сосудов почки, коронарных артерий, дизритмию и подавление функций миокарда. ФАТ является одним из медиаторов аллергических реакций, стимулируя реакцию высвобождения вазоактивных аминов [12, 30]. Специфические ингибиторы ФАТ неизвестны, но некоторые его эффекты подавляются нестероидными противовоспалительными средствами, и, если они вводятся в комбинации с антигистаминными и антисеротониновыми препаратами, это ведет к улучшению функции легких [35]. Разрушается ФАТ фосфолипазами А₂ и D и особенно интенсивно ацетилгидролазой [35]. Плазма быстро деацилирует ФАТ с образованием лизо-ФАТ; этот процесс подавляется при низких значениях рН.

ФАТ обнаружен в амниотической жидкости и моче новорожденных. В амниотической жидкости он появляется в начале родов. В этот же период обнаруживается также лизо-ФАТ, и даже в более высокой концентрации. По видимому, ФАТ стимулирует клетки амниона, обеспечивает мобилизацию арахидоната для синтеза простагландинов [16]. Еще многое неизвестно в отношении патофизиологической роли ФАТ, однако уже перечисленные выше свойства показывают, что речь идет о мощном биологическом факторе, действие которого необходимо учитывать при любых экстремальных ситуациях в организме и продолжать поиск ингибиторов его синтеза.

Продукты, образующиеся при действии фосфолипаз. Чрезвычайно токсичные продукты действия фосфолипаз А — лизофосфолипиды — образуются при ферментативном отщеплении от молекулы глицерофосфолипидов одной из двух жирных кислот. Они обладают повышенной растворимостью в водных фазах и оказывают мембранолитическое действие (гемолиз эритроцитов, цитолиз). Лизофосфолипиды образуют рыхлые мицеллярные структуры, что определяет их детергентное воздействие на мембраны: в присутствии ничтожных количеств лизофосфолипидов мембрана становится угол-

ценными, гидратированными, а их проницаемость для различных веществ резко возрастает [23]. При гипоксии в результате накопления лизофосфолипидов набухают мембраны митохондрий, нарушается их функциональная активность, снижаются синтез макроэргических фосфатов и их способность аккумулировать кальций. Лизолецитин блокирует аккумуляцию кальция саркоплазматическим ретикулумом и ведет к освобождению его из везикул за счет повышения проницаемости. Кроме того, лизолецитин вызывает разрыв биологических мембран и, по-видимому, участвует в процессе слипания клеток. Существует предположение, что лизофосфолипиды являются мощными ингибиторами транспорта электронов в дыхательной цепи, а эффект набухания митохондрий связан с воздействием лизофосфолипидов (и перекисей жирных кислот) как детергентов [2]. Установлена роль лизофосфолипидов в патогенезе некоторых болезней. Так, при заболеваниях почек у детей значительно повышается экскреция с мочой лизофосфолипидов и их концентрация в крови, что коррелирует с активностью патологического процесса [10, 13].

Другую группу метаболитов фосфолипидов составляют продукты действия фосфолипазы С. К таким продуктам относятся фосфорилированные холин, этаноламин, серин, инозитол. Фосфорилэтанолламин — нормальный компонент плазмы крови и мочи, ткани мозга. Его экскреция с мочой повышается при заболеваниях печени, целиакии, эритробластозе, резко увеличена при наследственной гипофосфатазии [18]. Фосфорилхолин и еще в большей степени фосфорилэтанолламин подавляют активность некоторых ферментов, в частности глутаматдекарбоксилазы и орнитиндекарбоксилазы, в центральной нервной системе животных [22, 34]. Фосфонинозитолы являются, по-видимому, медиаторами или вторичными посредниками передачи сигнала в клетку (наряду с цАМФ и ионами кальция). В этом отношении наиболее выраженное действие оказывает инозитолтрифосфат. Фосфатидилинозитол и его аналог 4,5-бис-фосфатидилинозитол под влиянием фосфолипазы С расщепляются на диацилглицерол, фосфонинозитол, а последний при участии АТФ преобразуется в инозитолтрифос-

фат. Имеются доказательства, что инозитолтрифосфат активирует мобилизацию кальция из эндоплазматического ретикулума, процессы секреции и пролиферации клеток [19].

Фосфосерин и фосфорилэтанолламин под влиянием тканевых фосфатаз (фосфомоноэстераз) преобразуются в свободные серин и этаноламин. Последние при мембранодеструктивных процессах могут стать основным источником образования щавелевой кислоты, повышение концентрации которой приводит к формированию оксалатно-кальциевых кристаллов, осаждаемых в тканях (в почках), что создает основу будущего конкремента. Наибольшая роль в этом процессе принадлежит расщеплению ФТЭА. Избирательное разрушение ФТЭА обнаружено при воспроизведении кальцификации мягких тканей в мембранах почечного эпителия животных (действие витаминов D, этиленгликоля) и в мембранах эритроцитов у больных мочекаменной болезнью, прогрессирующим оссифицирующим миозитом и др. [5, 14]. При этом в крови и моче резко увеличивалось количество этаноламин-жирнокислотных комплексов, в составе которых обнаруживались также продукты перекисного окисления.

Свободный этаноламин является не только высокоактивным биогенным амином, но и эффективным эмульгатором липидов, возможно его спонтанное ацилирование по ОН-группе. При этом большая часть жирных кислот оказывается прочно связанной с этаноламином и осаждается из биологических жидкостей ионами кальция с образованием кальциевых мыл и высвобождением этаноламина.

Значительное увеличение экскреции с мочой конъюгатов этаноламина с липидами, легко осаждаемых избытком кальция, оказалось специфичным признаком предрасположенности к патологической кальцификации мягких тканей (кальцифилаксия по Г. Селье) и может служить диагностическим тестом для выявления такого состояния [6].

В эксперименте на животных показано, что при ишемии в ткани мозга происходит распад фосфатидилхолина (ФТХ) с образованием глицерофосфохолина и фосфохолина и значительным повышением содержания свободного холина [37]. Обнаружение этих

соединений свидетельствует о том, что в условиях ишемии мембранные фосфолипиды мозговой ткани подвергаются активному воздействию фосфолипаз А и С и фосфомоноэстераз. Возможна активация фосфолипазы D, ведущая к образованию фосфатидной кислоты и свободного холина, однако условия образования этих компонентов при действии фосфолипазы D изучены мало. Фосфатидная кислота является активным кальциевым ионофором, сходным по действию с известными кальциевыми ионофорами — А23187 и иономицином [32, 33]. Обработка щеточных каемок почечного эпителия крысы фосфатидной кислотой вдвое увеличивала степень накопления кальция в мембранах, а в связи с увеличением связывания ионов кальция под влиянием фосфолипазы D в 2 раза увеличивалась сократимость миокарда [17]. Фосфатидная кислота генерирует зависимый от кальция медленный потенциал действия в предсердии крысы, не связанный с освобождением катехоламинов или простагландинов.

Свободный холин, образующийся при распаде ФТХ, может быть использован холинэргическими нейронами для синтеза ацетилхолина. При этом скорость деградации ФТХ может превышать скорость его синтеза с развитием местного дефицита холина. Высказана гипотеза о том, что подобный процесс лежит в основе болезни Альцгеймера — прогрессирующей старческой деменции [36].

В эксперименте на крысах обнаружено, что при интоксикации алкоголем в тканях обнаруживается необычный фосфолипид — фосфатидилэтанол, образующийся вследствие трансфосфатидирования, катализируемого фосфолипазой D [15, 37].

Плазмалогены. В отличие от глицерофосфолипидов в молекуле плазмалогенов у первого атома углерода глицерола имеется углеродная цепь, присоединенная гемиацетатной связью $H_2-C-O-CN=CH-R$. В сочетании с диацилглицерофосфолипидами плазмалогены повышают стабильность плазматической мембраны, снижают ее поверхностный потенциал и повышают текучесть мембраны. В составе мембранных фосфолипидов клеток различных органов человека содержится от 3 до 25 % плазмалогенов. Наибольшее их количество обнаруже-

но в фосфолипидах скелетных мышц (25 %), мозга (23 %), жировой ткани (21 %), кожи (14 %), желудочно-кишечного тракта (16 %), почек (12 %), сердца (3,2 %), а также среди N-ацил-ЭА фосфолипидов и фосфонолипидов [24].

В плазматических мембранах плазмалогены и 1-алкилглицерофосфолипиды концентрируются так же, как ФТЭА, на внутренней стороне мембраны. Некоторые из них образуют кластеры с белками и участвуют вместе с другими аминокислотами в выведении из клетки катионов и анионов, а также в контроле движения молекул воды через плазматические мембраны. Плазмалогены и их аналоги легко реагируют с кислородом, образуя гидропероксиды. Плазмалогены имеют значение как резерв для образования простагландинов, тромбоксанов, так как в молекуле их второй атом углерода глицерола ацилирован в основном арахидоновой кислотой [24].

Глицерофосфонолипиды и их метаболит 2-АЭФ. Показано, что часть фосфолипидов цитоплазматических мембран, содержащих фосфоновою кислоту (прямая связь C—P) вместо ортофосфорной (связь C—O—P), называют фосфонолипидами. Фосфонолипиды обнаружены в клетках разных органов и тканей человека (эритроциты, миокард, мозг, почки) [7]. В настоящее время еще недостаточно ясны физиологические функции фосфонолипидов, но в связи с их высокой устойчивостью к энзиматическому и кислотному гидролизу и распределением в основном в наружных клеточных мембранах они могут рассматриваться как мембранопротекторы клеток.

Фосфонолипиды служат источником образования ряда биологически активных метаболитов, в основном сходных по структуре с метаболитами фосфолипидов. Исключение составляет 2-аминоэтилфосфонат (2-АЭФ, аналог фосфорилэтаноламина), который может рассматриваться в качестве маркера структурно-функциональных изменений клеточных мембран [7]. Однако пока неясно, отражает ли повышение его содержания в биологических жидкостях процесс разрушения мембран или ограничение встраивания в мембранные липиды 2-АЭФ, который поступает с пищей. Высказывались предположения о том, что 2-АЭФ мо-

жет быть отнесен к витаминам, так как в организме человека нет ферментов, формирующих связь С—Р.

Диольные фосфолипиды. В организме человека и животных обнаружены липиды, построенные на основе двухатомного спирта этиленгликоля (СН₂ОН—СН₂ОН). Свойства этих фосфолипидов, названных диольными фосфолипидами, резко отличаются от свойств глицерофосфолипидов и скорее напоминают характеристики соответствующих лизоглицерофосфолипидов: они дают выраженный детергентный эффект, что обуславливает их мембранолитическое, действие, которое, однако, уменьшается по мере нарастания длины цепей жирных кислот и полностью отсутствует при наличии в молекуле диольных фосфолипидов ненасыщенных жирных кислот более С₁₈ (С₁₈₋₂₆). Подобно мылам, диольные фосфолипиды образуют в воде мелкие сферические мицеллы, которые захватывают липиды клеточных мембран, обуславливая лизис клетки. Содержание диольных липидов в тканях млекопитающих и растений возрастает в условиях усиленной функциональной активности (регенерирующая печень крыс и др.). Распад диольных фосфолипидов до этиленгликоля может вести к повышению синтеза оксалатов, однако значение этого механизма при патологии пока не установлено [3].

Таким образом, при ряде заболеваний в биологических жидкостях появляются в значительных количествах различные метаболиты глицерофосфолипидов, к которым относятся их промежуточные или конечные продукты. Некоторые из них присутствуют в небольших количествах и в норме: продукты перекисного окисления липидов, простагландины, конъюгаты липидов с аминогруппами аминокислот и др., а также не относящиеся к липидам соединения типа этаноламина, холина и их фосфорных эфиров. При патологии содержание этих продуктов резко увеличивается или появляется множество таких метаболитов, которые в физиологических условиях практически не выявляются. Большинство из них приобретает способность растворяться в воде и биологических жидкостях и обладает высокой биологической активностью. Так, изменения, повышающие гидрофильность липидных молекул,

образуются при переокислении фосфолипидов (перекиси фосфолипидов, жирных кислот), деградации молекул фосфолипидов (лизоформы), ацетилировании лизофосфолипидов, в результате N-О-ацетилирования липидных метаболитов при многочисленных энзиматических реакциях, преобразующих молекулу арахидоновой кислоты (простагландины, тромбоксаны, гидроксикозатетраеновые кислоты, лейкотриены и др.). Значительное повышение концентрации некоторых высокополярных метаболитов фосфолипидов приводит к токсическому повреждению тканей (лизофосфолипиды, ФАТ). В связи с таким широким спектром биологической активности и с учетом возможности внезапного и чрезвычайно выраженного воздействия на организм вплоть до летального исхода указанные метаболиты фосфолипидов следует отнести к соединениям, изучение которых является актуальной проблемой современной медицины и биохимии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Азимова А. М., Берман А. Л., Скворцов Е. Г. и др. // Биохимия. — 1980. — Т. 45, № 4. — С. 704—709.
2. Архипенко Ю. В., Каган В. Е., Козлов Ю. П. // Там же. — 1983. — Т. 48, № 3. — С. 433—441.
3. Вавер В. А., Ушаков А. Н., Бергельсон Л. Д. // Успехи биол. химии. — 1973. — Т. 14. — С. 227.
4. Вельтицев Ю. Е., Святкина О. Б. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 6. — С. 3—7.
5. Вельтицев Ю. Е., Юрьева Э. А. // Игнатова М. С., Вельтицев Ю. Е. Детская нефрология. — Л., 1982. — С. 309—332.
6. Вельтицев Ю. Е., Юрьева Э. А., Казанская И. В. и др. // Л. с. № 1197636 от 15/XII-85 г. Способ диагностики кальцифилаксии, опуб. в Б. И., 1986, № 2.
7. Вельтицев Ю. Е., Юрьева Э. А., Кудрин А. П. и др. // Хим.-фарм. жури. — 1983. — № 3. — С. 282—290.
8. Каган В. Е., Архипенко Ю. В., Козлов Ю. П. // Биохимия. — 1983. — Т. 48, № 1. — С. 158—166.
9. Клаан Н. К., Азимова О. А., Сибельдина Л. А. и др. // Там же. — № 4. — С. 626—633.
10. Кожевников Ю. П. Динамика активности фосфолипаз, содержания перекисей липидов и антиоксидантов у детей с диффузным гломерулонефритом: Автореф. дис. канд. мед. наук. — М., 1981.
11. Куликов В. И., Бельгельсон Л. Д. // Биохимия. — 1984. — Т. 49, № 8. — С. 1310—1315.
12. Куликов В. И., Музы Г. И., Бергельсон Л. Д. // Там же. — № 9. — С. 1449—1455.
13. Лебедева К. А. Клинико-патогенетическое

- обоснование применения антиоксидантных препаратов в терапии гломерулонефрита у детей: Автореф. дис. канд. мед. наук. — М., 1983.
14. Юрвеа Э. А. Повреждение клеточных мембран при заболеваниях почек у детей: Автореф. дис. д-ра мед. наук. — М., 1979.
 15. Alling C., Gustavsson L., Mansson Y. E. et al. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1984. — Vol. 793, N 1. — P. 119—122.
 16. Billah M., Johnston Y. Y. // *Biochem. biophys. Res. Commun.* — 1983. — Vol. 113, N 1. — P. 51—58.
 17. Burt J. M., Rich T. L., Langer L. // *Amer. J. Physiol.* — 1984. — Vol. 247, N 5. — P. 11880—885.
 18. Bartler F. C. // *The Metabolic Basis of Inherited Disease* / Ed. J. B. Stanbury et al. — New York, 1972. — P. 1292—1304.
 19. Berridge M. J., Irvin R. F. // *Nature.* — 1984. — Vol. 312. — P. 315—321.
 20. Epps D. E., Natarajan V., Schmid P. C., Schmid H. H. O. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1980. — Vol. 618. — P. 420—430.
 21. Epps D. E., Palmer J. W., Schmid H. H. O., Pfeifer D. R. // *J. biol. Chem.* — 1982. — Vol. 257, N 3. — P. 1383—1391.
 22. Gilad G. M. // *Biochem. biophys. Res. Commun.* — 1984. — Vol. 122, N 1. — P. 277—282.
 23. Jackson M. J., Yones D. A., Harris E. J. // *Biosci. Rep.* — 1984. — Vol. 4, N 7. — P. 581—587.
 24. Lee Te-Ching, Malone B., Snyder F. // *Arch. Biochem.* — 1983. — Vol. 223, N 1. — P. 33—39.
 25. McIntyre D. E., Kenneth P. W. // *Biochem. J.* — 1983. — Vol. 212, N 2. — P. 433—437.
 26. Nair V., Vielli D., Cooper C. // *J. Amer. chem. Soc.* — 1981. — Vol. 103, N 11. — P. 3030—3036.
 27. Natarajan V., Reddy P. V., Schmid P. C., Schmid H. H. O. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1982. — Vol. 712. — P. 342—355.
 28. Natarajan V., Schmid P. C., Reddy P. V., Schmid H. H. O. // *J. Neurochem.* — 1984. — Vol. 42, N 6. — P. 1613—1620.
 29. Pace-Asciak C., Granstrom E. *Prostaglandins and Related Substances.* — Amsterdam, 1983.
 30. Patterson R., Bernstein P. R., Harris K. E., Krell R. D. // *J. Lab. clin. Med.* — 1984. — Vol. 104, N 3. — P. 340—345.
 31. Raddy P. V., Natarajan V., Schmid P. C., Schmid H. H. O. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1983. — Vol. 750. — P. 472—480.
 32. Somermeyer M. Y., Knauss Th. C., Weinberg J. M., Humes H. D. // *Biochem. J.* — 1983. — Vol. 214, N 1. — P. 37—47.
 33. Serhan Ch., Anderson P., Goodman E. // *J. biol. Chem.* — 1981. — Vol. 236, N 6. — P. 2736—2741.
 34. Yagi K. *Lipid Peroxides in Biology and Medicine.* — New York, 1982. — P. 364—378.
 35. Wasserman St. Y. // *J. Allergy.* — 1983. — Vol. 72, N 2. — P. 101—105.
 36. Wurtman R. J., Blasztajn J. K., Marie J. C. // *Neurochem. Int.* — 1985. — Vol. 7, N 2. — P. 369—372.
 37. Zeisel St. // *Biochem. biophys. Acta.* — 1985. — Vol. 835, N 2. — P. 331—343.

Поступила 07.01.86

BIOLOGICALLY ACTIVE METABOLITES OF MEMBRANE GLYCEROPHOSPHOLIPIDS UNDER NORMAL AND PATHOLOGICAL STATES

Yu. E. Veltishev, E. A. Yur'eva,
E. S. Vozdvizhenskaya

Institute of Pediatrics and Child Surgery, Ministry of Public Health of the RSFSR, Moscow

The data on biological role of numerous phospholipid metabolites, main part of which is localized in cell membranes, are reviewed. Many of these metabolites are related to slowly reacting substances of anaphylaxis and participate in allergic and inflammatory reactions. Conditions of biosynthesis of phospholipid active metabolites are characterized in the reactions of lipid peroxidation, N-acetylation, formation of Schiff bases, enaminales via transacetylation, by the action of phospholipases, lipoxygenase, cyclooxygenase, by formation of plasmalogens, sphomonolipids, phospholipid diols. Role of individual phospholipid metabolites in normal and pathological states is discussed.

УДК 612.398 + 613.2.577.112:612.392.2

М. П. Черников

ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ ПИЩЕВЫХ БЕЛКОВ И ПРИНЦИП МИТЧЕЛЛА

Институт питания АМН СССР, Москва

В изучении ассимиляции и качества пищевых белков исследователи исходят из трех постулатов: 1) эссенциальности 8 аминокислот (с учетом тирозина и цистина), 2) качества белка, которое определяет соотношение (аминограмма) эссенциальных аминокислот, и 3) двух главных показателей качества пищевых белков: биологической ценности (БЦ) [20] и аминокислотного сора (табл. 1) [23].

Из 2-го постулата Митчелл вывел принцип продуктивного использования (на пластические нужды организма) эссенциальных аминокислот по 1-й дефицитной аминокислоте [21]. Например, если в белках сорго 1-й дефицитной аминокислотой является лизин со скором 33 %, то остальные эссенциальные аминокислоты должны продуктивно использоваться также на 33 %.

Между параметрами БЦ и аминокис-

Таблица 1

Факторы, определяющие и влияющие на БЦ белков

1-я группа факторов (определяющие)	2-я группа факторов (влияющие)
Содержание и соотношение эссенциальных аминокислот (аминокислотный скор)	Тип белка Структура белка и его атакуемость пищеварительными протеиназами Содержание ингибиторов протеиназ в пищевых продуктах Состояние пищевого белка (нативность, растворимость, дисперсность и др.) Доступность эссенциальных аминокислот Состояние физиологических систем, участвующих в ассимиляции белка Уровень белка в рационе тест-организма
БЦ _н	Изменчивость параметра БЦ Коэффициент К

слотный скор существует тесная корреляционная связь, которая интенсивно изучается. Предложен ряд коэффициентов и уравнений, связывающих эти величины.

Митчелл и Блок [23] предложили уравнение $БЦ = 100 - 0,634x$, где x — величина (в %), показывающая недостаток 1-й дефицитной аминокислоты по сравнению с этой же аминокислотой в эталонном белке. Используя в качестве эталонного белка для сравнения с оцениваемым белком содержание эссенциальных аминокислот в цельном белке женского молока, Кюнау [19] вывел показатель чистой ценности пищевого белка. В другом случае для этих же целей был предложен индекс эссенциальных аминокислот — ЕААІ [25], который был преобразован Митчеллом в модифицированный индекс эссенциальных аминокислот — МЕААІ [22]. Кроме того, использовали целый ряд других подходов для оценки качества пищевых белков [22]. Была обнаружена корреляция между БЦ и процентом азота креатинина в моче [2, 24].

Однако вследствие своей эмпиричности эти подходы не получили широкого распространения, а вопрос о нахож-

дении логической связи между БЦ и аминокислотным скором остается до последнего времени открытым.

Целью настоящего исследования явилось обоснование подхода к нахождению параметра, характеризующего БЦ пищевого белка, исходя из его аминокислотного скор. Мы предлагаем концепцию, возникновению которой предшествовали наши исследования по ассимиляции белков [7, 9] и, как нам кажется, она позволит преодолеть трудности, имеющиеся в этой области.

БЦ белка зависит от целого ряда разнородных факторов. В табл. 1 представлена классификация этих факторов по их значимости и влиянию на эффективность ассимиляции белка. Многочисленность факторов и их гетерогенность свидетельствуют об интегральной природе показателя БЦ, а именно о наличии по крайней мере двух составляющих в уравнении, связывающем аминокислотный скор с БЦ. Один из членов уравнения, который может быть рассчитан из 1-й группы факторов, т. е. собственно из аминокислотного скор, был назван нами «потенциальной (теоретической) биологической ценностью» (БЦ_н). Вторым параметром — коэффициентом компенсации (К), определяется некоторыми факторами, входящими во 2-ю группу (см. табл. 1), влияющими на ассимиляцию пищевых белков, улучшая или ухудшая последнюю. Таким образом, получается уравнение:

$$БЦ_э = БЦ_н + К, \quad (1)$$

где БЦ_э — экспериментальная биологическая ценность.

Для нахождения БЦ_н преобразуются данные по аминокислотному скору с использованием принципа Митчелла [21], уменьшая скор всех эссенциальных аминокислот на скор 1-й дефицитной аминокислоты и получая разность различий аминокислотного скор (ΔРАС). Средняя величина из этих разностей является коэффициентом различия аминокислотного скор (КРАС):

$$КРАС = \frac{\sum \Delta РАС}{n}, \quad (2)$$

где n — число эссенциальных аминокислот, как правило, равное 8.

Необходимо отметить, что КРАС, являющийся средней величиной, характеризующей использование эссен-

КРАС и БЦ_п белков говядины и шрота рапса

Незаменимые аминокислоты	Шкала ФАО/ВОЗ	Белок говядины [6, 12]			Белок шрота рапса [4]		
		содержа- ние ами- нокисло- ты	скор	ΔРАС	содержа- ние ами- нокисло- ты	скор	ΔРАС
Триптофан	1,0	1,1	110	5	1,23	123	34
Фенилалан + тирозин	6,0	7,8	130	25	6,1	102	13
Треонин	4,0	4,3	108	3	4,4	110	21
Метионин + цистин	3,5	3,8	109	4	3,1	89	0
Валин	5,0	5,6	112	7	4,9	98	9
Изолейцин	4,0	4,2	105	0	3,8	95	6
Лейцин	7,0	8,0	114	9	7,0	100	11
Лизин	5,5	8,5	155	50	5,9	107	18
ΣΔРАС	—	—	—	103	—	—	112
КРАС	—	—	—	13	—	—	14
БЦ _п	—	—	—	87	—	—	86

циальных аминокислот на энергетические нужды, выполняет в данном случае иную роль, чем это имеет место при манипулировании с обычными средними величинами, когда средняя величина сглаживает неточность измерений однородных параметров. В этом случае мы исходим из того, что все аминокислоты в определенной степени при биосинтезе белка равны, так как исключение любой из них нарушает этот процесс.

Мы приводим пример расчета для белка семян рапса и говядины (табл. 2). Зная КРАС, легко рассчитать продуктивное использование незаменимых аминокислот, т. е.

$$\text{БЦ}_{\text{п}} = 100 - \text{КРАС}. \quad (3)$$

Полученный показатель — БЦ_п — удовлетворительно характеризует качество пищевых белков, так как в отличие от БЦ_э он зависит только от содержания эссенциальных аминокислот в белке. Может возникнуть вопрос: почему, например, белки ржи имеют более высокие величины БЦ_э, чем белки овса, несмотря на то что последние более богаты лизином, являющимся 1-й дефицитной аминокислотой у большинства белков растительного происхождения [13]? Величины БЦ_п служат ответом на этот вопрос, так как в данном случае (табл. 3) между белками ржи и овса имеются в ряду еще три белка, превосходящих по БЦ_п белок овса. Необходимо в связи с этим от-

Таблица 3

КРАС, БЦ_п, БЦ_э и коэффициенты компенсации (К) пищевых белков (в %)

Пищевые белки	КРАС	БЦ _п	БЦ _э	К	Пищевые белки	КРАС	БЦ _п	БЦ _э	К
Белки животного происхождения:					Белки растительные:				
говядины	13	87	80	—7	рапса (шрот)	14	86	92***	6
яйца	24	76	100*	24	соевой муки	19	81	76	—5
казеин	36	64	73**	9	ржи	28	72	77**	5
молока	40	60	90	30	арахиса	31	69	60	—9
лактальбумин	42	58	84	26	ячменя	35	65	72**	7
молочной сыворотки	42	58	93	35	подсолнечника	40	60	71	11
овальбумин	46	54	82	28	овса	41	59	70**	11
желатин	100	0	25*	25	пшеницы	47	53	59**	6
гемоглобин	100	0	30	30	глюди	54	46	54	8
					кукурузы	58	42	58**	16
					сорго	75	25	52	27

Примечание. Одна звездочка—по данным [23], две—по данным [13], три—по данным [4], остальные показатели—по данным [1, 26] и [14].

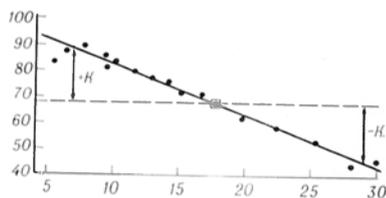


Рис. 1. Эффект компенсации (K) на примере зависимости БЦз (в %) от уровня казеина, обогащенного DL-метионином [13].

Квадрат — БЦн.

метить, что качество белка, помимо 1-й дефицитной аминокислоты, определяют и другие незаменимые аминокислоты, а именно их соответствие потребностям организма, т. е. их соотношение (аминограмма). Выведенный нами параметр БЦн хорошо отражает аминокорректуру незаменимых аминокислот.

Сопоставление величины БЦн для ряда белков (см. табл. 3) с величинами БЦз показало, что имеются все три возможности. Исходя из уравнения (1), следует:

$$K = \text{БЦз} - \text{БЦн} \quad (4)$$

Коэффициент K был положительным, отрицательным и равным нулю. Это хорошо демонстрируется на рис. 1, где показана зависимость БЦз от уровня белка в рационе на казеине, обогащенном DL-метионином, по данным [13] и нашим данным о БЦн для этого белка.

Какова же природа коэффициента K ? Очевидно, что он определяется некоторыми факторами, влияющими на ассимиляцию пищевых белков (см. табл. 1). Особенно отчетливо выявляется природа этого коэффициента на примере желатина. Этот белок не содержит триптофана и, следовательно, исходит из принципа Митчелла и нашей концепции, БЦн в данном случае должна быть равной нулю. В то же время величина БЦз оказалась равной 25% [23]. Следовательно, коэффициент K составил 25%. Ясно, что отсутствие триптофана в желатине временно компенсируется организмом за счет пула свободных аминокислот.

Парадоксально, что лучшие по качеству пищевые белки, имеющие высокие величины БЦ, характеризуются и высокими величинами коэффициента K . К этим белкам относятся такие белки животного происхождения, как белки яйца и молока. Так, коэффици-

ент K для лактоальбумина, белков молочной сыворотки, овальбумина и белков яйца равен соответственно 26, 35, 30, 26 и 24%. В то же время белки растительного происхождения имеют малые величины K (см. табл. 3).

Таким образом, пищевые белки, помимо известной их роли как источника незаменимых аминокислот для пополнения аминокислотных пулов, оказывают значительно более глубокое воздействие на белково-аминокислотный метаболизм организма.

При исследовании ассимиляции казеинов мы выделили эти белки в особый класс собственно пищевых белков с алиментарной специфичностью, т. е. эволюционно приспособленных к удовлетворению алиментарных потребностей новорожденного [7—11]. Обнаружение больших величин коэффициента K не только подтверждает нашу концепцию, но и расширяет наличие в этом классе других белков молока и яйца. В то же время такой белок высокого качества, имеющий максимальную величину БЦн, каким является белок говядины, не обладает этими свойствами, так как эволюционно он не предназначался в качестве пищи для плотоядных.

Необходимо отметить, что в условиях организма очень важный принцип Митчелла, который мы используем, сохраняет свое действие, но испытывает трансформацию из-за феномена компенсации. Его справедливость доказывается также и 2-м постулатом, о котором мы упоминаем вначале.

Естественно, возникают по крайней мере два вопроса: как компенсируется дополнительная нагрузка на аминокислотный пул при потреблении собственно пищевых белков и что определяет такое изменение обмена эссенциальных аминокислот, а следовательно, и различие в поведении пищевых белков?

На рис. 2 представлена обобщенная схема белково-аминокислотного метаболизма человека. Тканевые белки у взрослого человека массой 70 кг распадаются со скоростью 300—500 г/сут [3, 28]. С пищей мы получаем около 60—80 г белка за сутки. Эти данные свидетельствуют о значительной реутилизации эндогенных эссенциальных аминокислот на биосинтез тканевых белков. Можно полагать, что дополнительный фонд незаменимых аминокис-

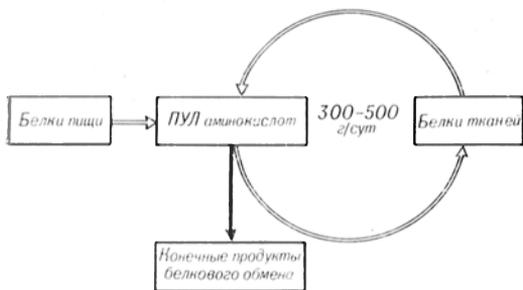


Рис. 2. Белково-аминокислотный метаболизм человека (схема).

лот может быть связан как с увеличением степени реутилизации, так и с уменьшением их катаболизма.

В последнее время появился ряд работ, касающихся образования при частичном протеолизе казеинов физиологически активных пептидов. Первое исследование в этом направлении было выполнено нами [10, 12]. При этом обнаружено, что гликопептид, образующийся при действии ренина или пепсина на κ -казеин, обладает ингибиторной активностью на секрецию желудка, и поэтому его можно отнести к анаболическим пептидам вместе с его антагонистом, содержащимся в исходной пептидной фракции. Вполне возможно, что из белков, относящихся к классу собственно пищевых, в процессе пищеварения при частичном протеолизе могут образовываться и другие пептиды с анаболической активностью, влияющей на белково-аминокислотный метаболизм. Растительные белки значительно отличаются от собственно пищевых белков животного происхождения как по содержанию аминокислот, так и по первичной структуре, что и приводит практически к отсутствию эффекта компенсации при оптимальных уровнях этих белков в рационах (7—10 %).

По-видимому, существует и другой тип «парадоксальной» компенсации при утилизации, например, таких дефектных белков, как желатин и гемоглобин, или со значительной разбалансировкой соотношений незаменимых аминокислот, например в случае потребления сорго. Вероятно, существует механизм, «чувствующий» разбалансировку незаменимых аминокислот.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кауль А. К. // Источники пищевого белка: Пер. с англ. — М., 1979. — С. 20.
2. Кремер Ю. П. Биохимия белкового питания. — Рига, 1965. — С. 95.

3. Мак-Мюррей У. Обмен веществ у человека: Пер. с англ. — М., 1980. — С. 271.
4. Олсон Р., Сепп Р. // Источники пищевого белка: Пер. с англ. — М., 1979. — С. 87—104.
5. Стан Е. Я., Попова А. В., Черников М. П. // Вопр. питания. — 1979. — № 1. — С. 18—22.
6. Химический состав пищевых продуктов / Под ред. М. Ф. Нестерина, И. М. Скурихина. — М., 1979. — С. 106—111.
7. Черников М. П. // Вопр. питания. — 1968. — № 5. — С. 3—12.
8. Черников М. П. Протеолиз и биологическая ценность белков. — М., 1975.
9. Черников М. П. // Теоретические и клинические аспекты науки о питании. — М., 1980. — С. 121—133.
10. Черников М. П., Никольская Г. В. и др. // Вопр. питания. — 1974. — № 2. — С. 21—25.
11. Черников М. П., Смирнова Л. Н. // Там же. — 1981. — № 6. — С. 28—32.
12. Шлыгин Г. К., Васильевская Л. С. и др. // Бюл. экпер. биол. — 1971. — № 12. — С. 9—13.
13. Эггум Б. Методы оценки использования белка животными: Пер. с англ. — М., 1977.
14. Amino Acid Content of Foods and Biological Data on Proteins. (FAO. Nutritional Studies 24). — Rome, 1981. — P. 36—139.
15. Block R. J. Amino Acid Handbook. — Springfield, 1956.
16. Brantl V., Teschemacher H., Henschen A., Lottspeich F. // Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. — 1979. — Bd 360. — S. 1211.
17. Evaluation of protein Quality. — Washington, 1963. — P. 1—50.
18. Garnot P. et al. // J. Dairy Res. — 1977. — Vol. 44. — P. 9—23.
19. Kühnau J. // Angew. Chem. — 1949. — Bd 61. — S. 357—365.
20. Mitchell H. H. // J. biol. Chem. — 1924. — Vol. 58. — P. 905.
21. Mitchell H. H. // Comparative Nutrition of Man and Domestic Animals. — New York. — 1964. — Vol. 2. — P. 596—604.
22. Mitchell H. H. // Methods for Evaluation of Nutritional Adequacy and Status. — Washington, 1954. — P. 13—28.
23. Mitchell H. H., Block R. J. // J. biol. Chem. — 1946. — Vol. 163. — P. 599.
24. Murlin J. R., Hayes A. D., Johnson K. // J. Nutr. — 1953. — Vol. 51. — P. 149—161.
25. Oser B. L. // Protein and Amino Acid Nutrition. — New York, 1959. — P. 281—295.
26. Renner E. Milk and Dairy Products in Human Nutrition. — München, 1983.
27. Ribadeau Dumas B. et al. // Nutrition. — Kyoto, 1975. — P. 371.
28. Schimke R. T. // Mammalian Protein Metabolism / Ed. H. N. Munro. — New York, 1970. — Vol. 4. — P. 177—228.

Поступила 15.01.86

POTENTIAL BIOLOGICAL VALUE OF FOOD PROTEINS AND MITCHELL'S PRINCIPLE

M. P. Chernikov

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

A concept is presented relating the amino acid score of food proteins to experimental magnitude of biological value (BV). Integral and

heterogenous parameters of BV might be expressed as a sum of two components: potential biological value (BV_p) and coefficient of compensation (C). " BV_p " (the first component of biological value), which depended on amino acid score of protein, is derived from Mitchell's principle involving the qualitative characteristics of food proteins. "C" (the second component of biological value) involved efficiency of the body in economy of deficient essential amino

acids of food proteins during their catabolism. Some food proteins were considered using the concept developed. The best animal proteins (from milk and egg) proved to exhibit the highest magnitudes of "C", thus corroborating not only the hypothesis on presence of food proteins with alimentary specificity but demonstrating their distinct effect on protein-amino acid metabolism.

УДК 615.214.31:547.745].015.4:612.744.013.7

А. П. Агуреев, А. И. Терехина

ОСОБЕННОСТИ ДЕЙСТВИЯ 2-ПИРРОЛИДОНАЦЕТАМИДА (ПИРАЦЕТАМА) НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКОЕ СОПРЯЖЕНИЕ В МИТОХОНДРИЯХ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ КРЫС В УСЛОВИЯХ ХОЛОДОВОГО СТРЕССА

Ранее было показано, что 2-пирролидонацетамид (пирацетам), являющийся поотропным лекарственным средством, при повторном введении крысам вызывает значительные изменения окислительного метаболизма митохондрией печени: разобщение окисления и фосфорилирования, увеличение скорости потребления кислорода на фоне ингибиторов первого и второго пунктов сопряжения, снижение скорости окисления аскорбата в присутствии N, N, N', N'-тетраметил-*n*-фенилендиаминдигидрохлорида (ТМФД) и др. [3, 12]. Указанные изменения, по-видимому, связаны с увеличением активности митохондриальной фосфолипазы A_2 и перекисного окисления липидов, а также изменением вязкости митохондриальных мембран [1, 4, 7, 15]. Сходные эффекты в митохондриях ряда тканей наблюдаются при резком охлаждении адаптированных к холоду животных [8, 10]. В связи с изложенным представлялось целесообразным изучить особенности действия пирацетама на системы окисления и энергетического сопряжения митохондрий в условиях холодового стресса, особенно митохондрий скелетных мышц, так как известно, что мышечная ткань вносит наибольший вклад в несократительный термогенез организма (примерно 50 %) [13].

Задачей настоящей работы явилось сравнительное изучение эффектов пирацетама на энергетическое сопряжение в митохондриях скелетных мышц как у интактных, так и у гонадэктомированных крыс, подвергавшихся и не подвергавшихся холодному воздей-

ствию. Опыты на гонадэктомированных животных проводили, исходя из полученных ранее данных о том, что эффект пирацетама на дыхание митохондрий печени наблюдается только у интактных, но не у гонадэктомированных крыс [12]. В работе изучали кинетику потребления кислорода митохондриями скелетных мышц (субстрат окисления — сукцинат) в присутствии разных концентраций разобщителя 2,4-динитрофенола (ДНФ), а также величину дыхательного контроля по Чансу (ДК).

Методика

Работу проводили на крысах-самках массой 150—180 г. Митохондрии выделяли, как описано ранее [5]. Скорость дыхания регистрировали с помощью кислородного электрода типа Кларка. Температура среды инкубации 28 °С. Белок определяли биуретовым методом. Среда выделения (СВ) содержала 250 мМ сахарозу, 10 мМ HEPES [4-(2-оксизетил)-1-пиперазин-этансульфоновая кислота] и 2 мМ ЭДТА pH 7,4, среда инкубации (СИ) — 120 мМ KCl, 5 мМ KH_2PO_4 , 5 мМ HEPES pH 7,4.

Проведено 4 серии опытов с 8 группами животных. В I серии оценивали эффекты холодового воздействия на энергетику митохондрий скелетных мышц интактных крыс. В исследовании участвовали животные 1-й и 2-й групп. 1-ю группу составили контрольные крысы, не подвергавшиеся действию холода, 2-ю — животные, плававшие 2 раза по 4 мин при температуре воды 10 °С с интервалом в 1—1,5 ч. Животных деканитировали через 30 мин после второго плавания. Во II серии опытов использовали животных 3-й и 4-й групп. Исследовали действие пирацетама на дыхание митохондрий интактных крыс и животных, подвергнутых холодному стрессу. Крысам 3-й группы в течение 6 сут внутримышечно вводили пирацетам в дозе 100 мг на 1 кг массы тела (1 раз в сутки); животных деканитировали на 6-е сутки, через 4 ч после введения препарата; кры-

Таблица 1

Влияние холодового стресса и пирацетама на энергетическое сопряжение в митохондриях скелетных мышц у интактных и овариэктомированных крыс

Группа животных	Скорость дыхания, нмоль O ₂ на 1 мг белка митохондрии в 1 мин				V ₃ /V ₄	V _{011go} /V ₄
	V ₀	V ₃	V ₄	V _{011go}		
1-я	31±1,5	82±5,1	26±3,0	25±0,7	3,1±0,1	0,92±0,01
2-я	30±3,0	64±4,0	25±3,1	20±1,0	2,6±0,2	0,74±0,04
3-я	41±1,5	90±4,3	35±2,1	29±2,2	2,6±0,1	0,83±0,01
4-я	34±1,4	72±3,8	37±5,8	25±0,8	1,9±0,2	0,68±0,08
5-я	35±1,8	79±4,8	37±2,6	30±1,9	2,2±0,2	0,81±0,03
6-я	28±1,0	81±11,0	37±1,9	29±2,1	2,2±0,3	0,80±0,02
7-я	37±1,3	86±6,5	37±3,2	24±1,8	2,3±0,04	0,64±0,001
8-я	30±2,5	92±8,7	40±3,8	26±1,5	2,3±0,04	0,67±0,04

Примечание. Здесь и в табл. 2 среда инкубации—как указано в методике +10 мМ сукцинат +2·10⁻⁶ М ротенон. V₀—скорость окисления сукцината, V₃—скорость дыхания в 3-м метаболическом состоянии в присутствии 150 мкМ АДФ, V₄—скорость окисления в 4-м метаболическом состоянии, V_{011go}—скорость окисления сукцината в присутствии олигомицина (1 мкг/мл), добавленного в 4-м метаболическом состоянии. Количество белка в ячеек 0,31—0,33 мг в 1 мл, в 3-й группе 0,39 мг в 1 мл. В каждом опыте использовано по 6–8 крыс.

сам 4-й группы вводили пирацетам, затем подвергали их воздействию холода (как и во 2-й группе). В III серии опытов исследовали влияние гонадэктомии на энергетику митохондрий: 5-ю группу составили овариэктомированные крысы (их использовали в опыте через 3 нед после операции), 6-ю — овариэктомированные крысы, подвергавшиеся холодовому воздействию (как и во 2-й группе). В IV серии опытов изучали влияние пирацетама на энергетику митохондрий овариэктомированных крыс в условиях холодового стресса: в 7-ю группу вошли овариэктомированные крысы, получавшие пирацетам (как и в 3-й группе), в 8-ю — овариэктомированные крысы, получавшие пирацетам (как и в 3-й группе) и подвергавшиеся воздействию холода (как и во 2-й группе). В каждой группе было по 6–8 животных.

В работе использовали сукцинат, альбумин, свободный от жирных кислот (5-я фракция), НЕРЕС, ротенон, олигомицин фирмы «Sigma», АДФ — «Reanal», ДНФ — «Merck». Олигомицин и ротенон растворяли в этаноле.

Результаты и обсуждение

Как видно из табл. 1 и 2, холодовый стресс вызывал снижение величины ДК по Чансу в митохондриях скелетных мышц с 3,1±0,1 до 2,6±0,2 и уменьшение стимуляции дыхания разбавителем с 3,4±0,4 до 2,5±0,2 (группы 1-я и 2-я); происходило заметное уменьшение абсолютных значений скоростей окисления сукцината в присутствии всех использованных в опытах концентраций ДНФ. Например, при концентрации ДНФ 32 мкМ скорости дыхания снижались с 103±±8,6 до 82±7,3 нмоль O₂ на 1 мг белка в 1 мин (см. табл. 2, группы 1-я и 2-я). Эти результаты находят в соответствии с данными, полученными

Таблица 2

Влияние пирацетама и холодового стресса на скорости окисления сукцината в присутствии разбавителя у интактных и овариэктомированных крыс

Группа животных	Скорость дыхания, нмоль O ₂ на 1 мг белка в 1 мин				V _{ДНФ} /V ₀
	V ₀	+ ДНФ, мкМ			
		16	32	64	
1-я	31±2,8	93±7,2	103±8,6	97±6,6	3,4±0,4
2-я	32±3,4	70±4,9	82±7,3	78±7,2	2,5±0,2
3-я	42±2,9	99±7,3	109±6,5	105±6,5	2,6±0,1
4-я	32±2,7	90±7,1	107±6,7	104±6,0	3,3±0,3
5-я	37±2,4	86±4,7	97±5,3	96±5,4	2,6±0,2
6-я	34±2,0	100±8,5	118±7,0	117±8,4	3,5±0,3
7-я	39±1,4	84±8,6	97±10,0	92±9,1	2,5±0,2
8-я	27±3,3	82±8,0	85±12,0	78±12,1	3,2±0,1

Примечание. V_{ДНФ}—максимальная скорость потребления O₂ в присутствии 32 мкМ ДНФ.

ми на митохондриях скелетных мышц и печени крыс при адаптации животных к холоду [6, 14], а также на митохондриях скелетных мышц голубей [11]. Для митохондрий, выделенных из мышц крыс, подвергавшихся холодовому воздействию, было характерно уменьшение отношения скорости окисления сукцината в присутствии олигомицина к скорости дыхания в метаболическом состоянии 4 (V_{oligo}/V_4) с $0,92 \pm 0,01$ до $0,74 \pm 0,04$ (см. табл. 1, группы 1-я и 2-я). Последнее может свидетельствовать о значительном вкладе в процесс разобщения H^+ -АТФазы.

Изучение влияния пиретама на дыхание митохондрий скелетных мышц интактных крыс (группа 3-я) показало, что в эффекте препарата имеется сходство с воздействием холода. Как видно из табл. 1 и 2 (группы 1-я и 3-я), введение пиретама приводило к снижению величины ДК с $3,1 \pm 0,1$ до $2,6 \pm 0,1$, стимуляции дыхания ДНФ с $3,4 \pm 0,4$ до $2,6 \pm 0,1$ раза, отношения V_{oligo}/V_4 — с $0,92 \pm 0,01$ до $0,83 \pm 0,01$. Отметим, что видимое увеличение скорости потребления O_2 митохондриями крыс 3-й группы (см. табл. 1 и 2) нельзя отнести к эффектам пиретама, так как количество белка митохондрий, добавляемое в полярографическую ячейку в данной группе опытов, было на 25—30 % выше, чем в других группах, и, следовательно, «рост» скоростей в этом случае объясняется большим содержанием в пробах белка.

Под влиянием плавления в холодной воде в митохондриях скелетных мышц крыс, получавших пиретама (группа 4-я), наблюдалось еще большее снижение величины ДК: с $2,6 \pm 0,1$ до $1,9 \pm 0,2$ (см. табл. 1, группы 2-я и 4-я). Уменьшение ДК происходило главным образом за счет возрастания скорости потребления O_2 в 4-м метаболическом состоянии (примерно на 48 %) с $25 \pm 3,1$ до $37 \pm 5,8$ нмоль на 1 мг белка в 1 мин. Олигомицин, добавленный к суспензии митохондрий в 4-м метаболическом состоянии, в значительной степени уменьшал эти различия. На фоне олигомицина скорости потребления O_2 снижались с $25 \pm 3,1$ до $20 \pm 1,0$ во 2-й группе (см. табл. 1) и с $37 \pm 5,8$ до $25 \pm 0,8$ нмоль на 1 мг белка в 1 мин в 4-й группе. Однако отношение V_{oligo}/V_4 в 4-й груп-

пе имело тенденцию к снижению. Указанные результаты свидетельствуют о несколько большем вкладе H^+ -АТФазы в процесс разобщения в митохондриях крыс, получавших пиретама. Вместе с тем отметим, что наблюдаемое разобщение не может быть объяснено только увеличением активности H^+ -АТФазы, так как скорости дыхания в присутствии олигомицина у животных 4-й группы были примерно на 25 % выше, чем во 2-й группе.

Кроме указанных изменений для митохондрий крыс, стрессированных холодом и получавших пиретама, было характерно увеличение стимуляции дыхания разобщителем (до уровня интактного контроля — 1-я группа) с $2,6 \pm 0,1$ до $3,3 \pm 0,3$ (см. табл. 2, группы 2-я и 4-я), а абсолютные значения скоростей потребления O_2 на фоне разобщителя не снижались (см. табл. 2, группы 1-я и 4-я).

Приведенные данные, по-видимому, свидетельствуют в пользу предположения о защитном действии пиретама в условиях холодового стресса. С одной стороны, при введении животным препарата происходит снижение степени сопряженности процессов окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи (снижается ДК), а следовательно, организм может большую часть энергии тратить на теплопродукцию [10], с другой стороны, в присутствии пиретама, вероятно, происходит мобилизация энергетических ресурсов субстратов, которые могут окисляться с большей скоростью, чем в отсутствие препарата (по-видимому, увеличивается чувствительность митохондрий к эндогенным разобщителям).

В III серии опытов изучали влияние овариэктоми на тканевое дыхание. Оказалось, что у оперированных крыс происходит ряд изменений в изучаемых характеристиках дыхания митохондрий. Как видно из табл. 1 и 2, у животных 5-й группы наблюдается снижение ДК с $3,1 \pm 0,1$ до $2,2 \pm 0,2$ и отношения $V_{\text{днф}}/V_0$ с $3,4 \pm 0,4$ до $2,6 \pm 0,2$. Величина ДК снижалась главным образом за счет увеличения скорости потребления O_2 в 4-м метаболическом состоянии с $26 \pm 3,0$ до $37 \pm 2,6$ нмоль на 1 мг белка в 1 мин (т. е. примерно на 42 %). Как видно, эти эффекты во многом сходны с действием пиретама.

Стимуляция дыхания разобщителем

в митохондриях овариэктомированных крыс возрастала в условиях холодового воздействия с $2,6 \pm 0,2$ до $3,5 \pm 0,3$, а величина ДК не изменялась (см. табл. 1 и 2, группы 5-я и 6-я). Эти данные позволяют предполагать, что механизм ответа мышечной ткани на холод у гонадэктомированных крыс отличен от такового у интактных животных. В связи с приведенными результатами интересно отметить, что, по данным Ю. А. Медведева и Т. С. Блиновой [9], продолжительность плавания кастрированных крыс при температуре воды 4°C была почти в 2 раза больше, чем у интактных животных, и охлаждение кастрированных крыс до критической температуры, при которой они погибали, происходило в 2 раза медленнее.

Введение овариэктомированным крысам, как плававшим, так и не плававшим в холодной воде, пираретама (см. табл. 1 и 2, группы 7-я и 8-я) показало, что препарат существенно не влияет на дыхание митохондрий этих животных, что находится в соответствии с полученными ранее данными на митохондриях печени крыс [3, 12].

Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что пираретам при неоднократном введении в суточной дозе 100 мг/кг у интактных крыс вызывает разобщение процессов окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи митохондрий скелетных мышц и увеличение активности H^+ -АТФазы; у животных, получавших пираретам и подвергавшихся холодовому воздействию, указанные эффекты выражены в большей степени, однако не наблюдается характерного для холодового стресса снижения абсолютных значений скоростей потребления O_2 в присутствии разобщителя. Пираретам не оказывал существенного влияния на исследованные характеристики дыхания митохондрий скелетных мышц овариэктомированных крыс.

Работа выполнена на базе отдела биоэнергетики Межфакультетской проблемной НИЛ им. А. Н. Белозерского, МГУ. Авторы благодарят ст. науч. сотр. Е. Н. Мохову за помощь в работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агуреев А. П., Жигачева И. В. // Биоантиоксидант. — Черноголовка, 1983. — С. 56—57.

2. Агуреев А. П., Мохова Е. Н. // Реакции живых систем и состояние энергетического обмена. — Пущино, 1979. — С. 27—51.
3. Агуреев А. П., Терехина А. И. // Вопр. мед. химии. — 1983. — № 5. — С. 32—35.
4. Агуреев А. П., Жигачева И. В., Машин А. И. и др. // Биоантиоксидант. — Черноголовка, 1983. — С. 55—56.
5. Алтухов Н. Д., Кириллова Г. П., Мохова Е. Н., Скулачев В. П. // Докл. АН СССР. — 1983. — Т. 271, № 5. — С. 1254—1256.
6. Белоусова Г. П. // Цитология. — 1983. — № 1. — С. 72—76.
7. Жигачева И. В., Каплан Е. Я., Цукерман А. И. // Биохимия. — 1983. — Т. 48, № 2. — С. 254—258.
8. Жигачева И. В., Мохова Е. Н., Скулачев В. П. // Докл. АН СССР. — 1976. — Т. 227, № 2. — С. 493—496.
9. Медведев Ю. А., Блинова Т. С. // Бюл. экпер. биол. — 1980. — № 9. — С. 384.
10. Скулачев В. П. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. — М., 1962.
11. Скулачев В. П., Маслов С. П. // Биохимия. — 1960. — С. 25, № 6. — С. 1055—1064.
12. Терехина А. И., Агуреев А. П., Лисица Л. И. и др. // Физиологически активные вещества — медицине. — Ереван, 1982. — С. 283.
13. Jansky L. // Canad. J. Biochem. Physiol. — 1963. — Vol. 41. — P. 1847.
14. Mokchova E. N., Skulatchev V. P., Zhigacheva I. V. // Biochim. biophys. Acta. — 1977. — Vol. 501. — P. 415—424.
15. Von Woelk H. // Arzneimittelforsch. — 1978. — Bd 29. — S. 615—618.

Поступила 14.12.85

SPECIFIC CHARACTERISTICS OF 2-PYRROLIDONE ACETAMIDE EFFECT ON ENERGETIC PROCESSES IN MITOCHONDRIA OF RAT SKELETAL MUSCLES IN COLD STRESS

A. P. Agureev, A. I. Terekhina

Institute for Biological Testing of Chemical Compounds, Moscow Region, Kupavna

Effects of 2-pyrrolidone acetamide (pyracetame) on energetic state of mitochondria were studied in skeletal muscles of intact and ovariectomized rats under conditions of drastic cooling (4 min swimming at 10°C). Readministration of pyracetame was shown to cause uncoupling of oxidation and phosphorylation in mitochondrial respiratory chain (a decrease in respiratory control by Chance), as well as the drug increased the rate of O_2 consumption in presence of oligomycin and decreased the uncoupler stimulating action on respiration in the group of intact animals. The alterations observed were most distinct in rats with cold stress, which was followed by pyracetame administration, except of the rate of respiration stimulation, distinctly increased in presence of uncoupler. Pyracetame did not exhibit any noticeable effects on the patterns of respiration studied in skeletal muscles of ovariectomized rats. Protective properties of pyracetame in cooling are discussed.

*В. С. Якушев, В. И. Курипка, Е. А. Шкопинский, В. В. Бушуева,
В. В. Давыдов, Н. В. Крисанова, В. П. Скурыгин, В. В. Жежа,
О. Б. Макоед*

ИНСУЛИН КРОВИ И ОСОБЕННОСТИ АЗОТИСТОГО ОБМЕНА ОРГАНОВ ПРИ ВОСПРОИЗВЕДЕНИИ НЕКРОЗА МИОКАРДА ПОСЛЕ ПЕРЕНЕСЕННОГО ЭМОЦИОНАЛЬНОГО СТРЕССА

Кафедра биохимии Запорожского медицинского института

Инфаркт миокарда сопровождается нарушением углеводного обмена, что выражается изменением секреции инсулина в кровь и сниженной толерантности к глюкозе [5, 8, 11, 13]. При этом психоэмоциональное перевозбуждение или стресс формирует выраженную инсулиновую недостаточность [9]. Очевидно, что различный характер продукции инсулина при состояниях, которые определяются степенью воздействия стрессогенных факторов, оказывает влияние на метаболические процессы. Выяснение их особенностей является важным для изучения некроза миокарда, часто возникающего в условиях предшествующего воздействия на организм эмоционального стресса (ЭС), так как основы патогенеза указанного варианта формирования и развития инфаркта миокарда до настоящего времени мало изучены.

Целью работы явилось, во-первых, изучение характера секреции в кровь инсулина при воспроизведении некроза миокарда после перенесенного ЭС и, во-вторых, исследование ряда основных показателей азотистого обмена при указанных моделях эксперимента, так как инсулин является одним из факторов контроля белкового обмена.

Методика

Опыты проведены на 505 крысах Вистар массой 150—180 г. Животных делили на 4 группы: 1-ю составили интактные крысы ($n=75$), 2-ю — животные ($n=99$), подвергавшиеся ЭС [18], 3-ю — животные ($n=111$) с некрозом миокарда, вызванным перевязкой коронарной артерии (стандартным способом), 4-ю — крысы ($n=122$), у которых через 24 ч после воспроизведения стресса моделировали некроз миокарда.

Эффективность развития стресса оценивали по количеству язв желудка [18], изменениям тимуса и надпочечников. Наличие некроза миокарда устанавливали гистологическими методами исследования.

Концентрацию инсулина исследовали радиоиммунным методом наборами рино-ИНС — ПГ — 1251 (СССР) с использованием счетчика «РАК-гамма» (ЛКВ, Швеция), содержание глюко-

зы — глюкозооксидазным методом. Показатели изучали после 16-часового голодания животных с учетом суточного ритма.

Парциальное давление кислорода (pO_2) и pH исследовали в крови из брюшного отдела аорты и нижней полой вены на микроанализаторе («Radelkis», ВНР) после внутримышечного введения калипсола в дозе 50 мг на 100 г массы тела. Одновременно у этих крыс цианидным методом определяли содержание гемоглобина (Hb). На основании этих показателей рассчитывали кислородное насыщение гемоглобина и истинную кислородную емкость артериальной и венозной крови, а также их разность.

В левом желудочке сердца исследовали содержание белка [10], аммиака [6], мочевины [1], ДНК и РНК [2]. Активность лейциламинопептидазы определяли по гидролизу лейцилгидразина (LAP-тест, ГДР), а катепсина D — в лизосомально-митохондриальной и постмитохондриальной фракциях, полученных при дифференциальном центрифугировании по гидролизу гемоглобина в кислой среде [4]. Для того чтобы исключить влияние операционной травмы у животных с некрозом миокарда все исследование азотистого обмена начинали через 48 ч после торакотомии, когда нет различий в изучаемых показателях по сравнению с интактными животными. Полученные данные обрабатывали статистически.

Результаты и обсуждение

Установлено, что в ранние периоды исследования стресса, в частности через 4 и 6 ч после начала его воспроизведения, а также на 2-е сутки после окончания моделирования ЭС выявляется гипoinsулинемия. Особенно она выражена на 2-е сутки опыта, когда концентрация инсулина в крови была наименьшей и составляла 21 % от его уровня у интактных животных. Содержание глюкозы в сыворотке крови увеличивается лишь на 2-е сутки после перенесенного ЭС, когда оно составляет 190 % от исходного уровня (табл. 1).

Полученные данные приводят к выводу о том, что при ЭС гипергликемия совпадает во времени с нарушением секреции инсулина в кровь, которое предшествует признакам нарушения утилизации глюкозы тканями.

При воспроизведении некроза мио-

Концентрация инсулина, глюкозы, гемоглобина, а также pO_2 крови при ЭС ($M \pm m$)

Показатель	Интактные животные	Время развития стресса, ч			Сутки после стресса	
		2	4	6	2-е	7-е
Инсулин, пмоль/л	110,5 ± 10,9 (6)	132,1 ± 23,4 (7)	25,9 ± 5,1* (6)	35,9 ± 9,2* (7)	23,1 ± 5,5* (6)	106,4 ± 13,3 (6)
Глюкоза, ммоль/л	4,1 ± 0,1 (8)	—	—	3,6 ± 0,4 (12)	5,4 ± 0,1* (7)	3,9 ± 0,1 (8)
pO_2 в артериальной крови, мм рт. ст.	67,7 ± 2,7 (12)	61,0 ± 1,7 (6)	78,8 ± 4,6 (8)	70,1 ± 2,0 (9)	84,7 ± 1,1* (8)	81,1 ± 3,2* (8)
pO_2 в венозной крови, мм рт. ст.	23,1 ± 1,9 (12)	33,8 ± 1,3* (6)	31,8 ± 1,8* (8)	34,0 ± 1,6* (9)	43,8 ± 1,1* (8)	22,3 ± 1,2 (7)
Гемоглобин, г/л	133,6 ± 1,9 (10)	123,1 ± 5,9 (6)	121,5 ± 4,5* (6)	109,6 ± 3,5* (6)	141,6 ± 3,3 (6)	130,8 ± 5,1 (6)

Примечание. Здесь и в табл. 2 в скобках — число животных. Звездочкой отмечено $P < 0,05$ по сравнению с показателями интактных животных.

карда после перенесенного ЭС на 2-е сутки опыта также выявляется гипергликемия (табл. 2). В этот период эксперимента концентрация глюкозы крови увеличивается соответственно на 90 и 92 % по сравнению с исходным уровнем или при сопоставлении с некрозом миокарда, воспроизведенным в традиционном варианте. К 7-м суткам после начала опыта имела место нормализация содержания глюкозы.

Параллельно с этим в сыворотке крови животных с некрозом миокарда, воспроизведенным после перенесенного ЭС, отмечалась гиперинсулинемия, особенно выраженная на 2-е сутки опыта. Концентрация инсулина крови в этот период превышала в 4,7 раза исходный уровень и в 1,1 раза показатель у животных, у которых некроз миокарда воспроизводили в традиционных условиях. К 7-м суткам опыта содержание инсулина нормализовалось (см. табл. 2).

Эти данные свидетельствуют о том, что изменения содержания инсулина в крови при некрозе миокарда не зависят от того, воздействовал ли предварительно стресс на организм или нет.

Однако очевидно, что различная направленность в колебаниях концентрации глюкозы в крови при некрозе миокарда, воспроизведенном после перенесенного стресса или без него, отражают изменения в эндокринной системе и обуславливаются характером поглощенных субстратов окисления в органах, а также соотношением аэробных и анаэробных процессов. Ранее было показано, что стресс сам по себе, а также в качестве предварительно воздействующего фактора перед воспроизведением некроза миокарда резко изменяет гликолиз в органах, в частности в сердце [14, 15]. Это влияет на потребление органами кислорода, а это наряду с нарушением балан-

Таблица 2

Концентрация инсулина, глюкозы, гемоглобина, а также pO_2 в сыворотке крови при некрозе миокарда, воспроизведенном после перенесенного ЭС ($M \pm m$)

Показатель	Интактные животные	Некроз миокарда, сутки		Некроз миокарда после ЭС, сутки	
		2-е	7-е	2-е	7-е
Инсулин, пмоль/л	110,5 ± 10,9 (6)	469,5 ± 23,6* (6)	181,6 ± 36,5 (6)	522,4 ± 10,5* (7)	122,9 ± 17,6 (8)
Глюкоза, ммоль/л	4,1 ± 0,1 (8)	4,01 ± 0,2 (7)	4,9 ± 0,2 (8)	7,7 ± 0,9*,** (8)	4,7 ± 0,4 (8)
pO_2 артериальной крови, мм рт. ст.	67,7 ± 2,7 (13)	86,2 ± 2,1* (7)	76,1 ± 7,0 (7)	107,1 ± 3,6*,** (7)	69,7 ± 1,8 (7)
pO_2 венозной крови, мм рт. ст.	23,1 ± 1,9 (12)	34,8 ± 2,2* (7)	33,5 ± 1,8* (7)	38,1 ± 2,7* (7)	38,1 ± 3,0* (7)
Гемоглобин, г/л	133,6 ± 1,9 (10)	128,0 ± 4,9 (7)	137,7 ± 11,6 (7)	104,1 ± 12,7 (7)	119,5 ± 10,8 (7)

* $P < 0,05$ по сравнению с интактными животными.

** $P < 0,05$ животных с ЭС-|некроз миокарда к животным с некрозом миокарда.

са глюкозы может оказать неблагоприятное воздействие на любой вид обмена. Изучение ряда особенностей кислородного баланса показывает, что при развитии некроза миокарда без предварительного воздействия ЭС отмечается увеличение pO_2 артериальной и венозной крови (см. табл. 2). Так, на 2-е сутки опыта pO_2 артериальной крови составляет 127 %, а венозной — 150,6 % по сравнению с показателями у интактных животных. На 7-е сутки опыта pO_2 артериальной крови приближается к исходному уровню, а в венозной крови pO_2 сохраняется на том же высоком уровне, что и на 2-е сутки эксперимента. В указанные сроки опытов концентрация гемоглобина и pH не изменяются.

При воспроизведении некроза миокарда после перенесенного ЭС (см. табл. 2) динамика показателей сохраняется примерно так же, как и при воспроизведении некроза миокарда без предварительного воздействия стресса. Однако имеется и ряд различий, в частности, на 2-е сутки данного опыта pO_2 артериальной крови составляет 158 % по сравнению с таковым интактных животных и крыс с обычно воспроизводимым некрозом миокарда. Величина pO_2 венозной крови также несколько выше. Вместе с тем расчет процента насыщения гемоглобина в артериальной и венозной крови, а также истинной артериовенозной разницы по кислороду (рис.) показывает, что кислородный режим преимущественно нарушается тогда, когда некроз миокарда развивается после предварительно перенесенного стресса. Так, из рис. 1 видно, что артериовенозная разница по O_2 , свидетельствующая о

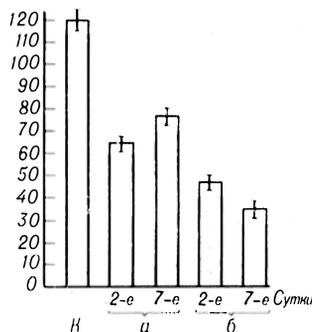
поглощении органами кислорода, при некрозе миокарда на 2-е и 7-е сутки после его развития снижается соответственно до 52 и 64 % от исходного уровня. В процессе же формирования некроза после воздействия ЭС данный показатель понижается еще в большей степени и на 2-е и 7-е сутки эксперимента составляет соответственно 68 и 43 % величины этого показателя у животных с некрозом миокарда без предварительно перенесенного стресса.

Полученные данные свидетельствуют о том, что перенесенный стресс в случае последующего развития некроза миокарда выступает как фактор формирования не только инсулинорезистентности, но и нарушения некоторых сторон транспорта и обмена кислорода. Совокупность этих сдвигов может оказать воздействие на обмен веществ, особенно зависящих от кислорода. С этой целью нами были изучены особенности азотистого обмена в сердце и мозге. Интерес к данному вопросу диктовался также и тем, что ранее в энергетическом и углеводном обменах нами были выявлены изменения [3, 14], специфичные для состояния перенесенного эмоционального и болевого стрессов.

Установлено, что содержание белка в левом желудочке сердца после воспроизведения стресса не изменяется по сравнению с исходным уровнем, а на 7-е сутки после начала опыта его количество увеличивается на 26 % по сравнению с показателями интактных животных (табл. 3).

Учитывая это, мы изучили содержание ДНК и РНК в сердце при стрессе. Оказалось, что, начиная со 2-х суток после ЭС, концентрация ДНК увеличивается на 106 % по сравнению с показателями здоровых животных. Эта же тенденция сохраняется и на 7-е сутки после начала опыта. Параллельно в левом желудочке сердца содержание РНК повышается на 54 % по сравнению с таковым интактных животных. Обращает на себя внимание и тот факт, что максимальное увеличение содержания РНК совпадает с аналогичным периодом в отношении ДНК (см. табл. 3).

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что постстрессорная активация генетического аппарата левого желудочка сердца, наблюдаемая и другими авторами [7], объясняет



Артериовенозная разница по кислороду (в мл) в контроле (К), при некрозе миокарда (а) и некрозе миокарда, воспроизведенном после воздействия ЭС (б).

Содержание некоторых метаболитов белкового обмена и нуклеиновых кислот в левом желудочке сердца и больших полушариях мозга при ЭС у крыс ($M \pm m$)

Показатель	Орган	Интактные животные	Стресс	Сутки после стресса	
				2-е	7-е
Белок, мг/кг	с	0,30±0,002	0,29±0,004	0,29±0,003	0,37±0,016*
	м	0,041±0,02	0,021±0,04*	0,039±0,03	0,032±0,02
ДНК, мкг на 1 г ткани	с	588±31	566±40	1212±110*	702±69
	м	573±30	630±40	790±50	700±80
РНК, мкг на 1 г ткани	с	1237±62	1644±96*	1902±153*	1457±89,0*
	м	1230±40	1200±70	1940±100*	1060±160*
Аммиак, ммоль/кг	с	0,67±0,03	1,07±0,02*	1,17±0,02*	0,87±0,02*
	м	0,56±0,02	0,79±0,01*	0,86±0,02	0,64±0,03
Мочевина, ммоль/кг	с	5,60±0,05	8,90±0,65*	5,90±0,45	5,90±0,48
	м	4,4±0,1	5,9±0,5	4,9±0,4	4,5±0,5

Примечание. В опытах использовано по 6—10 крыс. Здесь и в табл 4—5 с—сердце, м—мозг.

возможность повышенного синтеза белка и его увеличения в сердце в отдаленные периоды после воздействия стресса.

Однако эти сдвиги происходят в условиях повышенного аммиакообразования (см. табл. 3). Это подтверждается тем, что при самом стрессе, а также через 2 и 7 сут после его воздействия содержание в миокарде свободного аммиака соответственно увеличивается на 60, 75 и 30 % по сравнению с исходным уровнем. Интересно отметить, что в динамике концентрации мочевины в сердце после ЭС не отмечается аналогичного сдвига. Увеличение содержания мочевины на 60 % по сравнению с показателями интактных животных наблюдается лишь в период развития самого стресса.

Наряду с изменением показателей белкового и нуклеинового обменов в

сердце при стрессе изменяется и активность ферментов протеолиза (табл. 4). Так, активность катепсина D в лизосомально-митохондриальной фракции при стрессе, а также на 2-е и 7-е сутки после него увеличивается соответственно на 41, 72 и 134 % по сравнению с исходным уровнем. Одновременно происходит увеличение активности катепсина D в неседиментирующей фракции только в момент воспроизведения полного объема стрессорных изменений. Активность другого протеолитического фермента, лейциламинонептидазы (см. табл. 4) также увеличивается и на 6-й час воспроизведения стресса, а также на 2-е и 7-е сутки после него повышается соответственно на 356, 68 и 73 % по сравнению с показателями интактных животных.

Учитывая тот факт, что психоэмоциональное перенапряжение, или стресс, играет важную роль в патогене-

Таблица 4

Активность некоторых протеолитических ферментов в левом желудочке сердца и больших полушариях головного мозга при стрессе ($M \pm m$)

Показатель	Орган	Интактные животные	Стресс	Сутки после стресса	
				2-е	7-е
Катепсин D: лизосомальная фракция	с	6,4±1,2	9,0±0,8*	11,0±0,6*	15,0±0,6
	м	3,17±0,1	3,7±0,1	2,8±0,2	1,7±0,3*
цитозольная фракция	с	1,5±0,1	3,0±0,3*	1,2±0,1	1,8±0,4
	м	0,5±0,09	1,08±0,2*	0,9±0,03*	0,4±0,05
Лейциламинонептидаза	с	129,8±9,8	593±88*	218,1±15,3*	225,1±19,1*
	м	90±6,3	52,5±9,1*	572±80*	115±17,3

Примечание. Активность катепсина D в сердце выражена в микрограммах тирозина на 1 мг белка в 1 мин, в мозге—в микрограммах тирозина на 1 мг белка в 1 ч, лейциламинонептидазы—в микромолях на 1 кг белка в 1 с. Звездочкой отмечено $P < 0,05$ по отношению к интактным животным. В опытах использовали по 8—10 крыс.

Таблица 5
Содержание белка, некоторых метаболитов белкового обмена и нуклеиновых кислот в левом желудочке сердца и больших полушариях мозга крыс при некрозе миокарда, воспроизведенном после стресса ($M \pm m$)

Показатель	Орган	Интактные животные		Некроз миокарда, сутки		Некроз миокарда после ЭС, сутки	
		2-е	7-е	2-е	7-е	2-е	7-е
ДНК, мкг на 1 г ткани	С	588 ± 31	1160 ± 45*	1120 ± 74*	1160 ± 45*	1240 ± 75*	1210 ± 55*
РНК, мкг на 1 г ткани	М	573 ± 30	1033 ± 99*	766 ± 42*	1033 ± 99*	750 ± 43*	816 ± 62*,**
	С	1237 ± 62	2025 ± 113*	1300 ± 56	2025 ± 113*	1310 ± 94	1925 ± 99*
Аммиак, ммоль/кг	М	1230 ± 40	1910 ± 97*	1275 ± 114	1910 ± 97*	1110 ± 97	1550 ± 84*,**
	С	0,67 ± 0,03	0,79 ± 0,02*	1,25 ± 0,01*	0,79 ± 0,02*	1,28 ± 0,01*	0,97 ± 0,03*
Мочевина, ммоль/кг	М	0,56 ± 0,02	0,62 ± 0,01*	1,06 ± 0,01*	0,62 ± 0,01*	1,07 ± 0,01	0,69 ± 0,04
	С	5,60 ± 0,05	8,7 ± 0,38*	12,1 ± 0,7*	8,7 ± 0,38*	12,9 ± 0,5*	9,4 ± 0,4*
Белок, мг/кг	М	4,4 ± 0,1	5,8 ± 0,4*	8,4 ± 0,4*	5,8 ± 0,4*	9,6 ± 0,4*,**	7,2 ± 0,4*,**
Лейцинамминопептидаза	С	0,41 ± 0,02	0,36 ± 0,01	0,56 ± 0,005*	0,36 ± 0,01	0,33 ± 0,01*,**	0,31 ± 0,01*,**
	М	129 ± 9,8	221 ± 20,8	165 ± 14,7	221 ± 20,8	723 ± 25*,**	206 ± 5,2*

Примечание. В опытах использовано по 6—10 крыс. Одной звездочкой обозначено $P < 0,05$ по сравнению с интактными крысами, двумя — $P < 0,05$ по сравнению с крысами с некрозом миокарда.

незе ИБС и часто предшествует некрозу миокарда, изучали влияние стресса на ряд исследованных показателей азотистого обмена в сердце при последующем развитии некроза в миокарде (табл. 5).

Из табл. 5 видно, что при некрозе миокарда независимо от особенностей его воспроизведения в сохранившемся отделе левого желудочка сердца на 2-е и 7-е сутки после начала опыта наблюдалось примерно одинаковое увеличение содержания ДНК, РНК, мочевины и свободного аммиака по сравнению с показателями интактных животных. В ранний период опыта отмечалась более значительная (в 4,3 раза) активация лейцинамминопептидазы у животных с некрозом миокарда, воспроизведенным после стресса, по сравнению с данными крыс, у которых некроз миокарда моделировали без предварительного воздействия стресса.

Одновременно с левым желудочком сердца исследовали большие полушария головного мозга.

Установлено, что в период максимального развития ЭС (6-часовой срок опыта) в мозге уменьшалось содержание белка, которое составляло 47% исходного уровня (см. табл. 3). Параллельно концентрация свободного аммиака повышалась на 41% по сравнению с показателями интактных животных.

В отдаленные периоды последствия стресса на организм (2-е и 7-е сутки опыта) отмечалась нормализация содержания белка при увеличении содержания нуклеиновых кислот. Указанные изменения осуществлялись в условиях накопления свободного аммиака, уровень которого на 2-е и 7-е сутки опыта составлял соответственно 154 и 114% от исходной величины.

Изменение показателей азотистого обмена наблюдалось при активации протеолиза, что подтвердилось на 2-е сутки ЭС увеличением активности катепсина D в цитозоле на 71% по сравнению с исходной величиной (см. табл. 4). На 7-е сутки активность этого фермента резко снижалась, что свидетельствует об угнетении протеолиза и уменьшении лабильности мембран лизосом в этот период воздействия стресса на организм. Обращала на себя внимание существенная (в 6,3 раза) активация лейцинамминопептидазы,

особенно выраженная на 2-е сутки после перенесенного стресса.

Таким образом, воздействие стресса на организм сопровождалось в больших полушариях головного мозга активацией протеолиза, дезаминирования и накоплением свободного аммиака на фоне стимуляции генетического аппарата нейронов — явлений, особенно выраженных в ранний период после перенесенного ЭС. Указанные сдвиги в азотистом обмене полушарий мозга обуславливаются в условиях нарушенной секреции в кровь инсулина и гипергликемии, а также транспорта кислорода, что в комплексе может обуславливать изменение высшей нервной деятельности.

Развитие некроза в миокарде у животных, которые предварительно перенесли воздействие стресса, сопровождалось более выраженными нарушениями азотистого обмена в мозге (см. табл. 5). Так, на 2-е сутки данного опыта содержание белка было на 20 % ниже, а концентрация мочевины — на 118 % выше, чем у интактных животных. Направленность указанных сдвигов сохранялась и на 7-е сутки опыта. При этом весь период эксперимента сопровождался увеличенной концентрацией свободного аммиака по сравнению с исходной величиной.

Особенно характерным для больших полушарий головного мозга являлось изменение концентрации пукленовых кислот (см. табл. 5). Так, после воспроизведения некроза миокарда без предварительного влияния ЭС содержание ДНК и РНК нарастало, и к 7-м суткам их величина соответственно

составляла 180 и 155 % по сравнению с таковой интактных животных. У крыс же, у которых моделировали некроз миокарда после перенесенного стресса, на 7-е сутки опыта концентрация ДНК и РНК была соответственно ниже на 28 и 19 %, чем у животных с обычно воспроизводимым вариантом некроза в сердце.

Анализ указанных показателей азотистого обмена и активности протеолиза показывает, что перенесенный стресс вносит существенные изменения в его состояние в случае последующего развития некроза в миокарде. В частности, было отмечено (см. табл. 5), что воспроизведение некроза миокарда без предварительного воздействия стресса характеризуется иной динамикой изучаемых показателей. Так, на 2-е сутки данного эксперимента содержание белка увеличивалось на 36 %, а прирост мочевины составлял только 90 % по сравнению с таковым интактных животных. К 7-м суткам этого опыта содержание указанных показателей нормализовалось.

В эти же сроки исследования отмечена активация ферментов протеолиза (табл. 6). В частности, на 2-е сутки развития некроза миокарда после перенесенного стресса седиментирующая активность катепсина D была выше, чем у интактных животных, на 43 %. Активность же лейцинаминопептидазы превышала в 6,1 раза исходный уровень. К 7-м суткам опыта активность катепсина D нормализовалась, однако величина активности лейцинаминопептидазы сохранялась на повышенном уровне.

Таблица 6

Активность протеолитических ферментов в полушариях головного мозга крыс с различными вариантами некроза миокарда ($M \pm m$)

Показатель	Интактные животные	Некроз миокарда, сутки		Некроз миокарда после ЭС, сутки	
		2-е	7-е	2-е	7-е
Катепсин D: лизосомально-митохондриальная фракция	$3,17 \pm 0,15$	$2,91 \pm 0,20$	$1,76 \pm 0,39$	$4,55 \pm 0,29^{*,**}$	$2,84 \pm 1,20$
цитозольная фракция	$0,53 \pm 0,09$	$0,72 \pm 0,11^*$	$0,84 \pm 0,10^*$	$0,43 \pm 0,03^{**}$	$0,38 \pm 0,04^{**}$
Лейцинаминопептидаза	$90 \pm 6,3$	$199,3 \pm 36,9^*$	$162,7 \pm 25,6^*$	$554,4 \pm 38,6^{*,**}$	$325,5 \pm 42,5^{*,**}$

Примечание. В опытах использовано по 6—8 крыс. Одна звездочка — $P < 0,05$ по сравнению с интактными животными, две — $P < 0,05$ по сравнению с крысами с некрозом миокарда. Активность катепсина D выражена в микромолях тирозина на 1 мг в 1 ч, активность лейцинаминопептидазы — в микромолях на 1 кг белка в 1 с.

Полученные данные свидетельствуют о том, что перенесенный стресс в больших полушариях головного мозга животных с некрозом миокарда препятствует компенсаторной активации генетического аппарата нейронов, сопровождающейся более выраженным дефицитом белка на фоне резко активированного катепсина D в лизосомальной фракции.

Известно, что развитие компенсаторных процессов, в том числе и при некрозе миокарда, существенно зависит от концентрации глюкозы и инсулина крови. Так, они протекают более эффективно при гиперинсулинемии на фоне умеренно повышенного или нормального уровня глюкозы [21]. Поэтому очевидно, что при некрозе миокарда, развивающемся до и после перенесенного стресса, будут выявляться характерные сдвиги метаболизма в органах. В этом плане изучение азотистого обмена показывает, что в условиях гипергликемии и гиперинсулинемии, вызванных перенесенным стрессом, в мозге не реализуются компенсаторные сдвиги, связанные с активацией генетического аппарата и белкового синтеза в нейронах. В левом желудочке сердца, как и в крови [16], не выявляется каких-либо специфических сдвигов в азотистом обмене, и, по-видимому, их происхождение объясняется общими закономерностями реакции сердечно-сосудистой системы на стрессогенные факторы. Интересно отметить, что вышеуказанные сдвиги в сердце и мозге осуществляются в условиях повышенного аммиакообразования и изменения кислородного режима организма, особенно нарушенных при формировании некроза миокарда после перенесенного стресса.

Учитывая характер окислительных процессов в сердце при воспроизведении некроза миокарда после ЭС [3], можно думать, что именно указанные выше причины на фоне неспецифических сдвигов в азотистом обмене послужат важным фактором, способствующим расширению площади некроза в сердце, о чем сообщалось ранее [3]. Вместе с тем перенесенный стресс в случае последующего развития некроза миокарда выступает как фактор угнетения компенсаторных процессов, выявляемых в мозге на уровне генетического и белоксинтезирующего аппарата. Одновременно с

этим важной является и ответная реакция ферментов протеолиза, в частности лейцинаминопептидазы. Известно, что при стрессе в мозге снижается содержание лейцин-энкефалина [12, 19], изменяется соотношение между энкефалинами в пользу метэнкефалина [12, 19], активируется лейцинаминопептидаза [17]. В этих условиях метэнкефалин способствует активации гипоталамус-гипофиз-надпочечниковой системы [10] и углубляет повреждающее воздействие стресса. Поэтому можно предполагать, что перенесенный стресс в случае последующего развития некроза в сердце, способствуя резкой активации лейцинаминопептидазы, будет уменьшать содержание лей-энкефалина и соответственно нарушать антистрессорную защиту организма. Все это требует проведения мероприятий, направленных на ингибирование этого фермента, что повысит естественную резистентность организма к различным проявлениям стресса, поскольку не будет происходить мобилизации гормональных механизмов, угнетающих развитие общего адаптационного синдрома. В этих же условиях важное значение будет иметь и соответствующая коррекция сдвигов азотистого обмена в мозге и сердце с учетом профилактики инсулинрезистентности и недостаточного усвоения глюкозы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Асатиани В. С. Ферментные методы анализа. — М., 1969.
2. Георгиев Г. П. // Химия и биохимия нуклеиновых кислот. — Л., 1968. — С. 74—120.
3. Давыдов В. В., Якушев В. С. // Вопр. мед. химии. — 1982. — № 4. — С. 34—37.
4. Дудаев В. А., Горин В. В., Тороховская Т. И. и др. // Кардиология. — 1984. — № 8. — С. 85—89.
5. Лизосомы, методы исследования / Под ред. Дж. Дингла: Пер. с англ. — М., 1980.
6. Львов Н. П. // Методы современной биохимии. — М., 1975. — С. 58—60.
7. Меерсон Ф. З. Адаптация, стресс и профилактика. — М., 1981.
8. Оганов Р. Г., Александров А. А., Бунаева В. Е. и др. // Тер. арх. — 1980. — № 8. — С. 91—96.
9. Пания Л. Е., Соколов В. П. Психосоматические взаимоотношения при хроническом эмоциональном напряжении. — Новосибирск, 1981.
10. Слепушкин В. Д., Лишманов Ю. Б., Золов Г. К., Пруж И. А. // Успехи физиол. наук. — 1985. — Т. 16, № 4. — С. 109—118.
11. Сунцов Ю. И., Жуковский Г. С., Мазовецкий А. Г. и др. // Кардиология. — 1984. — № 11. — С. 85—89.

12. Тигранян Р. А., Вакулина О. П. // Всесоюзная конф. по биохимии нервной системы: 9-я. Тезисы докладов. — Ереван, 1983. — С. 321—322.
13. Титов В. П., Қаримов Р. Г., Қасаткина В. Г. и др. // Кардиология. — 1983. — № 6. — С. 91—94.
14. Якушев В. С., Жежа В. В., Давыдов В. В. // Вопр. мед. химии. — 1982. — № 6. — С. 94—96.
15. Якушев В. С., Жежа В. В. // Там же. — 1985. — № 1. — С. 79—82.
16. Якушев В. С., Бушцеева В. В., Давыдов В. В. // Кардиология. — 1985. — № 12 — С. 123.
17. Якушев В. С., Крисанова Н. В. // Укр. биохим. журн. — 1985. — Т. 57, № 3. — С. 69—71.
18. Desiderato O., Mackinnon I., Hisson H. // J. comp. Physiol. Psychol. — 1974. — Vol. 87. — P. 208—214.
19. Gibson A., Hart S., Snabib A. // Brit. J. Pharmacol. — 1980. — Vol. 70. — P. 509—511.
20. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
21. Tilbach O., Will-Shahab L., Zeyer P. et al. // Z. ges. inn. Med. — 1983. — Vol. 38. — P. 284—288.

Поступила 17.01.86

УДК 616.89-008.441.13+616.36-002.2]-07:616.153.915-074

В. К. Макаров, А. В. Каргаполов

ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ АЛКОГОЛИЗМОМ И ХРОНИЧЕСКИМ ПЕРСИСТИРУЮЩИМ ГЕПАТИТОМ

Кафедра биоорганической и биофизической химии, кафедра инфекционных болезней
с курсом эпидемиологии Калининского медицинского института

В клинической практике часто приходится встречаться с больными хроническим персистирующим гепатитом (ХПГ), которые до развития заболевания длительное время злоупотребляли алкоголем. Установлено, что сочетание поврежденный организм, возникающих при утилизации алкоголя и под воздействием вируса гепатита, способствует возникновению существенных особенностей в протекании фундаментальных биохимических процессов в клетке.

Поскольку липиды играют важную роль в функционировании биологических мембран и формировании защитных реакций организма против вирусов, представляло интерес детально изучить показатели липидного обмена у больных ХПГ и алкоголизмом. Полученные данные могут помочь объяснить факты высокой поражаемости вирусом гепатита В лиц, злоупотреб-

BLOOD INSULIN AND SPECIFIC CHARACTERISTICS OF NITROGEN METABOLISM IN TISSUES DURING MYOCARDIUM NECROSIS DEVELOPED AFTER EMOTIONAL STRESS

V. S. Yakushev, V. I. Quripka, E. A. Shkopinsky, V. V. Bushlseva, V. V. Davydov, N. V. Krisanova, V. P. Skurygin, V. V. Zhezha, O. B. Maikoed

Medical School, Zaporozh'e

Simulation of myocardium necrosis developed after emotional stress led to hyperinsulinemia and hyperglycemia simultaneously with a decrease in arterial-venous difference of oxygen. In control, stress-treated animals, hypoinsulinemia and hyperglycemia were detected. Dissimilar alterations in nitrogen metabolism were observed in heart and brain tissues of the animals with myocardium necrosis under conditions of anomalous insulin secretion and glucose consumption. During the first steps of myocardium necrosis after emotional stress increase in content of nucleic acids, ammonium, urea as well as activation of leucine aminopeptidase were found in heart of the animals. At the same time, a number of compensatory reactions, involved in nitrogen metabolism, were not found in brain of the animals with myocardium necrosis; distinct activation of leucine aminopeptidase was detected in the tissue.

ляющих алкоголем, и разработать способы коррекции липидного обмена. В отличие от данных, имеющихся в литературе, где большинство авторов [4, 5, 7] исследовали только содержание основных липидов, нами изучен детальный липидный состав сыворотки крови больных алкоголизмом и ХПГ.

При интерпретации полученных данных большое внимание уделяется процентному содержанию отдельных липидных компонентов сыворотки крови, так как именно этот показатель, по свидетельству ряда авторов [6, 10], имеет важное значение для оценки степени изменений биохимических процессов.

Методика

Исследовали сыворотку крови 86 больных хроническим алкоголизмом, 67 больных ХПГ, злоупотреблявших алкоголем, и 50 доноров.

Липидный состав сыворотки крови у больных алкоголизмом и ХПГ

липиды	Доноры, ($M_1 \pm m_1$)	$p_{1,2}$	Больные алкоголиз- мом ($M_2 \pm m_2$)	$p_{2,3}$	ХПГ + злоупот- ребление алко- голем ($M_3 \pm m_3$)
Общие липиды, г/л	7,8±0,3	<0,01	10,1±0,3	<0,01	11,8±0,3
ФЛ*	19,5±0,5	>0,05	20,4±0,7	<0,02	22,4±0,7
СХ	11,4±0,3	<0,01	14,7±0,5	>0,05	15,3±0,4
СЖК	4,1±0,3	<0,01	6,6±0,5	>0,05	5,8±0,3
ТГ	22,0±0,6	<0,01	27,5±0,7	>0,05	27,8±0,5
ЭХ	43,2±0,8	<0,01	31,8±1,0	<0,01	28,5±0,7
ЛФЛ**	11,5±1,2	>0,05	12,5±0,3	<0,01	6,9±0,9
СМ	21,5±1,2	>0,05	23,0±0,5	>0,05	21,0±1,0
ФХ	36,3±1,2	>0,05	32,6±0,9	<0,001	49,6±1,4
ФЭА	13,0±1,8	>0,05	10,7±0,5	>0,05	9,4±0,8
ФК	17,3±1,8	>0,05	15,5±0,8	>0,05	13,0±1,1

* Фракции липидов даны в процентах от общих липидов.

** Фракции ФЛ приводятся в процентах от уровня общих ФЛ.

Под злоупотреблением алкоголем понимали прием более 80 г чистого этанола в сутки несколько раз в неделю. Данное количество алкоголя является токсичным и вызывает поражение печени [2].

Липиды выделяли по Фолчу [8] и фракционировали модифицированным методом [3], позволяющим количественно определить минорные липидные компоненты сыворотки крови (фосфатидные кислоты, лизопронизводные фосфолипидов) одновременно с основными липидными фракциями. Процентное содержание отдельных липидных фракций устанавливали денситометрически после обугливания липидов на хроматографических пластинках хромовой смесью. В связи с тем что задача исследования состояла в изучении изменений соотношения липидных фракций у больных разных групп, мы не учитывали зависимость степени обугливания липидных фракций от особенностей их химического строения и молекулярной массы.

Общие липиды определяли по Маршу [9]. Изучено процентное содержание следующих фракций липидов: триглицеридов (ТГ), эфиров холестерина (ЭХ), свободного холестерина (СХ), свободных жирных кислот (СЖК), фосфолипидов (ФЛ) и их отдельных фракций — суммарных лизофосфолипидов (ЛФЛ), сфингомиелинов (СМ), фосфатидилхолинов (ФХ), фосфатидилэтаноламинов (ФЭА) и фосфатидных кислот (ФК).

Поверхностный антиген гепатита В определялся методом встречного иммуноэлектрофореза [1]. Принцип электрофоретического метода заключается в следующем: антиген гепатита В в электрическом поле движется к аноду, антигена — к катоду. При взаимодействии их образуется полоса преципитации, расположенная перпендикулярно к направлению движения тока. Использовали стеклянные пластинки с 1,5 % агаром «Дифко», приготовленным на барбиталово-ацетатном буфере рН 8,4. Электрофорез протекал при постоянной силе тока 50 мА. Через 1,5 ч прибор отключали, пластинку помещали на 1 ч в 10 % раствор хлористого натрия. После этого учитывали результаты. Для документирования результатов опыта пластинку с агаром окрашивали амидо черным 10Б.

Результаты и обсуждение

Исследование липидного состава сыворотки крови у больных алкоголизмом, по сравнению с донорами, показало наличие нарушений в соотношении липидных фракций (см. таблицу), которые характеризовались повышением относительного содержания СХ, СЖК, ТГ и понижением уровня ЭХ. При этом количество общих липидов было достоверно повышено в 1,2 раза. Установлено, что абсолютное содержание ФЛ в сыворотке крови у больных алкоголизмом не отличалось от концентрации их у доноров. Однако детальный анализ показал, что у 44 больных алкоголизмом относительное содержание ФЛ оказалось снижено ($15,9 \pm 0,6\%$) и у 42 — повышено ($25,0 \pm 0,8\%$).

Сопоставление показателей липидного состава у больных алкоголизмом и ХПГ, злоупотребляющих алкоголем, позволило обнаружить их определенное сходство, которое выражалось в относительно близких значениях СХ, СЖК, ТГ, ФЭА, ФК и общих липидов (см. таблицу). Следует отметить, что при ХПГ у лиц, злоупотреблявших алкоголем, наблюдалось высокое процентное содержание общих ФЛ, ФХ и низкое ЭХ и ЛФЛ.

Полученные данные об изменении процентного содержания ФК, ЛФЛ, ТГ, общих ФЛ, СЖК — соединений, являющихся исходными и конечными продуктами ключевых реакций липидного обмена, свидетельствуют о том, что в условиях носительства вируса

гепатита В изменяются как реакции синтеза, так и процессы распада липидов.

Следовательно, можно предположить, что у больных алкоголизмом компенсаторные возможности липидного обмена противостоять вирусной инфекции в значительной мере исчерпаны. Данное предположение хорошо согласуется с тем фактом, что в группе больных алкоголизмом с повышенным уровнем ФЛ снижены показатели ЭХ и чаще выявляется поверхностный антиген гепатита В (HBsAg).

Носительство HBsAg среди больных алкоголизмом данной группы составляло 25,7%, что является весьма близким в HBs-антигемии у больных ХПГ, злоупотреблявших алкоголем (25,2%), но в 5 раз выше, чем у больных алкоголизмом с пониженным уровнем ФЛ в сыворотке крови.

Таким образом, не исключена вероятность, что предрасположенность больных алкоголизмом к носительству маркера гепатита В (HBsAg) в значительной степени объясняется использованием одних и тех же ферментных систем липидного обмена, необходимых как для утилизации алкоголя, так и для формирования иммунной реакции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Блюгер А. Ф., Новицкий И. П. Практическая гепатология. — Рига, 1984.
2. Дунаевский О. А., Макаров В. К. // Вирус-

ные гепатиты. — М., 1984. — С. 172—176.

3. Каргаполов А. В. // Биохимия. — 1981. — Т. 46, № 4. — С. 691—698.
4. Кондрашенко В. Г., Скугаревский А. Ф. Алкоголизм. — Минск, 1983.
5. Латенков В. П. // Вопр. питания. — 1985. — № 6. — С. 23—28.
6. Никитин Ю. П., Курилович С. А., Давидик Г. С. Печень и липидный обмен. — Новосибирск, 1985.
7. Folch J., Lees M., Stanley G. H. G. // J. Biol. Chem. — 1957. — Vol. 226. — P. 497—509.
8. March J. B., Weinstein P. B. // J. Lipid Res. — 1966. — Vol. 7. — P. 574—576.
9. Phillips G. B. // J. clin. Invest. — 1960. — Vol. 39. — P. 1639—1650.

Поступила 25.05.86

LIPID COMPOSITION OF BLOOD SERUM IN PATIENTS WITH ALCOHOLISM AND WITH CHRONIC PERSISTING HEPATITIS

V. K. Makarov, A. V. Kargapolov

Patterns of free cholesterol, free fatty acids, triglycerides, phosphatide acids, phosphatidyl ethanolamine and total lipids were similar in blood serum of patients both with alcoholism and with chronic persisting hepatitis, consuming ethanol. In these diseases HB_s-antigenemia constituted 15.4% and 25.2%, respectively. In the group of patients with alcoholism exhibiting high content of phospholipids HB_sAg-carriage was not practically distinct from the frequency of HB_s-antigenemia in the patients with chronic persisting hepatitis and was equal to 25.7%. This suggests that patients with alcoholism and high level of phospholipids in blood serum should be considered as a group of risk for development of chronic persisting hepatitis.

УДК 612.744.11/14.015.1.014.46

И. А. Феоктистов, Г. Н. Балденков, М. Ю. Меньшиков,
Н. П. Ларионов

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЗАМОДЕЙСТВИЯ КАЛЬМОДУЛИНА С ФЕРМЕНТАМИ

Лаборатория метаболизма сердца Сибирского филиала ВКНЦ АМН СССР, Томск, лаборатория молекулярной эндокринологии НИИ экспериментальной кардиологии ВКНЦ АМН СССР, Москва

В настоящее время известны два основных способа регуляции ионами кальция кальмодулинзависимых процессов. Первый из них осуществляется путем связывания ионов кальция кальмодулином, после чего этот белок присоединяется к ферменту и изменяет его каталитическую активность. Таким путем регулируется активность фосфо-

диэстеразы циклических нуклеотидов и многих других кальмодулинзависимых ферментов [3].

Второй способ кальмодулинзависимой регуляции характеризуется тем, что уже существующий комплекс кальмодулин—фермент взаимодействует с ионами кальция, в результате чего происходит активация фермента. По

этому принципу происходит регуляция ионами кальция активности киназы фосфорилазы — фермента, состоящего из 16 субъединиц $\alpha_4\beta_4\gamma_4\delta_4$, где γ -субъединица обладает каталитической активностью [17], α - и β -субъединицы являются мишенью различных регуляторных воздействий (цАМФ-зависимое фосфорилирование, аутофосфорилирование, протеолиз и т. д.) [4], а δ -субъединица обеспечивает чувствительность к ионам кальция и представляет собой кальмодулин, интегрированный в структуре фермента [6].

Киназа фосфорилазы в присутствии ионов кальция способна также присоединять дополнительно еще 4 молекулы кальмодулина, взаимодействующих одновременно с α - и β -субъединицами фермента [15]. Активность киназы фосфорилазы при этом возрастает в несколько раз [18].

Показано, что многие фармакологические соединения в результате взаимодействия с кальмодулином по гидрофобным участкам, экспонирующимся при связывании кальмодулином ионов кальция [13], способны подавлять кальмодулинзависимую стимуляцию фосфодиэстеразы и других ферментов [16, 22]. Выделяют различные типы кальцийзависимых участков связывания фармакологических соединений [10, 12]. Связывание фармакологических соединений по различным участкам на кальмодулине и разнообразие способов взаимодействия кальмодулина с регулируемым им ферментами дают основание предполагать, что существуют различия в ингибировании фармакологическими агентами кальмодулинзависимых процессов [22].

Для выяснения этого вопроса изучали влияние фармакологических соединений на различные типы кальмодулинзависимой регуляции ферментов — киназы фосфорилазы и фосфодиэстеразы.

Методика

Фосфорилазу Б скелетных мышц кролика выделяли по методу, опубликованному ранее [7]. Выделение и определение активности киназы фосфорилазы скелетных мышц кролика при рН 6,8 осуществляли в соответствии с работой [5]. Фосфодиэстеразу цАМФ сердца кролика получали описанным ранее методом [19], модифицированным в работе [2]. Активность фосфодиэстеразы цАМФ определяли по методу [12]. Кальмодулин выделяли из мозга быка [9]. Со-

держание белка устанавливали [14], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин. Константы ингибирования кальмодулинзависимой активации ферментов рассчитывали по Диксону [11]. Ошибка при определении констант ингибирования не превышала 20 %.

В работе использовали трифлуоперазин и хлорпромазин фирмы «Sigma» (США). Метопролол, тиопроперазин, левопромазин, галоперидол, трифлуперидол и имипрамин — фармакопейные препараты производства «Geedeon Richter» и EGYT (ВНР).

Результаты

Исследовали влияние фармакологических соединений в концентрации 10^{-4} М на Ca^{+2} -зависимую активность киназы фосфорилазы в отсутствие добавленного кальмодулина (см. таблицу).

Трифлуоперазин, хлорпромазин, левопромазин, тиопроперазин и имипрамин не влияли на Ca^{+2} -зависимую активность фермента, т. е. на функционирование интегрированного кальмодулина в молекуле киназы фосфорилазы. Бутирофеноны — трифлуперидол и галоперидол — снижали активность фермента соответственно до 58 и 87 % от исходной. Метопролол ингибировал киназу фосфорилазы на 22 %. Однако наблюдаемое ингибирование киназы фосфорилазы метопрололом, трифлуперидолом и галоперидолом трудно интерпретировать как влияние их на интегрированный кальмодулин ввиду сложной организации фермента.

При добавлении насыщающих концентраций кальмодулина ($4 \cdot 10^{-7}$ М)

Влияние фармакологических соединений на кальмодулинзависимую стимуляцию киназы фосфорилазы и фосфодиэстеразы, а также на Ca^{2+} -зависимую активность киназы фосфорилазы

Вещество, 10^{-4} М	Ca^{2+} -зависимая активность киназы фосфорилазы, % от контроля	K_i кальмодулинзависимой стимуляции киназы фосфорилазы, мкМ	K_i кальмодулинзависимой стимуляции фосфодиэстеразы, мкМ
Трифлуоперазин	101 ± 7	12	4
Хлорпромазин	102 ± 9	25	18
Метопролол	78 ± 7	12	7
Тиопроперазин	111 ± 10	30	15
Левопромазин	107 ± 13	>200	25
Имипрамин	97 ± 3	40	50
Галоперидол	87 ± 5	200	120
Трифлуперидол	58 ± 5	60	35

Примечание. Приведены средние величины 4—5 параллельных экспериментов.

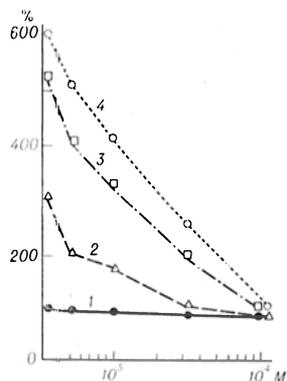


Рис. 1. Зависимость активности киназы фосфорилазы от концентрации метофеназина. Здесь и на рис. 2 по оси абсцисс — концентрация исследуемого препарата (в М); по оси ординат — степень активации фермента (в %). 1 — активность фермента в отсутствие кальмодулина; 2—4 — в присутствии кальмодулина в концентрации соответственно $2,5 \cdot 10^{-8}$, $1,6 \cdot 10^{-7}$ и $4 \cdot 10^{-7}$ М.

активность киназы фосфорилазы увеличивалась в 6 раз. Для оценки действия фармакологических препаратов на активацию киназы фосфорилазы экзогенным кальмодулином были проведены опыты, результаты которых представлены для метофеназина и трифлуперидола на рис. 1 и 2. Преобразование данных рисунков в координатах Диксона позволило определить константы конкурентного ингибирования кальмодулинзависимой активации киназы фосфорилазы (см. таблицу). Из рис. 1 и 2 видно, что метофеназин и трифлуперидол ингибируют кальмодулинзависимую стимуляцию киназы фосфорилазы, причем эффективность метофеназина выявлялась при меньших концентрациях, чем в случае трифлуперидола (см. рис. 1 и 2). В це-

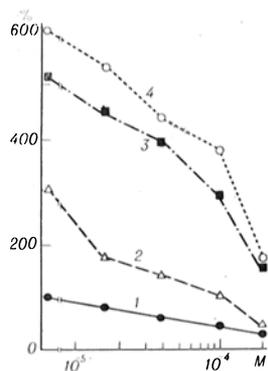


Рис. 2. Зависимость активности киназы фосфорилазы от концентрации трифлуперидола.

лом феноптиазины более эффективно ингибировали стимуляцию фермента кальмодулином, чем имипрамин и бутирофеноны, однако левомепромазин (соединение феноптиазинового ряда) в концентрации до 200 мкМ не оказывал влияния на активность киназы фосфорилазы как в присутствии, так и в отсутствие кальмодулина (см. таблицу). Метофеназин ингибировал активность киназы фосфорилазы в присутствии кальмодулина при значительно меньших концентрациях, чем это необходимо для ингибирования Са-зависимой активности фермента, определяемой в отсутствие добавленного кальмодулина. В этих же условиях производные бутирофенона — трифлуперидол и галоперидол — оказывали ингибирующее влияние на активность фермента в концентрациях, близких к их константам ингибирования кальмодулинзависимой стимуляции киназы фосфорилазы (см. таблицу, рис. 1 и 2). Эти данные свидетельствуют о влиянии бутирофенонов на функционирование кальмодулина, прочно связанного с киназой фосфорилазы.

Регуляция киназы фосфорилазы существенно отличается от регуляции других кальмодулинзависимых ферментов тем, что кальмодулин взаимодействует сразу с двумя (α - и β -) субъединицами фермента [15]. Кальцийзависимая регуляция активности фосфодиэстеразы осуществляется путем связывания с одной субъединицей фермента [21]. Выделенный нами препарат фосфодиэстеразы активировался кальмодулином в насыщающих концентрациях ($5 \cdot 10^{-7}$ М) в 6 раз. Константы ингибирования кальмодулинзависимой стимуляции фосфодиэстеразы были получены для исследуемых соединений методом, аналогичным использованному в экспериментах с киназой фосфорилазы (см. таблицу). Несмотря на некоторые различия, наблюдается хорошая корреляция эффективности действия фармакологических агентов на оба кальмодулинзависимых фермента (рис. 3). Исключением в этом ряду является левомепромазин, ингибирующий кальмодулинзависимую стимуляцию фосфодиэстеразы с $K_i = 25$ мкМ, но не оказывающий влияния на кальмодулинстимулированную активность киназы фосфорилазы в концентрациях до 200 мкМ.

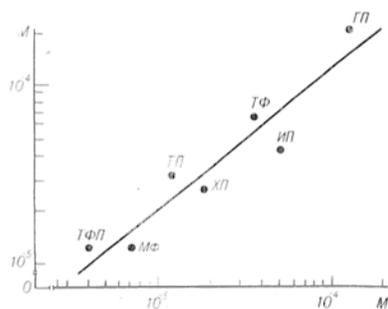


Рис. 3. Корреляционная зависимость эффективности влияния фармакологических соединений на кальмодулинзависимую стимуляцию фосфодиэстеразы и киназы фосфорилазы (коэффициент корреляции $r=0,97$; $P<0,01$).

По оси абсцисс — константа ингибирования фосфодиэстеразы (в М); по оси ординат — то же киназы фосфорилазы (в М).

ТФП — трифлуперазин; МФ — метофеназин; ХП — хлорпромазин; ТП — тиопроперазин; ТФ — трифлуперидол; ИП — имипрамин; ГП — галоперидол.

Обсуждение

В настоящей работе проведено сравнительное изучение влияния фармакологических препаратов на 2 кальмодулинзависимых фермента. Используемые нами препараты различаются по их влиянию на активность киназы фосфорилазы, определяемую в разных функциональных состояниях — в присутствии и в отсутствие экзогенного кальмодулина, а также на кальмодулинзависимую регуляцию фосфодиэстеразы. Наиболее сильными ингибиторами кальмодулинзависимой активации фосфодиэстеразы являлись фенотиазины, которые с близкой эффективностью подавляли действие кальмодулина и на киназу фосфорилазы. Одинаковое действие на кальмодулинзависимую регуляцию этих ферментов оказывал также имипрамин. Однако все эти соединения практически не влияли на Ca^{2+} -зависимую регуляцию киназы фосфорилазы, определяемую в отсутствие добавленного кальмодулина, т. е. на функционирование интегрированного кальмодулина, образующего прочный комплекс с другими субъединицами фермента. Отсутствие действия трифлуперазина на интегрированный кальмодулин было отмечено также в работах других исследователей [20]. Ингибирование Ca^{2+} -зависимой активности киназы фосфорилазы было выявлено только для бутирофенонов, которые в равной степени влияли на все типы кальмодулинзависимой регуляции киназы фосфорилазы и

фосфодиэстеразы. В то же время бутирофеноны значительно уступали фенотиазинам в ингибировании эффектов экзогенного кальмодулина как на киназу фосфорилазы, так и на фосфодиэстеразу. Из этих экспериментов недостаточно ясно, взаимодействуют ли бутирофеноны с интегрированным кальмодулином или влияют на каталитическую активность фермента путем связывания с другими субъединицами. Поскольку бутирофеноны, как и другие соединения, взаимодействуют с Ca^{2+} -зависимыми гидрофобными областями молекулы кальмодулина [16], можно предположить, что в присутствии кальция для трифлуперидола и галоперидола доступны гидрофобные участки интегрированного кальмодулина. Молекулы бутирофенонов обладают меньшим гидрофобным ядром, чем фенотиазины или трициклические антидепрессанты, которые, по-видимому, встречают стерическое препятствие при взаимодействии с интегрированным кальмодулином и поэтому неэффективны при подавлении Ca^{2+} -зависимой регуляции киназы фосфорилазы.

Необходимо отметить необычное действие левомепромазина, который хорошо подавлял кальмодулинзависимую активацию фосфодиэстеразы ($K_i=25$ мкМ), но не влиял на кальмодулинзависимую активацию киназы фосфорилазы (см. таблицу). Подобные расхождения в ингибировании кальмодулинзависимой фосфодиэстеразы мозга и Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов выявлены для мощного ингибитора кальмодулина — кальмидазолиума (R-24 571) [8]. Указанный эффект, по-видимому, объясняется возможностью различного влияния кальмидазолиума на данные ферменты [8] либо различиями регуляторного влияния кальмодулина на указанные белки [22]. В случае с киназой фосфорилазы необходимо учитывать, что экзогенный кальмодулин может взаимодействовать одновременно с двумя белками — α - и β -субъединицами фермента, что может отражаться на проявлении ингибирующего действия левомепромазина и, возможно, других соединений.

Различия в действии фенотиазинов на разные типы кальмодулинзависимой регуляции киназы фосфорилазы и фосфодиэстеразы заставляют с осторожностью подходить к оценке резуль-

татов биохимических и физиологических экспериментов с использованием этих соединений в целях выяснения участия кальмодулина в том или ином биологическом процессе. В то же время обнаруженная способность бутирофенонов с близкой эффективностью подавлять как кальмодулинзависимую активацию фосфодиэстеразы и киназы фосфорилазы, так и Ca^{2+} -зависимую регуляцию киназы фосфорилазы, опосредованную интегрированным кальмодулином, может оказаться полезным подходом для выявления участия кальмодулина в тех процессах, которые нечувствительны к широко используемым ингибиторам кальмодулина из группы фенотиазинов. Дальнейшее изучение влияния фармакологических агентов на различные типы кальмодулинзависимой регуляции может привести к созданию набора препаратов, способных не только выявлять участие кальмодулина в тех или иных процессах, но и определять характер взаимодействия кальмодулина с другими белками.

Авторы благодарят В. А. Ткачука за плодотворное обсуждение работы и внимание, проявленное к ней.

ЛИТЕРАТУРА

1. Диксон М., Узбб Э. Ферменты: Пер. с англ. — М., 1982. — Т. 2. — С. 500—508.
2. Ткачук В. А., Лазаревич В. Г., Меньшиков М. Ю., Северин С. Е. // Биохимия. — 1978. — Т. 43, № 9. — С. 1622—1630.
3. Cheung W. U. // Fed. Proc. — 1982. — Vol. 41. — P. 2253—2257.
4. Cohen P. // Europ. J. Biochem. — 1973. — Vol. 100. — P. 329—337.
5. Cohen P. // Ibid. — 1980. — Vol. 111. — P. 563—574.
6. Cohen P., Burchell A., Foulkes G. et al. // FEBS Lett. — 1978. — Vol. 92. — P. 287—293.
7. Fisher E. H., Krebs E. L. // J. biol. Chem. — 1958. — Vol. 231. — P. 65—71.
8. Gietzen K., Sadorf I., Bader H. // Biochem. J. — 1982. — Vol. 207. — P. 541—548.
9. Gopalakrishna R., Anderson W. B. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1982. — Vol. 104. — P. 830—836.
10. Inagaki M., Hidaka H. // Pharmacology. — 1984. — Vol. 29. — P. 75—84.
11. Johnson J. D. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1983. — Vol. 112. — P. 787—793.
12. Kincaid R. S., Kompauer E., Manganiello V. C., Vaughan M. // J. biol. Chem. — 1981. — Vol. 256. — P. 11345—11350.
13. La Porte D. C., Wierman B. M., Storm D. R. // Biochemistry (Wash.). — 1980. — Vol. 19. — P. 3814—3819.
14. Peterson G. L. // Analyt. Biochem. — 1971. — Vol. 83. — P. 346—356.
15. Picton P., Klee C. B., Cohen P. // Europ. J. Biochem. — 1980. — Vol. 111. — P. 553—561.
16. Prozialeck W. C., Weiss B. // J. Pharmacol. exp. Ther. — 1982. — Vol. 222. — P. 509—516.
17. Scuster J. R., Chan K. F. J., Graves D. J. // J. biol. Chem. — 1980. — Vol. 255. — P. 2203—2210.
18. Shenolikar S., Cohen P. T. W., Nairn A. C. et al. // Europ. J. Biochem. — 1979. — Vol. 110. — P. 329—337.
19. Teo T. S., Wang T. H., Wang J. H. // J. biol. Chem. — 1973. — Vol. 248. — P. 588—595.
20. Walsh K. X., Millikin D. M., Shlender K. K., Reimann E. M. // Ibid. — 1980. — Vol. 255. — P. 5036—5042.
21. Wang J. H., Sharma R. K., Huan C. Y. et al. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1982. — Vol. 356. — P. 190—204.
22. Weiss B., Earl C., Prozialeck W. C. // Psychopharmacol. Bull. — 1983. — Vol. 19. — P. 378—386.

Поступила 20.05.86

USE OF PHARMACOLOGICAL DRUGS IN STUDIES OF CALMODULIN INTERACTION WITH ENZYMES

I. A. Feoktistov, G. N. Baldenkov,
M. Yu. Men'shikov, N. P. Lariouov

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

Calmodulin-dependent regulation of cyclic nucleotide phosphodiesterase and kinase phosphorylase activities as well as Ca^{2+} -dependent regulation of kinase phosphorylase, mediated via the integrated calmodulin, were studied in presence of phenothiazine and butyrophenone series of pharmacological drugs. As compared with butyrophenones, phenothiazines were shown to be more effective inhibitors of calmodulin-dependent activation of the phosphodiesterase. Phenothiazines inhibited similarly the effect of calmodulin on activity of kinase phosphorylase, whereas they did not affect the Ca^{2+} -dependent activity of kinase phosphorylase. At the same time, butyrophenones proved to inhibit the Ca^{2+} -dependent activation of kinase phosphorylase, mediated via integrated calmodulin as well as these drugs inhibited uniformly the calmodulin-dependent regulation of both kinase phosphorylase and phosphodiesterase. The data obtained suggest that dissimilar effect of phenothiazines on calmodulin-dependent regulation of kinase phosphorylase and phosphodiesterase, carried out using dissimilar mechanisms, required an extreme caution in evaluation of physiological and biochemical experiments, where these drugs were used as means for study of calmodulin functions in biological processes.

Б. А. Коннов, О. П. Заргарова, Л. А. Коннова, В. Ф. Мелькишев

МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ФОНД СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ КРОВИ И СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ У БОЛЬНЫХ АДЕНОМОЙ ГИПОФИЗА ДО И ПОСЛЕ ПРОТОННОЙ ТЕРАПИИ

Центральный научно-исследовательский рентгено-радиологический институт Минздрава СССР, Ленинград

Определение содержания аминокислот крови и спинномозговой жидкости (СМЖ) редко проводят в клиниках ввиду методической сложности и затруднений в интерпретации результатов [11]. Хотя в норме пути обмена аминокислот хорошо изучены, при патологических состояниях их превращения в организме выявлены не полностью [7]. Аминокислоты обеспечивают не только синтез биологически активных соединений, но и участвуют в регуляции метаболических процессов [5]. Поскольку в превращениях самих аминокислот важную роль играют эндокринные факторы [8, 12], особый интерес представляет исследование свободных аминокислот крови и СМЖ при заболеваниях с известными гормональными нарушениями. Задача настоящей работы заключалась в сравнительном изучении особенностей состава аминокислот крови и СМЖ в норме и у больных с аденомой гипофиза, продуцирующей соматотропный гормон (СТГ), до лечения и на протяжении 3 лет после протонной терапии.

Методика

Обследовано 15 здоровых и 34 больных в возрасте 20—45 лет. У всех больных была диагностирована аденома гипофиза, продуцирующая СТГ, содержание которого в плазме крови определяли радиоиммунологическим методом на фоне инсулин-толерантного теста (ИТТ) из расчета 0,1 ЕД инсулина на 1 кг массы тела больного [3, 4]. У всех больных отмечены активная фаза акромегалии и повышенное содержание (в 1,5 раза) СТГ. Средняя концентрация СТГ во время ИТТ в крови больных составила $13,2 \pm 1,5$ мкг/л при норме $8,8 \pm 0,9$ мкг/л ($p < 0,02$). Все больные имели аденому гипофиза в стадии эндосellarного роста. Отсутствовал пик концентрации СТГ в ответ на инсулиновую гипогликемию в течение ИТТ. Исследования проводили до лечения и на протяжении 3 лет после протонной терапии, выполненной ранее опубликованным методом [4]. До протонной терапии и ежегодно после лечения проводили направленную пневмоэнцефалографию (НПЭГ) для исключения супрасellarного роста и контроля за опухолью. СМЖ для анализа забирали во время НПЭГ.

Суммарную фракцию свободных аминокис-

лот выделяли из сыворотки крови и СМЖ депротеинизацией сульфосалициловой кислотой (ССК). Кровь для анализа забирали катетером во всех случаях патологически, в одно и то же время суток (утром) из локтевой вены. 8 % раствор ССК добавляли к сыворотке крови из расчета 1:4, тщательно размешивали и оставляли на холоду на 1 ч, затем центрифугировали, надосадочную жидкость и рН доводили до 2,2. Ввиду меньшей концентрации аминокислот в СМЖ, депротеинизацию проводили с добавлением ССК в кристаллическом виде. Полученные образцы крови и СМЖ либо анализировали сразу, либо хранили в замороженном виде (при -20°C). Состав свободных аминокислот определяли двухколоночным методом жидкостной хроматографии на автоматическом аминокислотном анализаторе КЛА-5 фирмы «Хитачи» (Япония). Кислые и нейтральные аминокислоты разделяли на колонке со смесью 2613, используя цитратные буферы рН 3,35 и 4,28. Основные аминокислоты — на колонке со смесью 2611, с буфером рН 5,28 при температуре колонки 55°C . Поскольку данная программа анализа не предусматривает определение триптофана, он был добавлен в эталонную смесь аминокислот в соответствующем количестве. При элюировании с малой колонки триптофан был идентифицирован в первом пике, обнаруживаемом перед лизином. Концентрация аминокислот рассчитана в микромолях на 1 л сыворотки крови и СМЖ — в микрометрах на 1 л; результаты обрабатывали методом вариационной статистики.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 приведены результаты исследования концентрации аминокислот в сыворотке крови у 15 здоровых людей (20—45 лет) и в СМЖ у 5 лиц, у которых при комплексном обследовании не был подтвержден диагноз аденомы гипофиза, что позволяет нам принять уровень аминокислот в СМЖ этой группы обследованных за норму. Наши данные по составу свободных аминокислот крови и СМЖ у здоровых людей соответствующим имеющимся в литературе [1, 10, 11]. Как видно из табл. 1, в сыворотке крови в норме около одной четверти (23 ± 3 %) всех аминокислот составляют глутамин + глутаминовая кислота, кроме того, можно отметить высокое относительное содержание аланина (18 ± 2 %),

Концентрация свободных аминокислот в сыворотке крови и СМЖ у здоровых и больных аденомой гипофиза

Аминокислота, мкМ	Норма			Больные до лечения		
	СМЖ	сыворотка крови	СМЖ/кровь	СМЖ	сыворотка крови	СМЖ/кровь
три	14±1	150±10	0,09	20±2	169±20	0,12
лиз	27±6	202±24	0,13	18±1	139±18	0,13
гис	21±4	48±4	0,44	11±1	55±5	0,2
арг	20±1	40±6	0,5	13±1	60±5	0,22
асп	36±7	85±15	0,42	17±3	89±6	0,19
тре	25±3	120±26	0,21	25±8	83±8	0,3
сер	37±4	200±45	0,19	34±5	157±13	0,22
глу + глут	312±34	630±70	0,5	274±20	288±27	0,95
про	—	28±2	—	—	85±9	—
гли	38±3	280±30	0,14	15±1	211±16	0,07
ала	42±8	480±50	0,09	27±5	309±34	0,09
цис	—	24±6	—	—	43±4	—
вал	19±2	116±40	0,16	35±6	159±17	0,22
мет	6±0,1	15±2	0,4	12±4	46±4	0,26
иле	22±2	56±11	0,39	13±1,5	49±5	0,27
лей	41±4	120±10	0,34	4±0,6	130±15	0,03
тир	11±2	50±6	0,22	7±0,6	49±6	0,14
фен	16±2	58±12	0,28	8±1	51±6	0,16
	n = 5	n = 15		n = 34	n = 26	

лизина ($7 \pm 0,8 \%$), серина ($7 \pm 1,6 \%$) и лицина ($10 \pm 1 \%$). Аланин представляет собой основную гликогенную аминокислоту в организме человека, является главным предшественником глюкозы, синтезируемой в печени [8]. К гликогенным аминокислотам относятся также серин и глицин. 16 из 18 аминокислот, определяемых нами в сыворотке крови, присутствуют и в СМЖ, исключение составляют пролин и цистин, что согласуется с данными литературы [10]. Концентрация аминокислот в СМЖ значительно ниже, чем в сыворотке крови, соотношение СМЖ/кровь для большинства аминокислот колеблется в пределах 0,1—0,3. Глутамин+глутаминовая кислота составляют почти половину ($45 \pm 5 \%$) всех аминокислот СМЖ, доля каждой из них не превышает 1—6 %.

По нашим наблюдениям, у больных до лечения (см. табл. 1) концентрационный состав аминокислот крови и СМЖ имел определенные отклонения от нормы. Так, на фоне повышенного содержания СТГ в крови больных обнаружено снижение по сравнению с нормой уровня аланина на 36 % ($P < 0,01$), глутамин+глутаминовой кислоты — на 54 % ($P < 0,001$), лизина — на 31 % ($P < 0,05$) и глицина — на 25 % ($P < 0,05$). При этом относительное содержание глутамин+глу-

таминовой кислоты в крови больных также понижено и составляет не $23 \pm 3 \%$, а только $13 \pm 1 \%$ ($P < 0,001$) от общей суммы аминокислот. Уровень серосодержащих аминокислот цистина и метионина соответствовал $179 \pm 17 \%$ ($P < 0,01$) и $307 \pm 27 \%$ ($P < 0,001$) нормальных значений, концентрация пролина была втрое ($P < 0,001$) и аргинина — на 50 % ($P < 0,02$) выше нормы. Концентрация аминокислот, мало поглощаемых печенью, либо соответствовала таковой у здоровых людей (изолейцин и лейцин), либо имела тенденцию к возрастанию, что относится к уровню валина. Содержание остальных аминокислот в сыворотке крови больных до лечения практически не отличалось от контроля.

При анализе содержания аминокислот в СМЖ больных также обнаружены существенные отличия по сравнению со СМЖ здоровых людей. Значительно ниже нормы был уровень гистидина — на 48 % ($P < 0,02$), аргинина — на 35 % ($P < 0,001$), аспарагина — на 53 % ($P < 0,02$), глицина — на 61 % ($P < 0,001$), изолейцина — на 41 % ($P < 0,002$), фенилаланина — на 50 % ($P < 0,001$) и лейцина — на 90 % ($P < 0,001$). Соответственно наблюдали снижение соотношения концентраций перечисленных

Концентрация свободных аминокислот в сыворотке крови и СМЖ у больных после протонной терапии

Аминокислоты, мкМ	1-й			2-й			3-й		
	СМЖ	сыворотка крови	СМЖ/кровь	СМЖ	сыворотка крови	СМЖ/кровь	СМЖ	сыворотка крови	СМЖ/кровь
три	17±1	145±19	0,12	14±1	140±15	0,1	15±2	200±15	0,08
лиз	20±2	190±22	0,11	27±5	230±32	0,12	22±2	202±16	0,11
гис	14±1	45±5	0,31	15±5	46±9	0,33	16±4	49±5	0,33
арг	15±2	58±4	0,26	23±2	65±2	0,37	18±4	72±5	0,25
асп	16±5	93±8	0,17	30±8	91±8	0,33	25±8	84±8	0,3
тре	28±5	121±17	0,23	53±8	181±16	0,29	39±4	108±7	0,36
сер	33±6	200±19	0,17	67±8	248±27	0,27	45±4	129±9	0,35
глу + глут	229±34	501±34	0,46	303±34	456±41	0,66	340±40	450±40	0,8
про	—	61±9	—	—	48±4	—	—	23±2	—
гли	20±3	292±28	0,07	38±11	194±14	0,2	22±3	270±42	0,08
ала	42±7	356±56	0,12	72±10	422±34	0,17	51±9	462±23	0,11
цис	—	31±4	—	—	21±3	—	—	19±2	—
вал	17±3	131±17	0,13	35±3	113±9	0,31	26±6	112±9	0,23
мет	24±3	32±5	0,75	20±1	26±3	0,77	5±0,7	14±2	0,36
иле	27±5	43±6	0,63	32±2	37±3	0,86	19±2	40±4	0,48
лей	12±2	107±5	0,11	25±2	71±5	0,35	17±2	130±8	0,13
тир	8±1	44±5	0,18	14±2	58±3	0,24	9±0,5	42±6	0,21
фен	8±2	50±6	0,16	15±1	42±12	0,36	15±4	45±5	0,36
	n = 18	n = 17		n = 8	n = 13		n = 12	n = 10	

аминокислот СМЖ/кровь почти вдвое, а для лейцина — в 11 раз. В то же время уровень триптофана в СМЖ больных превышал норму на 43 % ($P < 0,01$) и валина — на 84 % ($P < 0,01$), при этом в 1,4 раза возросло и соотношение концентраций СМЖ/кровь. Уровень остальных 7 аминокислот в СМЖ больных не имел достоверных отличий от нормы; прослеживалась лишь тенденция к снижению содержания лизина, серина, аланина, тирозина и глутамин+глутаминовой кислоты, и к повышению уровня метионина ($P > 0,1$).

Через год после протонной терапии мы наблюдали у больных подавление активности СТГ-продуцирующей аденомы гипофиза. Отмечено достоверное снижение средней концентрации СТГ в крови в течение ИТТ с $13,2 \pm 1,5$ мкг/л (исходный уровень) до $8,5 \pm 1,1$ мкг/л ($P < 0,02$), что соответствует уровню гормона в крови в течение ИТТ у здоровых людей — $8,8 \pm 0,9$ мкг/л ($P > 0,5$). Далее, в течение всего периода наблюдений, уровень СТГ сохранялся в пределах нормы, составляя через 2 и 3 года $8,3 \pm 1$ и $8,0 \pm 1,4$ мкг/л соответственно.

Анализ динамики изменений уровня свободных аминокислот у больных в

течение 1—3 лет после протонной терапии позволяет отметить, что на фоне нормализации содержания СТГ в крови и ремиссии заболевания восстанавливается практически до нормы и концентрационный состав аминокислот как в сыворотке крови, так и в СМЖ (табл. 2).

Как видно из табл. 2 и 1, через 1 год после протонной терапии восстанавливалось до нормы ($P < 0,05$ во всех случаях по сравнению с исходным уровнем) в сыворотке крови содержание 5 аминокислот, включая лизин, глутамин+глутаминовую кислоту, аланин и цистин. Концентрация лизина в сыворотке крови больных возрастала к этому времени на 33 %, глутамин+глутаминовой кислоты — на 74 % ($P < 0,01$), глицина — на 38 % ($P < 0,02$) и аланина — на 15 % ($P < 0,05$). Уровень цистина в этой группе больных (через 1 год после лечения) уменьшился на 28 % ($P < 0,05$) по сравнению с исходным. В то же время следует отметить, что, несмотря на существенное снижение исходных значений уровня пролина и метионина (на 28 и 30 % соответственно; $P < 0,05$), концентрация этих аминокислот остается выше, чем у здоровых лиц: пролина на 118 %

($P < 0,01$) и метионина на 113 % ($P < 0,02$).

Содержание треонина и серина, хотя достоверно увеличилось по сравнению с показателями, отмеченными до лечения (на 46 и 27 %; $P < 0,05$), но сохранилось в пределах нормы как и до облучения ($P > 0,5$ по сравнению с нормой в обоих случаях). Со стороны остальных аминокислот можно отметить тенденцию к снижению, по сравнению с исходным уровнем, лейцина, валина, гистидина и триптофана ($P > 0,1$). В то же время в СМЖ больных нормализовался уровень гистидина, который был выше исходного на 27 % ($P < 0,05$), изолейцина, превысившего исходный на 108 % ($P < 0,01$), и валина, уровень которого уменьшился на 52 % ($P < 0,01$). Практически нормализовались соотношения концентраций СМЖ/кровь для гистидина, валина и глутамин+глутаминовой кислоты. В этой же группе обследованных больных обращает на себя внимание значительное повышение уровня метионина и лейцина в СМЖ, на 100 и 200 % по сравнению с исходными значениями ($P < 0,02$), на фоне снижения их уровня в крови на 30 и 20 % соответственно ($P < 0,05$). Возрастание уровня лейцина в СМЖ больных можно считать положительной динамикой. То же самое можно отметить и в отношении наблюдаемой тенденции к снижению концентрации триптофана.

Наметилась тенденция и к нормализации в СМЖ уровня аргинина, который оставался все же ниже нормы на 25 % ($P < 0,05$, до лечения на 53 %). Сохранилась, как и до лечения, разнонаправленность изменений концентраций этой аминокислоты — в сыворотке крови уровень превышал норму на 45 % ($P < 0,02$), в СМЖ — ниже нормы на 25 % (до лечения 50 и 35 % соответственно). На фоне достоверной нормализации концентрации глицина в сыворотке крови проявилась тенденция и к нормализации его уровня в СМЖ. Концентрация аланина не отличалась от нормы ($P > 0,05$). Содержание аспарагина и фенилаланина до лечения и через год после него не изменилось, оставаясь заниженным примерно в 2 раза ($P < 0,05$ и $P < 0,01$ соответственно). Уровни глутамин+глутаминовой кислоты, лизина, треонина, серина и тирозина были

такими же, как до лечения, и не отличались от нормы ($P > 0,5$ во всех случаях).

Через 2 года после лечения в сыворотке крови и СМЖ больных остались стабильными достигнутые уже через 1 год нормальные концентрации 6 аминокислот (за исключением глицина в сыворотке крови и валина СМЖ). Кроме того, в СМЖ восстановились до уровня, свойственного здоровым людям концентрации триптофана, аргинина, аспарагина и фенилаланина. Таким образом, ко 2-му году после облучения у больных нормализовался концентрационный состав 4 аминокислот в сыворотке крови и 6 — в СМЖ, т. е. 10 (67 %) из 15 аминокислот с нарушенными концентрациями до лечения. При этом содержание триптофана уменьшилось на 30 % от исходного уровня ($P < 0,01$) и на 18 % по сравнению с 1-м годом после облучения ($P < 0,05$). Содержание аргинина возросло на 77 % от исходного уровня ($P < 0,001$) и на 53 % по сравнению с исследованием, проведенным через год ($P < 0,01$). Уровень аспарагина и фенилаланина возрос почти на 90 % от исходного значения ($P < 0,05$). Отмечены и другие существенные изменения концентраций аминокислот в этот срок наблюдения.

В сыворотке крови, несмотря на нормализацию концентрации через 1 год после лечения, уменьшился до исходного уровень глицина, который составил примерно 70 % от нормы ($P < 0,01$). Оставались повышенными концентрации аргинина (на 55 %; $P < 0,01$), пролина (на 71 %; $P < 0,001$) и метионина (на 33 %; $P < 0,001$). Содержание аргинина было практически таким же, как до лечения и через год после него. Концентрации остальных аминокислот практически не отличались от исходных значений и нормы.

В СМЖ больных повысился уровень валина (в 2 раза по сравнению с исследованием через 1 год; $P < 0,001$). Более выраженной стала тенденция к нормализации концентрации лейцина, которая возросла в 2 раза ($P < 0,001$) относительно 1-го года (или в 6,3 раза исходного уровня; $P < 0,001$) и стала меньше нормы лишь в 1,6 раза ($P < 0,001$). Соотношение концентраций лейцина СМЖ/кровь достигло практически нормы — 0,35. Содержа-

ние метионина несколько понизилось (на 17 %) по сравнению с 1-м годом, но осталось выше нормы в 3,3 раза ($P < 0,001$), коэффициент соотношения концентрации метионина СМЖ/кровь превышал норму почти вдвое (0,77). Концентрация аланина возросла в 1,7 раза по сравнению с нормой. Остальные 5 аминокислот, так же как и через 1 год после лечения, по концентрации не отличались от таковой у здоровых людей.

Через 3 года после лечения в сыворотке крови и СМЖ больных отмечены нормальные концентрации большинства аминокислот. Из 8 аминокислот сыворотки крови, концентрации которых до лечения отличались от уровня, свойственного здоровым людям, у 6 (лизина, пролина, глицина, аланина, цистина и метионина) отмечено полное восстановление концентрационного состава до нормы ($P > 0,5$ во всех случаях). Продолжал сохраняться высокий уровень аргинина, превышающий норму на 80 % ($P < 0,001$), несколько ниже нормы был уровень глутамин+глутаминовой кислоты (на 29 %; $P < 0,05$). Из 9 аминокислот СМЖ с нарушенной до лечения концентрацией, у 7 (триптофана, гистидина, аргинина, аспарагина, валина, изолейцина и фенилаланина) уровень стал таким же, как и у здоровых ($P > 0,05$ во всех случаях). Ниже нормы на 42 % ($P < 0,001$) и на 59 % ($P < 0,001$) оставалось содержание соответственно глицина и лейцина. Следует отметить, что у двух аминокислот с одновременными нарушениями концентраций в сыворотке крови и СМЖ — аргинина и глицина, восстановление уровня наблюдалось либо в СМЖ (аргинин), либо в сыворотке крови (глицин). Таким образом, у 11 (73 %) из аминокислот с отклонениями концентраций от нормы отмечено восстановление содержания до нормы в сыворотке крови и СМЖ больных через 3 года после протонной терапии. Несколько выше нормальных значений были уровни триптофана в сыворотке крови (на 33 %; $P < 0,01$) и треонина в СМЖ (на 56 %; $P < 0,01$). Содержание остальных аминокислот не отличалось от концентраций, характерных для здоровых людей.

Известно, что метаболический фонд свободных аминокислот крови достаточно постоянен и представляет собой

резерв организма, связанный с многочисленными сторонами обмена веществ, прежде всего с белковым и углеводным обменом [5, 7, 8]. Сдвиг концентрационного равновесия аминокислот крови, обнаруженный нами у больных с аденомой гипофиза, наблюдается на фоне высокого содержания в крови больных СТГ. Известно, что этот гормон, с одной стороны, оказывает анаболическое действие, стимулируя усвоение аминокислот тканями и включение их в белки, и с другой стороны, снижает скорость деградации белков, подавляя протеолитические процессы и, следовательно, уменьшает поступление аминокислот в кровь [9]. Результаты предыдущего исследования [3] показали, что при данном заболевании имеется высокий уровень активности антипротеаз крови, что косвенно указывает на повышение синтеза белков в печени. Известно также, что СТГ активирует глюконеогенез в печени [2, 8], стимулируя скорость поступления аминокислот, что может лежать в основе наблюдаемого нами уменьшения содержания гликогенных аминокислот крови и прежде всего аланина и глутамин. Аланин представляет собой ключевую аминокислоту, активно участвующую как в процессах трансаминирования, так и глюконеогенеза в печени, и снижение его уровня в крови свидетельствует не только о повышении синтеза тканевых белков, что имеет место при данном заболевании, но и о стимуляции глюконеогенеза в печени. Кроме того, аланин и глутамин являются главными рециркулирующими эндогенными аминокислотами, в связи с чем изменение их содержания свидетельствует также о нарушении промежуточного обмена аминокислот, их синтеза, взаимопревращений и реутилизации. Изменения концентрации аргинина в крови и СМЖ у обследованных больных представляют интерес в связи с имеющимися данными о широком спектре регуляторного влияния аргинина на обмен веществ, в том числе и на гормональный баланс организма [5]. Известно, что в сложной цепи регуляторных механизмов синтеза и деградации аргинина определенную роль играет гормональный контроль, в связи с чем высокий уровень СТГ в крови может быть взаимосвязан с пре-

вращениями этой аминокислоты в организме.

В СМЖ у больных на фоне пониженного уровня в крови обнаружено снижение (или тенденция к снижению) концентрации большинства аминокислот — лизина, серина, глутамин+глутаминовой кислоты, глицина, аланина, изолейцина и фенилаланина. В то же время уровень аминокислот, превышающий норму в сыворотке крови — валина, триптофана и метионина, был повышен и в СМЖ. Это не относится к аргинину, концентрация которого в СМЖ была ниже нормы на 35 % ($P < 0,001$), на фоне повышенного на 50 % ($P < 0,02$) содержания его в крови. Тенденция к такой направленности изменений в крови и в СМЖ обнаружена для гистидина, аспарагина и лейцина, что в определенной мере может быть результатом изменения проницаемости гематоэнцефалического барьера. В пользу такого предположения свидетельствует и тенденция к снижению в СМЖ у больных глутамин+глутаминовой кислоты, поскольку особенность к повышению этой аминокислоты в СМЖ характерна для многих патологических состояний и утрачивается только при нарушениях гематоэнцефалического барьера [6]. Об изменении проницаемости гематоэнцефалического барьера позволяет говорить и ранее опубликованные данные о низком уровне антипротеаз в СМЖ при данном заболевании [3].

Таким образом, результаты анализа концентрационного состава аминокислот крови и СМЖ у больных с аденомой гипофиза, продуцирующей СТГ, и динамика изменений уровня аминокислот на фоне нормализации содержания СТГ на протяжении 3 лет после проведенного лечения позволяют говорить о зависимости концентрации аминокислот крови и СМЖ от уровня СТГ в организме. Сниженный уровень гликогенных аминокислот и прежде всего аланина в крови на фоне высокого содержания СТГ у больных свидетельствует об активации глюконеогенеза в печени и об участии СТГ в регуляции скорости этого процесса. Выявленные нарушения соотношений отдельных аминокислот СМЖ/кровь косвенно свидетельствуют об изменении со стороны гематоэнцефалического барьера, возможно, компенсаторного характера. Обнаруженные при дан-

ном заболевании нарушения обмена аминокислот патогномичны и являются одним из звеньев в сложной цепи патогенеза, связанного с нарушениями гормонального статуса. Проведенная протонная терапия привела к постепенному регрессу заболевания, снижению до нормы СТГ и нормализации уровня большинства аминокислот в крови и СМЖ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бредбери М. Концепция гематоэнцефалического барьера: Пер. с англ. — М., 1983.
2. Генес С. Г. // Пат. физиол. — 1974. — № 6. — С. 74—81.
3. Заргарова О. П., Коннова Л. А. // Вопр. мед. химии. — 1983. — № 6. — С. 96—98.
4. Коннов Б. А., Шустин Б. А. и др. // Использование протонных пучков в лучевой терапии. — М., 1979. — Вып. 3. — С. 50—57.
5. Кричевская А. А., Лукаш А. И., Шугалей В. С., Бондаренко Т. И. Аминокислоты, их производные и регуляции метаболизма. — Ростов н/Д, 1983. — С. 59.
6. Фейгин Г. А., Кацук Л. И., Егоров В. И. // Лаб. дело. — 1975. — № 1. — С. 10—13.
7. Хашен Р., Шейх Д. Очерки по патологической биохимии: Пер. с нем. — М., 1981.
8. Шапот В. С., Блинов В. А. // Успехи биол. химии. — 1975. — Т. 16. — С. 196—213.
9. Gluidolli G., Borgnelli A., Gazzola G. // Biochim. biophys. Acta. — 1978. — Vol. 515. — P. 329—366.
10. Mc Gall C., Pye J., Stonier C. et al. // J. Neurochem. — 1977. — Vol. 29. — P. 291—297.
11. Van Steirteghem A., Young D. // Amino Acid Determination, Methods and Techniques. — New York, 1978. — P. 261—317.
12. Wise J., Hendler R., Felig P. // J. clin. Invest. — 1973. — Vol. 52. — P. 2774—2780.

Поступила 30.05.86

METABOLIC POOL OF FREE AMINO ACIDS IN BLOOD AND CEREBROSPINAL FLUID OF PATIENTS WITH ADENOMA OF HYPOPHYSIS BEFORE AND AFTER PROTON THERAPY

B. A. Konnov, O. P. Zargarova,
L. A. Konnova, V. F. Mel'kischev

Central X-ray Radiological Institute, Ministry of Public Health of the USSR, Leningrad

A pool of free amino acids was studied in blood and cerebrospinal fluid of 34 patients with adenoma of hypophysis before proton therapy and within 3 years after the treatment. The course of proton therapy was shown to cause a regression of the disease, a decrease in content of somatotrophic hormone in blood as well as to normalize the metabolic pool of amino acids in blood and cerebrospinal fluid.

Г. В. Троицкий, Г. А. Касьмова, С. И. Борисенко

СТЕПЕНЬ МОДИФИКАЦИИ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА КАК ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ТЕСТ

Крымский медицинский институт, Симферополь

При патологических состояниях в крови людей и животных выявляются разные формы альбумина: нативная и модифицированная [2]. Конформационные и другие физико-химические свойства исходной электрофоретической фракции альбумина при патологии в значительной степени зависят от присутствия и концентрации модифицированных форм [11].

По существу модифицированный альбумин следует относить к белкам острой фазы [10, 13]. Модифицированные формы оказались множественными и представляют собой конформеры с различными лигандами [1, 8]. Кроме того, известно, что альбумин, являясь фактором детоксикации, образует формы, отличающиеся по свойствам от нативного белка [5, 6, 9]. В связи с этим выявление модифицированных форм альбумина, особенно при контакте с токсическими веществами, представляет определенный интерес.

Определение модифицированного альбумина раньше требовало предварительного выделения чистого белка, что для клинических лабораторий не всегда приемлемо. Нами разработан метод количественного анализа модифицированного альбумина непосредственно в сыворотке крови. Он сочетается в себе электрофорез сыворотки с последующей обработкой электрофореграмм кислым этанолом.

В настоящей работе представлены данные о количественном содержании модифицированного альбумина у людей, работающих в условиях химического производства и контактирующих с токсичными агентами. Полученные результаты сопоставляли с клиническим состоянием обследованных лиц.

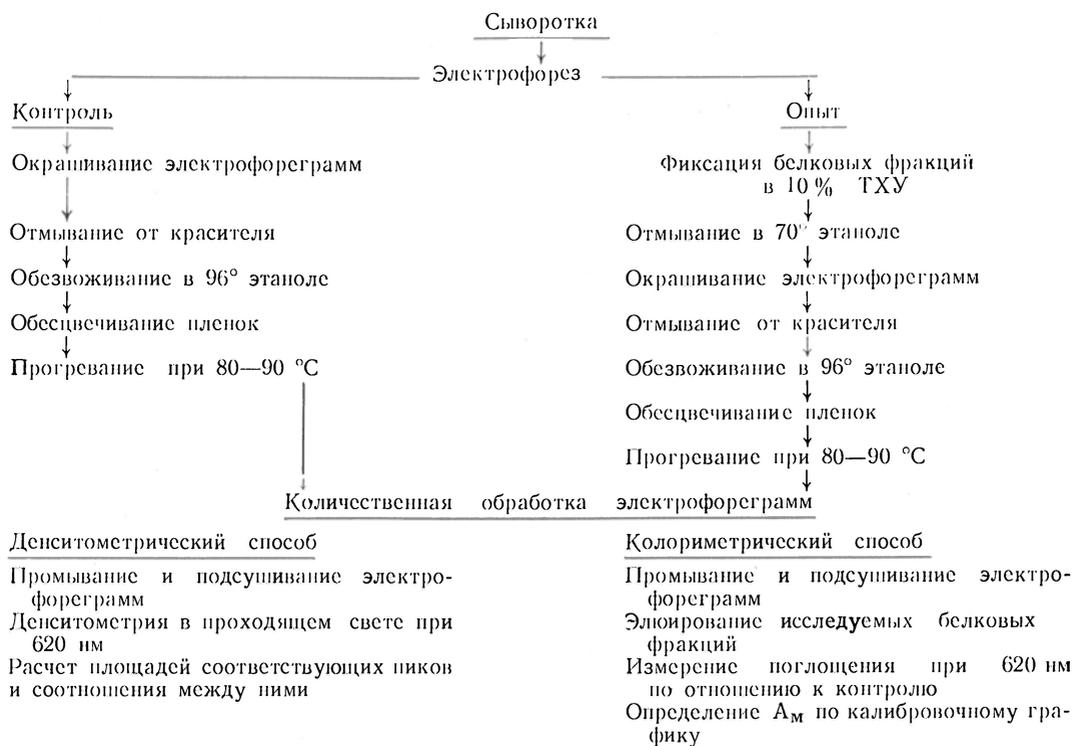
Методика

Метод количественного определения модифицированной формы альбумина после электрофореза сыворотки крови на ацетатцеллюлозных пленках. Электрофорез проводили в модифицированном аппарате ПЭФ-3, в камеру которого помещали рамку с натянутой леской. На рамку накладывали мостики из фильтро-

вальной бумаги. Работали с пленкой из ацетатцеллюлозы шириной 25 мм, выпускаемой ВНИИСС (г. Владимир) и КПО «Тасма» (Казань). Использовали 0,05 М медиал-цитратный или вероналовый буфер, рН 8,6. Электрофорез осуществляли в течение 1 ч при 120 В с силой тока 0,5 мА/см. Электрофоретический путь составлял 50 мм. Получали 5 белковых фракций. Во всех исследуемых случаях наносили по 4 мкл сыворотки, разбавленной водой до определенной концентрации общего белка, например до 3%. Одновременно проводили электрофорез на 8 пленках с обязательным использованием контрольной сыворотки здорового человека. Для протитывания пленок буфером их предварительно выдерживали в течение 5 мин на поверхности, а затем погружали в буфер на 10 мин. Место нанесения сыворотки надрезали. По окончании электрофореза контрольные пленки (без ТХУ-этаноловой обработки) окрашивали сразу в 0,5% растворе амидо черного 10Б в течение 5 мин и трижды отмывали в смеси этанол — уксусная кислота — вода (3,6:1:5,6). Пленки с опытными образцами после электрофореза помещали на 5 мин в 10% ТХУ, затем выдерживали 60 мин в 70% этаноле. После такой обработки электрофореграммы окрашивали вышеописанным способом. Для получения прозрачного фона пленки обрабатывали 5 мин 96% этанолом, а затем раствором для обезбачивания (этанол — уксусная кислота — глицерин, 82:15:3) и прикрепляли к обезжиренному предметному стеклу. Обработанные таким образом пленки с контрольными и опытными образцами прогревали при 80—90°C до полного обезбачивания 5 мин [7, 12]. При наличии модифицированной формы альбумина этот белок фиксируется на пленке после обработки ТХУ-этанолом (рис. 1, б-2 см. на вклейке). У здоровых лиц нативная альбуминовая фракция отмывается (рис. 1, а-2).

Количественную обработку электрофореграммы проводили колориметрическим или денситометрическим способами [7, 12]. В первом случае колориметрирование проводили на спектрофотометре «Спектротом-204» при 620 нм. Для этого пленки промывали в дистиллированной воде и подсушивали на фильтровальной бумаге. Затем вырезали белковые фракции и элюировали их в 3 мл, в альбумин — в 6 мл смеси: 1 н. NaOH — 0,1 н. ЭДТА — вода (5:0,5:5) в течение 40 мин. При втором способе электрофореграммы денситометрировали в проходящем свете при той же длине волны на денситометре фирмы «Beckman». Перед этим пленки также промывали в воде и подсушивали на фильтровальной бумаге, а затем вырезали вдоль узкую полоску пленки по размеру используемой кюветы, в которую помещали электрофореграмму. Количественное содержание белковых фракций рассчитывали по соотношению площадей соответствующих пиков (рис. 2 см. на вклейке). Приведена схема метода, использованного в работе.

Схема метода количественного анализа модифицированного альбумина в сыворотке крови на ацетатцеллюлозных пленках



Примечание. После окрашивания электрофореграмм в опыте у здоровых доноров альбуминовая фракция практически отсутствует, а при интоксикации после анализа по схеме модифицированный альбумин выявляется на пленке.

В работе исследовали сыворотки крови от 42 практически здоровых людей, 15 сывороток от служащих предприятий, не связанных непосредственно с производством, 127 сывороток крови людей, занятых на химическом производстве. Контроль за клиническим состоянием обследованных рабочих проводили врачи здравпунктов предприятий.

Нами исследована кровь рабочих с завода «Бытовая химия» Симферополя из цехов № 1 (синтетические моющие средства, СМС) и № 2 (производство аэрозолей), а также людей, занятых на производстве химического завода г. Саки в цехах № 2 (производство брома), № 6 (производство марганца) и № 4 (производство метила). Эти цехи считаются наиболее вредными в условиях данных химических предприятий. Рабочие в них непосредственно связаны с токсичными веществами и работают при расфасовке и приготовлении составов от 5 до 25 лет.

Для полного анализа результатов с целью учета сопутствующих заболеваний были просмотрены медицинские карты.

Результаты и обсуждение

Результаты количественного определения модифицированного альбумина представлены в табл. 1, из которой видно, что у рабочих химических цехов содержание в крови модифицированной формы альбумина значительно

выше, чем у здоровых доноров и служащих, не связанных непосредственно с производством.

Таблица 1
Содержание модифицированного альбумина у рабочих вредных химических производств

Группа обследуемых	Число обследуемых	Содержание модифицированного альбумина, %
Здоровые доноры	42	$2,20 \pm 0,24$
Служащие предприятий, не связанные с производством	15	$4,53 \pm 0,41$
Рабочие завода «Бытовая химия»		
Цех № 1 (СМС)	20	$23,40 \pm 5,00^*$
» № 2 (аэрозоли)	21	$18,50 \pm 3,70^*$
Рабочие химического завода		
Цех № 6 (марганец)	29	$22,30 \pm 4,20^*$
» № 2 (бром)	22	$20,60 \pm 3,40^*$
» № 4 (бромистый метил)	20	$11,00 \pm 3,20^*$

* $P < 0,01$ по сравнению с группой здоровых доноров.

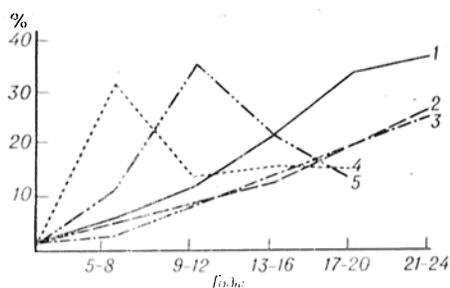


Рис. 3. Зависимость содержания модифицированного альбумина от стажа работы на вредном химическом производстве.

По оси абсцисс — стаж работы (годы); по оси ординат — содержание модифицированного альбумина (в %): 1—5 — цехи по производству брома, 2 — марганца, 3 — бромистого метила, 4 — СМС и 5 — аэрозолей соответственно.

Ранее отмечалось токсическое воздействие СМС на организм человека, при котором выявлены изменения свойств альбумина [3, 4]. Эти данные подтверждены и нашими исследованиями. Анализ электрофорограмм сыворотки крови рабочих химического завода показал, что наибольшее содержание модифицированной формы альбумина регистрируется у людей, связанных с производством марганца,

ца, — 22,3 %. При изготовлении брома выявлено 20,6 % модифицированного белка, а в цехе, где выпускают бромистый метил, среднее значение модифицированного альбумина составляет 11 %.

На рис. 3 приведены данные о количественном содержании модифицированного альбумина в крови в зависимости от стажа работы. Из рисунка следует, что после 5 лет работы у рабочих в цехе № 1 (СМС) количество модифицированного альбумина увеличивается до 32 %, в цехе же № 2 (аэрозоли) увеличение этого показателя до 37,4 % наблюдается лишь через 11 лет работы на данном производстве. Затем содержание модифицированного белка в обоих цехах уменьшается и через 20 лет достигает среднего значения — около 13 %. Остается неясным, отражает ли это снижение адаптацию организма или происходит истощение детоксикационного резерва альбумина.

Из полученных результатов видно, что все цехи химического завода отличаются значительной степенью токсичности, при которой выявляется вы-

Таблица 2

Максимальное содержание модифицированного альбумина у некоторых людей, занятых на вредном химическом производстве, с учетом сопутствующих заболеваний

Обследуемые лица	Стаж работы, годы	Возраст, годы	Содержание модифицированного альбумина, %	Сопутствующие заболевания
Завод «Бытовая химия»				
цех № 1 (СМС)				
Ф-о	5	34	50,0	Острый ринофарингит
Я-я	6	38	58,1	Операция по поводу панкреатита, ОРЗ
цех № 2 (аэрозоли)				
Е-н	8	52	62,7	Гипертония I стадии, алкоголизм, ОРЗ
К-а	12	52	58,8	Конъюнктивит (лечение пенициллином)
Химический завод				
цех № 2 (бром)				
П-в	15	39	40,1	Хронический холецистит, алкоголизм, ОРЗ
С-а	16	42	38,3	Полиартрит, туберкулез почки (удалена)
К-о	18	39	41,1	ОРЗ, неврастенический синдром
П-а	18	47	38,7	ОРЗ, полиартрит
цех № 6 (марганец)				
М-а	13	38	78,9	Ревматизм, хронический холецистит
Х-я	10	47	68,6	ОРЗ, полиартрит (лечение тетрациклином)
К-н	13	44	74,4	ОРЗ, хронический холецистит, радикулит, заболевания сердца, гипертония I стадии
С-к	26	49	36,2	Гипертония I стадии
В-а	22	43	55,8	Лекарственная аллергия, ОРЗ, бронхиальная астма

сокое содержание модифицированного альбумина в крови людей, длительное время контактирующих с вредными веществами на данном химическом производстве.

Следует отметить, что особенно высокая концентрация модифицированного альбумина (более 50 %) наблюдалась в группе, в которую входили лица, злоупотребляющие алкоголем, после длительного лечения антибиотиками, а также лица с сопутствующими хроническими заболеваниями печени (табл. 2).

Анализ полученных результатов позволяет говорить о том, что метод определения степени модификации альбумина в крови можно использовать как токсикологический тест.

ЛИТЕРАТУРА

1. Багдасарьян С. П., Алахов Ю. Б., Троицкий Г. В. // Докл. АН СССР. — 1980. — Т. 225, № 1. — С. 222—224.
2. Багдасарьян С. П., Троицкий Г. В. // Молекуляр. биол. — 1972. — № 8. — С. 97—99.
3. Заречная И. П., Багдасарьян С. П., Троицкий Г. В. и др. // Укр. биохим. журн. — 1982. — Т. 54, № 4. — С. 383—388.
4. Заречная И. П., Троицкий Г. В. // Патология систем крови и кровообращения. — Симферополь, 1978. — С. 43—45.
5. Луйк А. И., Лукьянчук В. Д. Сывороточный альбумин и биотранспорт ядов. — М., 1984.
6. Луйк А. И., Лукьянчук В. Д., Лебедев О. И. и др. // Докл. АН СССР. — 1983. — Т. 268, № 2. — С. 488—492.

7. Пушкарев И. А., Удрис О. Ю., Гусева Л. Н. // Лабораторная диагностика. Клиническая биохимия. — М., 1979. — С. 173—174.
8. Троицкий Г. В., Ажицкий Г. Ю., Селиванова К. Ф., Соколова П. П. // Докл. АН УССР. — 1981. — № 7. — С. 83—85.
9. Троицкий Г. В., Соркина Д. А. // Биохимия. — 1956. — Т. 21, № 6. — С. 784—792.
10. Троицкий Г. В., Багдасарьян С. П. // Бюл. экспер. биол. — 1973. — № 8. — С. 48—50.
11. Троицкий Г. В., Рыбалка А. Н., Багдасарьян С. П. и др. // Вопр. онкол. — 1982. — № 1. — С. 28—33.
12. Электрофорез белков на пленках из ацетатцеллюлозы в клинической лаборатории. (Метод. рекомендации). — М., 1980.
13. Silvestrini B., Natali P., Catanese B. et al. // Canad. J. Biochem. — 1980. — Vol. 58. — P. 89—92.

Поступила 21.05.86

THE RATE OF BLOOD SERUM ALBUMIN MODIFICATION AS A TOXICOLOGICAL TEST

G. V. Troitsky, G. A. Kasymova,
S. N. Borisenko

Crimean Medical School, Simpheropol

A procedure is developed, involving electrophoresis and TCA-ethanol treatment of electrophoregrams, which enabled to estimate quantitatively the modified derivatives of albumin just in blood serum without the protein isolation. The method is based on ability of native albumin to maintain its solubility after TCA-ethanol treatment. At the same time, modified albumin with conformational alterations was fixed on a carrier and might be estimated using colorimetry or densitometry. The procedure developed might be used in chemical industry for evaluation of toxic effects of some substances.

УДК 616.379-008.64-092.9-07;616.153.915-39-053-092.9

Л. М. Мажуль

НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В КРОВИ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА ПРИ АЛЛОКСАНОВОМ ДИАБЕТЕ

Сектор геронтологии АН БССР, Минск

Важную роль в повреждении сосудистой стенки при диабете играют нарушения липидного обмена [3, 4]. Вместе с тем [1] не всегда выявляются достоверные различия в уровне холестерина, триглицеридов и липопротеидов в плазме крови при обследовании больных с инсулинзависимой формой сахарного диабета и у здоровых людей. Сформировалось мнение о ведущей роли в развитии сосудистых поражений активации процессов перекисного окисления липидов — ПОЛ

[2, 4, 5]. Так, показано увеличение содержания плазменно-липидных перекисей у больных диабетом [10]. При наличии ангиопатий уровень липидных перекисей был значительно выше [9].

Мы изучали некоторые показатели ПОЛ у крыс разного возраста в норме и при аллоксановом диабете.

Методика

Эксперименты проведены на 31 старой (24—26 мес) и 36 молодых (4—5 мес) крысах-самцах линии Вистар. О состоянии процесса ПОЛ

Изменение некоторых биохимических показателей в сыворотке крови крыс разного возраста в норме и при трехдневном аллоксановом диабете ($\bar{x} \pm S\bar{x}$)

Условия опыта	Молодые крысы				Старые крысы			
	глюкоза, ммоль/л	общие липиды, г/л	МДА, Д ₅₃₂ /мг липида	СОД, ед. акт/мл крови	глюкоза, ммоль/л	общие липиды, г/л	МДА, Д ₅₃₂ /мг липида	СОД, ед. акт/мл крови
Контроль	3,8±0,1 (24)	1,99±0,13 (10)	0,06±0,007 (9)	2360±65 (4)	4,2±0,2 (17)	2,63±0,32 (8)	0,04±0,002 (10)	2165±275 (5)
Диабет	11,8±1,25* (5)	3,94±0,49* (11)	0,1±0,02** (12)	4205±624* (5)	13,5±1,6* (5)	5,72±0,45* (11)	0,11±0,02* (5)	3168±275** (5)

Примечание. Здесь и в табл. 2 в скобках число животных; одна звездочка — $P < 0,01$, две — $P < 0,05$.

судили по содержанию малонового диальдегида — МДА [11], которое выражали в единицах оптической плотности на 1 мг липида (Д₅₃₂/мг липида). Активность цинк-медьсодержащей супероксиддисмутазы (супероксид: супероксид оксиредуктаза, КФ. 1.15.1.1) определяли по методу [7]. Концентрацию глюкозы в крови определяли ортотолуидиновым методом, используя стандартные наборы в соответствии с прилагаемой к ним инструкцией. Общие липиды исследовали с помощью наборов «Био-тест» («Lachema», ЧССР). Модель трехдневного аллоксанового диабета воспроизводили внутрибрюшинным введением аллоксана в дозе 13,5 мг на 100 г массы тела. Модель 10-дневного аллоксанового диабета вызывали двукратным введением аллоксана (1-й и 4-й дни) в дозе 13 мг на 100 г массы тела. Дозы аллоксана подбирали в специальных экспериментах.

Результаты обрабатывали методом вариационной статистики.

Результаты и обсуждение

Как показали проведенные исследования, содержание МДА, продукта ПОЛ в сыворотке крови старых крыс в пересчете на 1 мг липида достоверно не отличается от такового у молодых крыс (табл. 1). Интенсивность накопления продуктов ПОЛ зависит от наличия субстратов окисления и активности антиокислительной системы организма. По нашим данным, активность одного из основных антиоксидантных ферментов — цинк-медьсодержащей супероксиддисмутазы в гемолизе эритроцитов при старении достоверно не изменялась. Что касается субстратов окисления, то в сыворотке крови старых интактных крыс содержание общих липидов было повышено по сравнению с таковым у молодых крыс в 1,4 раза. Это позволяет предположить, что общее содержание продуктов ПОЛ в сыворотке крови с возрастом увеличивается, но поскольку при старении отмечается липидемия, то в пересчете на 1 мг липида этот возрастной подъем нивелируется.

У крыс с трехдневным аллоксановым диабетом отмечается высокий уровень глюкозы в сыворотке крови: у молодых — повышение в 3 раза, у старых — в 3,2 раза (см. табл. 1). Кроме того, в сыворотке крови отмечалось накопление МДА. Причем у старых крыс повышение его концентрации было значительно выше (на 150 %; $P < 0,01$), чем у молодых (на 66 %; $P < 0,05$). Вероятно, отмеченное различие может быть связано с возрастными изменениями в системе антиокислительной защиты организма. Действительно, если у молодых крыс в процессе развития аллоксанового диабета активность цинк-медьсодержащей супероксиддисмутазы возрастает на 78 % ($P < 0,01$), то у старых — только на 46 % ($P < 0,05$). В то же время уровень общих липидов у животных обеих возрастных групп увеличивался примерно одинаково — в 2 раза.

Установленное нами более высокое содержание токсичных продуктов перекисного окисления липидов у старых животных, возможно, связано с такой важной особенностью сахарного диабета пожилых, как преобладание поражения сердечно-сосудистой системы.

Следует принять во внимание, что у крыс при остром аллоксановом диабете (через 3 сут после введения препарата) наблюдаемые изменения могут быть обусловлены не только развивающимся диабетом, но и токсическим действием аллоксана. Поэтому была проведена серия опытов на экспериментальной модели диабета с десятидневным сроком от начала введения аллоксана.

При десятидневном аллоксановом диабете отмечалась более выраженная гипергликемия. Уровень глюкозы у молодых крыс повышался в 3,4 раза,

Изменение некоторых биохимических показателей в сыворотке крови крыс разного возраста в норме и при десятидневном аллоксановом диабете ($\bar{x} \pm Sx$)

Условия опытов	Молодые крысы				Старые крысы			
	глюкоза, ммоль/л	общие липиды, г/л	МДА, Д ₅₃₂ /мг липида	СОД, ед. акт/мл крови	глюкоза, ммоль/л	общие липиды, г/л	МДА, Д ₅₃₂ /мг липида	СОД, ед. акт/мл крови
Контроль	3,8±0,1 (24)	2,35±0,34 (6)	0,146±0,016 (5)	1420±155 (4)	4,2±0,2 (17)	3,29±0,27 (6)	0,169±0,024 (6)	1484±79 (5)
Диабет	13,2±1,1* (7)	3,3±0,23* (7)	0,12±0,012 (6)	2633±299 (4)	14,7±1,25* (9)	7,2±0,6* (9)	0,058±0,011* (8)	2955±375 (9)

у старых — в 3,5 раза по сравнению с контролем. Содержание МДА (табл. 2) в сыворотке крови молодых крыс изменялось недостоверно (снижение на 18%), у старых крыс оно снижалось более значительно — на 65% ($P < 0,01$), что отчасти может быть связано с более высоким уровнем липидемии у старых животных. У молодых аллоксандиабетических животных отмечалось повышение содержания общих липидов в 1,4 раза, а у старых — в 2,1 раза по сравнению с контролем. В то же время активность супероксиддисмутазы эритроцитов при диабете возрастала почти вдвое: на 85% у молодых ($P < 0,01$) и на 99% у старых ($P < 0,01$). Восстановление аллоксана в β -клетках в диалурниновую кислоту с последующим обратным окислением в аллоксан сопровождается генерацией супероксида [10]. Поэтому изменения в системе антиоксидантной защиты организма, выражающиеся в повышении активности супероксиддисмутазы, можно рассматривать как компенсаторно-приспособительные, направленные на поддержание постоянства внутренней среды организма.

Следует отметить, что снижение содержания продуктов ПОЛ в сыворотке крови не всегда является благоприятным моментом, поскольку вместе с реакционно-способным кислородом они могут участвовать в процессе окислительного фагоцитоза [11]. Значительное уменьшение их содержания в сыворотке крови старых крыс через 10 дней после введения аллоксана может свидетельствовать об изменениях, наступивших в системе иммунитета.

Таким образом, по мере развития экспериментального аллоксанового диабета включаются адаптационные механизмы. Они способствуют нормализации (у молодых) и даже сниже-

нию ниже нормы (у старых) содержания в сыворотке крови токсичных продуктов ПОЛ. Происходит это на фоне активации антиоксидантного фермента цинк-медьсодержащей супероксиддисмутазы. Необходимо отметить возрастные особенности этого процесса. Если через 3 дня после введения аллоксана у старых крыс резко выражены токсические проявления экспериментального диабета, то к 10-му дню содержание МДА в сыворотке крови уменьшается, причем у старых крыс в большей степени. Это в значительной мере связано с повышением активности супероксиддисмутазы, которая у молодых крыс увеличивается с 78% при трехдневном диабете до 85% при десятидневном, а у старых — с 46 до 99%, что говорит о замедленной реакционной способности старых животных при развитии адаптационных сдвигов.

Л И Т Е Р А Т У Р А

- Ефимов А. С., Науменко В. Г. // Пробл. эндокринологии. — 1985. — № 1. — С. 6—9.
- Калмыкова В. И., Арончик Э. К., Гришина И. М. // Сов. мед. — 1974. — № 1. — С. 23—29.
- Климов А. П. // Биохимические основы патогенеза атеросклероза. — 1980. — С. 3—45.
- Климов А. Н., Цикльчева Н. Г. // Кардиология. — 1972. — № 6. — С. 133—149.
- Ланкин В. З., Тихазе А. К., Котелевцева И. В. // Кардиология. — 1976. — № 2. — С. 23—30.
- Панченко Л. Ф., Герасимов А. М., Антоненко В. Д. Роль пероксисом в патологии клетки. — М., 1981.
- Чумаков В. Н., Осинская Л. Ф. // Вопр. мед. химии. — 1979. — № 3. — С. 261—266.
- Grankvist R., Marklund S., Taljedel I. // Nature. — 1981. — Vol. 294, N 5837. — P. 158—160.
- Lenzen S. // Amer. J. Physiol. — 1979. — Vol. 236, N 4. — P. E391—E400.
- Nishigaki I., Hagihara M., Tsunekawa H. et al. // Biochem. Med. — 1981. — Vol. 25. — P. 373—378.
- Uchiyama M., Mihara M. // Analyt. Biochem. — 1978. — Vol. 86, N 1. — P. 271—278.

Поступила 21.05.86

SOME PATTERNS OF LIPID PEROXIDATION IN BLOOD OF OLD RATS WITH ALLOXANE DIABETES

L. M. Mazhul

Department of Gerontology, Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Minsk

Activation of lipid peroxidation was observed in development of alloxane diabetes in young (5-6 months old) and old rats (24-26 months old). Slight inhibition of lipid peroxidation was detected within 10 days of the development of

diabetes. The compensatory-adaptation reactions, particularly activation of Zn, Cu-superoxide dismutase, were apparently responsible for the inhibition of lipid peroxidation observed.

УДК 579.842.23:579.222:577.152

В. Е. Сидорова, Т. Н. Варвашевич, Н. Ф. Тимченко

ЭКЗОФЕРМЕНТЫ ПСЕВДОТУБЕРКУЛЕЗНОГО МИКРОБА

Институт эпидемиологии и микробиологии СО АМН СССР, Владивосток

Возникновение свойства патогенности, как считается в настоящее время, связано у микроорганизмов с заселением ими новой среды обитания — многоклеточных организмов [1]. Чтобы бактерии смогли заселить новую экологическую нишу, им необходимо проникнуть и распространиться в микроорганизме, т. е. подавить его сопротивление и адаптироваться к новым физико-химическим условиям. Предпосылки для этого у сапрофитных бактерий существуют: они обладают целым комплексом ферментов, расщепляющих различные классы органических соединений.

Проникновение микроба в микроорганизм обуславливается многими факторами. Из них немаловажную роль играют гиалуронидаза и нейраминидаза [2, 3]. Для фитопатогенных бактерий аналогичным ферментом является каталаза.

До настоящего времени изучение формирования факторов патогенности микробов во внешней среде практически не проводилось. Исследования в этом направлении начаты в Институте эпидемиологии и микробиологии СО АМН СССР около 10 лет назад. За это время на модели псевдотуберкулезного микроба установлена психрофильная природа этого возбудителя, показана его возможность развиваться и накапливаться, повышать вирулентность во внешней среде [4, 5]. Усиление вирулентности микроба при относительно низких температурах во внешней среде является одной из потенциальных причин возникновения вспышек псевдотуберкулеза.

Задачами данной работы были сле-

дующие: установить, какие из ферментов, участвующие в проникновении бактерий в микроорганизм, локализованы в поверхностных структурах псевдотуберкулезного микроба; определить влияние температуры культивирования *in vitro* на активность продуцируемых ферментов и связь этих ферментов с вирулентностью культур; исследовать активность экзоферментов при культивировании псевдотуберкулезного микроба *in vivo*.

Методика

В работе было использовано 11 типичных по культуральным и биохимическим свойствам штаммов псевдотуберкулезного микроба. Штаммы выращивали на мясопептонном агаре, pH 7,2—7,3 при 10 и 37 °C в течение 48 ч. Бактерии *in vivo* выращивали в целлофановой капсуле длиной 8—10 см, стерильно шитой под гексеналовым наркозом в брюшную полость кролика. Через 3, 6 и 17 сут капсулу извлекали, ее содержимое собирали и центрифугировали при 6000 об/мин в течение 30 мин, бактерии дважды отмывали физиологическим раствором NaCl.

Капсульную субстанцию получали по методу Е. С. Станиславского [6] и обрабатывали культуру ультразвуком на аппарате УЗДН-1 с частотой 22 кГц в течение 1 мин. После ультразвуковой обработки культуру центрифугировали 20 мин при 8000 об/мин, дальнейшую работу проводили с надосадочной фракцией.

Для изучения ферментов капсульную субстанцию псевдотуберкулезного микроба разделяли на высокомолекулярную (ВМФ) и низкомолекулярную (НМФ) фракции путем центрифугирования при 37 000 g в течение 2 ч при 2 °C.

Гель-фильтрацию проводили через сефадекс G-200 физиологическим раствором NaCl pH 7,3 на колонке 80 × 2,5 см со скоростью вытекания 12 мл/ч. Фракции собирали на коллекторе фракций ХКОВ-1 по 3 мл.

Активность нейраминидазы и гиалуронидазы определяли на анализаторе ферментативной активности АФ-1. В качестве субстрата для ней-

раминназы использовали 0,5 % овомуконд фирмы «Олайн» на 0,01 М фосфатном буфере рН 7,0, для гиалуронидазы — экстракт гиалуроновой кислоты, полученной по методу Смирновой [7], разведенной 0,01 М фосфатным буфером рН 7,2 в соотношении 1 : 1.

Удельную активность ферментов выражали в условных единицах по показаниям самописца (замеры проводили на 4 уровнях чувствительности: 250, 75, 50 и 25 мВ) и рассчитывали средние показатели на 1 мг белка в 1 мин. Белок определяли по Лоури.

Каталазы исследовали с помощью электрофореза в 14 % крахмальном геле, приготовленном на трис-цитратном буфере рН 7,5, фореэ проводили в трис-глицериновом буфере рН 8,3, каталазы проявляли 1,5 % водным раствором KI после насыщения хроматограммы 0,04 % H_2O_2 [8].

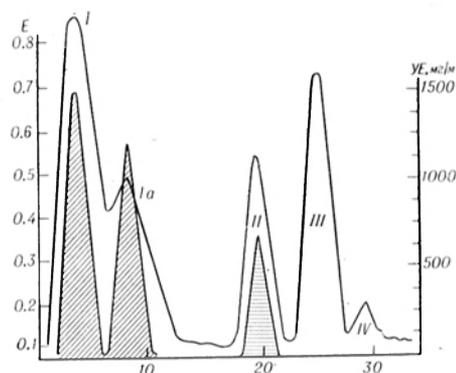
Эстеразный спектр капсульного антигена исследовали методом диск-электрофореза в 7 % ПААГ в трис-глицериновом буфере рН 8,3 общепринятым способом. Продолжительность фореэ составляла 3,5 ч и контролировалась с помощью бромфенолового синего. Эстеразы проявляли 0,1 % α -нафтилацетатным реактивом, приготовленным на 50 % водном ацетоне и смешанным с 0,05 % раствором прочного синего в соотношении 1 : 25 [9].

Сигаловые кислоты определяли по методу Гесса [10].

Вирулентность культур и летальную токсичность капсульной субстанции выявляли на инбредных белых мышах массой 12—14 г при внутрибрюшинном введении по общепринятым методам. ЛД₅₀ рассчитывали по Керберу [11].

Результаты и обсуждение

В предыдущих работах было установлено, что псевдотуберкулезный микроб проявляет нейраминидазную и гиалуронидазную активности и что эти ферменты индуцибельны [12]. Поскольку оба фермента общепризнанно считаются факторами патогенности, логично было предположить, что они



Разделение капсульного вещества псевдотуберкулезного микроба на сефадексе G-200 и ферментативная активность фракций.

По оси абсцисс — номера пробирок; по оси ординат — слева показания экстинкции при 230 нм, справа — удельная активность ферментов в пересчете на 1 мг белка в 1 мин. Пики I и Ia обладают гиалуронидазной активностью, пик II — нейраминидазной. Активность ферментов показана заштрихованными пиками.

находятся в поверхностных структурах микроба. Действительно, в капсульной субстанции были выявлены оба фермента. Они оказались локализованными в высокомолекулярной фракции. Гель-фильтрация этой фракции через сефадексе G-200 выявила хроматографический профиль, представленный на рисунке. Гиалуронидазной активностью обладал первый пик, нейраминидазной — второй, причем активность ферментов возросла в 30 раз.

При сравнительном исследовании вирулентности штаммов, токсичности поверхностных антигенов и их нейраминидазной и гиалуронидазной активности установлено определенное соотношение (табл. 1).

Таблица 1

Вирулентность штаммов, токсичность, нейраминидазная и гиалуронидазная активности капсульной субстанции *Y. pseudotuberculosis* при выращивании культур при 10 и 37 °С

Штамм	ЛД ₅₀ штамма по Керберу	ЛД ₅₀ , мкг белка по Керберу	Нейраминидазная активность, усл. ед. на 1 мг белка	Гиалуронидазная активность, усл. ед. на 1 мг белка
<i>Температура культивирования 10 °С</i>				
79	$3,2 \cdot 10^1$	76,8	$7,8 \pm 1,68$	$46,9 \pm 4,4$
3Д	$8 \cdot 10^1$	47,8	$16,7 \pm 1,58$	$280,3 \pm 8,1$
46Д	$3,2 \cdot 10^1$	79,0	$17,8 \pm 1,8$	$44,6 \pm 4,1$
87 ^a	$3,16 \cdot 10^2$	50	$18,6 \pm 0,5$	$72,6 \pm 2,93$
282	10	25,0	$47,8 \pm 1,41$	$296,8 \pm 5,05$
328	$8 \cdot 10^1$	46,8	$19,3 \pm 1,38$	$42,2 \pm 3,88$
458	10^4	25,0	$19,4 \pm 0,2$	$278 \pm 8,2$
<i>Температура культивирования 37 °С</i>				
87 ^a	Вирулентен	Более 400	$2,8 \pm 0,45$	$8,6 \pm 1,27$
282	»	Более 400	$13,5 \pm 3,29$	$16 \pm 1,6$
458	»	Более 400	$3,9 \pm 0,6$	$15,6 \pm 1,41$
328	»	Более 400	$2,0 \pm 0,45$	$14,5 \pm 0,49$

При культивировании *in vitro* возбудитель был токсигенен, если выращивание микроба вели при 10°C. С токсигенностью совпадала активность ферментов гиалуронидазы и нейраминидазы. При этом гиалуронидазная активность была во всех случаях выше нейраминидазной. Культивирование возбудителя при 37°C резко снижало его токсическую и ферментативную активность.

Действие токسينа на белых мышах и кроликах проявлялось в учащении дыхания животных, треморе, параличе или парезах задних конечностей. Часто у кроликов наблюдались непривольные мочеиспускание и дефекация. Введение токسينа вызывало у беременных самок мышей выкидыши. Через 24—72 ч после инъекции токسينа животные, как правило, погибали.

Таким образом, можно сделать вывод, что при введении псевдотуберкулезного микроба в микроорганизм в первый же момент сочетанно действуют токсин, гиалуронидаза и нейраминидаза.

Не менее интересны опыты по определению нейраминидазной активности псевдотуберкулезных культур, проведенные с использованием нормальной бычьей сыворотки (табл. 2).

Перед опытом определили исходное количество сиаловых кислот в нормальной бычьей сыворотке. Оно было равно $60 \pm 1,7$ ед. Добавление к сыворотке суспензии нативных микроорга-

низмов в дозе 500 млн. микробных тел (инкубация 1 ч при 37°C) увеличивало количество свободных сиаловых кислот в 1,5—4 раза, если микробы выращивали при 10°C, и в 1,2—1,3 раза, если культивирование вели при 37°C.

Аналогичный опыт был проведен с капсульными антигенами, содержащими нейраминидазу. И в этом случае большую активность имели антигены, выделенные из «низкотемпературных» бактерий, по сравнению с таковыми, выделенными из «высокотемпературных» (см. табл. 2).

Увеличение содержания сиаловых кислот в бычьей сыворотке связано с прямым действием нейраминидазы на гликопротеиды [13], которые являются субстратом для фермента.

Рассмотренная ситуация интересна не только в сугубо прикладном аспекте, но и с общетеоретических позиций, так как наглядно показывает, что факторы патогенности у возбудителя псевдотуберкулеза формируются во внешней среде. Ведущая роль, как мы убедились в течение 10-летнего изучения возбудителя, принадлежит низкой температуре культивирования. Она является фактором, оптимизирующим во внешней среде все функции микробной клетки.

У проблемы психрофилии патогенных микроорганизмов есть и другой аспект: развитие возбудителя *in vivo* в макроорганизме. Вероятно, в этом случае происходит смена популяционного состава бактерий. Исходя из общепризнанных положений, можно предположить, что смена популяций происходит в макроорганизме не однажды, так как организм не остается индифферентным к вторжению, а отвечает адекватными стереотипными реакциями. Первые опыты культивирования псевдотуберкулезного микроба *in vivo* дали интересный для размышления материал. Мы исследовали изменение активности нейраминидазы и гиалуронидазы возбудителя псевдотуберкулеза, выращенного в организме кролика (табл. 3), в качестве контроля выращивали *in vitro* этот же штамм при 37°C.

Выращивание возбудителя *in vivo* до 6 сут включительно вызывало парастание активности обоих ферментов, затем начиналось ее снижение.

В результате встречи микроба с

Таблица 2

Количество сиаловых кислот в нормальной бычьей сыворотке после инкубирования ее с культурами псевдотуберкулезного микроба или его капсульными антигенами

Штамм	Доза возбудителя, млн. микробных тел	Количество сиаловых кислот, ед.	Доза капсульного вещества, мкг белка	Количество сиаловых кислот, ед.
<i>Температура культивирования 10°C</i>				
1179	500	$90 \pm 8,12$	500	$220 \pm 2,0$
87—84	500	$150 \pm 4,05$	500	$260 \pm 5,8$
512	500	$240 \pm 3,16$	500	$190 \pm 5,1$
282	500	$120 \pm 3,68$	500	$225 \pm 4,07$
<i>Температура культивирования 37°C</i>				
1179	500	$70 \pm 3,53$	500	$90 \pm 2,88$
87—84	500	$70 \pm 2,65$	500	$90 \pm 1,03$
512	500	$140 \pm 7,07$	500	$85 \pm 1,64$
282	500	$80 \pm 3,65$	500	$70 \pm 2,45$

Активность нейраминидазы и гиалуронидазы капсульной субстанции, выделенной из псевдотуберкулезного микроба, культивированного *in vitro* и *in vivo*

Условия культивирования штамма	Гиалуронидаза, усл. ед. на 1 мг белка				Нейраминидаза, усл. ед. на 1 мг белка			
	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>			<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>		
		3 сут	6 сут	17 сут		3 сут	6 сут	17 сут
10 °С махачкалинский агар	4,66				2,33			
10 °С махачкалинский агар	0	7,82±1,15	18,8±1,88	0,66	0,3	46,3±1,38	100,6±2,96	8,3±0,24

микроорганизмом «начинается процессе взаимного приспособления, проявляющийся развитием инфекционной болезни, обычно отчетливо локализованной» [14]. В этот период происходят деполлимеризация коллагеновых волокон, смещение проколлагена и колластромина и освобождение мукополисахаридов, входящих в состав коллагеновых белков. Высокогидрофильные мукополисахариды удерживают воду, что приводит к мукоидному отеку или набуханию [14]. Такого действия гиалуронидаз. Как отмечают М. А. Борисова [15], В. С. Матковский и соавт. [16], у больных псевдотуберкулезом довольно часто поражается опорно-двигательный аппарат, что проявляется болевым синдромом типа артралгий, отечностью тканей вокруг суставов. Симптомы острого полиартрита, в развитие которых вносит свою долю и гиалуронидаза, отмечаются в 7—10 % наблюдений [15]. Воспалительные изменения стойко держатся до 10 дней, что согласуется с экспериментальными данными по нарастанию активности гиалуронидазы.

Еще более наглядно экспериментальные данные согласуются с исследованиями В. П. Малого [17], проведенными на больных псевдотуберкулезом. Он отмечает, что в 1-ю неделю заболевания у больных в крови резко нарастает количество сиаловых кислот, достигая при легком течении $233 \pm 7,5$ ед., при среднетяжелом и тяжелом — $264 \pm 9,43$ ед. Затем происходит их снижение, а к началу 4-й недели их уровни приближаются к норме ($176 \pm 8,7$ ед.). Эти изменения содержания сиаловых кислот у больных хорошо совпадают с эксперименталь-

ными данными по увеличению и снижению активности нейраминидазы.

Что касается других ферментов, локализованных в поверхностных активностях, то здесь обнаружена каталазная и эстеразная активности.

Эстеразы оказались индуцибельными ферментами. Они появлялись в поверхностных антигенах при культивировании *in vitro* на соответствующих средах, содержащих эфиры карбоновых кислот. Выращивание микроорганизма *in vitro* при 10 °С вызывает индукцию двух изоферментов, определенных электрофорезом в ПААГ, а при 37 °С — лишь одного фермента. Связи этого фермента с патогенными свойствами возбудителя псевдотуберкулеза не обнаружено.

Псевдотуберкулезный микроб выделяет 3 экзокаталазы. Их продукция *in vitro* также зависит от температуры культивирования: низкие температуры индуцируют продуцирование трех изоформ, а при повышении температуры их количество снижается до одной изоформы. Биологическая роль этих изоформ исследуется.

ЛИТЕРАТУРА

1. Езепчук Ю. В. // Факторы патогенности микроорганизмов: химия, природа, биологические функции и генетический контроль. — М., 1974. — С. 1—2.
2. Вергнев Ю. В., Езепчук Ю. В. // Вестн. АН СССР. — 1973. — № 12. — С. 56—61.
3. Езепчук Ю. В. Биомолекулярные основы патогенности бактерий. — М., 1974.
4. Варвашевич Т. П. Изучение изменчивости псевдотуберкулезного микроба: Автореф. дис... канд. биол. наук. — Алма-Ата, 1978.
5. Сомов Г. П. Дальневосточная скарлатиноподобная лихорадка. — М., 1979.
6. Станиславский Е. С. Бактериальные структуры и их антигенность. — М., 1971.
7. Руководство по клиническим лаборатор-

- ным исследованиям, основанное Предтеченским. — М., 1960.
8. Рекомендации по использованию электрофоретических данных при популяционных и межвидовых сравнениях. — Владивосток, 1980.
 9. Родионов И. В. // Журн. микробиол. — 1982. — № 6. — С. 69—73.
 10. Рынская М. Л. // Тер. арх. — 1961. — № 1. — С. 391—394.
 11. Ашмарин И. П., Воробьев А. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. — Л., 1962.
 12. Варвашевич Т. Н., Сидорова В. Е. // Иерсиниозы. — Новосибирск, 1963. — С. 12—19.
 13. Laurell A. B. // Acta path. microbiol. scand. — 1959. — Vol. 47. — P. 182—190.
 14. Нестеров А. И., Сигидин Я. А. Клиника коллагеновых болезней. — М., 1966. — С. 41—42.
 15. Борисова М. А. Висцеральная патология, патогенез, диагностика и лечение псевдотуберкулеза: Автореф. дис... д-ра мед. наук. — М., 1971.
 16. Матковский В. С., Антонов В. С., Бочоршвили В. Г. Псевдотуберкулез. — Тбилиси, 1976.

17. Малый В. П. Аутоиммунные процессы при псевдотуберкулезе (Дальневосточной скарлатиноподобной лихорадке): Автореф. дис... канд. мед. наук. — Владивосток, 1975.

Поступила 21.05.86

EXOENZYMES OF PSEUDOTUBERCULOUS MICROBE

E. V. Sidorova, T. N. Varvashevich,
N. F. Timchenko

Institute of Experimental Medicine, Academy of Medical Sciences of the USSR, Vladivostok.

Pseudotuberculous microbe produced (in natural medium, at 10-14°) toxins and exoenzymes, pathogenic effect of which was studied in experimental conditions. After invasion of pseudotuberculous microbe into macroorganism its populations appear to change, as a result of this activities of penicillinase and hyaluronidase were increased. Cultivation of pseudotuberculosis bacteria *in vivo* may serve as a promising model for studies of enzymatic mechanisms of pathogenesis.

УДК 617-001.17-092.9-07:616.36-008.931-074

З. З. Хакимов, И. Р. Мавлянов, А. К. Карабанович

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ СЕТИ ГЕПАТОЦИТОВ У КРЫС С ТЕРМИЧЕСКИМ ОЖОГОМ

ЦИИЛ Ташкентского медицинского института

Известно, что в патогенезе развития ожоговой болезни важное значение имеет интоксикация организма токсинами экзогенного и эндогенного происхождения. Развитию интоксикации способствует, в частности, снижение обезвреживающей функции печени.

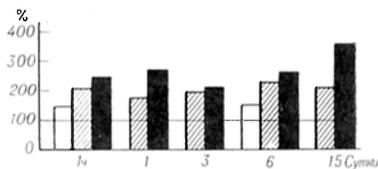
Ввиду того что процессы детоксикации протекают в цитоплазматической сети гепатоцитов, можно было ожидать, что исследование активности микросомальных ферментов позволит судить о состоянии антитоксической функции печени при ожоге. Одним из показателей функционального состояния цитоплазматической сети гепатоцитов, по имеющимся данным [7, 11, 12], является гексеналовый тест.

Исходя из этого, в настоящей работе проводилось изучение продолжительности гексеналового сна, а также активности основных микросомальных ферментов и цитохромов печени у крыс с ожогом.

Методика

Опыты проведены на 240 крысах-самцах смешанной популяции с исходной массой 180—200 г. Ожог IIIБ степени, соответствующий 3,

10 и 20 % поверхности тела, вызывали под эфирным наркозом путем наложения на предварительно депилированную кожу спины в течение 10 с нагретой до 200 °С медной пластинки, установленной на кончике электропаяльника. Спустя 1 ч, 1, 3, 6 и 15 сут после нанесения термической травмы изучали продолжительность сна, вызванного гексеналом. Последний вводили интратрибушино в дозе 100 мг/кг. В отдельной серии экспериментов через 1 ч, 1, 3 и 6 сут после воспроизведения ожога, соответствующего 10 % поверхности тела крысы, выделяли микросомальную фракцию печени методом дифференциального центрифугирования при 105 000 g на центрифуге ВАС-601, в микросомальной фракции определяли активность N-деметилазы амидопирина [13], гидроксилазы анилина [3], содержание цитохромов P-450 и B₅ [23], белка [22]. Для определения продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) из 1—2 мл сыворотки крови или 1 мл постмитохондриальной надосадочной жидкости гомогенатов печени (9000 g в течение 20 мин) выделяли липиды по методу Фольча. Содержание общих липидов определяли весовым методом, конъюгированных диенов и диенкетонов — по методу Плацера [18]. Содержание исследованных продуктов ПОЛ рассчитывали в единицах оптической плотности (D) на 1 мг липидов. Активность спонтанного и индуцированного НАДФ·Н₂ ПОЛ микросом определяли по методу, опубликованному ранее [5]. Результаты выражали в никомолях на 1 мг белка в 1 мин. Каждая экспериментальная группа состояла из 6—11 животных. Цифровые данные были обработаны методом вариационной статистики [4].



Продолжительность спотворного действия гексана у крыс с различной площадью глубокого ожога.

По оси абсцисс — сроки исследования (в сут), по оси ординат — удлинение гексаналового сна (в % к контролю).

Светлые столбики — ожог IIIБ степени, соответствующий 3 % поверхности тела, заштрихованные — то же 10 %, темные — то же 20 %. Различия между опытными и контрольными группами животных во все сроки статистически достоверны.

Результаты и обсуждение

Результаты проведенных исследований показали, что при ожоге наблюдается значительное удлинение спотворного действия гексана, пропорционально площади термического поражения. Так, через 1 ч после нанесения травмы у крыс с ожогом, соответствующим 3 % поверхности тела, удлинение сна составляет 44,7 %, а у крыс с ожогом, соответствующим 10 и 20 % поверхности тела — соответственно 126,5 и 141 %. Аналогичные по характеру, но более выраженные изменения отмечены через 6 дней с момента воспроизведения ожога (см. рисунок). Следовательно, у крыс с ожогом гексана вызывает более продолжительный сон, степень которого зависит от площади глубокого ожога. Поскольку биотрансформация этого барбитурата протекает в печени, можно

было предположить, что удлинение продолжительности его спотворного действия обусловлено замедлением скорости процессов микросомального окисления. Изучение активности основных ферментов, участвующих в процессах детоксикации, подтвердило это предположение.

Как видно из табл. 1, при ожоговой травме отмечается снижение интенсивности гидроксилирования анилина. Так, спустя 1 ч с момента нанесения травмы она угнетается на 61 %, а через 1, 3 и 6 сут — соответственно на 79,45 и 45,3 %. Реакция деметилирования амидопирина также угнетается, но в меньшей степени, чем гидроксилирование анилина. Следовательно, при ожоге снижается интенсивность процессов гидроксилирования и деметилирования ксенобiotиков в печени.

Известно, что в реакциях окислительного превращения ксенобiotиков центральная роль принадлежит цитохрому P-450 [2, 21]. Исследование содержания этого гемопротенда в печени крыс с ожогом показало, что уже через 1 ч после нанесения травмы его уровень снижается на 45 %, через 24 ч — на 76 %, через 3 сут — на 32 %, и через 6 сут — на 50 %. Уменьшается, но в меньшей степени, и содержание цитохрома B₅. Эти нарушения указывают на правомерность вывода о том, что термическая травма затрагивает в основном среднюю и терминальную часть электронно-транспортной цепи микросом [14]. Параллельно изменениям активности фер-

Таблица 1

Некоторые биохимические показатели микросом печени крыс с ожогом

Срок после нанесения ожога	Содержание белка, мг на 1 г печени	N-демeтилaза амидопирина, нмоль ПСОН на 1 мг в 1 мин	Анилин гидроксилаза, нмоль п-аминофенола на 1 мг в 1 мин	Содержание цитохромов, нмоль в 1 г печени	
				P-450	B ₅
Контроль	13,61±0,51	1,104±0,095	0,963±0,060	11,75±0,65	5,66±0,28
1 ч	12,89±0,69	1,108±0,067	0,379±0,067	6,48±1,46	4,90±0,64
P	>0,05	>0,05	<0,001	<0,02	>0,05
1 сут	15,12±0,84	0,713±0,031	0,198±0,015	2,87±0,39	2,74±0,27
P	>0,05	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001
Контроль	16,23±0,83	0,884±0,045	0,815±0,064	10,31±0,37	6,31±0,45
3 сут	13,69±0,46	0,670±0,057	0,450±0,020	7,04±1,19	3,69±0,40
P	<0,05	<0,05	<0,002	<0,05	<0,01
6 сут	11,64±0,27	0,681±0,062	0,446±0,036	5,19±0,59	4,22±0,46
P	<0,001	<0,05	<0,01	<0,001	<0,02

Количественные показатели ПОЛ микросом печени у крыс с ожогом

Срок после ожога	Интенсивность реакции ПОЛ в микросомах печени		Постмитохондриальная над- осадочная жидкость печени		Сыворотка крови	
	спонтанное	фермента- тивное	конъюгиро- ванные дисны	диенкетоны	конъюгиро- ванные дисны	диенкетоны
Контроль	0,040±0,003	0,536±0,043	0,462±0,018	0,130±0,007	0,279±0,024	0,068±0,007
1 ч	0,057±0,005	0,712±0,040	0,547±0,033	0,171±0,022	—	—
Р	<0,05	<0,05	<0,05	>0,05		
24 ч	0,005±0,001	0,384±0,033	0,729±0,071	0,265±0,043	0,392±0,030	0,130±0,022
Р	<0,001	<0,05	<0,02	<0,05	<0,05	<0,05

ментов и цитохромов снижалось и содержание микросомального белка, что отмечено нами во все сроки исследования, за исключением 24-часового. Эти сдвиги, по всей вероятности, связаны с уменьшением количества ферментных молекул в гепатоцитах.

Таким образом, ожог кожи приводит к снижению количественного уровня и активности ферментов, локализованных в цитоплазматической сети клеток печени, что обуславливает снижение ее антитоксической функции. Этим обстоятельством объясняется, по-видимому, изменение фармакодинамики лекарственных веществ у крыс с ожогом [10, 17, 20], уменьшение поглощения клетками печени бенгальского розового, меченного ^{131}I [16], а также изменения фармакокинетики лекарств [19, 24] и пробы Квика — Пытеля у больных с ожогами [8]. У последних почти в 2 раза снижается суточная экскреция D-глутаровой кислоты с мочой, что также указывает на снижение функциональной активности печеночной микросомальной системы метаболизирования лекарственных веществ [19].

Повреждение печени при ожоге обусловлено действием ряда факторов [24], среди которых следует особо выделить гипоксию тканей. При ожоге она развивается прежде всего за счет уменьшения объема циркулирующей крови в результате усиленной потери воды с ожоговой поверхности, гемолиза эритроцитов, замедления кровотока вследствие ослабления сократительной способности миокарда и сгущения крови, спазма периферических сосудов, нарушения микроциркуляции, развития ацидоза и др.

Как известно, при гипоксии печени происходит усиление процессов ПОЛ [6, 9], что приводит к нарушению функции субклеточных структур. Учитывая изложенное, мы специально изучали процессы ПОЛ в печени. Об интенсивности ПОЛ судили по накоплению конъюгированных диенов и диенкетонов в липидах постмитохондриальной надосадочной жидкости печени и сыворотки крови, а также по скорости спонтанного (без инициатора) и ферментативного (НАДФ·Н₂-зависимого) окисления липидов микросом печени. Результаты этих исследований показали, что на начальных сроках исследования (через 1 ч после нанесения травмы) ПОЛ усиливается. Как видно из данных, приведенных в табл. 2, усиление спонтанного ПОЛ в микросомах составляет 42,5 %, а ферментативного — 32,8 %. Через 24 ч ПОЛ в микросомах резко снижается, особенно спонтанное (на 87,5 %), что, возможно, связано со значительным уменьшением количества неповрежденных микросомальных мембран. Вероятно, поэтому в данный срок исследования выявлены более высокая степень угнетения активности ферментов и снижение микросомальных цитохромов по сравнению с другими сроками исследования.

Логично предположить, что усиление процессов ПОЛ в субклеточных структурах тканей должно приводить к накоплению в крови и печени продуктов этой реакции — конъюгированных диенов и диенкетонов. Исследования показали нарастание количественного уровня этих продуктов ПОЛ в постмитохондриальном супернатанте печени опытных крыс. Так, через 1 ч

после ожога отмечалось увеличение конъюгированных диенов на 18 %, диенкетонов — на 31,5 %, а через 24 ч — соответственно на 57,8 и 104 % (см. табл. 2). Повышенные концентрации данных соединений в сыворотке крови на этом сроке исследования составило соответственно 40,5 и 91,2 %. Полученные данные свидетельствуют об усилении процессов ПОЛ в микросомах печени, что, по-видимому, является одной из причин нарушений функции цитоплазматической сети гепатоцитов при ожоге. При этой патологии наблюдается усиление ПОЛ не только микросомальных мембран, но и митохондриальных и лизосомальных [1], причем степень и направленность этих изменений для различных оргanelл неодинаковы. Следует отметить, что повреждение мембран цитоплазматической сети гепатоцитов при ожоге может быть и результатом гидролиза липидов под воздействием эндогенной фосфолипазы, активность которой при гипоксии печени также повышается [15].

Таким образом, при ожоге наблюдается угнетение антиоксидантной функции печени в результате снижения активности ее микросомальных ферментов и содержания цитохромов P-450 и B₅. Одним из факторов, приводящих к снижению функционального состояния цитоплазматической сети гепатоцитов при ожоге, является усиление интенсивности процессов ПОЛ и ее мембран в начальный период воздействия термического агента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аристархова С. А., Буракова Е. Б., Заец Т. Л. // Вопр. мед. химии. — 1983. — № 4. — С. 102—106.
2. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. — М., 1975.
3. Арчаков А. И., Карузина И. И., Тверитинов В. И. и др. // Биохимия. — 1975. — Т. 40, № 1. — С. 32—39.
4. Бельский М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. — Рига, 1959.
5. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М., 1972.
6. Воронов Г. Г., Лукиенко П. И., Бушма М. И. // Фармакол. и токсикол. — 1982. — № 1. — С. 54—58.
7. Гижларян М. С. // Гиг. труда. — 1976. — № 10. — С. 49—50.
8. Доценко А. П., Чинченко Е. И., Похно М. М. и др. // Клини. хир. — 1979. — № 3. — С. 58—59.

9. Дудник Л. Б., Биленко М. В., Алесенко А. В. и др. // Бюл. экспер. биол. — 1980. — № 5. — С. 556—558.
10. Кленин В. В. // Клини. хир. — 1979. — № 1. — С. 16—18.
11. Михайлец Г. А., Лисочкин Б. Г., Крылова И. Б. и др. // Фармакологическая регуляция регенераторных процессов. — Поникар-Ола, 1979. — С. 222—224.
12. Наджимутдинов К. Н., Камилов И. К., Музрабеков Ш. М. // Фармакол. и токсикол. — 1974. — № 5. — С. 533—537.
13. Попов П. // Экспер. мед. — 1973. — Т. 12, № 3. — С. 130—135.
14. Рябинин В. Е., Лифшиц Р. И. // Вопр. мед. химии. — 1985. — № 5. — С. 38—40.
15. Сейфулла Р. Д., Онищенко П. А., Артамонов С. Д. и др. // Фармакол. и токсикол. — 1979. — № 2. — С. 157—163.
16. Сиваченко Т. П., Клименко Л. А., Одерий Е. А. и др. // Клини. хир. — 1981. — № 3. — С. 10—12.
17. Хакимов З. З., Наджимутдинов К. Н., Мавлянов И. Р. // Фармакол. и токсикол. — 1985. — № 2. — С. 103—106.
18. Шилина И. К., Чернавина Г. В., Маслова Л. А. // Лаб. дело. — 1978. — № 3. — С. 140—142.
19. Claccio E. I., Fruncillo R. J. // Clin. Pharmacol. Ther. — 1979. — Vol. 25. — P. 340—344.
20. Durlafsky L., Fruncillo R. J. // J. Trauma. — 1982. — Vol. 22. — P. 950—953.
21. Dybing E. // Acta vet. scand. — 1973. — Vol. 14. — P. 11—21.
22. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
23. Omura T., Sato R. // Ibid. — 1964. — Vol. 239. — P. 2470—2378.
24. Sawchuk R. J., Rector T. S. // Clin. Pharmacokinetic. — 1980. — Vol. 5. — P. 548—556.

Поступила 30.05.86

THE FUNCTIONAL STATE OF HEPATOCYTE CYTOPLASMIC STRUCTURE IN RATS WITH THERMIC BURNS

Z. Z. Khakimov, I. R. Mavlyanov,
A. K. Karabanovich

Central Research Laboratory, Medical School,
Tashkent.

Intensity of xenobiotic biotransformation estimated by means of "hexenal" test as well as enzymatic activity in liver microsomes were studied in rats with burns corresponding to impairment of 3 %, 10 % and 20 % of body surface within 1 hr, 1, 3, 6 and 15 days. Soporific effect of hexenal was distinctly increased in the burns, which correlated to the severity of thermic impairment. Activities of amidopyrine-N-demethylase and aniline pydroxylase as well as content of protein, cytochromes P₄₅₀ and b₅ were decreased in liver microsomes. At the same time, lipid peroxidation was activated in microsomes, content of diene conjugates and diene ketons was increased in blood serum and in liver postmitochondrial fraction of experimental animals. Disfunction of hepatocyte cytoplasmic structures appears to be among the factors responsible for a body intoxication in burns.

УЧАСТИЕ ПРОСТАГЛАНДИНОВ В АКТИВИРОВАНИИ ТРАНСПОРТА САХАРОВ В ДИАФРАГМУ КРЫС

НИИ краевой медицины Минздрава Узбекской ССР, Ташкент

Простагландины (ПГ) участвуют в разнообразных физиологических реакциях организма, в частности они обладают способностью усиливать транспорт глюкозы в мышечную и жировую ткань в присутствии инсулина [13, 14], т. е. усиливать эффект гормона. Ингибирование биосинтеза ПГ введением индометацина приводило к уменьшению потребления глюкозы работающими мышцами предплечья человека во время инфузии инсулина и глюкозы [10]. Ранее было показано, что инкубация диафрагмы и матки крыс с ПГ E_2 и ПГ $F_{2\alpha}$ в присутствии инсулина приводит к повышению потребления глюкозы тканями [5].

В данной работе мы изучали вопрос о месте действия ПГ при увеличении ими потребления глюкозы. Связано ли увеличение потребления глюкозы с усилением ее метаболизма под влиянием ПГ или последние действуют непосредственно на систему транспорта сахаров? Для решения этого вопроса изучали транспорт неметаболизируемого аналога глюкозы — D-ксилозы в изолированную диафрагму крыс под влиянием ПГ E_2 , ПГ $F_{2\alpha}$ и инсулина и рассчитывали кинетические параметры транспорта.

Методика

Опыты проводили на самцах крыс массой тела 100—120 г. Индометацин («Фармахим», Болгария) вводили подкожно по 5 мг на 100 г массы тела за 18—20 ч до забоя для подавления эндогенного синтеза ПГ. ПГ E_2 и ПГ $F_{2\alpha}$ (получены из Опытного завода органического синтеза и биопрепаратов Института химии АН Эстонской ССР, Таллин) добавляли дважды: в среду преникубации и инкубации до концентрации 3 мкМ. После 18-часового ночного голодания животных декапитуировали, диафрагму разделяли на 2 части, в которых определяли скорость транспорта D-ксилозы, как описано у Н. Н. Никольского [7], с некоторыми нашими изменениями [6]. Полудиафрагмы промывали в буферном растворе при 0°C, затем преникубировали при 27°C в буферном растворе без ксилозы с исследуемыми агентами в течение 30 мин, после чего колбочки помещали в лед, добавляли различные концентрации ксилозы и выдерживали 20 мин при 0°C. Затем пробы инкубировали в аппарате Варбурга 20 мин при 27°C. После инкубации колбочки снова поме-

щали в лед, ткань извлекали, быстро ополаскивали в холодном буферном растворе и переносили в пробирки с 4 мл буферного раствора при 0°C. Оставляли на 40 мин для отмывки ткани от внеклеточной ксилозы. Затем полудиафрагмы просушивали фильтровальной бумагой, взвешивали, помещали в пробирки с 1,5 мл воды и прогревали 10 мин в кипящей водяной бане. Ткань из пробирок удаляли, к экстракту добавляли 0,5 мл 12% трихлоруксусной кислоты и определяли D-ксилозу [3], причем в контрольном опыте инкубировали ткань без ксилозы. Внеклеточное пространство определяли отдельно, инкубируя ткань с 0,5% сахарозой и исследуемыми агентами в течение 1 ч. Содержание сахарозы определяли антроновым методом [4]. Для сохранения постоянной ионной силы в растворах с ксилозой соответственно уменьшали содержание хлористого натрия.

Результаты и обсуждение

В таблице показана зависимость скорости транспорта D-ксилозы в диафрагму крыс от различных концентраций сахара в среде. Поток ксилозы во всех вариантах опыта возрастает с увеличением ее концентрации снаружи и стремится к насыщению. Это еще раз говорит о том, что транспорт D-ксилозы в мышечные клетки, как и глюкозы, осуществляется по типу пассивного транспорта с участием переносчика и подчиняется кинетике Михаэлиса — Ментен [8]. Поэтому результаты, полученные при изучении проникновения ксилозы, могут быть использованы для объяснения регуляции транспорта глюкозы. Показано, что в условиях опыта под влиянием инсулина скорость транспорта увеличивается в среднем на 50%. На фоне активированного инсулином транспорта наблюдается дополнительное увеличение скорости потока ксилозы под влиянием ПГ E_2 в среднем на $49 \pm 3\%$ и под влиянием ПГ $F_{2\alpha}$ в среднем на $19 \pm 2\%$. При сравнении средних значений скоростей транспорта в присутствии инсулина с таковыми в присутствии гормона и ПГ $F_{2\alpha}$ различия были недостоверны ввиду небольшого эффекта ПГ $F_{2\alpha}$ (19%). Однако из таблицы видно, что увеличение скорости потока наблюдается при всех шести концентрациях ксилозы в среде.

Влияние ПГ E₂ и ПГ F_{2α} на транспорт D-ксилозы при 27 °С в изолированную диафрагму крыс в присутствии инсулина

Концентрация ксилозы в среде, мМ	Скорость транспорта, мМ на 1 л внутриклеточной воды в 1 ч						
	контроль	инсулин	изменения по сравнению с контролем, %	инсулин + ПГ E ₂	изменения по сравнению с показателем в присутствии инсулина, %	инсулин + ПГ F _{2α} ***	изменения по сравнению с показателем в присутствии инсулина, %
2,5	1,2±0,2 (4)	1,8±0,2 (8)	50	2,6±0,5 (4)	44	2,3±0,5 (4)	28
5,0	2,2±0,2 (10)	3,2±0,2* (10)	45	4,6±0,5** (8)	44	3,8±0,3 (8)	19
10,0	3,5±0,3 (10)	5,8±0,8* (10)	66	9,0±0,8** (8)	55	6,5±0,6 (8)	12
20,0	6,3±0,8 (8)	9,5±0,9* (8)	51	13,9±1,1** (8)	46	11,5±1,0 (8)	21
25,0	7,9±0,9 (4)	11,0±1,0* (8)	39	16,3±2,0** (5)	48	12,8±3,0 (4)	16
40,0	10,0±1,1 (6)	14,7±1,4* (6)	47	23,4±2,7** (5)	59	17,7±1,9 (5)	20

Примечание. Концентрация инсулина в среде 0,5 мед/мл, ПГ — 3 мкМ. В скобках указано число полудиафрагм. Одна звездочка — достоверные различия между показателями в контроле и в присутствии инсулина, две — то же между показателями в присутствии инсулина и инсулина + ПГ E₂, три — то же между показателями в присутствии инсулина и инсулина + ПГ F_{2α}.

Поэтому мы применили другой подход (метод парных сравнений), позволяющий сравнивать целые выборочные совокупности. Как показал анализ, имеются достаточные основания признать, что различия между двумя сопряженными рядами были статистически достоверны ($t=3,49$; $P<0,02$).

Таким образом, на фоне действия инсулина ПГ E₂ и ПГ F_{2α} обладают способностью дополнительно стимулировать транспорт ксилозы. Вместе с тем в активности данных ПГ наблюдаются различия количественного характера, что может косвенно указывать на некоторую специфичность в их действии.

Анализ полученных данных по Лайпунверу — Бэрку [2] показал, что увеличение скорости транспорта ксилозы под влиянием инсулина, а также инсулина и ПГ осуществляется за счет увеличения максимальной скорости транспорта (V_{max}) при неизменной величине константы диссоциации комплекса переносчик — сахар, K_m (см. рисунок). Полученные значения констант транспорта для каждого варианта опыта свидетельствуют о том, что активирование транспорта сахаров под влиянием инсулина и некоторых ПГ осуществляется либо путем увеличения числа активных мембранных переносчиков, либо через ускорение их движения в мембране. При этом сред-

ство переносчика к сахару, вероятно, не меняется.

Каков механизм действия ПГ на систему транспорта сахаров? Есть сообщения о том, что некоторые ПГ обладают Ca²⁺- и Mg²⁺-ионофорными свойствами [1], увеличивают содержание Ca²⁺ в культивируемых клетках [12] и изолированных митохондриях [11]. Вместе с тем хорошо известно свойство кальциевых ионофоров уси-

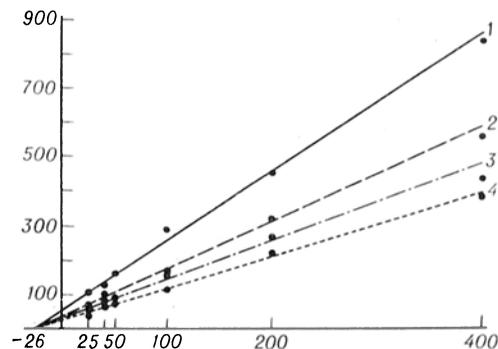


График двойных обратных величин процесса транспорта ксилозы в диафрагму крыс при 27 °С в норме, при действии инсулина и ПГ. По оси абсцисс — $1/C_0$, где C_0 — концентрация ксилозы в среде, М; по оси ординат — $1/V$, где V — скорость транспорта ксилозы, М/ч. 1 — норма, 2 — действие инсулина, 3 — инсулина+ПГ F_{2α} и 4 — инсулина+ПГ E₂ соответственно. Пересечение прямых с осью ординат соответствует величине $1/V_{max}$ ($V_{max}=0,30, 0,42, 0,56$ и $0,76$ мМ/мин для прямых 1, 2, 3 и 4 соответственно). Пересечение с осью абсцисс — $1/K_m$ ($K_m=38$ мМ).

ливать транспорт глюкозы в мышечную ткань за счет увеличения потока Ca^{2+} через плазматическую мембрану [6, 9]. Весьма вероятно, что эффект ПГ на транспорт сахаров связан с их способностью увеличивать содержание внутриклеточного Ca^{2+} , который в свою очередь регулирует скорость транспорта сахаров и необходим для реализации эффекта инсулина [9].

На основании полученных данных можно заключить, что ПГ E_2 и ПГ $F_{2\alpha}$ на фоне действия инсулина дополнительно увеличивают скорость транспорта D-ксилозы в изолированную диафрагму крыс. Это достигается путем увеличения максимальной скорости транспорта при неизменном средстве переносчика к сахару.

ЛИТЕРАТУРА

1. Безуглов В. В., Викторов А. В., Бергельсон Л. Д. // Биоорганич. химия. — 1981. — Т. 7. — С. 145—147.
2. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты: Пер. с англ. — М., 1966.
3. Дине Э. // Методы химии углеводов: Пер. с англ. — М., 1967. — С. 27—28.
4. Дине Э. // Там же. — С. 32—33.
5. Косовский М. И., Хусаинова Ф. А., Гулямов Т. Д. Пробл. эндокринологии. — 1982. — № 5. — С. 57—60.
6. Косовский М. И., Газельганс А. И., Хусаинова Ф. А. и др. // Цитология. — 1984. — № 4. — С. 409—414.

7. Никольский Н. П. // Там же. — 1973. — № 3. — С. 310—317.
8. Никольский Н. П., Трошин А. С. Транспорт сахаров через клеточные мембраны. — Л., 1973.
9. Никольский Н. П., Скопичева В. И., Трошин А. С. // Цитология. — 1977. — № 4. — С. 356—360.
10. Dietze G., Wicklmayr M., Böltger J., Mayer Z. // FEBS Lett. — 1978. — Vol. 92. — P. 294—297.
11. Malmstrom K., Carafoli E. // Arch. Biochem. — 1975. — Vol. 171. — P. 418—423.
12. Maura A., Simpkins H. // Molec. Cell. Endocr. — 1976. — Vol. 5. — P. 349—357.
13. Olefsky J. M., Alto P. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1977. — Vol. 75. — P. 271—276.
14. Torella R., Giugliano D., Giordano Z., D'Onofrio F. // Acta diabetol. lat. — 1976. — Vol. 13. — P. 40—46.

Поступила 21.05.86

PARTICIPATION OF PROSTAGLANDINS IN ACTIVATION OF SUGAR TRANSPORT IN RAT DIAPHRAGM

M. I. Kosovskiy

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

Kinetic parameters of D-xylose (nonmetabolized analogue of glucose) transport were studied in isolated rat diaphragm in presence of insulin and prostaglandins E_2 and $F_{2\alpha}$. Prostaglandins E_2 and $F_{2\alpha}$ simultaneously with insulin were found to increase the rate of D-xylose transport by $49 \pm 3\%$ and $19 \pm 2\%$, respectively, which occurred due to increase in V_{max} , while K_m value of the carrier-sugar complex was unaltered.

УДК 612.115.35:612.115.12+616.151.55-02:615.273.53:577.152.34

В. Н. Никандров, В. И. Вотяков, С. А. Паумович, Г. В. Воробьева,
С. Г. Цыманович, Г. С. Янковская

ИССЛЕДОВАНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ КОМПЛЕКСОВ СТРЕПТОКИНАЗЫ И ГЕПАРИНА И ИХ СВОЙСТВ

Белорусский НИИ эпидемиологии и микробиологии

Одним из важных механизмов регуляции жидкого состояния крови является реализация функции противосвертывающей системы [4]. Важным компонентом этой системы является гетерополисахарид гепарин — естественный антикоагулянт. Многочисленными исследованиями [4, 5] установлено, что гепарин способен образовывать комплексы с Ca^{2+} , катехоламинами, тромбогенными белками, а также с плазминогеном и плазмином [6], при этом образующиеся комплексы приобретают свойство дезагрегации растворимого (нестабилизованного) фибрина. Это явление получило на-

звание неферментативного фибринолиза.

Не менее важным в этом отношении является вопрос о возможности формирования таких комплексов и их свойствах с экзогенными белками, например с вводимыми в организм тромболитическими ферментами. Этот вопрос остается малоизученным. Одним из наиболее широко применяемых в клинической медицине тромболитиков является стрептокиназа (СК) [9].

Цель настоящей работы — выяснение взаимодействия СК с гепарином, изучение свойств полученных комплексов.

Методика

В работе использовали гепарин — натриевую соль фирм «Fluka» (Швейцария) и «Снофа» (ЧССР), а также раствор гепарина для инъекций фирмы «Рихтер» (ВНР) и отечественного производства. СК выделяли из культуральной жидкости методом ионообменной хроматографии, как описано ранее [7]. В отдельных опытах использовали коммерческий препарат СК «целназу» отечественного производства, балластные белки удаляли методом ионообменной хроматографии.

Активность СК определяли по лизису фибринового сгустка [3] и площади зон лизиса фибриновых пластин [12] с последующей коррекцией по международному стандарту стрептокиназы — стрептодориаза (Лондон, ВОЗ). Белок определяли по методу Лоури [15]. Удельная активность образцов СК, использованных в экспериментах, составляла 30 000 МЕ на 1 мг белка.

Для образования комплексов СК и гепарин смешивали в 0,06 М фосфатном буфере pH 7,4 в соотношении 30 000 МЕ и 150 ЕД соответственно при температуре 4 и 24 °С в течение 1—17 ч.

Образование комплексов регистрировали методами тонкослойной гель-хроматографии на сефадексе G-200, инфракрасной спектроскопии в таблетках с КВг и дифференциальной УФ-спектроскопии. Инфракрасные спектры снимали на спектрофотометре UR-20, дифференциальные ультрафиолетовые — на спектрофотометре Spereord M40 в 4-кюветной системе. Спектры кругового дихроизма снимали на спектрополяриметре Jasco-20 в диапазонах длин волн 205—240 нм в кюветках с толщиной слоя 2 мм, при концентрации белка 0,32 мг/мл. Результаты выражали через молярную эллиптичность на аминокислотный остаток — [θ]. Средний вес остатка принят равным 133. Прибор откалиброван по D-пенталактону.

После гель-хроматографии на сефадексе готовили отпечатки на хроматографической бумаге, которые затем высушивали и фиксировали. Для выявления локализации компонентов полученные отпечатки окрашивали 1 % раствором амидо черного (белки) или 0,03 % раствором азуря II (гепарин).

Термостабильность нативной СК и комплекса ее с гепарином оценивали при температурах 25, 37, 50 и 70 °С. Колебания температуры во времени не превышали 0,2 °С.

Исследования влияния СК, гепарина и их комплекса на гемостазиологические показатели выполняли на кроликах массой 2—2,5 кг. СК (60 000 МЕ/кг), гепарин (300 ед/кг) и комплексе СК — гепарин (60 000/300 МЕ/ед/кг) вводили

а	1	в	б	2	в
0		0	0		0

Рис. 1. Гель-хроматография стрептокиназы (а), гепарина (б) и комплекса стрептокиназа — гепарин (в) в тонком слое сефадекса G-200.

1 — окраска амидо черным 10 В, 2 — окраска азуром II.

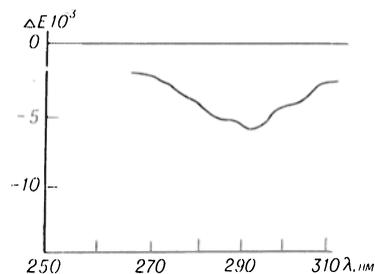


Рис. 2. Дифференциальный УФ-спектр стрептокиназы при взаимодействии с гепарином. Концентрация стрептокиназы $7 \cdot 10^{-6}$ М.

внутривенно однократно. До введения, через 10, 30, 60, 120 мин, 3 и 4 ч после него в крови определяли тромбиновое время по Сирмаи [10], время лизиса сгустка разбавленной крови по Ферили [13], концентрацию фибриногена и фибринолитическую активность плазмы [14], общие антиплазмины [1] и антитромбин III [11]. В период исследования животные находились под внутривенным тиопенталовым наркозом (30 мг/кг), после окончания экспериментов их умерщвляли путем введения воздуха в яремную вену.

Результаты исследований обрабатывали статистически [8].

Результаты и обсуждение

Смешивание растворов СК и гепарина в весовом соотношении 3,2 : 1 (на 30 000 МЕ СК 150 ЕД гепарина) при pH 7,4 приводит к изменению подвижности СК и полисахарида, регистрируемой тонкослойной гель-хроматографией на сефадексе G-200, по сравнению с подвижностью отдельно взятых компонентов (рис. 1). При окраске хроматограмм амидо черным или азуром II отмечено отсутствие следового количества исходных компонентов вне

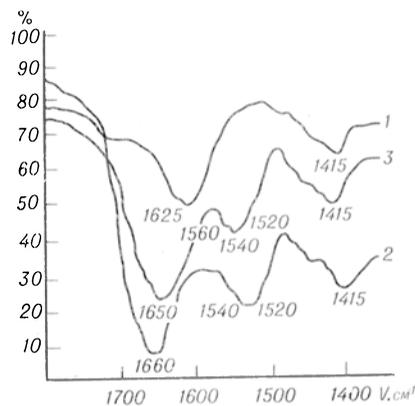


Рис. 3. ИК-спектры гепарина (1), стрептокиназы (2) и комплекса стрептокиназа — гепарин (3).

По оси ординат — пропускание (%).

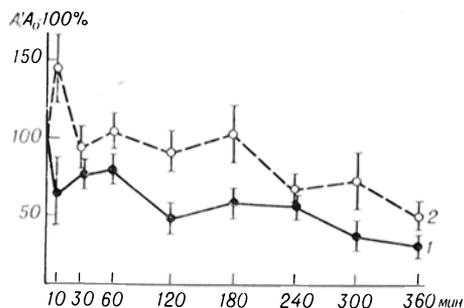


Рис. 4. Динамика активности стрептокиназы (1) и ее комплекса с гепарином (2) при 50°C.

образовавшегося нового пятна с измененной подвижностью. Это позволяет полагать, что при взаимодействии СК и гепарина образуется комплекс с измененными свойствами, причем оба исходных компонента включаются в состав комплекса практически полностью.

Образование комплекса подтверждается также появлением разностного УФ-спектра в области 250—300 нм (рис. 2). Кроме того, это свидетельствует, по-видимому, о конформацион-

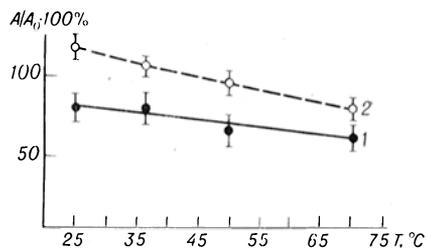


Рис. 5. Температурная стабильность стрептокиназы (1) и комплекса стрептокиназы — гепарин (2).

Остаточная активность определена через 2 ч инкубации при соответствующей температуре.

ных изменениях молекулы СК в составе комплексов. Эти изменения проявляются в сдвиге состояния ароматических хромофоров белка.

О структурных изменениях молекулы СК свидетельствует также смещение полосы амид I и амид II в ИК-спектре комплекса (рис. 3), а также уменьшение величины молярной эллиптичности в дальней УФ-области спектра кругового дихроизма: значение $[0]_{220}$ для СК и комплекса СК — гепарин составляет $7,2 \pm 0,5$ и $5,1 \pm 0,3$

Таблица 1
Динамика показателей фибринолиза и гемостаза при введении кроликам гепарина (300 ЕД/кг), ($n = 6$)

Исследуемый показатель	Исходные данные	Время от начала инфузии, мин			
		10	30	60	120
Тромбиновое время, с	$38,0 \pm 1,3$	>300	>300	>300	$28,0 \pm 2,3$
Время лизиса сгустка крови, ч	24	24	24	24	24
Антиплазмины, с	$154,0 \pm 2,5$	$162,0 \pm 17,0$	$162,0 \pm 18,0$	$156,0 \pm 21,0$	$152,0 \pm 18,0$
Антитромбин III, %	$98,7 \pm 5,2$	$84,0 \pm 5,2$	$79,1 \pm 3,9^*$	$72,0 \pm 5,1^*$	$85,6 \pm 4,1$
Концентрация фибриногена, мг%	$530,0 \pm 28,6$	$478,0 \pm 38,0$	$420,0 \pm 26,0^*$	$480,0 \pm 13,0$	$500,0 \pm 40,0$
Фибринолитическая активность плазмы, %	$19,3 \pm 2,8$	$21,5 \pm 7,3$	$17,3 \pm 2,6$	$18,5 \pm 3,1$	$21,4 \pm 3,0$

* $P \leq 0,05$.

Таблица 2
Динамика показателей фибринолиза и гемостаза при введении кроликам стрептокиназы в дозе 60 000 МЕ/кг ($n = 6$)

Исследуемый показатель	Исходные данные	Время от начала инфузии, мин			
		10	30	60	120
Тромбиновое время, с	$30,0 \pm 2,2$	$54,3 \pm 5,5^*$	$40,0 \pm 3,9$	$47,3 \pm 2,7^*$	$31,2 \pm 3,2$
Время лизиса сгустка крови, с	24 ч	$83,3 \pm 1,0^*$	$101,3 \pm 1,5^*$	$140,0 \pm 2,2^*$	24 ч
Антиплазмины, с	$91,5 \pm 1,0$	$150,0 \pm 3,4^*$	$167,0 \pm 12,9$	$122,0 \pm 8,9$	$126,5 \pm 12,2$
Концентрация фибриногена, мг%	$449,0 \pm 72,8$	$216,0 \pm 38,0$	$196,7 \pm 29,1^*$	$238,8 \pm 48,5$	$366,7 \pm 48,5$
Фибринолитическая активность плазмы, %	$18,8 \pm 3,5$	$41,6 \pm 8,2^*$	$32,1 \pm 3,2^*$	$31,1 \pm 6,4$	$22,6 \pm 5,0$

* Изменения статистически достоверны при $P \leq 0,05$.

соответственно. Эти данные позволяют считать, что комплексобразование приводит к изменениям вторичной и, по-видимому, третичной структуры молекулы СК. Судя по данным тонкослойной гель-хроматографии, комплекс СК — гепарин отличается меньшей подвижностью, чем исходные компоненты ($R_{ст}$ комплекса по отношению к СК равен 0,88). Такое изменение подвижности при ожидаемом изменении молекулярной массы ассоциатов по сравнению с исходными компонентами может быть обусловлено изменением формы комплекса, например отклонением от шарообразной. Подобные явления наблюдались нами при образовании комплексов СК с нативными декстрановыми препаратами [2].

Исследование термостабильности показало, что по сравнению с нативной СК комплекс отличается большей термостабильностью, особенно в температурном диапазоне 25—50°C (рис. 4 и 5). При экспозиции при 50°C в течение 6 ч активность комплекса СК — гепарин остается более высокой, чем нативной СК.

Полученные комплексы СК — гепарин отличались не только по молекулярным свойствам, но и по действию на систему фибринолиза в организме животных.

Введение кроликам гепарина практически не изменяло исследуемые показатели фибринолиза (табл. 1). После введения антикоагулянта лишь нарастал антикоагулянтный потенциал крови, выразившийся в резком удлинении тромбинового времени, некотором снижении уровня антитромбина III. Эти изменения отмечались на протяжении 1 ч после введения.

Для действия нативной СК (целиаза) характерна активация фибринолиза: резкое ускорение лизиса сгустка цельной крови, повышение фибринолитической активности плазмы, снижение концентрации фибриногена — эффект, наблюдавшийся в период до 2 ч после введения СК (табл. 2). К 2 ч исследуемые показатели не отличались от исходного уровня.

В отличие от действия гепарина или СК, влияние на гемостаз у кроликов комплекса СК — гепарин было длительным. Так, в тесте лизиса сгустка цельной крови изменения отмечены и через 2 ч, а фибринолитическая ак-

Таблица 3
Динамика показателей фибринолиза и гемостаза при введении кроликам комплекса стрептскиназа — гепарин (60 000/30 МЕ ЕД/кг) ($n = 6$)

Исследуемые показатели	Время от начала инфузии, мин						
	10	30	60	120	180	240	300
Тромбиновое время, с	>300	>300	>390	>300	35,0±5,7	28,0±1,5	35,0±5,1
Время лизиса сгустка крови, с	75,5±10,9	111,6±18,8	185,0±10,9	250,0±15,4	24 ч	24 ч	24 ч
Антиплазмины, с	460,0±20,4	216,0±28,8	221,5±30,9	185,0±28,1	193,0±25,4	155,0±20,8	260,0±15,0
Антитромбин III, %	124,8±14,2	137,3±2,3	114,4±9,8	367,3±9,8	235,3±3,2	82,3±6,7	62,6±3,3
Концентрация фибриногена, мг%	536,0±61,7	518,6±53,7	509,6±45,2	481,5±47,2	366,6±54,3	335,0±34,0	313,3±40,4
Фибринолитическая активность плазмы, %	35,0±2,6	43,6±3,5	51,6±4,0	40,8±6,9	36,0±4,0	26,5±8,2	18,3±4,5

тивность плазмы сохранялась на повышенном уровне вплоть до 3 ч (табл. 3). Концентрация фибриногена при этом постепенно снижалась вплоть до 4 ч (на 44 %) с момента введения животным комплекса.

Таким образом, СК способна взаимодействовать с гепарином с образованием комплекса. В составе последнего белковая часть подвергается конформационным перестройкам, что, по-видимому, может способствовать повышению устойчивости СК, включенной в комплекс, к температурным воздействиям. Комплекс СК — гепарин обладает особенностями действия на гемостазиологические показатели в организме. Это необходимо учитывать при проведении тромболитической терапии препаратами СК в сочетании с гепарином, а также при получении комплексных препаратов СК с гепарином.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреев Г. В. // Лаб. дело. — 1969. — № 8. — С. 477—479.
2. Вотяков В. И., Воробьева Г. В., Никандров В. И. и др. // Стрептокиназа в регуляции свертывающей и противосвертывающей систем крови. — Минск, 1985. — С. 74—83.
3. Каневская М. П., Конилов А. П. // Детские каплевые инфекции. — Л., 1953. — С. 47—59.
4. Кудряшов Б. А. Биологические проблемы регуляции жидкого состояния крови и ее свертывания. — М., 1975.
5. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А. // Стрептокиназа в регуляции свертывающей и противосвертывающей систем крови. — Минск, 1985. — С. 121—127.
6. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А. // Вопр. мед. химии. — 1973. — № 2. — С. 136—140.

7. Никандров В. И. // Изв. АН БССР: Сер. биол. наук. — 1985. — № 3. — С. 64—67.
8. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. — Минск, 1973.
9. Савченко И. Е., Вотяков В. И., Никандров В. И. // Стрептокиназа и другие тромболитические ферменты. — Минск, 1979. — С. 3—9.
10. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования / Под ред. Е. А. Кост. — М., 1968. — С. 130.
11. Abildgaard U., Graven I., Godal H. C. // Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttg.). — 1970. — Bd 24. — S. 224—229.
12. Astrup T., Müllertz S. // Arch. Biochem. — 1952. — Vol. 40. — P. 346—351.
13. Fearnley G., Balmforth G., Fearnley E. // Clin. Sci. — 1957. — Vol. 16. — P. 645.
14. Lazar G. // Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttg.). — 1967. — Bd 17. — S. 401.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. I., Farr A. L., Randall R. I. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol 193. — P. 265.

Поступила 21.05.86

FORMATION OF STREPTOKINASE-HEPARIN COMPLEXES AND THEIR PROPERTIES

V. N. Nikandrov, V. I. Votyakov,
S. A. Naumovich, G. V. Vorob'yeva,
S. G. Tsymanovich, G. S. Yankovskaya

Byelorussian Institute of Epidemiology and Microbiology, Minsk

Streptokinase and heparin developed complex at the ratio 3.2:1, w/w, respectively, and neutral values of pH, which was registered by means of thin-layer chromatography and differential UV-spectroscopy. IR-, differential UV- and CD-spectroscopic methods showed that secondary and tertiary structures of streptokinase were altered in the complex. Streptokinase containing in the complex exhibited the higher thermostability at 50° as compared with native protein. After intravenous administration of the complex into rabbits more distinct alterations were observed in thrombin time, blood clot lysis and in blood plasma fibrinolytic activity as compared with native streptokinase effect.

УДК 616.832-004.2-07:[616-008.831:577.152.344]-074

А. П. Хохлов, Т. С. Баскаева, Н. А. Хрусталева, И. А. Завалишин,
В. Т. Мозжечков

ВЫДЕЛЕНИЕ И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЛЕЙЦИНАМИНОПЕПТИДАЗЫ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ БОЛЬНЫХ РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ

Лаборатория патохимии обмена веществ и кафедра биохимии I ММИ им. И. М. Сеченова

При рассеянном склерозе одним из начальных ключевых звеньев процесса демиелинизации считают активацию протеаз, что приводит к разрушению белковой стромы миелина и образованию энцефалитогенных пептидов [5, 8]. Возрастающее протеазной актив-

ности регистрируют по периферии очага демиелинизации. Обнаружено [15] повышение лейцинаминопептидазной активности в ликворе больных рассеянным склерозом в стадии обострения, что, по-видимому, обусловлено активацией и выходом фермента в

ликвор из пораженных участков миелина. Отмечено [1], однако, снижение аминопептидазной активности сыворотки крови в остром периоде заболевания по сравнению с периодом ремиссии, что, вероятно, обусловлено появлением в биологических жидкостях специфического ингибитора. На присутствие в интактном миелине ингибитора лейцинаминопептидазы (ЛАП) указывают работы некоторых авторов [7]. Таким образом, данные литературы подтверждают возможность появления протеолитических ферментов в биологических жидкостях больных рассеянным склерозом.

Целью данной работы были выделение из биологических жидкостей фермента ЛАП и попытка идентификации его как маркера миелина.

Методика

Всего было обследовано 74 больных рассеянным склерозом, 35 пациентов находились в фазе ремиссии, у 39 человек была установлена фаза обострения заболевания. Контрольную группу составили 46 больных с различными поражениями нервной системы без признаков раздражения миелина (радикулиты вне стадии обострения, миопатии, паркинсонизм, спинальные амиотрофии, остаточные явления после перенесенного арахноидита), а также 8 больных с компенсированными циррозами печени.

В сыворотке крови и спинномозговой жидкости пациентов активность ЛАП определяли по методу [6, 7] с использованием набора реактивов фирмы «Fermognost» (ГДР). При применении в качестве субстрата L-лейцин-*p*-нитроанилида активность энзима выявляли по методу [14]. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее гидролиз 1 ммоль субстрата (лейцингидразида или L-лейцин-*p*-нитроанилида) за 1 мин при температуре 37 °С. В процессе работы выяснилось, что в биологических жидкостях больных рассеянным склерозом большая часть активности энзима проявлялась только после соответствующей обработки. Обнаруженная дополнительная активность фермента была обозначена как «связанная» в отличие от «свободной», доступной для определения прямыми методами. Для разделения форм фермента использовали впервые обнаруженное свойство «связанной» формы сорбироваться на сефадексе G-75 (видимо, вследствие высокого сродства связывающего агента к декстранам). Балластные белки и «свободная» ЛАП были удалены многократным промыванием колонки физиологическим раствором. «Связанная» активность после выдерживания колонки в течение 3—4 дней при температуре 0—4 °С была освобождена и элюирована физиологическим раствором.

Высокая степень очистки выделенного фермента была подтверждена методом электрофореза в полиакриламидном геле [12] с определением активности ЛАП.

Очищенный энзим отделяли от присутствующих в сыворотке крови печеночных форм ЛАП

с помощью электрофореза в агарозном геле. В качестве источника фермента одновременно использовали кровь больного гепатитом (12 ед/л) и острым нефритом (9,1 ед/л). На стандартную пластинку агарозного геля фирмы «Beskinap» наносили 5 мкл раствора энзима или 10 мкл сыворотки и помещали в камеру для электрофореза с 0,1 М трис-боратным буфером pH 9,2. Электрофоретическое разделение проводили при напряжении 100 В в течение 30—35 мин. Фиксацию пластин осуществляли погружая их на 5 мин в 3 М раствор сульфата аммония. Далее пластины погружали в ванночку с инкубационной смесью общим объемом 5 мл, содержащую лейцингидразид или L-лейцин-*p*-нитроанилид в конечной концентрации 18 ммоль в 0,1 М этаноловом буфере pH 9,7 и инкубировали в течение 40—60 мин при температуре 37 °С. Проявленный 5 % раствором 4-диметиламинобензальдегида образец фиксировали метанол — формалиновой смесью (40 % метанол + 10 % формальдегид в соотношении 2:1).

Молекулярную массу очищенного энзима определяли двумя способами: 1) геле-фильтрацией на сефадексе G-200; 2) методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия [12].

Результаты и обсуждение

Результаты определения активности ЛАП в сыворотке крови и ликворе больных рассеянным склерозом представлены в таблице.

Установлено, что активность фермента в сыворотке крови у больных демиелинизирующим заболеванием колебалась в пределах 1,2—10 ед/л, составив в среднем $3,35 \pm 0,4$ ед/л, и таким образом превысив аналогичное значение контрольной группы ($p < 0,05$). В стадии ремиссии активность фермента увеличивалась до $4,2 \pm 0,61$ ед/л (от 3,2 до 10 ед/л), что существенно выше активности ЛАП в остром периоде заболевания (от 1,2 до 3,8 ед/л). В ликворе изменений активности фермента по сравнению с таковой у лиц контрольной группы выявлено не было.

Увеличение активности ЛАП в крови, как в целом по группе больных, так и в индивидуальных случаях, могло быть обусловлено сопутствующим поражением печени и освобождением изоформ фермента. В литературе имеются указания на поражение печени при рассеянном склерозе [3]. Однако параллельное определение активности энзима с использованием L-лейцин-*p*-нитроанилида — классического субстрата печеночной изоформы фермента — не подтвердило этого предположения (см. таблицу). По-видимому,

Изменения активности свободной и связанной ЛАП (в ед/л; $M \pm m$) в биологических жидкостях у больных с неврологическими заболеваниями

Группа пациентов	Кровь				Ликвор			
	свободная активность		связанная активность		свободная активность		связанная активность	
	а	б	а	б	а	б	а	б
Больные миопатиями, компенсированными циррозами печени, радикулитом, паркинсонизмом и др. ($n = 54$, контроль)	$2,42 \pm 0,26$	$25,16 \pm 3,44$	0	0	$0,43 \pm 0,19$	0	0	0
	$3,35 \pm 0,4$ $< 0,05$	$13,06 \pm 1,03$ $< 0,01$	$25,7 \pm 1,7$ $< 0,01$	0	$0,48 \pm 0,008$ $< 0,05$	0	0	$92,0 \pm 5,1$ $< 0,001$
Больные рассеянным склерозом ($n = 74$)	$2,35 \pm 0,38$	—	$28,8 \pm 1,28$	—	$0,40 \pm 0,09$	—	—	$99,4 \pm 5,07$
	$4,2 \pm 0,61$ $< 0,05$	—	$17,3 \pm 2,7$ $< 0,01$	—	$0,65 \pm 0,16$ $> 0,05$	—	—	$79,5 \pm 8,3$ $< 0,01$
в стадии обострения ($n = 39$)								Следы активности
в стадии ремиссии ($n = 35$)								

Примечание. а — лейцингидразид, б — Z-лейцин-п-нитроанлид. p — степень достоверности между контр⁰льной и опытной группами, p_1 — степень достоверности между стадиями обострения и ремиссии.

активность энзима у больных рассеянным склерозом повышается за счет выхода фермента из некротизированных участков миелина. В острой фазе заболевания одновременное освобождение ингибитора существенно снижает суммарную активность фермента в крови. Таким образом, большая часть ЛАП, по-видимому, циркулирует в биологических жидкостях в комплексе с ингибитором.

Нам удалось подтвердить это предположение. Разработан метод для отделения ЛАП от связывающего агента.

1—3 мл сыворотки крови или ликвора пропускали через хроматографическую колонку размером $5 \times 0,8$ см с приспособлением для центрифугирования, заполненную набухшим сефадексом G-75. Для удаления балластных белков колонку центрифугировали со скоростью 700 об/мин, промывали 5—6 мл физиологического раствора и снова центрифугировали. Фермент от предполагаемого ингибитора отделяли выдерживанием колонки в течение 3—4 сут при температуре $0-4^\circ\text{C}$. В течение этого времени, по-видимому, вследствие аутоокисления происходил разрыв химических связей между энзимом и связывающим агентом, имеющим высокое сродство к сефадексу. Далее фермент элюировали 2 мл физиологического раствора.

Высокая степень очистки препарата была подтверждена с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (рис. 1).

Для проверки ферментативной активности обнаруженной фракции столбика геля извлекали из трубочек, разрезали в поперечном направлении по 3 мм и каждый отрезок элюировали 0,05M веронал-мединаловым буфером pH 8,6, содержащим 2,5% хлорида калия, для осаждения додецилсульфата натрия. В полученном элюате определяли активность ЛАП с использованием в качестве субстрата лейцингидразида. Установлено, что 95% активности фермента сосредоточено на участке геля соответствующей фракции с молекулярной массой 65 000 дальтон.

Была также измерена молекулярная масса выделенного фермента с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-200 с постоянным определением

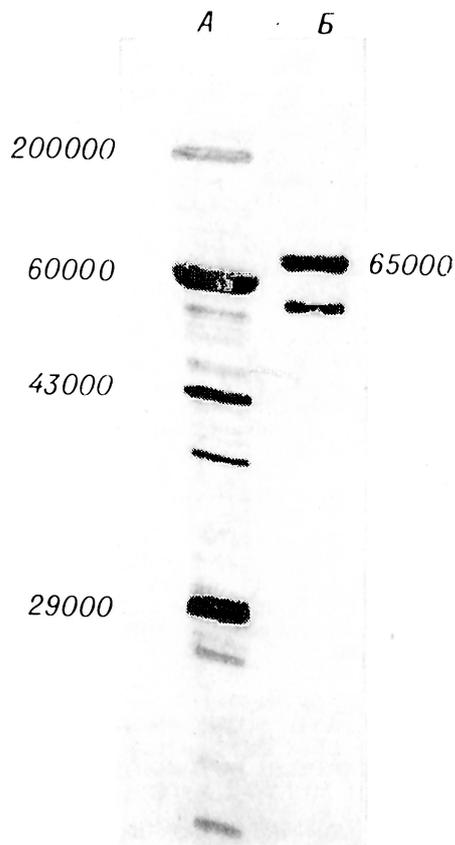


Рис. 1. Электрофорез ЛАП в ПААГ.
Разделение: А — белков-маркеров с известной молекулярной массой; Б — исследуемого элюата, полученного после обработки на сефадексе G-75 ликвора больных рассеянным склерозом.

активности ЛАП. Молекулярная масса фермента оказалась в пределах 63 000—65 000 дальтон, что подтвердило результаты, полученные методом электрофореза в полиакриламидном геле. В то же время величина молекулярной массы для печеночных и почечных изоформ фермента значительно превышала определенную нами [6].

Выделенный фермент отличался по физико-химическим свойствам от присутствующих в сыворотке крови других изоформ ЛАП. Так, при электрофорезе на пластинках агарозного геля энзим оставался на старте, в то время как печеночная и почечная формы фермента отделялись от стартовой линии (рис. 2). При использовании в качестве субстрата L-лейцин-*p*-нитроанилида активность в области стартовой линии не проявлялась.

Полученные результаты указывают на присутствие в биологических жидкостях у больных рассеянным склерозом

характерной формы ЛАП, что имеет диагностическое значение. Содержание связанной формы фермента превышало активность свободной формы в сыворотке крови в 8 раз, а в ликворе — в 184 раза.

Тот факт, что активность ЛАП в ликворе многократно превышает активность фермента в сыворотке крови, является одним из доказательств принадлежности ЛАП к числу ферментов нервной системы. Поскольку фермент выявлен только у больных с демиелинизирующими заболеваниями, можно предполагать, что ЛАП (в комплексе с ингибитором или отдельно) выходит в ликвор при деструкции миелина.

Данные литературы о содержании протеолитических ферментов в миелине крайне противоречивы [4, 13]. Предполагали существование 4 энзимов: кислой и нейтральной протееиназ, ариламидазы и ЛАП (КФ.3.4.11.1). Затем было показано [4, 11], что очищенный миелин имеет лейцинаминопептидазную активность (оптимум — рН 7,6; субстрат трипептид лей-гли-гли) и, возможно, кальцийзависимую протееиназную активность [7], но с этим положением согласны не все авторы [17].

Однако, учитывая высокую скорость обновления белка миелина (период полужизни основного белка у лабораторных животных колеблется в пределах 14—21 дня), нельзя исключить существование в миелине других протеолитических ферментов, в частности изоформ ЛАП.

Попытки [2, 15] выявить ЛАП миелина в биологических жидкостях у больных с демиелинизирующими заболеваниями дала противоречивые ре-

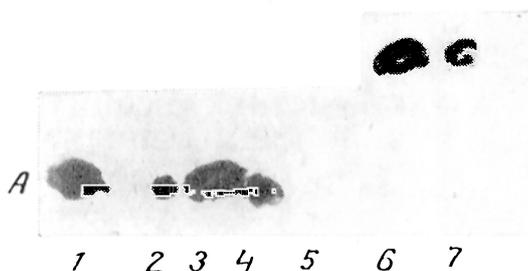


Рис. 2. Электрофоретическое разделение специфической ЛАП от сывороточной формы фермента.

А — стартовая линия; 1, 2, 3, 4 — элюат из сыворотки крови больных рассеянным склерозом после обработки на сефадексе G-75; 5, 6, 7 — сыворотка крови больных гепатитом и острым нефритом.

зультаты [2], поскольку были использованы субстраты для определения ариламидазы, в частности L-лейцил-β-нафтиламид. Выделенная нами форма ЛАП взаимодействовала с алифатическими соединениями, но не катализировала гидролиз классических ариламидазных субстратов (см. таблицу).

Оптimum pH ЛАП реакции был в области 9,7—10,0; другие авторы [15] определяли активность фермента при нейтральных значениях pH. Подбор оптимальных условий для определения активности ЛАП и введение дополнительных приемов, позволяющих отделить фермент от предполагаемого ингибитора, позволили зарегистрировать активность ЛАП в биологических жидкостях больных с демиелинизирующими заболеваниями.

Свойства выделенного фермента (субстратная специфичность, электрофоретическая подвижность, молекулярная масса) свидетельствуют о появлении при демиелинизирующих заболеваниях новой формы ЛАП, которая является компонентом миелина.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Иванова Е. А.* Клинические и параклинические критерии дифференциальной диагностики рассеянного склероза и нейрохирургических заболеваний: Автореф. дис. канд. мед. наук. — М., 1982.
2. *Иванова Е. А., Хохлов А. П., Мельничук П. В.* // Журн. невропатол. и психиатр. — 1982. — № 2. — С. 171—176.
3. *Марков Д. А., Леонович А. Л.* Рассеянный склероз. — М., 1976.
4. *D'Monte B., Mela P., Marks N.* // *Eur. J. Biochem.* — 1971. — Vol. 23. — P. 355—365.
5. *Einstein E. R., Csejley J., Dalal K. B.* et

- al. // *J. Neurochem.* — 1974. — Vol. 23. — P. 965—971.
6. *Fittkau S., Förster U., Pascual C., Schunck W. H.* // *Eur. J. Biochem.* — 1974. — Vol. 44. — P. 523—528.
7. *Frey H. J., Riekkinen P. J., Rinne V. K., Arslila A. V.* // *Brain Res.* — 1970. — Vol. 22. — P. 243—248.
8. *Hallpike J. F., Adams C. W. M.* // *Histochem. J.* — 1969. — Vol. 1. — P. 559—578.
9. *Haschen R. J., Farr D.* // *Z. klin. Chem.* — 1968. — Bd 6. — S. 11.
10. *Haschen R. J.* // *Enzymdiagnostik.* — Jena, 1970.
11. *Hirsch H. E.* // *Neurology (Minneapolis).* — 1976. — Vol. 26, N 6. — Pt 2. — P. 39—41.
12. *Laemmli U. K.* // *Nature.* — 1970. — Vol. 227. — P. 680—685.
13. *Marks N.* // *Advanc. exp. Med. Biol.* — 1972. — Vol. 32. — P. 263.
14. *Nagel W. F., Willing F., Schmidt F. H.* // *Klin. Wschr.* — 1964. — Bd 42. — S. 447.
15. *Rinne U. K., Riekkinen P. J.* // *Acta neurol. scand.* — 1968. — Vol. 44. — P. 156—167.
16. *Sato S., Miyalake T.* // *Biomed. Res.* — 1982. — Vol. 3. — P. 461—464.
17. *Suzuki K.* // *Neurologische Mutations Affecting Myelination.* — Amsterdam, 1980. — P. 333—347.

Поступила 10.10.86

ISOLATION AND SOME PROPERTIES OF SPECIFIC LEUCINE AMINOPEPTIDASE FROM BIOLOGICAL FLUIDS OF PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS

*A. P. Khokhlov, T. S. Baskaeva,
N. A. Khrustaleva, I. A. Zavalishin,
V. T. Mozhenkov*

I. M. Sechenov I Medical School, Moscow

Specific form of leucine aminopeptidase (which was distinct from other forms of the enzyme found in blood) was characterized by its physico-chemical properties — pH optimum, substrate specificity, electrophoretic mobility and molecular mass. The enzyme was isolated from biological fluids of patients with multiple sclerosis. Free and bound forms of the enzyme were detected in blood and cerebrospinal fluid. Estimation of the bound enzyme activity has a diagnostic significance.

УДК 616.517-07:616.591-008.93:577.112/.113-076.5:576.315.42

И. З. Яговдик, Т. А. Федорова, О. П. Детинкин

ХАРАКТЕРИСТИКА АССОЦИИИ БЕЛКА И ДНК В ХРОМАТИНЕ КЛЕТОК ЭПИДЕРМИСА ПРИ ПСОРИАЗЕ

Белорусский научно-исследовательский кожно-псеврологический институт Минздрава БССР, сектор геронтологии АН БССР, Минск

Этиология и многие вопросы патогенеза псориаза до сих пор остаются невыясненными. Немаловажная роль в решении этой проблемы принадлежит изучению функционирования генома псориазных клеток [4].

Как известно, функция генома регу-

лируется различными факторами и зависит в определенной степени от состояния хроматина клеток [1]. Одним из показателей его состояния является степень ассоциации содержащихся в нем ДНК и белка [4]. Анализ литературы показал, что особенности функци-

ционирования хроматина при псориазе, сопровождающемся изменением репликативного синтеза ДНК и функционирования генома, изучены недостаточно [6]. Не исследована прочность связи нуклеопротенидного комплекса в псориатической клетке.

Мы предприняли попытку восполнить этот пробел и выявить возможные различия в прочности связи ДНК и белка в хроматине кератиноцитов здоровых людей и больных псориазом.

Методика

Для изучения связи ДНК с белком в хроматине кератиноцитов применен метод нуклеопротенидцелитной хроматографии с использованием в качестве исходного материала нефракционированных клеточных лизатов, в котором реализуется принцип разделения нуклеиновых кислот соответственно прочности связи с белковым компонентом в нуклеопротениде. При этом белковая часть сорбируется на целите, а нуклеиновые кислоты извлекаются при помощи градиента концентрации диссоциирующих агентов (соль, мочевины, температура) [3].

Эпидермис для исследования взят у 7 больных псориазом с пораженных и не пораженных патологическим процессом участков, а также у

6 здоровых лиц. Материал брали электродерматомом с участков кожи на спине под местной анестезией хлорэтилом. Полученные кусочки кожи затем в стерильных условиях парезали лезвием бритвы на равные части и инкубировали 4 ч при 37°C в культуральной среде 199, содержащей радиоактивный ³H-тимидин (10 мкКи/мл).

Для получения нефракционированных клеточных лизатов около 15 мг ткани после инкубации гомогенизировали в 4,5 мл ТМ буфера (0,25 М трис-НСl рН 7,6; 0,005 MgCl₂), содержащем по 1% тритона X-100 (неионный детергент) и метабисульфита натрия (ингибитор протеаз). Лизат наносили на колонку размером 0,9×7 см, заполненную 1,5 г целита-545.

Фиксированные на целите за счет белкового компонента нуклеопротениды подвергали диссоциации линейным градиентом концентрации хлористого лития и мочевины (до 4 и 8 М соответственно). При этом элюировались относительно слабо связанные с белком нуклеиновые кислоты. Прочно связанные нуклеиновые кислоты элюировали в градиенте температуры (от 2 до 100°C) раствором 4 М хлористого лития и 8 М мочевины в буфере ТМ.

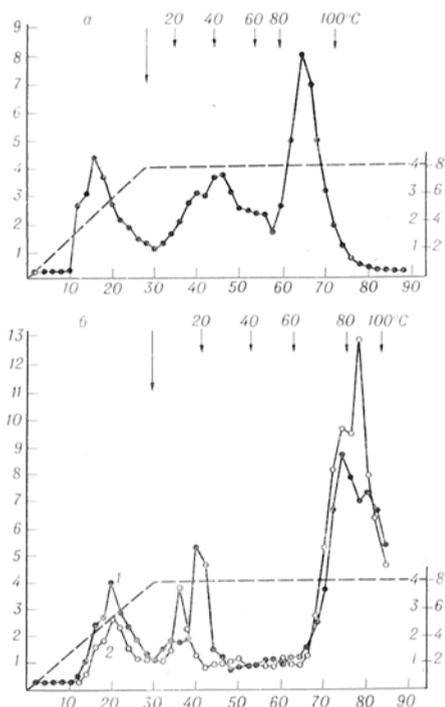
Собирали фракции по 3 мл. Для определения радиоактивности к пробам добавляли РНК-носитель до конечной концентрации 100 мкг/мл. ДНК осаждали двойным объемом 96% этилового спирта при 2°C. Полученный осадок гидролизовали в 0,5 мл HClO₄ при 80°C в течение 20 мин. Радиоактивность проб измеряли в диоксиановом сцинтиляторе (0,2 г ПОПОН, 4 г ППО, 60 г нафталина на 1 л диоксиана) на счетчике «Mark-3» фирмы «Nuklear Chicago» (США).

Результаты и обсуждение

Результаты исследования приведены на рисунке. На оси ординат обозначена радиоактивность каждой фракции (в процентах по отношению к суммарной) во всех пробах, что позволяет проводить сравнительный анализ данных всей серии опытов.

На хроматограмме четко определяются два основных пика радиоактивной ДНК. Первый пик образуется за счет элюции с колонки относительно слабо связанной с белками ДНК (α -форма хроматина). Диссоциация комплекса в этом случае происходит при 2°C и концентрации хлористого лития и мочевины соответственно 2 и 4 М. Рядом авторов показано, что наличие такой формы характерно для клеток, находящихся в состоянии покоя (стадия G₀ клеточного цикла).

Второй пик радиоактивности на хроматограмме формируется прочно ассоциированной с белком ДНК (β -форма хроматина). Ее элюцию 4 М хлористым литием и 8 М мочевиной наблюдали при достижении температуры в колонке 80°C и выше. Показано, что такая форма присуща активно деля-



Дезоксирибонуклеопротенидцелитная хроматограмма клеток эпидермиса человека.

По оси абсцисс — номер фракции; по оси ординат: слева — радиоактивность (в % по отношению к общей во всех фракциях), справа — градиент концентраций LiCl и мочевины (в М). а — кожа здорового человека; б — пораженная (1) и непораженная (2) кожа больного псориазом. Стрелками указано начало и развитие градиента температуры.

щимся клеткам и появляется при переходе клеток от состояния покоя к делению [3]. Возрастание при этом прочности ассоциации нуклеопротенда связано, по-видимому, с активированием и синтезом ДНК-полимераз, ковалентно связывающихся с ДНК.

Из рисунка видно, что при достижении температуры 20 °С на хроматограмме появляется дополнительный пик радиоактивности, что может быть связано с сопряженными перестройками хроматина при переходе клеток из одного состояния в другое. Обращает на себя внимание значительно большее количество этих форм в кератиноцитах человека по сравнению с таковым у морских свинок [2]. В то же время для кожи человека (в отличие от таковой морских свинок) характерно преобладание β -формы хроматина [2].

Анализ полученных хроматограмм позволяет сделать заключение об отсутствии принципиальных различий между распределением различных форм хроматина в пораженной и непораженной коже больных псориазом и здоровых людей.

Однако проведенный расчет соотношения количества радиоактивной ДНК, снятой с помощью градиентов концентрации и температуры, показал, что различия между псориазическими и нормальными кератиноцитами имеются. Так, во всех случаях в пораженной и непораженной коже больных псориазом количество прочно связанной ДНК, элюируемой в жестких условиях (при повышении температуры от 2 до 100 °С), было в 4 и более раза выше количества ДНК, снятой с колонки, только за счет повышения градиента концентрации. В здоровой коже соотношение ни в одном случае не превышало 3,9. Это свидетельствует об изменении количества ДНК, прочно ассоциированной с белком в хроматине эпидермиса больных псориазом в сторону увеличения. Последнее позволяет высказать предположение об увеличении в псориазической коже числа пролиферирующих клеток, что, на первый взгляд, согласуется с гипотезой об увеличении пролиферативного пула [5]. Однако обнаруженные нами изменения в соотношении α - и β -форм хроматина незначительны и не могут объяснить столь интенсивное образование клеток, которое наблюдается при псориазе [7].

Отсутствие значительного возрастания пула пролиферирующих клеток в коже больных псориазом, о чем свидетельствуют полученные нами хроматограммы, подтверждает оспариваемое до сих пор предположение об ускорении при псориазе клеточного цикла кератиноцитов. Это согласуется с данными ряда исследователей, показавших резкое уменьшение продолжительности всех периодов деления клеток при псориазе [6].

Таким образом, полученные нами данные о незначительном увеличении прочно ассоциированной с белком ДНК в хроматине псориазической кожи человека позволяют предположить косвенные доказательства патогенетической роли ускорения клеточного цикла в возникновении псориазической болезни и противоречат предположению о существенном увеличении пролиферативного пула в коже больных псориазом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бредбери Э. М. // Клеточное ядро. Морфология, физиология, биохимия. — М., 1972. — С. 30—43.
2. Делинкин О. И., Яговдик Н. З. и др. // Патогенез и терапия кожных и венерических заболеваний. — Минск, 1984. — С. 95—98.
3. Сьяксте Н. И. и др. // Молекул. биол. — 1981. — № 6. — С. 1321—1328.
4. Busch H. The Cell Nucleus: Vol. 4. — New York, 1978.
5. Gelfand // Brit. J. Derm. — 1976. — Vol. 95. — P. 577.
6. Jarret A. // Ibid. — 1973. — Vol. 89. — P. 607—612.
7. van Scott E., Ekel T. M. // Arch. Derm. — 1963. — Vol. 88. — P. 373—382.

Поступила 02.09.85

CHARACTERISTICS OF PROTEIN-DNA ASSOCIATION IN CHROMATIN OF EPIDERMAL CELLS IN PSORIASIS

N. Z. Yagovdik, T. A. Fedorova,
O. N. Delinkin

Dermatovenerologic Institute, Ministry of Public Health of the Byelorussian SSR, Department of Gerontology, Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Minsk

Two forms of nucleoprotein complex α and β were found in human keratinocytes by means of nucleoprotein celite chromatography. There were not observed any principal differences between distribution of chromatin various forms in impaired and normal skin of the patients with psoriasis as well as in skin of healthy persons. Only slight differences were detected in the ratio of radioactive DNA in α and β forms of chromatin from impaired and normal keratinocytes, while tightly-bound DNA was increased in psoriasis. In psoriasis acceleration of keratinocyte cell cycle but not an increase in proliferating cells pool appear to occur.

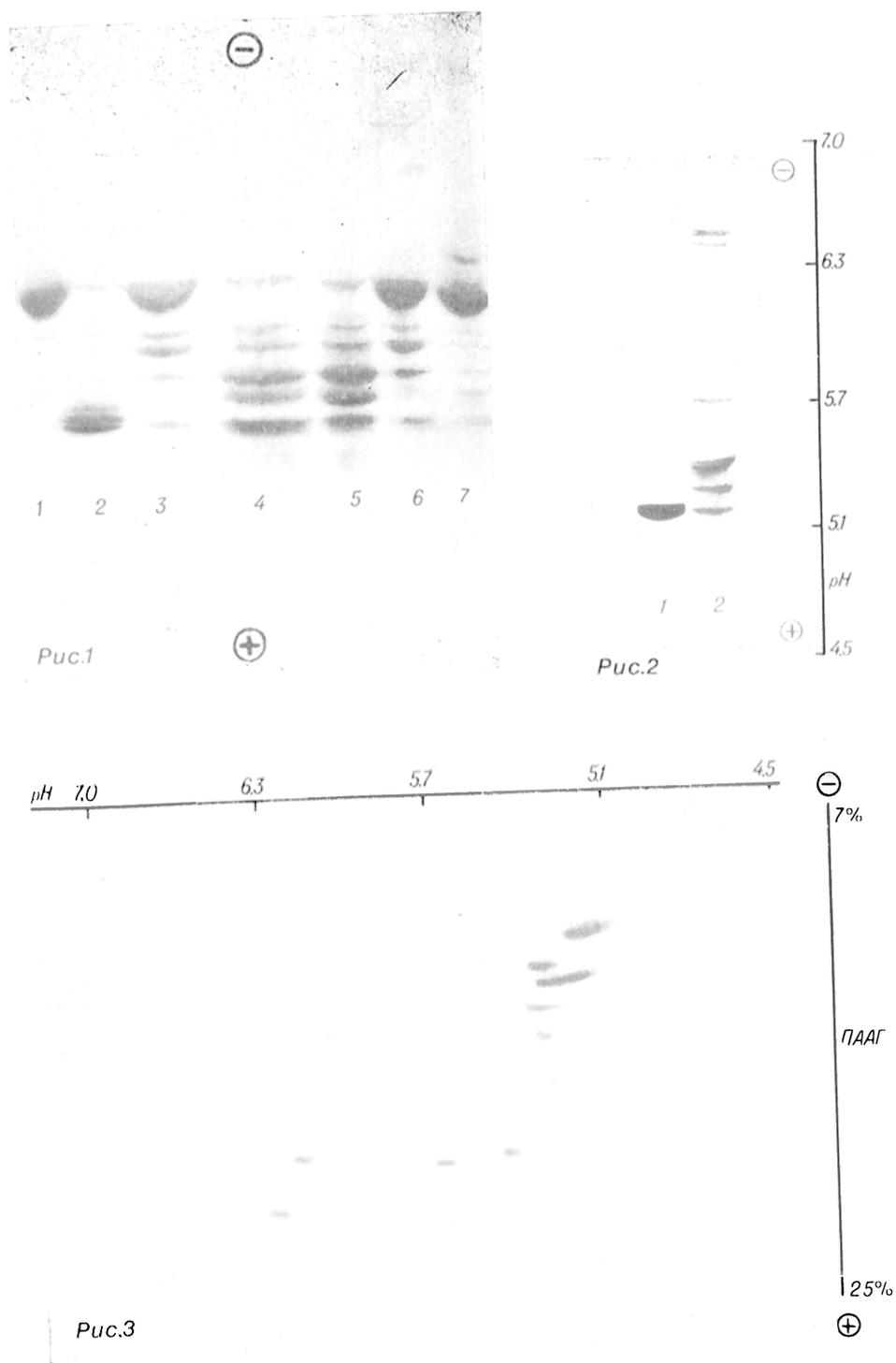


Рис. 1. Электрофорез в градиенте ПААГ (7—25 %) с 0,1 % ДДС Na.
 1 — САЧ; 2 — трицепин (как маркер); 3 и 6 — гидролизат свежевыделенного альбумина; 4, 5 — гидролизат лиофилизированного альбумина фирмы «Reena»; 7 — сыворотка крови человека.

Рис. 2. ИЭФС продуктов ограниченного гидролиза САЧ (борат-полиольная система).
 1 — мономер САЧ; 2 — гидролизат САЧ.

Рис. 3. Двухмерный электрофорез продуктов ограниченного гидролиза САЧ.

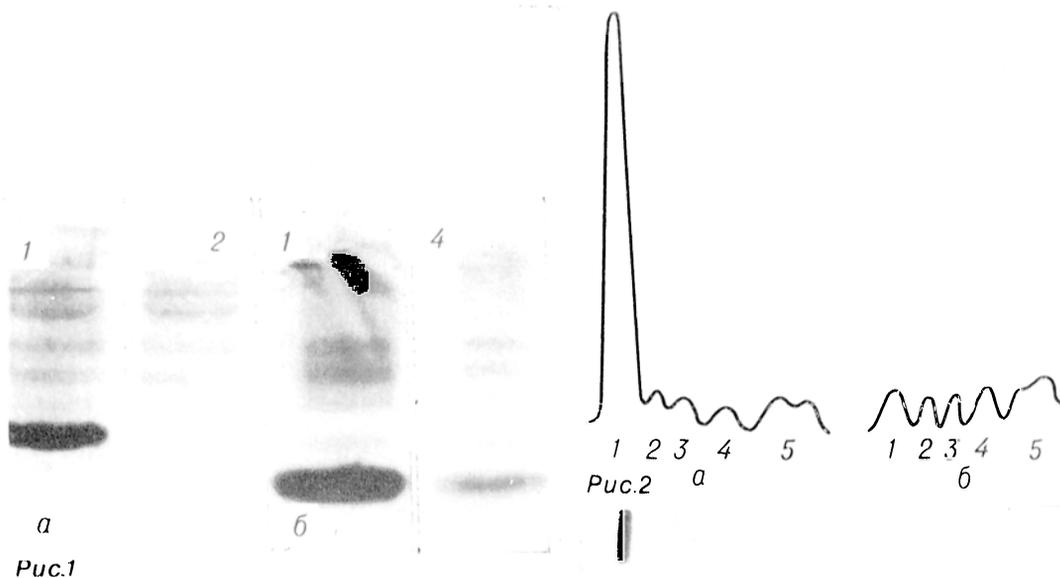


Рис. 1

Рис. 1. Электрофореграммы сыворотки крови здоровых (а) и больных (б) людей на ацетатцеллюлозных пленках до (1) и после (2) обработки 70%-этанолом.

Рис. 2. Денситограммы сыворотки крови здорового человека после электрофореза на ацетатцеллюлозных пленках до (а) и после (б) обработки 70%-этанолом.

1 — альбумин; 2-5 — соответственно α_1 , α_2 , β - и γ -глобулины.

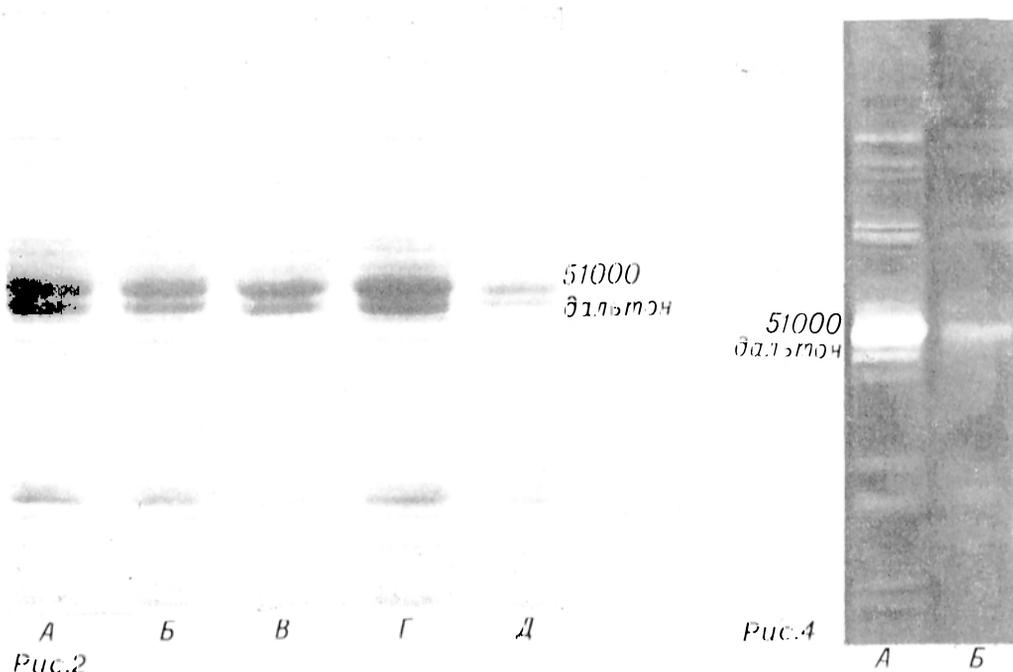


Рис. 2

Рис. 2. Электрофоретическое разделение микросом печени крыс, индуцированных ИПААН. А — 1 сут индукции; В — 2 сут индукции; В — 3 сут индукции; Г — 4 сут индукции; Д — контроль.

Рис. 4. Автофлюорография пластинок геля после электрофоретического разделения микросом печени крыс, индуцированных ИПААН.

А — индукция ИПААН; Б — контроль.

В. Е. Рыженков, А. А. Прокопьев, Г. Г. Нерсиян, И. Ю. Каменева,
А. Г. Шава

ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ РАЦЕМИЧЕСКОГО МЕТИЛОВОГО ЭФИРА 16,16-ДИМЕТИЛ-D-ГОМО-8-ИЗОЭСТРОНА

Институт экспериментальной медицины АМН СССР и Ленинградский университет
им. А. А. Жданова

В литературе имеются сведения о том, что частота сердечно-сосудистых заболеваний у женщин в пременопаузальном периоде достоверно ниже, чем у мужчин сравнимаемого возраста [1, 2]. При этом у женщин отмечается более низкое содержание в крови общего холестерина и триглицеридов, а также холестерина атерогенных липопротеидов и более высокий уровень холестерина липопротеидов высокой плотности [11, 4]. Эти различия постепенно сглаживаются после менопаузы [13]. Отмечена важная роль эстрогенов в метаболизме липидов и липопротеидов [16]. В эксперименте показано, что применение эстрогенов уменьшает развитие атеросклероза и снижает содержание липидов в атеросклеротических бляшках [5]. Отмечено уменьшение проницаемости артериальной стенки для атерогенных липопротеидов под влиянием эстрогенов [17]. В то же время, применение их в клинике в качестве гиполипидемических средств показало, что эти соединения вызывают выраженные побочные эффекты, одним из которых является увеличение уровня триглицеридов в сыворотке крови и опасность тромбообразования [14]. В связи с этим в настоящее время проводятся работы по изысканию аналогов стероидных гормонов с ослабленным эстрогенным действием или лишенных последнего, в то же время в силу структурного сходства сохраняющих положительное действие на липидный обмен [3, 6].

Целью настоящей работы было изучение влияния рацемического метилового эфира 16,16-диметил-D-гомо-8-изоэстронона (ДГИ) на содержание холестерина и триглицеридов в сыворотке крови, печени и аорте intactных животных, а также в условиях индуцированной гиперлипидемии. Исследовали влияние ДГИ на уровень неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК) в сыворотке крови. Для сравнения использовали эстрадиол.

Методика

ДГИ был синтезирован по методу И. В. Торгова и С. Н. Апанченко [8], его строение доказано методами УФ-, ИК- и ПМР-спектроскопии. Опыты проводили на крысах-самцах массой 200—250 г, морских свинках-самцах массой 300—400 г и кроликах-самцах массой 3—3,5 кг, получавших стандартный лабораторный рацион. В опытах на intactных крысах вещества вводили в течение 10 дней внутримышечно в 0,3 мл подсолнечного масла, эстрадиол — в дозе 1 мг/кг, ДГИ — 10 мг/кг ежедневно. Гиперлипидемия у морских свинок вызывали ежедневным введением холестерина в дозе 0,5 г/кг перорально вместе со смесью животных жиров (0,75 г/кг) в течение 1 мес. Гиперлипидемия у крыс индуцировали введением холестерина (1 г/кг), витамина D₂ (300 000 МЕ/кг) через зонд в желудок в течение 6 дней, а также однократной инъекцией поверхностно-активного вещества тритона WR-1339 (225 мг/кг внутривентриально). В последнем случае исследуемое вещество вводили также внутривентриально в течение 3 дней до применения тритона и одновременно с ним. Животных декапитировали после 14—18 ч голодания. Для стимуляции липолиза в жировой ткани применяли адреналин (1,5 мг/кг внутривентриально за 30 мин до декапитации). Исследуемое вещество в этом случае вводили в течение 3 дней до инъекции адреналина; последнее введение осуществляли за 30 мин до введения адреналина. Гиперлипидемия у кроликов вызывали ежедневным введением холестерина в дозе 0,5 г/кг в 5 мл растительного масла перорально в течение 90 дней. ДГИ в этих опытах применяли в дозе 15 мг/кг. Кровь получали через 18 ч голодания животных. Липиды сыворотки крови экстрагировали по Бреддону [9]. Содержание общего холестерина определяли по реакции Либерманна — Бурхардта, триглицериды — в соответствии с методом Нери [15], НЭЖК — по методу [12]. Влияние ДГИ на гонадотропную функцию гипофиза изучали на самцах крыс массой 180—200 г и самках массой 60—70 г в соответствии с описанным методом [7].

Острую токсичность ДГИ исследовали в опытах на белых мышах-самцах массой 18—20 г. При внутривентриальном введении его ЛД₅₀ составила 2584 мг/кг. Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики [1].

Результаты и обсуждение

Из приведенных в табл. 1 данных видно, что ДГИ и эстрадиол достоверно снижают концентрацию холестерина в сыворотке крови intactных крыс.

Влияние ДГИ на содержание липидов в сыворотке крови, печени и аорте у животных разного вида

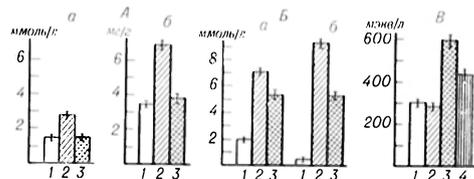
Животные	Видимое вещество	Доза, мг/кг	Холестерин			Триглицериды	
			сыворотка, ммоль/л	печень, мг/г	аорта, мг/г	сыворотка, ммоль/л	печень, мг/г
Крысы-самцы	1. Растворитель (15)		1,55±0,07	4,24±0,18		0,59±0,05	7,60±0,39
	2. Эстрадиол (6)	1	0,98±0,03 $P_{2-1}<0,01$	5,50±0,30		1,16±0,09 $P_{2-1}<0,05$	9,00±0,40 $P_{2-1}<0,05$
	3. ДГИ (12)	10	0,77±0,07 $P_{3-1}<0,01$	4,92±0,35		0,64±0,05	7,05±0,91
Морские свинки-самцы	1. Растворитель (8)		1,00±0,04	2,20±0,13	1,58±0,08	1,52±0,04	4,04±0,53
	2. Холестерин (8)	500	3,91±0,60 $P_{2-1}<0,01$	11,80±1,15 $P_{2-1}<0,01$	1,80±0,07	0,95±0,09 $P_{2-1}<0,01$	11,9±0,91 $P_{2-1}<0,01$
	3. Холестерин + ДГИ (7)	500+10	1,68±0,16 $P_{3-2}<0,01$	3,34±0,31 $P_{3-2}<0,01$	1,71±0,11	0,85±0,04	10,0±0,64
Кролики-самцы	1. Растворитель (6)		1,70±0,34	3,10±0,20	2,50±1,70	1,10±0,03	4,00±0,30
	2. Холестерин (6)	500	49,4±2,70 $P_{2-1}<0,01$	19,9±2,30 $P_{2-1}<0,01$	33,6±1,21 $P_{2-1}<0,01$	6,51±1,21 $P_{2-1}<0,01$	17,8±0,85 $P_{2-1}<0,01$
	3. Холестерин + ДГИ (6)	500+15	31,5±2,60 $P_{3-2}<0,01$	16,3±2,97	19,9±5,29	4,87±0,97	11,9±1,75 $P_{3-2}<0,05$

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

При этом ДГИ не вызывает изменений содержания триглицеридов в сыворотке крови и печени, в то время как под влиянием эстрадиола уровень триглицеридов значительно возрастает. У крыс, получавших гиперлипидемическую диету, введение ДГИ снижает повышенное содержание холестерина в крови и печени (см. рисунок, А). У крыс с гиперлипидемией, индуцированной введением тритона WR-1339, изучаемое соединение достоверно сни-

жает уровень как холестерина, так и триглицеридов в сыворотке крови (см. рисунок, Б). В условиях повышенного уровня НЭЖК в крови, вызванного введением адреналина, ДГИ приводит к достоверному его снижению (см. рисунок, В). В опытах на морских свинках с гиперлипидемией, индуцированной введением холестерина вместе с животными жирами, также отмечено достоверное снижение содержания общего холестерина в сыворотке крови и печени под влиянием ДГИ (см. табл. 1). При этом содержание триглицеридов в крови имело тенденцию к снижению. Как видно из табл. 1, у кроликов с гиперлипидемией изучаемое соединение достоверно снижало содержание холестерина в сыворотке крови, а также триглицеридов в печени. Кроме того, имела тенденция к снижению содержания холестерина в аорте. Степень атеросклеротического поражения аорты у животных, получавших ДГИ, была достоверно ниже, чем у кроликов, получавших только холестерин ($31,8\pm 7,6$ и $57,5\pm 5,9$ % соответственно; $P<0,05$).

Таким образом, из полученных данных следует, что ДГИ оказывает отчетливое гиполипидемическое действие и уменьшает степень атеросклеротического поражения аорты у кро-



Влияние ДГИ на содержание холестерина, триглицеридов и НЭЖК в сыворотке крови крыс.

А — изменение содержания холестерина в сыворотке крови (а) и печени (б) крыс, получавших гиперлипидемическую диету.

1 — интактные животные; 2 — крысы, получавшие гиперлипидемическую диету; 3 — животные, получавшие гиперлипидемическую диету и ДГИ;

Б — изменение содержания холестерина (а) и триглицеридов (б) в сыворотке крови крыс с гиперлипидемией, индуцированной тритоном WR=1339.

1 — интактные животные; 2 — крысы, получавшие тритон WR=1339; 3 — крысы, получавшие тритон WR=1339 и ДГИ; В — изменение содержания НЭЖК в сыворотке крови крыс. 1 — интактные животные; 2 — животные, получавшие ДГИ; 3 — крысы, получавшие адреналин; 4 — крысы, получавшие адреналин и ДГИ.

Таблица 2
Влияние ДГИ на гонадотропную [функцию гипофизов крыс

Введенное вещество	$\frac{\text{Масса яичников}}{\text{Масса тела животного}} \cdot 10^3$
1. Суспензия гипофизов крыс, получавших растворитель (7)	$3,14 \pm 0,08$ $P_{1-4} < 0,01$
2. Суспензия гипофизов крыс, получавших эстрадиол (7)	$2,04 \pm 0,09$ $P_{2-1} < 0,01$
3. Суспензия гипофизов крыс, получавших ДГИ (7)	$2,92 \pm 0,12$
4. Физиологический раствор (7)	$2,13 \pm 0,06$

ликов. В то же время в отличие от классического эстрогена у животных, получавших ДГИ, не только не развивалась гипертриглицеридемия, но наблюдалась тенденция к нормализации содержания триглицеридов в сыворотке крови и печени морских свинок и кроликов (см. табл. 1). У крыс с гиперлипидемией, индуцированной триптоном WR-1339, отмечалось достоверное снижение концентрации триглицеридов в сыворотке крови (см. рисунок, А).

В следующей серии опытов было изучено влияние ДГИ на содержание гонадотропинов в гипофизе крыс. Известно, что повышение уровня эндогенных эстрогенов в крови или экзогенное их введение снижает содержание гонадотропинов в гипофизе [10]. Как видно из табл. 2, введение суспензии гипофизов интактных взрослых крыс неполовозрелым крысам-самкам привело к значительному увеличению у последних массы яичников, что указывает на значительное количество гонадотропинов (преимущественно фолликулостимулирующего гормона) в гипофизах интактных животных. Введение в течение 8 дней ДГИ взрослым крысам и последующее тестирование их гипофизов на гонадотропную активность не показало значимых различий по сравнению с показателями животных контрольной группы, в то время как введение эстрадиола привело к угнетению гонадотропной активности гипофизов крыс (см. табл. 2). Результаты этих опытов показывают, что в изученных дозах эстрадиол угнетает гонадотропную функцию гипофиза, в то время как ДГИ не оказывает подоб-

ного действия. Полученные данные свидетельствуют о том, что ДГИ лишен специфического эстрогенного эффекта. Этим, по-видимому, объясняется тот факт, что ДГИ в опытах на интактных и гиперлипидемических животных не увеличивает уровень триглицеридов в сыворотке крови.

Учитывая низкую токсичность рацемического метилового эфира 16,16-диметил-D-гомо-8-изоэстрогена, представляется перспективным дальнейшее его изучение для возможной апробации в качестве средства профилактики развития атеросклероза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беленький М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. — Л., 1963.
2. Герасимова Е. Н. // Структура, биосинтез и превращение липидов в организме животного и человека. — Л., 1978. — С. 7—8.
3. Кацапова О. Ф., Крылова Е. Б., Маргынова В. Ф., Шава А. Г. // Журн. огр. химии. — 1981. — Т. 51, № 12. — С. 2797—2799.
4. Климов А. Н., Шестов Д. Б., Трюфанов В. Ф. // Кардиология. — 1984. — № 4. — С. 56—62.
5. Наследова И. Д., Рафальский Я. Д. // Механизмы старения. — Киев, 1963. — С. 431—437.
6. Пат. 3546292 (1970), США // РЖ Хим. 1971. — Вып. 13. — И46711.
7. Рыженков В. Е., Павлыш В. В. // Пробл. эндокринологии. — 1964. — № 3. — С. 102—104.
8. Торгов И. В. // Изв. АН СССР. — Сер. хим. — 1982. — № 2. — С. 299—317.
9. Bragdon G. H. // Lipids and the Steroid Hormones in Clinical Medicine / Ed. F. W. Sunderman. — Philadelphia, 1960. — Vol. 2. — P. 7—8.
10. Desaulles P. A., Krahenbuhl C. // Acta endocr. (Kbh.). — 1964. — Vol. 47. — P. 444—456.
11. Heiss G., Tanir J., Davis C. E. et al. // Circulation. — 1980. — Vol. 61. — P. 302—315.
12. Haya K., Ui M. // J. Lipid Res. — 1965. — Vol. 6. — P. 16—20.
13. Kannel W. B., Hiorlland M. C., McNamara P. M., Gardon T. // Ann. intern. Med. — 1976. — Vol. 85. — P. 447—452.
14. Kaula K. N. // Triangle. — 1976. — Vol. 15. — P. 9—17.
15. Neri B. P., Fringe C. S. // Clin. Chem. — 1973. — Vol. 19. — P. 1201—1202.
16. Oliver M. F., Boyd G. S. // Circulation. — 1956. — Vol. 13. — P. 82—91.
17. Shimamoto T. // Jap. Heart J. — 1972. — Vol. 13. — P. 537—562.
18. Stamler J. // Circulation. — 1978. — Vol. 58. — P. 3—19.

Поступила 04.09.85

HYPOLIPIDEMIC EFFECT OF RACEMIC 16,16-DIMETHYL-D-HOMO-8-ISOESTRONE METHYL ESTER

V. E. Ryzhenkov, A. A. Prokop'ev, G. G. Nersisyan, I. Yu. Kameneva, A. G. Shavva

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

Racemic 16,16-dimethyl-D-homo-8-isoestrone methyl ester (substance I) was shown to decrease the content of cholesterol in blood serum and liver tissue of animals with induced hyperlipidemia (rats, guinea pigs, rabbits) as well as to decrease the rate of atherosclerotic im-

pairments in rabbit aorta. As distinct from usual estrogen, the substance I did not cause hypertriglyceridemia but normalized triglycerides in blood and liver tissue. Substance I exhibited low toxic effects.

УДК 612.351.1.015-085.23

С. А. Козлов, Е. Н. Киселев, Ю. В. Зиновьев

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РЯДА БИОХИМИЧЕСКИХ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИЗОЛИРОВАННОЙ ПЕРФУЗИРУЕМОЙ ПЕЧЕНИ КРОЛИКОВ, МОРСКИХ СВИНОК И КРЫС

Лаборатория патологической физиологии Кировского НИИ гематологии и переливания крови

Успешное осуществление пересадки печени теснейшим образом связано с решением проблемы достаточно длительной и надежной консервации этого органа [1]. Печень очень чувствительна к воздействию ишемии, поэтому использование даже самых совершенных перфузионных методов консервации не в состоянии обеспечить более чем 24-часовое гарантированное сохранение этого органа вне организма [2]. В доступной литературе мы не встретили работ, посвященных сравнительным биохимическим и физиологическим исследованиям изолированной перфузируемой печени различных видов животных. Между тем сопоставление видовой устойчивости печени к кислородному голоданию могло бы способствовать выяснению механизмов, повышающих резистентность органа к этому виду экстремальных воздействий. В настоящей работе были поставлены следующие задачи: исследовать основные энергетические процессы (потребление кислорода и гликолиз) и некоторые другие параметры изолированной перфузируемой печени кроликов, морских свинок и крыс; выявить видовую устойчивость печени этих животных к кислородному голоданию; сопоставить видовую устойчивость печени к кислородному голоданию, скорость основных энергопродуцирующих процессов, другие параметры в целях выяснения механизмов резистентности

к гипоксии как одному из основных факторов повреждения органов при консервации.

Методика

Опыты проведены на изолированной печени 10 кроликов породы шиншилла массой 2272 ± 86 г, 7 морских свинок массой 473 ± 54 г и 7 белых крыс массой 142 ± 31 г. Использовали фторотановый наркоз. Проводили срединную лапаротомию. Выделяли гепатодуоденальную связку, вводили канюли в общий желчный проток, воротную и нижнюю полую вены. Печень выделяли вместе с диафрагмой. Масса печени составляла у кроликов $83,5 \pm 8,0$ г, у морских свинок — $25,8 \pm 2,6$ г и у крыс — $8,9 \pm 0,9$ г. Печень отмывали от крови желатинолем, содержащим в 1 мл 5 ЕД гепарина (из расчета 4 мл желатиноля на 1 г массы печени), методом кратковременной перфузии через воротную вену и подключали к перфузионной системе. Последняя состояла из напорного сосуда, где находился оксигенированный раствор Хенкса, камеры для органа и теплообменника. Перфузию осуществляли через воротную вену в постоянном режиме при $36-38^\circ\text{C}$ в течение 60 мин. Давление перфузата автоматически поддерживалось на постоянном уровне, равном 15 мм рт. ст. Перфузат через полую вену оттекал в камеру, минуя последнюю через отвод. Перфузия осуществлялась в открытом контуре, без рециркуляции раствора. Напряжение кислорода в перфузате на входе составляло 730—800 гПа. Контролировали расход перфузата на выходе системы, артериовенозную разницу по напряжению кислорода, величине рН и содержание глюкозы, определяли концентрацию лактата в оттекающем перфузате, оценивали желчеотделительную функцию печени. Концентрацию глюкозы в перфузате определяли стандартным ортолуидиновым методом, содержание лактата — как описано ранее [3].

Животных умерщвляли кровопусканием на фоне фторотанового наркоза. Данные обрабатывали статистически методом непрямых разностей с использованием константной формулы [4].

Результаты и обсуждение

Перфузия изолированной печени животных осуществлялась в нормотермическом температурном режиме (36—38 °С) перфузатом, не содержащим эритроцитов и каких-либо других переносчиков кислорода. В связи с этим при нормальных метаболических потребностях органа содержание кислорода в циркулирующем растворе было сниженным: оксигенация чистым кислородом (рО₂ 550—600 мм рт. ст.) и повышенный расход перфузата (до 3—4 мл/мин/г) были не в состоянии компенсировать низкий коэффициент растворимости кислорода в солевом растворе. Иными словами, перфузия изолированной печени осуществлялась в гипоксическом режиме, о чем свидетельствует также неуклонное снижение потребления кислорода по мере увеличения длительности перфузии. Как известно, снижение потребления кислорода является довольно объективным критерием повреждения изолированного органа при его перфузии [5]. Исходя из вышеуказанного, мы провели сравнительную оценку степени повреждения печени разных видов животных при нормотермической 60-минутной перфузии в гипоксическом режиме по степени снижения потребления кислорода. Результаты были следующими (табл. 1). К концу перфузии потребление кислорода печенью кроликов снижалось до 48,3±5,3 %

исходного уровня, морских свинок — до 86,2±14,4 %, в то время как падения потребления кислорода печенью крыс на протяжении 60 мин практически не наблюдалось. Эти различия были статистически достоверны. Таким образом, можно заключить, что печень морских свинок и крыс более устойчива к гипоксии, чем печень кроликов.

Как видно из табл. 1, наибольшее среднее потребление кислорода за время перфузии имело место у крыс, несколько меньшее — у морских свинок и самое низкое — у кроликов. Иными словами, более устойчивая к гипоксии печень морских свинок и крыс имеет в то же время и более интенсивный аэробный энергетический обмен, проявляющийся в более высокой скорости потребления кислорода.

В табл. 2 представлены данные о скорости гликолиза в изолированной перфузируемой печени кроликов, морских свинок и крыс. Из таблицы видно, что более устойчивая к гипоксии печень морских свинок и крыс имеет и большую скорость гликолиза, что выражается в более интенсивном выбросе в перфузат лактата, конечного продукта данного энергетического процесса.

На протяжении всего периода перфузии происходил более или менее интенсивный выброс в циркулирующий раствор глюкозы. Однако статистически значимой разницы между сравниваемыми группами по этому показателю обнаружено не было. Это может свидетельствовать о приблизительно одинаковой скорости распада гликогена печени как одного из важнейших

Таблица 1

Скорость потребления кислорода изолированной перфузируемой печенью животных (в мкл/мин/г)

Животные	Время от начала перфузии, мин							Среднее потребление О ₂
	3	10	20	30	40	50	60	
Кролики (9—10) P ₁	12,9±1,4 <0,01	8,9±0,7 <0,01	7,7±0,4 <0,05	6,7±0,5 <0,05	6,2±0,5	5,8±0,3	5,8±0,5	7,7±0,4 <0,01
Морские свинки (6—7) P ₂	13,9±2,5	16,9±2,2	12,6±2,0 <0,01	11,7±2,0 <0,001	8,1±1,4 <0,001	8,0±1,1 <0,001	9,5±2,1 <0,05	12,0±1,2 <0,001
Крысы (5—7) P ₃	20,5±4,0	19,5±2,0 <0,001	21,8±1,9 <0,001	25,5±1,8 <0,001	20,5±1,3 <0,001	25,2±1,3 <0,001	19,4±4,1 <0,01	22,0±1,9 <0,001

Примечание. Здесь и в табл. 2: P₁ — вероятность различия между показателями кроликов и морских свинок; P₂ — то же между величинами морских свинок и крыс и P₃ — то же между показателями крыс и кроликов. В скобках указано число животных.

Скорость гликолиза изолированной перфузируемой печени животных (в мкмольях лактата на 1 г массы органа в 1 мин)

Животные	Время от начала перфузии, мин							Средняя скорость гликолиза
	3	10	20	30	40	50	60	
Кролики (9—10) P_1	70±7 <0,001	52±3 <0,01	55±5 <0,05	50±5 <0,05	55±5 <0,05	54±5 <0,05	56±4 <0,05	56±4 <0,01
Морские свинки (6—7) P_2	184±24	150±26	146±39	131±27	143±30	95±16	91±13	142±23
Крысы (5—7) P_3	179±60	169±35	156±36 <0,05	185±30 <0,001	111±38	115±39	133±33 <0,05	143±35 <0,05

источников энергии при гипоксии. Не было выявлено статистически значимых различий между сравниваемыми группами животных и по артериовенозной разнице рН и скорости желчеотделения. Средние значения данных параметров для изолированной печени кроликов, морских свинок и крыс составляли соответственно для рН: $0,29 \pm 0,02$; $0,28 \pm 0,04$ и $0,22 \pm 0,04$; для скорости желчеотделения, $10,5 \pm 2,41$; $16,7 \pm 4,08$ и $8,44 \pm 1,38$ мл на 1 кг массы печени за 1 ч.

Обнаружена значимая разница по периферическому сопротивлению печени исследуемых животных. Наименьшее периферическое сопротивление наблюдалось в печени у кроликов ($0,091 \pm 0,003$ П·с·см⁻⁵), несколько большее — у морских свинок ($0,141 \pm 0,011$) и наибольшее — у крыс ($0,361 \pm 0,031$). Эти различия можно объяснить разницей в массе печени и, следовательно, в суммарном просвете сосудов.

Подводя итог сказанному, можно заключить, что наиболее устойчивая к гипоксии печень крыс и морских свинок имеет в то же время и более высокую скорость основных энергопродуцирующих процессов (тканевого дыхания и гликолиза) и, наоборот, менее устойчивая к гипоксии печень кроликов имеет и более низкие значения данных параметров. Следовательно, резистентность изолированной печени к действию гипоксии, основного повреждающего фактора консервации,

находится в прямой зависимости от интенсивности основных энергопродуцирующих процессов данного органа, т. е. в конечном счете от его энергообеспеченности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Маргулис М. С., Сорокин Ю. А., Квицинская Е. А., Гавриленко Г. П. // Хирургия. — 1978. — № 7. — С. 120—123.
2. Монцевичуге-Эрингене Е. В. // Пат. физиол. — 1964. — № 4. — С. 71—79.
3. Шумаков В. И., Онищенко Н. А., Курпатовский В. И. Фармакологическая защита трансплантата. — М., 1983.
4. Шумаков В. И., Штенгольд Е. Ш., Онищенко Н. А. Консервация органов. — М., 1975.
5. Hohorst H. J. // Methoden der enzymatischen Analyse / Hrsg. H. U. Bergmeyer. — Weinheim, 1962. — S. 266—270.

Поступила 05.09.85

SOME BIOCHEMICAL AND PHYSIOLOGICAL PATTERNS OF ISOLATED PERFUSED LIVER TISSUE FROM RABBIT, GUINEA PIG AND RAT

S. A. Kozlov, E. N. Kiselev, Yu. V. Zinov'ev
Institute of Hematology and Blood Transfusion, Kirov

As shown in 24 experiments using 60-min normothermic perfusion of isolated liver tissue from rabbit, guinea pig and rat, the tissues from guinea pig and rat proved to be more resistant to the impairing effect of hypoxia; besides, there was the higher rate of main energy producing processes — tissue respiration and glycolysis. This suggests that resistance of isolated liver tissue to the effect of hypoxia, involved in the processes of tissue damage in storage, depended directly on intensity of energetic reactions in the tissue.

В. Г. Дегтярь, Н. Е. Кушлинский, Н. В. Хотченкова

ОЧИСТКА РАДИОАКТИВНЫХ ПОЛОВЫХ СТЕРОИДОВ КАК ЛИГАНДОВ РЕЦЕПТОРОВ

Применение меченых тритием стероидных гормонов высокой удельной радиоактивности при определении рецепторов (РСГ) не только повысило чувствительность метода, но и выдвинуло ряд проблем. Важнейшая среди них — значительная степень радиолиза таких соединений, интенсивность которых прямо зависит от удельной радиоактивности и мало зависит от условий хранения [1]. В то же время для определения РСГ необходима высокая чистота радиоактивных лигандов и присутствие продуктов радиолиза может оказывать большое влияние на правильность этого определения [2].

В данной работе предложен простой и быстрый способ очистки половых ^3H -стероидов высокой удельной радиоактивности.

Методика

В работе использовали ^3H -стероиды: [6,7- ^3H]-эстрадиол-17 β (^3H E₂), удельная радиоактивность (УР) 52 Ки/ммоль («Изотоп», СССР); [2,4,6,7- ^3H]₂, УР 104 Ки/ммоль; 5 α [2,4,5,6,7- ^3H]-дигидротестостерон (^3H ДГТ), УР 101 Ки/ммоль; [1,2,6,7- ^3H]-прогестерон (^3H Прг), УР 99 Ки/ммоль; (16 α -метил-21-оксиг-19-нор [6,7- ^3H]-прегн-4-ен-3,20-дион ([6,7- ^3H] ORG 2058), УР 40 Ки/ммоль (все фирмы «Amersham», Англия); [17 α -метил- ^3H]-метилтриенолон (^3H]1881), УР 87 Ки/ммоль (NEN, ФРГ). 5 α [2,4,5,6,7- ^3H] андростан-3 β ,17 β -диол (^3H]3 β -диол) получали из ^3H] ДГТ по методу [3]. В качестве свидетелей использовали стероиды: R 1881 (NEN, ФРГ), ORG 2058 («Amersham», Англия), E₂, ДГТ, Прг, 3 β -диол и 5 α -андростан-3 α ,17 β -диол, 3 α -диол («Koch-Light Laboratories», Англия).

Бензол (квалификация «для спектроскопии») и 96 % этанол (СССР) после абсолютирования безводным сульфатом меди перегоняли с дефлегматором. Ацетон (квалификации ос. ч., СССР) использовали без перегонки. Диэтиловый эфир (квалификация «для наркоза») перегоняли с дефлегматором и хранили над едким кали. Хлористый метилен (квалификации х. ч., СССР) очищали концентрированной серной кислотой, перегоняли с дефлегматором и хранили над прокаленным поташом. Стандартные пластинки «Силуфол» (ЧССР) 15×15 см перед использованием промывали метанолом (квалификация х. ч., СССР) 3 раза восходящим способом, фронт растворителя не доходил до края пластинки 2—3 мм. Радиометрию образцов проводили, как описано ранее [4].

Очистка ^3H -стероидов. На линию старта на расстоянии 10 мм от нижнего края (проводили

линию мягким карандашом) промытой метанолом пластинки наносили стеклянным капилляром однократного пользования 10—20 мкл раствора ^3H -стероида или растворенную в 50—60 мкл смеси бензол : метанол (9 : 1, по объему) реакционную смесь [^3H]3 β -диола с примесями [3] в виде полоски длиной не более 15 мм. С обеих сторон на расстоянии 5—6 мм от пятна ^3H -стероида наносили 50—60 мкл раствора стероида-свидетеля (концентрация 0,5 мг·мл⁻¹ в метаноле). Растворитель испаряли в токе воздуха комнатной температуры (18—20 °С). Проводили восходящую хроматографию в системе бензол : ацетон : этанол абсолютный (9 : 1 : 0,5, по объему) 1, 2 или 3 раза, каждый раз высушивая пластинку на воздухе перед следующим хроматографированием. Фронт растворителя не доходил до верхнего края пластинки 5 мм. После хроматографии вырезали полоски пластинки по ходу фронта растворителя, отступая от края пятна нанесения ^3H -стероида на старте 2—3 мм. Оставшуюся часть пластинки со свидетелем проявляли, как описано ранее [4], по пятну свидетеля отмечали место нахождения ^3H -стероида, вырезали зону шириной 5—6 мм и элюировали ^3H -стероид дважды 1,5 мл смеси бензол : этанол абсолютный (9 : 1, по объему). В аликвотной порции определяли общую радиоактивность ^3H -стероида. При необходимости раствор упаривали в токе азота или добавляли растворитель для получения необходимой концентрации ^3H -стероида. Полученный раствор хранили при —12...—15 °С.

Проверка чистоты ^3H -стероида. 10—20 мкл раствора ^3H -стероида наносили на хроматографическую пластинку «Силуфол» со свидетелем, хроматографировали, вырезали часть пластинки, проявляли и отмечали место нахождения ^3H -стероида, как описано выше. Затем полоску вырезанной пластинки размечали карандашом на зоны шириной около 5 мм перпендикулярно ходу фронта растворителя. После радиометрии образцов рассчитывали радиоактивность каждой зоны в процентах к сумме радиоактивности во всех зонах. Определение проводили в трех параллельных пробах и вычисляли среднее значение. Разница между величинами при каждом определении не превышала 5 %.

Результаты и обсуждение

Для получения ^3H -стероидов высокой степени чистоты используют хроматографию на бумаге, в тонком слое (ХТС) различных сорбентов и варианты жидкостной хроматографии на сефадексе LM-20, силикагелях, целите и т. д., в том числе и высокоэффективную жидкостную хроматографию. Из перечисленных методов наиболее быстрым, простым и дешевым можно считать ХТС. Одной из обычных слож-

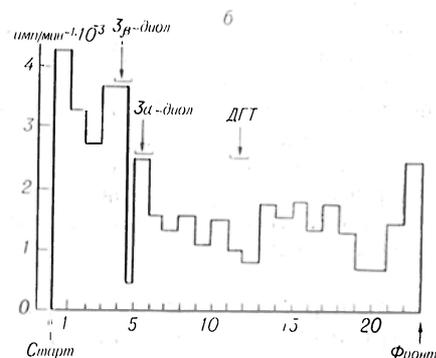
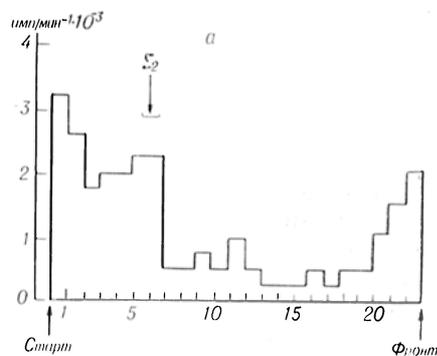
Таблица 1

Чистота коммерческих препаратов ^3H -стероидов через различные сроки хранения при $-12 \dots -15^\circ\text{C}$

Стероид	Срок хранения, мес	Чистота, %
^3H E ₂ («Изотоп»)	6	90
^3H E ₂ («Amersham»)	6	91
^3H 1881 (NEN)	12	68
^3H ДГТ («Amersham»)	10	72
^3H Прг («Amersham»)	3	94
^3H ORG 2058 («Amersham»)	3	94

ностей данного метода является подбор системы растворителей (подвижной фазы), в которой можно было бы разделить ряд стероидов близкой структуры и примеси. Поскольку это не всегда удается, используют набор сорбентов и/или подвижных фаз.

Предложенная нами подвижная фаза (см. раздел «Методика») позволяет разделить на стандартных пластинках «Силуфол» ряд половых ^3H -стероидов, которые используют для определения РСГ в тканях животных и человека. Однако правильность определения РСГ зависит от чистоты используемых ^3H -лигандов. В качестве примера в табл. 1 представлены данные о чистоте коммерческих препаратов ^3H -стероидов, используемых в качестве лигандов РСГ. Ясно, что использование этих препаратов для определения РСГ после определенного



Распределение радиоактивности на пластинке «Силуфол» после хроматографии в системе бензол:ацетон:этанол абсолютный (9:1:0,5) коммерческого препарата ^3H E₂ (а) и раствора реакционной смеси после восстановления ^3H ДГТ боргидридом натрия (б).

По оси абсцисс — № зоны; по оси ординат — радиоактивность (в имп/мин $\cdot 10^{-3}$). Стрелками указано расположение на хроматограмме пятен холодных стероидов, добавленных перед хроматографией.

срока хранения может привести к ошибочным результатам, если ^3H -стероид предварительно не очистить.

Таблица 2

Относительная подвижность (ОП = $R_f \cdot 100$) и чистота ^3H -стероидов (в %) после хроматографии на пластинках «Силуфол»

Стероид	Система А						Система Б				Система В	
	хроматография											
	однократная		двукратная		трократная		однократная		двукратная		однократная	
	ОП	чистота	ОП	чистота	ОП	чистота	ОП	чистота	ОП	чистота	ОП	чистота
^3H 3β-диол	12	91	14	92	16	97	12	30	16	32	36	32
^3H 3α-диол	14	90	16	92	19	98	12	65	16	64	36	62
^3H E ₂	19	95	21	96	22	97	20	92	21	96	56	95
^3H R1881	27	96	30	96	32	97	29	95	31	95	67	96
^3H ДГТ	29	94	35	95	42	98	32	96	34	96	68	95
^3H Прг	36	95	45	95	58	97	63	94	76	96	80	92
^3H ORG2058	38	96	53	96	63	98	66	95	78	97	85	92

Примечание. Система А — бензол:ацетон:этанол абсолютный (9:1:0,5), система Б — хлористый метилен:эфир (4:1); система В — хлористый метилен:ацетон (4:1); ^3H 3α-диол обнаружился вместе с ^3H 3β-дионом при восстановлении ^3H ДГТ боргидридом натрия [3]. Чистоту стероидов проверяли в системе А.

Относительные подвижности и чистота [^3H]-стероидов после хроматографии в трех системах (предложенной нами и используемых часто для ТСХ стероидов [5]) представлены в табл. 2. Видно, что предложенная система позволяет получить [^3H]-стероиды более высокой степени чистоты.

Важное преимущество предложенной системы растворителей — возможность отделять как полярные, так и неполярные примеси (либо продукты радиолиза, либо метаболиты) от [^3H] ДГТ, [^3H] E_2 и [^3H] 3β -диола. На рисунке, а показано распределение радиоактивности в тонком слое пластинки при очистке [^3H] E_2 (фирма «Amersham») после 1 года хранения при $-10\text{...}-12^\circ\text{C}$. Распределение радиоактивности на пластинке при очистке [^3H] 3β -диола, полученного из [^3H] ДГТ по методу [3], показано на рисунке, б. Из рисунка видно, что в предложенной системе эффективно отделяются не только [^3H] ДГТ от [^3H] 3β -диола и [^3H] 3α -диола, но также и [^3H] 3β -диол и от [^3H] 3α -диола и полярных примесей, что составляло проблему ранее [6]. Последнее имеет принципиальное значение, когда проверяется чистота связанного с рецепторами лиганда при определении рецепторов андрогенов в тканях-мишенях с помощью [^3H] ДГТ и [^3H] 3β -диола [8, 9].

Таким образом, предлагаемая подвижная фаза может быть использована как для получения высокой степени чистоты природных и синтетических лигандов половых стероидов, так и для идентификации связанных [^3H]-лигандов при определении РСГ в различ-

ных тканях-мишенях человека и животных, других радиолигандных методов, а также при изучении метаболизма стероидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chambers V. E. M. Radiolabelled Steroids. — Amersham, 1980. — P. 70—90.
2. Builder S., Seger F. // *Analyt. Biochem.* — 1978. — Vol. 84. — P. 413—424.
3. Weisz J., Gibbs C. // *Neuroendocrinology.* — 1974. — Vol. 14. — P. 72—86.
4. Дегтярь В. Г., Милосердов Ю. В., Кушлинский Н. Е. // *Вопр. мед. химии*, 1982. — № 6. — С. 131—134.
5. Хроматография в тонких слоях / Под ред. Э. Шталя: Пер. с нем. — М., 1965. — С. 259—265.
6. Denej C., Magnus G., McEwen B. S. // *J. Endocr.* — 1973. — Vol. 59. — P. 605—621.
7. Кушлинский Н. Е., Дегтярь В. Г., Бассальк Л. С. // *Лаб. дело.* — 1983. — № 7. — С. 16—20.
8. Дегтярь В. Г. // *Биохимия.* — 1982. — Т. 47, № 4. — С. 587—593.
9. Samperez S., Jouan P. // *J. Steroid Biochem.* — 1979. — Vol. 11. — P. 819—831.

Поступила 10.09.85

PURIFICATION OF RADIOACTIVE SEX STEROIDS AS RECEPTOR LIGANDS

V. G. Degtyar, N. E. Kushlinsky,
N. V. Khotchenkova

A system (mobile phase) containing benzene: acetone: absolute ethanol 9:1:0.5, respectively, is described for thin-layer chromatography on Silufol plates of ligand receptors of sex steroid hormones ^3H -5 α -androstane-3 β ,17 β -diol, ^3H -estradiol-17 β , ^3H -5 α -dihydrotestosterone, ^3H -methyltrienolone (R 1881), ^3H -OPG 2058 and ^3H -progesterone. A purity of commercially available ^3H -steroids was decreased in storage, therefore they should be purified before use. The system described enabled to produce the ^3H -steroids studied of high purity.

УДК 617-001.17-07:616.153.962.3-074

В. В. Саломатин, Р. И. Лифшиц

СВЯЗЫВАЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ПРИ ТЕРМИЧЕСКИХ ОЖОГАХ

Кафедра биологической и биоорганической химии Челябинского медицинского института

Связывание и транспорт сывороточным альбумином многих низкомолекулярных веществ эндогенного и экзогенного происхождения являются важными факторами регуляции их биологической активности и скорости элиминации из кровеносного русла. Изменение этих функций альбумина в отношении свободных жирных кислот, про-

дуктов пигментного обмена, биогенных аминов, пептидов группы «средних молекул» и других азотсодержащих соединений может иметь непосредственное отношение к механизмам развития токсемии при термических ожогах. Кроме того, изменение свойства альбумина связывать лекарственные вещества при термических ожогах

необходимо учитывать в определении такого способа и режима их введения, которые исключали бы возможность их токсического действия и были бы максимально эффективны для достижения терапевтических целей. Подобные вопросы уже ставились и решались при изучении других патологических состояний [5—7].

Гипоальбуминемия, сопровождающая развитие ожоговой болезни, предполагает снижение связывающей способности сыворотки крови в отношении веществ, транспортируемых альбумином. Однако неизвестно, в какой степени это снижение зависит не только от количественного уровня альбумина, но и от возможного изменения его связывающих свойств, и, если это изменение имеет место, то в какой связи оно находится с выраженностью токсемического синдрома при ожогах. Изучению этих вопросов и посвящена настоящая работа.

Методика

Эксперименты выполняли на белых крысах-самцах массой 180—200 г. Ожог ППБ степени наносили на 10 % поверхности тела на эпилированную поверхность спинки под эфирным наркозом инфракрасным облучением на установке для ожога с кварцево-галогенной лампой. Через 1, 3, 7 сут животных декалентировали, получали сыворотку крови, которую хранили в замороженном состоянии.

Обследовали 8 больных с термическими ожогами в стадии острой ожоговой токсемии. У 5 из них определяли связывающую способность альбумина непосредственно перед началом гемосорбции и сразу после ее окончания. Гемосорбцию проводили с предварительным введением гепарина (10 000 ЕД) на сорбентах СКН-2М и СКН-4М в течение 60—90 мин с объемом перфузии 7—12 л. Всем больным проводили интенсивную инфузионную и лекарственную терапию (10 % глюкоза, реополиглюкин, гемодез, желатиноль, альбумин, плазма крови, инсулин, гепарин, дронеридол, димедрол, комплекс витаминов, оротат К, γ -глобулин и антибиотики). В качестве контроля использовали плазму крови 6 здоровых доноров. При получении плазмы кровь брали в пробирки, предварительно смоченные раствором гепарина (1000 ЕД/мл).

Связывающую способность альбумина определяли для салицилата Na и 2,4-динитрофенола (2,4-ДНФ) методом ультрафильтрации. В ячейки вместимостью 4 мл вносили 1 мл 10 мМ 2,4-ДНФ, приготовленного на 0,134 М фосфатном буфере pH 7,4, либо 1 мл 7,25 мМ салицилата Na, приготовленного на 0,134 М NaCl, доведенном добавлением NaOH до pH 7,4. Далее вносили 1 мл плазмы или сыворотки крови и смесь перемешивали встряхиванием. Ультрафильтрацию смеси осуществляли под давлением 0,4 МПа через ацетицеллюлозные ультрафильтрационные мембраны УАМ-150.

Предварительно устанавливали, что эти мембраны характеризуются 99 % задержкой альбумина и 2—3 % задержкой салицилата Na и 2,4-ДНФ. Приготовление смеси и ее ультрафильтрацию проводили в термостате при 37 °С. Получали 0,5 мл ультрафильтрата, в котором определяли концентрацию салицилата Na по цветной реакции с $FeCl_3$ и 2,4-ДНФ спектрофотометрически при λ -360 нм. Найденные концентрации расценивали как свободные фракции соединений и по ним рассчитывали количество связанного вещества. Связывающую способность альбумина сыворотки и плазмы крови оценивали, стандартизуя ее по альбумину, применяемому для трансфузионной терапии. Для этого строили калибровочный график зависимости количества связанного вещества от начальной концентрации в ячейке альбумина. В дальнейшем связывающую способность сыворотки и плазмы крови выражали в абсолютных значениях (в граммах на 1 л), соответствующих концентрациям стандартного раствора альбумина. Таким образом оценивали количество активно действующих участков связывания на альбумине и нивелировали ошибку определения, связанную с сорбцией салицилата Na и 2,4-ДНФ материалом ячейки.

Для выяснения вероятных механизмов влияния гемосорбции на связывающую способность альбумина в опытах *in vitro* определяли ее изменение под действием обработки сыворотки крови гемосорбентом СКН-2М. Для этого смешивали аликвотные порции сывороток крови отдельных животных в каждой экспериментальной группе (контрольную и с ожогами на 1, 3 и 7-е сутки). К суммарной сыворотке крови добавляли равный объем гранул гемосорбента и инкубировали при 37 °С в течение 30 мин при легком встряхивании. Далее сыворотку крови отделяли от гемосорбента и исследовали ее связывающую способность, как описано выше.

Общий белок сыворотки устанавливали по методу Лоури, а содержание альбумина рассчитывали после электрофореза белков сыворотки крови на бумаге.

Результаты и обсуждение

Из данных, представленных в табл. 1, видно, что ожоговая травма у крыс приводит к гипопротемии, гипоальбуминемии и уменьшению связывающей способности сыворотки крови. Эти изменения достоверны во все сроки исследования, но степень их существенно различается. Так, содержание общего белка сыворотки крови через 1 сут после ожога оказалось сниженным на 12 %, через 3 сут — на 7 % и через 7 сут — на 9 %, а содержание альбумина — на 22, 24 и 16 % соответственно. Развитие гипопротемии при ожогах преимущественно за счет фракции альбумина хорошо известно. Однако важно, что уменьшение связывающей способности сыворотки крови по отношению к салицилату Na и 2,4-ДНФ выражено в еще большей степени, чем уменьшение концентрации

Изменение общего белка, количества альбумина и связывающей способности по отношению к салицилату Na и 2,4-ДНФ сыворотки крови крыс после термического ожога

Группа животных и срок исследования	Общий белок, г/л	Альбумин, г/л	Связывающая способность сыворотки, г/л	
			салицилат Na	2,4-ДНФ
Контроль (8)	62,0±1,04	29,1±1,07	16,5±0,84	28,2±0,91
После ожога, сутки				
1-е сутки (7)	54,7±1,55	22,6±0,93	9,8±0,25	19,3±0,54
3-и сутки (8)	57,7±1,39	22,1±0,94	10,7±0,77	20,6±0,32
7-е сутки (7)	56,5±0,36	25,1±0,30	9,0±1,02	17,6±1,62

Примечание. В скобках — число животных.

в ней альбумина. Через 1 сут после ожога это уменьшение для салицилата составило 41 %, через 3 сут — 35 % и через 7 сут — 46 %. Значительно снижалась (на 38 %) способность альбумина связывать и 2,4-ДНФ на 7-е сутки после ожога. Между тем известно, что салицилат Na и 2,4-ДНФ связываются в крови исключительно с альбумином [2, 8]. Это свидетельствует о том, что понижение связывающей способности сыворотки крови при ожогах определяется не только уменьшением концентрации альбумина в ней, но, по-видимому, и уменьшением количества связывающих мест на его молекулах.

При изучении хронической уремии было доказано, что основной причиной уменьшения связывающей способности альбумина является накопление в крови низкомолекулярных соединений, блокирующих места связывания на альбумине по механизму конкурентного ингибирования [7]. Известно, что ожоговая болезнь сопровождается также увеличением содержания в крови многих низкомолекулярных метаболитов белкового, жирового и углеводного обмена. Максимум этого увеличения наблюдается, как правило, в разгаре ожоговой токсемии, т. е. к исходу 1-й недели после ожоговой травмы [1, 3, 9]. Именно в этот период и отмечается максимальное уменьшение связывающей способности альбумина.

Для уточнения вопроса о возможном свойстве низкомолекулярных веществ ингибировать связывающую способность сывороточного альбумина при ожогах сыворотка крови различных групп животных была подвергнута обработке гемосорбентом СКН-2М. Как свидетельствуют данные, приведенные

в табл. 2, в результате такой обработки связывание альбумином салицилата Na и 2,4-ДНФ повысилось, причем особенно заметно у животных с ожогами. В результате указанной обработки различия в связывающей способности альбумина в норме и при ожогах, хотя и сохранились, однако существенно нивелировались. Отмеченные изменения произошли несмотря на то, что содержание общего белка и альбумина в сыворотке крови в результате ее обработки гемосорбентом уменьшилось на 10—12 %. Все это подтверждает, что при термических ожогах в сыворотке крови накапливаются низкомолекулярные соединения (обладающие свойством уменьшать связывающую способность альбумина), удаляемые из нее при контакте с гемосорбентом.

В табл. 3 представлены результаты клинических исследований. Из таблицы видно, что у больных с ожоговой травмой, как и в эксперименте на животных, отмечено значительное

Таблица 2

Изменение способности сыворотки крови крыс под влиянием ее обработки гемосорбентом СКН-2М связывать салицилат Na и 2,4-ДНФ в норме и после термического ожога

Группа животных и срок исследования	Связывание салицилата Na, г/л		Связывание 2,4-ДНФ, г/л	
	до обработки	после обработки	до обработки	после обработки
Контроль	16,3	16,9	28,1	34,5
После ожога сутки				
1-е	9,7	15,5	19,2	29,2
3-и	10,5	15,4	20,4	30,5
7-е	8,9	14,2	17,4	30,4

Способность плазмы крови связывать салицилат Na и 2,4-ДНФ и некоторые другие клинические и биохимические показатели у больных с термическими ожогами

Обследуемые	Площадь ожога, %	Степень ожога	Срок исследования после ожога, сут	Наличие симптомов энцефалопатии	Общий белок плазмы, г/л	Альбумин плазмы, г/л	Связывающая способность плазмы, г/л		Исход болезни
							к салицилату Na	к 2,4-ДНФ	
Здоровые лица (n = 6)	—	—	—	—	78,5±2,7	44,1±1,5	40,4±1,2	62,6±2,0	—
Пациенты									
В. Ж.	14	I—IIA	7	—	48,8	25,6	15,4 (11,0)	34,2 (30,2)	Б (26)
К. В.	18	IIA—IIБ	4	—	59,4	26,8	16,4	46,5	Б (51)
К. А.	20	IIA—IIБ	2	—	50,0	24,0	12,4	45,2	Б (53)
Ж. В.	32	IIA—IIБ	5	—	61,3	29,0	15,4 (17,0)	50,2 (48,5)	Л (54)
Г. М.	36	II—IIБ	4	—	58,0	28,7	14,7	42,3	Б (62)
П. М.	45	IIA—IIБ	1	—	53,8	28,2	6,6 (16,3)	34,0 (43,9)	Л (30)
П. М.	45	IIA—IIБ	6	+	71,2	33,0	14,0 (15,6)	49,6 (47,6)	Л (30)
Я. К.	45	II—IV	2	+	59,4	34,2	6,6 (6,0)	32,0 (30,6)	Л (5)
С. Н.	80	I—IIБ	3	+	64,0	32,0	9,4 (5,8)	40,7 (38,0)	Б (53)
С. Н.	80	I—IIБ	8	+	65,1	25,0	8,0 (7,4)	34,9 (35,0)	Б (53)
					59,1±1,8	28,7±1,3	11,9±1,2	41,0±2,2	

Примечание. В скобках даны результаты после гемосорбции. В графе «Исход болезни» буквой Б обозначен благоприятный исход, буквой Л — летальный, в скобках — количество дней пребывания в стационаре.

снижение связывающей способности альбумина. Связывание плазмой крови салицилата Na находится в обратной зависимости от площади ожога ($r = -0,69$). Интересно, что среднее значение связывающей способности плазмы крови в отношении салицилата Na у больных с имеющимися или появляющимися в ближайшие дни симптомами энцефалопатии (спутанное сознание, бред, галлюцинации) составляет $8,9 \pm 1,3$ г/л. Это достоверно ниже, чем в остальной группе больных, где она составляет $14,9 \pm 0,7$ г/л. Аналогичные, но выраженные в меньшей степени изменения наблюдаются и в отношении связывания плазмой 2,4-ДНФ.

По нашим данным, гемосорбция не приводит к повышению связывающей способности плазмы, хотя, как отмечалось, гемосорбент при контакте с сывороткой крови животных, получивших ожоги, повышал ее связывающую способность (см. табл. 2). В связи с этим можно предполагать, что удаление из крови низкомолекулярных ингибиторов связывающей способности альбумина в процессе гемосорбции приводит к смещению их распределения между кровью и тканями. Поэтому гемосорбция может стимулировать образование этих соединений, переход

из тканей в кровь и связывание с альбумином. Такое явление было обнаружено, в частности, в отношении билирубина, содержание которого в крови у больных с поражениями печени в первые часы после гемосорбции повышено [4]. Поэтому отсутствие увеличения связывающей способности плазмы крови после гемосорбции не свидетельствует о малой эффективности процедуры.

Снижение среднего показателя связывающей способности плазмы крови по отношению к салицилату Na у больных с ожогами указывает на то, что ее изменение, как и в экспериментальных исследованиях, нельзя объяснить только снижением концентрации альбумина. Очевидно, происходит угнетение и его комплексобразующих свойств. Не представляется возможным однозначно трактовать роль этого явления в развитии эндотоксемии при термических ожогах. Уменьшение связывания с альбумином токсических соединений приводит к увеличению их свободной фракции и усилению их биологического действия. Однако это может иметь решающее значение лишь в случае острого отравления. При хроническом же отравлении, каким и является любая эндотоксемия, решающая роль в проявлении действия ток-

ических соединений должна отводиться почкам и метаболизирующим токсинам ферментным системам. И здесь связывание токсинов с белками крови может либо потенцировать, либо тормозить их обезвреживание и удаление из организма. Уменьшение связывающей способности альбумина будет способствовать детоксикации, если переход эндотоксинов в метаболизирующие их клетки и мочу происходит путем диффузии свободной фракции. Если этот переход обеспечивает активный транспорт, то уменьшение связывания эндотоксинов с альбумином будет способствовать проявлению их биологического действия и задержке в организме. Таким образом, окончательное решение этого вопроса требует дополнительных сведений об основных токсических субстанциях при ожоговой болезни и механизмах их элиминации из кровеносного русла. Исследования в этом направлении будут способствовать совершенствованию дезинтоксикационной и лекарственной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Камиллов Ф. Х., Ефименко Г. П., Якушев В. С. // Метаболические основы острой ожоговой токсемии. — Омск, 1977. — С. 25—124.
2. Луйк А. Н., Лукьянчук В. Д. Сывороточный альбумин и биотранспорт ядов. — М., 1984.

3. Маркелов И. М., Вихриев Б. С., Тушикова З. А. и др. // Вопр. мед. химии. — 1983. — № 3. — С. 105—108.
4. Николайчук В. В. Молекулярные механизмы развития эндогенной интоксикации и совершенствование путей детоксикации: Автореф. дис... д-ра мед. наук. — М., 1984.
5. Чёгёр С. И. Транспортная функция сывороточного альбумина. — Бухарест, 1975.
6. Boobis S. W. // Clin. Pharmacol. Ther. — 1977. — Vol. 22. — P. 147—154.
7. McNamara P. J., Lalka D., Gibald M. // J. Lab. clin. Med. — 1981. — Vol. 98. — P. 730—740.
8. Meyer M. C., Guttman D. E. // J. pharm. Sci. — 1968. — Vol. 57. — P. 895—918.
9. Wilmore D. W., Aulick L. H. // Surg. Clin. N. Amer. — 1978. — Vol. 58. — P. 1173—1187.

Поступила 17.10.85

BINDING ABILITY OF BLOOD SERUM ALBUMIN IN THERMIC BURNS

V. V. Salomatin, R. I. Lijshits

Medical School, Chelyabinsk

Binding ability of blood serum albumin was decreased in patients with thermic burns as well as in rats with burns. Loss of this albumin property did not depend on decrease of its content in blood serum; in the patients with burns the decrease in albumin binding ability correlated with development of encephalopathic symptoms. After treatment of blood serum from experimental animals with hemosorbent the blood serum binding ability was distinctly restored *in vitro*. At the same time, hemosorption did not affect the binding ability of blood plasma in patients with burns. Importance of alterations in binding ability of blood serum albumin for development of acute burns toxemia is discussed.

УДК 612.352.2.014.46:615.256.51

В. М. Санфирова, В. Н. Титов, М. Громадова

ВЛИЯНИЕ ЭТИНИЛЭСТРАДИОЛА И ЭСТРАДИОЛА ДИПРОПИОНАТА НА ЭТЕРИФИКАЦИЮ НАСЫЩЕННЫХ И НЕНАСЫЩЕННЫХ ЭКЗОГЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ПЕЧЕНИ КРЫС

Институт кардиологии им. А. Л. Мясникова ВКНЦ АМН СССР, Москва

По современным представлениям, развитие эстроген-индуцированной гипертриглицеридемии обусловлено повышением биосинтеза триглицеридов в печени и секреции их в кровь в составе липопротеидов (ЛП) очень низкой плотности (ЛПОНП) [23, 43], а также нарушением их катаболизма в кровяном русле [17, 20]. Ведущим механизмом в развитии гипертриглицеридемии под влиянием эстрогенов считают активацию биосинтеза триглицеридов в печени [23, 42].

Основным источником биосинтеза триглицеридов в ткани печени служат экзогенные (пищевые) жирные кислоты (ЖК) [17, 18, 21]. Установлено, что ЖК являются не только субстратом для биосинтеза липидов, но и играют важную роль в регуляции обмена всех классов ЛП и прежде всего ЛПОНП [5, 13, 19]. Одним из основных факторов, регулирующих активность процессов биосинтеза триглицеридов в гепатоцитах и секреции их в кровь в составе ЛПОНП, является

уровень поступления в печень ЖК [4, 18, 20]. Катаболизм ЛПОИП в крови под действием гепаринзависимой триацилглицеролгидролазы в значительной мере зависит от степени ненасыщенности триглицеридов и фосфолипидов ЛП частиц [12, 28, 34], что в свою очередь определяется специфичностью процессов этерификации насыщенных и ненасыщенных ЖК в ткани печени [4, 39].

Целью настоящей работы было исследование действия эстрогенов на этерификацию насыщенных и ненасыщенных экзогенных ЖК в печени крыс как одного из возможных механизмов развития эстроген-индуцированной гипертриглицеридемии. Различия во влиянии синтетического эстрогена — компонента оральных контрацептивов (этинилэстрадиола — ЭЭ) и натуральных эстрогенов на развитие гипертриглицеридемии [27, 38] послужило предпосылкой к исследованию действия на процессы этерификации ЖК в печени двух эстрогенов: ЭЭ и аналога натуральных эстрогенов — эстрадиола динорпионата (ЭД).

Методика

Работа была выполнена на крысах-самцах линии Вистар массой 180—200 г. Для исключения модифицирующего влияния на процессы липогенеза пищевых жиров, отличающихся по степени ненасыщенности [6], крыс в течение 2 нед до начала экспериментов и в ходе самих экспериментов содержали на безжировой диете. Использование в работе крыс-самцов позволило исключить колебания уровня эндогенных эстрогенов.

Животных разделили на 3 группы (по 10 крыс в каждой). Крысам 1-й и 2-й групп ежедневно в течение 5 дней вводили внутримышечно по 10 мкг ЭЭ и ЭД в 0,2 мл оливкового масла соответственно. Животные контрольной группы получали ежедневно на протяжении этого периода внутримышечно инъекции 0,2 мл оливкового масла. На 5-й день после 14-часового голодания и через 3 ч после инъекции гормонов всем животным внутривенно вводили по 15 мкКи эквивалентной эквивалентной смеси ^3H -пальмитиновой и ^{14}C -линолевой кислот в 0,2 мл диметилсульфоксида [1]. Через 1 ч после введения меченых предшественников крыс забивали декапитацией. Печень перфузировали охлажденным 0,15 М NaCl.

Липидный экстракт из ткани печени получали по методу [15]. Разделение основных фракций липидов печени проведено методом препаративной тонкослойной хроматографии на силикагеле [24]. Содержание липидов в образцах определяли сульфованилиновым методом с использованием соответствующего стандарта для каждого класса липидов [37]. Радиоактивность липидных фракций определяли на жидкостном сцинтилляционном спектрометре [44].

Активность процессов этерификации насыщенной и ненасыщенной экзогенных ЖК в печени крыс оценивали по удельной радиоактивности основных классов эфиров ЖК: триглицеридов, фосфолипидов и эфиров холестерина. Для суждения об относительной этерификации ненасыщенной и насыщенной ЖК рассчитывали коэффициент $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ для каждого из указанных классов липидов печени.

Результаты исследования обработаны методом вариационной статистики с использованием критерия *t* Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Действие ЭЭ и ЭД на этерификацию насыщенных и ненасыщенных экзогенных ЖК в печени крыс *in vivo* оценивали по включению в триглицериды, фосфолипиды и эфиры холестерина печени ^3H -пальмитиновой и ^{14}C -линолевой кислот, являющихся важными представителями насыщенных и ненасыщенных ЖК.

Введение обоих эстрогенов приводило к существенному повышению включения экзогенных насыщенной и ненасыщенной ЖК в общий пул триглицеридов печени (табл. 1). При введении ЭД отмечена тенденция к увеличению по сравнению с контролем относительной этерификации в триглицериды ^{14}C -линолевой кислоты. Относительная этерификация экзогенной ненасыщенной ЖК при введении ЭД была достоверно выше, чем при введении ЭЭ.

Значительное увеличение включения ^3H -пальмитиновой и ^{14}C -линолевой кислот в триглицериды под влиянием ЭЭ и ЭД свидетельствует о существенной активации этерификации экзогенных ЖК в триглицериды. Полученные результаты находятся в полном соответствии с представлением о том, что повышение этерификации ЖК в триглицериды является основным меха-

Таблица 1

Включение экзогенных ^3H -пальмитиновой и ^{14}C -линолевой кислот (в имп/мин·мг липида) в общий пул триглицеридов печени крыс ($M \pm m$; $n = 10$)

Условия опыта	^3H	^{14}C	$^{14}\text{C}/^3\text{H}$
Контроль (1)	1165 ± 120	780 ± 109	0,748 ± 0,077
ЭЭ (2)	2672 ± 221	1360 ± 166	0,570 ± 0,073
ЭД (3)	2099 ± 281	2173 ± 110	0,971 ± 0,103
P_{1-2}	<0,001	<0,01	—
P_{1-3}	<0,01	<0,001	<0,1
P_{2-3}	—	<0,001	<0,01

низмом индуцированной эстрогенами активации биосинтеза триглицеридов в печени [40—42]. Возрастание этерификации экзогенных ЖК в триглицериды печени было отмечено как для натуральных, так и для синтетических эстрогенов: эндогенных [40], ЭД [настоящая работа], диэтилстильбэстрола [23], ЭЭ [41, 42, настоящая работа]. Активация этерификации экзогенных ЖК в триглицериды и увеличение биосинтеза триглицеридов в печени представляет собой, очевидно, один из наиболее общих метаболических эффектов эстрогенов. Согласно современным представлениям, повышение биосинтеза триглицеридов в печени является ведущим механизмом в развитии индуцированной эстрогенами гипертриглицеридемии [23, 42].

Основным фактором, определяющим скорость биосинтеза и секреции триглицеридов в печени, является уровень свободных ЖК в гепатоцитах [4, 17, 18]. Увеличение включения экзогенных ЖК в триглицериды под влиянием ЭЭ и ЭД указывает либо на возрастание поступления экзогенных ЖК в печень, либо на повышение использования их в синтезе триглицеридов. Это согласуется с данными литературы о том, что эстрогены увеличивают поглощение печенью из крови ЖК [25, 30, 31] и вследствие ингибирования кетогенеза повышают долю ЖК, вступающих в процессы этерификации [17, 41, 42]. Таким образом, можно полагать, что одним из этапов активации эстрогенами биосинтеза триглицеридов является увеличение содержания свободных ЖК в гепатоцитах вследствие повышения поглощения их из крови и снижения окисления ЖК.

Оба эстрогена (ЭЭ и ЭД) активировали включение в триглицериды как пальмитиновой, так и линолевой кислот, однако ЭД увеличивал относительное включение в триглицериды экзогенной ненасыщенной ЖК в большей степени (см. табл. 1).

Механизмы различного влияния ЭЭ и ЭД на относительную этерификацию насыщенной и ненасыщенной экзогенных ЖК не ясны. Основным путем биосинтеза триглицеридов в печени является синтез *de novo* [39]. Жирнокислотный состав синтезирующихся по этому пути триглицеридов зависит прежде всего от специфичности ацилтрансфераз, участвующих в биосинте-

зе фосфатидных кислот [39]. В вопросе о влиянии эстрогенов на активность ферментов биосинтеза триглицеридов в печени имеется много разногласий. Индуцированную эстрогенами активацию биосинтеза триглицеридов в печени связывают с глицерофосфатацилтрансферазой [30], диацилглицеролацилтрансферазой [35], глицерокиназой [26]. Повышение относительной этерификации ^{14}C -линолевой кислоты в триглицериды под действием ЭД не может быть, однако, объяснено изменением активности ни одного из указанных ферментов.

Полагают [8, 42], что активация эстрогенами биосинтеза триглицеридов связана не столько с изменением каталитической активности индивидуальных ферментов, сколько с повышением общего содержания ферментов в ткани печени. Специфичность ацилтрансфераз, участвующих в биосинтезе триглицеридов, не абсолютна, вследствие чего жирнокислотный состав синтезирующихся в печени триглицеридов в значительной мере зависит от поступающих в печень ЖК [36]. Все изложенное выше позволяет предположить, что возрастание относительной этерификации ^{14}C -линолевой кислоты в триглицериды под влиянием ЭД связано с более высоким, чем при действии ЭЭ, поступлением ненасыщенной ЖК в печень. Это предположение частично подтверждается данными литературы [25, 30, 31], о том, что повышение поглощения ЖК печенью обусловлено увеличением в гепатоцитах концентрации белка, специфически связывающего ЖК [25, 30, 31], и отмеченным более высоким сродством этого транспортного белка к ненасыщенным ЖК [16]. Увеличение в гепатоцитах концентрации указанного белка описано только для натуральных эстрогенов [25, 30, 31]. Таким образом, активация этерификации экзогенных ЖК в триглицериды под влиянием ЭД сопряжена в отличие от действия ЭЭ с повышением степени ненасыщенности триглицеридов.

Влияние ЭЭ и ЭД на этерификацию экзогенных ЖК в фосфолипиды различно: ЭЭ вызвал некоторое увеличение, а ЭД существенно снижал включение ^3H -пальмитиновой и ^{14}C -линолевой кислот в фосфолипиды печени крыс (табл. 2). Оба эстрогена не-

Таблица 2

Включение экзогенных ^3H -пальмитиновой и ^{14}C -линолевой кислот (в имп/мин на 1 мг липида) в пул фосфолипидов печени крыс ($M \pm m$; $n = 10$)

Условия опыта	^3H	^{14}C	$^{14}\text{C}/^3\text{H}$
Контроль (1)	987 \pm 70	369 \pm 28	0,375 \pm 0,02
ЭЭ (2)	1152 \pm 207	580 \pm 45	0,496 \pm 0,055
ЭД (3)	434 \pm 45	250 \pm 7	0,655 \pm 0,046
P_{1-2}	<0,1	<0,001	<0,1
P_{1-3}	<0,05	<0,001	<0,001
P_{2-3}	<0,01	<0,001	<0,05

сколько повышали относительную этерификацию в фосфолипиды экзогенной ненасыщенной ЖК. Более выражено это действие у ЭД. Ранее в исследованиях на перфузированной печени показано, что эстрогены не влияют [41, 42] или даже повышают [40] включение экзогенных ЖК в фосфолипиды. Наши результаты свидетельствуют о том, что ЭЭ повышает, а ЭД снижает этерификацию в фосфолипиды экзогенных ЖК. Одной из причин расхождения данных является, вероятно, тот факт, что в настоящей работе в отличие от приведенных выше исследований влияние эстрогенов на этерификацию экзогенных ЖК в фосфолипиды печени исследовали *in vivo*. По-видимому, эстрогены не оказывают на биосинтез фосфолипидов печени столь же однонаправленного действия, как на биосинтез триглицеридов.

Механизмы различного влияния ЭЭ и ЭД на этерификацию экзогенных ЖК в фосфолипиды не ясны. Рядом исследователей на основании данных о сравнительной этерификации экзогенных и эндогенных ЖК в триглицериды и фосфолипиды было сделано заключение, что основным источником для биосинтеза триглицеридов являются экзогенные ЖК, тогда как в биосинтезе фосфолипидов более важную роль играют эндогенные ЖК [29]. Ранее нами было показано [2], что ЭД повышает биосинтез фосфолипидов в печени из эндогенных предшественников и активизирует включение в фосфолипиды эндогенных ЖК, что не свойственно ЭЭ. Это позволяет предположить, что при введении ЭД одной из причин более низкой, чем в контроле и при действии ЭЭ, этерификации в

фосфолипиды экзогенных ЖК является повышенное включение в них эндогенных ЖК. Вместе с тем снижение этерификации экзогенных ЖК в фосфолипиды под влиянием ЭД может быть связано отчасти с увеличением ненасыщенности синтезирующихся в печени триглицеридов. Известно, что секреция ненасыщенных триглицеридов в форме ЛПОНП требует меньшего количества фосфолипидов и свободного холестерина в расчете на 1 моль триглицеридов в липопротеидной частице по сравнению с секрецией насыщенных триглицеридов [18, 21]. Оба эстрогена увеличивали относительную этерификацию в фосфолипиды экзогенной ненасыщенной ЖК. Тем не менее при введении ЭЭ отмечена только тенденция, тогда как под влиянием ЭД относительная этерификация ^{14}C -линолевой кислоты была достоверно выше, чем в контроле и при действии ЭЭ (см. табл. 2).

Поскольку основным фосфолипидом печени является фосфатидилхолин [39], этерификация пальмитиновой и линолевой кислот связана, по-видимому, прежде всего с этой фракцией. Увеличение относительной этерификации линолевой кислоты в фосфатидилхолин может происходить либо в процессе биосинтеза фосфатидилхолина *de novo*, либо за счет повышения ее включения в фосфатидилэтаноламин и активации метилирования фосфатидилэтанолamina [39, 45]. В то же время повышение относительного включения линолевой кислоты на фоне общего снижения этерификации экзогенных ЖК в фосфолипиды при введении ЭД может быть связано с более высоким поступлением ненасыщенной ЖК в печень по сравнению с

Таблица 3

Включение экзогенных ^3H -пальмитиновой и ^{14}C -линолевой кислот (в имп/мин на 1 мг липида) во фракцию эфира холестерина печени крыс ($M \pm m$; $n = 10$)

Условия опыта	^3H	^{14}C	$^{14}\text{C}/^3\text{H}$
Контроль (1)	230 \pm 38	207 \pm 37	0,811 \pm 0,090
ЭЭ (2)	58 \pm 10	95 \pm 14	1,585 \pm 0,246
ЭД (3)	59 \pm 7	244 \pm 21	4,055 \pm 0,514
P_{1-2}	<0,001	<0,05	<0,01
P_{1-3}	<0,001	—	<0,001
P_{2-3}	—	<0,001	<0,001

введением ЭЭ, как и в случае триглицеридов. Увеличение относительной этерификации ненасыщенной ЖК в фосфолипиды под действием ЭЭ и ЭД может, очевидно, приводить к повышению степени ненасыщенности синтезированных фосфолипидов и, в частности, фосфатидилхолинов.

ЭЭ и в меньшей степени ЭД снижали включение экзогенных ЖК в эфиры холестерина (табл. 3), что свидетельствует об ингибировании эстрогенами этерификации ЖК. Это согласуется с данными об ингибировании эстрогенами биосинтеза эфиров холестерина в печени из эндогенных предшественников липогенеза [3] и о снижении активности синтетазы эфиров холестерина в печени голубя при введении эстрогенов [32]. Уменьшение включения экзогенных ЖК в эфиры холестерина обусловлено, по-видимому, снижением активности ацил-КоА: холестеролацилтрансферазы — АХАТ. Ингибирующее действие эстрогенов на активность АХАТ является, вероятно, вторичным по отношению к повышению уровня в гепатоцитах СЖК, так как высокая внутриклеточная концентрация ацил-КоА в печени снижает активность АХАТ [14].

Оба эстрогена (в особенности ЭД) увеличивали относительное включение в эфиры холестерина экзогенной ¹⁴С-линолевой кислоты (см. табл. 3). Таким образом, ЭЭ и ЭД снижают этерификацию экзогенных ЖК в эфиры холестерина печени и повышают степень их ненасыщенности. Эстрогены увеличивают поглощение ЛПНП печенью [7, 22], что приводит к накоплению эфиров холестерина в составе мембран эндоплазматического ретикула [10], уменьшению жидкости мембран и нарушению функций мембраносвязанных ферментов [9, 10, 33]. Возрастание относительной этерификации ненасыщенных ЖК во фракцию эфиров холестерина (и фосфолипидов) можно рассматривать, по-видимому, как компенсаторный механизм, ограничивающий до некоторой степени снижение жидкости мембранных структур печени.

Результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что ЭД более существенно, чем ЭЭ, активизирует относительную этерификацию экзогенной ненасыщенной кислоты во все классы эфиров жирных кислот печени: три-

глицериды, фосфолипиды и эфиры холестерина. Поскольку биосинтез указанных классов липидов происходит разными путями, эти данные могут служить косвенным подтверждением высказанного выше предположения, что ЭД в большей степени, чем ЭЭ, повышает поступление экзогенных ненасыщенных ЖК в печень.

Одной из причин разного влияния ЭЭ и ЭД на этерификацию насыщенных и ненасыщенных ЖК в печени является, по-видимому, различие в их молекулярной структуре. Введение α -алкильного заместителя в положение 17 стероидов (17 α -этинильная группа в составе ЭЭ) обуславливает изменение их действия на процессы метаболизма [11].

Взаимосвязь между процессами этерификации ЖК в печени и развитием индуцированной эстрогенами гипертриглицеридемии можно представить следующим образом. Основным механизмом являются активация этерификации в триглицериды экзогенных ЖК, увеличение биосинтеза триглицеридов в печени и секреции их в кровь в форме ЛПОНП. Введение ЭД приводило к достоверно более высокому, чем при применении ЭЭ, включению в триглицериды и фосфолипиды печени экзогенной ненасыщенной ЖК. Скорость секреции триглицеридов печенью не зависит от их жирнокислотного состава [4]. Сведений о характере секреции печенью фосфолипидов с разным жирнокислотным составом в литературе нет. Косвенным доказательством более высокой скорости секреции печенью ненасыщенных фосфолипидов по сравнению с насыщенными являются данные [17] о повышенном по сравнению с фосфолипидами печени содержании ненасыщенных ЖК в составе фосфолипидов ЛП крови крыс в условиях полиненасыщенной диеты [13]. Сопоставление этих данных позволяет заключить, что под влиянием ЭД в печени синтезируются и секретируются в кровь ЛПОНП, триглицериды и фосфолипиды которых более богаты ненасыщенными ЖК, чем при введении ЭЭ. Поскольку гепаринзависимая триацилглицеролгидролаза — основной фермент катаболизма ЛПОНП в кровяном русле — более активно гидролизует ненасыщенные субстраты [28], можно полагать, что при поступлении в организм

ненасыщенных пищевых липидов скорость удаления ЛПОНП из циркуляции может быть выше при введении ЭД, чем при применении ЭЭ.

Косвенным подтверждением предположения о взаимосвязи между процессами этерификации насыщенных и ненасыщенных ЖК в печени и развитием индуцированной эстрогенами гипертриглицеридемии служат данные о выраженности гипертриглицеридемии при введении ЭД и ЭЭ у крыс, содержащихся на стандартной лабораторной диете с добавлением растительных и молочных жиров: $98,20 \pm \pm 7,89$ мг % (контроль), $219,80 \pm \pm 22,90$ мг % (ЭЭ) и $117,80 \pm \pm 8,13$ мг % (ЭД). Это согласуется с данными о том, что введение крысам ЭЭ в дозе 6 мкг в день, т. е. близкой к использованной в настоящей работе, приводило к значительному повышению уровня триглицеридов в крови, тогда как введение ЭД в той же дозе не вызывало аналогичного эффекта [38]. Поскольку ЭЭ и ЭД увеличивали общую этерификацию экзогенных ЖК в триглицериды примерно в равной степени (см. табл. 1), можно полагать, что введение ЭД в отличие от ЭЭ не приводило к развитию гипертриглицеридемии за счет увеличения скорости гидролиза триглицеридов в крови вследствие возрастания ненасыщенности триглицеридов и фосфолипидов ЛПОНП.

Таким образом, активация этерификации экзогенных ЖК в триглицериды и изменения в относительной этерификации насыщенных и ненасыщенных ЖК в триглицериды и фосфолипиды печени представляются важным механизмом в развитии эстрогениндуцированной гипертриглицеридемии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кендыш И. И. // Пробл. эндокринолог. — 1980. — № 4. — С. 77—80.
2. Санфиорова В. М. Влияние эстрогенов на биосинтез и этерификацию жирных кислот в печени крыс *in vivo*: Автореф. дис. канд. биол. наук. — М., 1984.
3. Титов В. И. Механизмы развития гиперлипидемии при действии глюкокортикоидов и эстрогенов. Дис. д-ра мед. наук. — М., 1981.
4. Akesson B. // *Lipids*. — 1980. — Vol. 15, N 9. — P. 677—681.
5. Baudel M. F., Esteve O. et al. // *Ibid.* — N 4. — P. 216—223.
6. Brindley D. N., Glenny H. P., Pritchard P. H. et al. // *Lipoprotein Metabolism and Endocrine Regulation* // Ed. L. W. Hessel, H. M. J. Krans. — Amsterdam, 1979. — P. 243—256.
7. Chao Y.-S., Windler E. E., Chi Chen G. et al. // *J. biol. Chem.* — 1979. — Vol. 254, N 22. — P. 11360—11366.
8. Coleman R., Polokoff M. A., Bell R. M. // *Metabolism*. — 1977. — Vol. 26, N 10. — P. 1123—1130.
9. Davis R. A., Kern F., jr., Showalter R. et al. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.* — 1978. — Vol. 75, N 9. — P. 4130—4134.
10. Davis R. A., Showalter R., Kern F., jr. // *Biochem. J.* — 1978. — Vol. 174. — P. 45—51.
11. Delorimer A. A., Gordon G. S., Lowe R. C. et al. // *Arch. intern. Med.* — 1965. — Vol. 116. — P. 289—294.
12. Desreumaux C., Dedonder E., Dewailly P. et al. // *Arzneimittel-Forsch.* — 1979. — Bd 29, N 10. — S. 1581—1583.
13. Dunn G. D., Wilcox H. G., Heimberg M. // *Lipids*. — 1975. — Vol. 10, N 12. — P. 773—782.
14. Erickson S. K., Cooper A. D. // *Metabolism*. — 1980. — Vol. 29, N 10. — P. 991—996.
15. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. H. // *J. biol. Chem.* — 1957. — Vol. 226. — P. 497—509.
16. Gangl A., Kornauth W., Mlczech J. et al. // *Lipids*. — 1980. — Vol. 15, N 2. — P. 75—79.
17. Heimberg M., Goh E. H., Klausner H. A. et al. // *Disturbances in Lipid and Lipoprotein Metabolism* / Ed. J. M. Dietschy, — Baltimore, 1978. — P. 251—267.
18. Heimberg M., Woodside W. F., Wilcox H. G. et al. // *Die Lipoproteine des Blutes*. — Darmstadt, 1973. — S. 88—99.
19. Jackson R. L., Taunton O. D., Morrisett J. D. et al. // *Circulat. Res.* — 1978. — Vol. 42, N 4. — P. 447—453.
20. Kim H.-J., Kalkhoff R. K. // *Metabolism*. — 1978. — Vol. 27, N 5. — P. 571—587.
21. Kohout M., Kohoutova B., Heimberg M. // *J. biol. Chem.* — 1971. — Vol. 246, N 16. — P. 5067—5074.
22. Kovanen P. T., Brown M. S., Goldstein J. L. // *Ibid.* — 1979. — Vol. 254, N 22. — P. 11367—11373.
23. Kudzma D. J., Claire F. St., DeLallo L. et al. // *J. Lipid. Res.* — 1975. — Vol. 16. — P. 123—133.
24. Kuksis A. // *J. Chromatogr.* — 1977. — Vol. 143. — P. 3—30.
25. Kushlan M. C., Gollan J. L., Wei-lan Ma. et al. // *J. Lipid Res.* — 1981. — Vol. 22. — P. 431—436.
26. Lamb R. G., Fallon H. J. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1974. — Vol. 348. — P. 179—188.
27. Loeper J., Goy-Loeper J., Jeny R. et al. // *Nouv. Presse méd.* — 1980. — Vol. 9, N 32. — P. 2229—2232.
28. Miller G. H., Wallace-parce J., Sisson P. et al. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1981. — Vol. 665. — P. 385—392.
29. Numa S., Yamashita S. // *Current Topics in Cellular Regulation* // Ed. B. L. Horecker, E. R. Stadtman. — New York, 1974. — Vol. 8. — P. 197—246.

30. Ockner R. K., Burnert D. A., Lysenko N. et al. // J. clin. Invest. — 1979. — Vol. 64. — P. 172—181.
31. Ockner R. K., Lysenko N., Manning J. A. et al. // Ibid. — 1980. — Vol. 65. — P. 1013—1023.
32. Ravi Subbiah M. T. // Endokrinologie. — 1977. — Bd 70, N 3. — S. 257—262.
33. Simon F. R., Gonzales M., Sutherland E. et al. // J. clin. Invest. — 1980. — Vol. 65. — P. 851—860.
34. Smith L. C., Miller A. L., Taunton O. D. et al. // Circulation. — 1973. — Vol. 48, Suppl. 4. — P. 445.
35. Soler-Argilaga C., Russel R. L., Heimberg M. // Biochim. biophys. Acta. — 1978. — Vol. 83, N 3. — P. 869—873.
36. Sandler R., Akesson B., Nilsson A. // J. biol. Chem. — 1974. — Vol. 249. — P. 5102—5107.
37. Tapscott E. // J. Chromatogr. — 1975. — Vol. 107. — P. 420—424.
38. Valette A., Carasco G., Verine A. et al. // J. Endocr. — 1978. — Vol. 79. — P. 405—406.
39. Van Golde L. M. G., Van den Bergh S. G. // Lipid Metabolism in Mammals. — New York, 1977. — Vol. 1. — P. 35—149.
40. Wasfi I., Weinstein I., Heimberg M. // Biochim. biophys. Acta. — 1980. — Vol. 619. — P. 471—481.
41. Weinstein I., Soler-Argilaga C., Heimberg M. // Biochem. Pharmacol. — 1977. — Vol. 26. — P. 77—80.
42. Weinstein I., Soler-Argilaga C., Werner H. V. et al. // Biochem. J. — 1979. — Vol. 180. — P. 265—271.
43. Weinstein I., Turner F. C., Soler-Argilaga C. et al. // Biochim. biophys. Acta. — 1978. — Vol. 530. — P. 394—401.
44. Winterbourn C. C., Batt R. D. // Ibid. — 1968. — Vol. 152. — P. 255—268.
45. Young D. L. // J. Lipid Res. — 1971. — Vol. 12, N 5. — P. 590—595.

Поступила 17.10.85

EFFECT OF ESTRADIOL ETHYNYL AND ESTRADIOL PROPIONATE ON ESTERIFICATION OF SATURATED AND NON-SATURATED EXOGENOUS FATTY ACIDS IN RAT LIVER TISSUE

V. M. Sanfirova, N. N. Titov, M. Gromadova

A. L. Myasnikov Institute of Clinical Cardiology, All-Union Cardiological Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Effect of estradiol ethynyl and estradiol propionate on esterification of saturated and non-saturated fatty acids in liver tissue, as one of possible mechanisms in development of estrogen-induced hypertriglyceridemia, was studied using labelled precursors ^3H -palmitic and ^{14}C -linoleic acids. Both these estrogens stimulated the incorporation of exogenous fatty acids into triglycerides. After administration of estradiol dipropionate relative esterification of ^{14}C -linoleic acid into triglycerides was increased as compared with controls. Estradiol ethynyl increased and estradiol dipropionate decreased the incorporation of exogenous fatty acids into liver phospholipids. Both estrogens activated the relative esterification of linoleic acid into phospholipids. A decrease in exogenous fatty acids esterification into fraction of cholesterol esters, caused by both these estrogens, occurred due to an increase in relative incorporation of linoleic acid into these lipids. As shown in experiments of relative esterification of saturated and non-saturated fatty acids, estradiol propionate stimulated synthesis of more non-saturated forms of triglycerides, phospholipids and cholesterol esters in rat liver tissue as compared with the estradiol ethynyl action. The data obtained and the data of literature suggest that activation of exogenous fatty acids esterification into triglycerides and alterations in relative esterification of saturated and non-saturated fatty acids into triglycerides and phospholipids of liver tissue are of importance in pathogenesis of estrogen-induced hypertriglyceridemia.

УДК 612.112.95-06:612.123:577.112.8561.015.13:577.152.344

Г. Г. Ковалева, И. М. Карманский

ХАРАКТЕР ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МАКРОФАГОВ С СЫВОРОТОЧНЫМИ ЛИПОПРОТЕИДАМИ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ, ЧАСТИЧНО ГИДРОЛИЗОВАННЫМИ ПЕПСИНОМ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Как известно, внутриклеточное накопление липидов является одним из факторов развития атеросклероза [2]. Существенным вкладом в понимание этого процесса явились исследования [7], в которых удалось получить характерные для атеросклеротических очагов «пенистые клетки» при инкубации макрофагов с ацетилированными

липопротеидами низкой плотности (ЛПНП). Показано, что проникновение ацетилированных ЛПНП в клетки происходит благодаря их взаимодействию со специфическими рецепторами на поверхности макрофагов, которые не связываются с нативными ЛПНП, но «узнают» ЛПНП, несущие дополнительный суммарный отрица-

тельный заряд. Этот заряд может появиться не только в результате ацетилирования ЛПНП, но и после обработки их малоновым альдегидом или в ходе инкубации с эндотелиальными клетками [5]. Не исключена возможность, что на поверхности макрофагов есть рецепторы, способные взаимодействовать с ЛПНП, претерпевшими другие модификации и, в частности, протеолитические, которые не приводят к существенным изменениям заряда ЛПНП. В этой связи представляло интерес изучить характер взаимодействия макрофагов с ЛПНП, частично гидролизованными пепсином — аналогом катепсина D. Этому вопросу и посвящена настоящая работа.

Методика

Липопротеиды низкой плотности ($1,019 < d < 1,063$ г/мл) выделяли из сыворотки крови здоровых доноров методом ультрацентрифугирования [8]. Йодирование ЛПНП [125 I] проводили йодмоноклоридным методом [10], низкомолекулярные продукты реакции удаляли диализом. Удельная радиоактивность полученных препаратов составляла 80—150 имп/мин на 1 мкг белка. Гидролиз пепсином нативных и радиоiodированных ЛПНП проводили, как описано ранее [1]. Низкомолекулярные продукты протеолиза удаляли гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-75. Эффективность удаления низкомолекулярных продуктов оценивали путем осаждения 10 % ТХУ и определения радиоактивности и белка в ТХУ-растворимом материале. Концентрацию белка в пробах устанавливали по методу Лоури [9].

Ацетилирование ЛПНП проводили с использованием 14 C-уксусного ангидрида [4].

Липопротеиддефицитную сыворотку (ЛПДС) человека получали препаративным ультрацентрифугированием при плотности 1,21 г/мл [11]. ЛПДС диализовали против 0,15 М NaCl в 0,02 М Na-фосфате pH 7,4, стерилизовали фильтрацией через фильтр с диаметром пор 0,22 мк и хранили при -20°C .

Для получения макрофагов самцам белых беспородных мышей внутрибрюшинно вводили 5 мл 3 % раствора пептона в среде Хенкса. Спустя 2 сут брюшинную полость мышей промывали 7 мл среды А (среда Игла, 10 % сыворотки крупного рогатого скота, 290 мкг/мл L-глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина), содержащей 80 ЕД гепарина в 1 мл. Перитонеальные клетки собирали центрифугированием промывной жидкости (900 об/мин, 5 мин, 4°C), клетки отмывали однократно средой А, ресуспендировали в этой же среде и разбавляли до плотности $(1-2) \times 10^6$ клеток в 1 мл. Аликвотные порции суспензии (2 мл) помещали в пластиковые чашки Петри (40×10 мм, завод «Медполимер», Ленинград) и инкубировали в атмосфере 5 % CO_2 и 95 % O_2 .

Перед экспериментом клетки отмывали дважды 2 мл среды А (без сыворотки), затем добавляли 1 мл среды А с ЛПДС (3 % по объему) и необходимое количество радиоiodи-

рованных и немеченных ЛПНП. Инкубацию клеток с ЛПНП вели в течение 5 ч при 37°C в атмосфере 5 % CO_2 и 95 % O_2 . После окончания инкубации культуральную среду отбирали в пробирки с ТХУ для определения деградации (см. ниже), клетки промывали 3 раза 2 мл 0,15 М NaCl в 0,05 М трис-HCl pH 7,4, затем 2 раза этим же раствором с добавлением альбумина (2 мг/мл) и наконец 2 раза тем же раствором, но без альбумина. Клетки растворяли в 1 мл 0,1 М NaOH в течение ночи при комнатной температуре и определяли их радиоактивность на гамма-счетчике. После измерения радиоактивности в этих же пробах определяли содержание белка. Количество поглощенных ЛПНП рассчитывали на основании результатов измерения радиоактивности клеток и удельной радиоактивности добавляемых препаратов ЛПНП. Получаемая при этом величина отражала не только связывание ЛПНП с клеточной поверхностью, но и проникновение ЛПНП внутрь макрофагов. Результаты выражали в микрограммах поглощенного белка ЛПНП на 1 мг клеточного белка.

Для определения деградации ЛПНП культуральную среду после инкубации отбирали и осаждали 10 % ТХУ (конечная концентрация), надосадочную жидкость отделяли после центрифугирования при 3000 об/мин в течение 15 мин, инкубировали с H_2O_2 в присутствии K1, экстрагировали хлороформом для удаления свободного йода и измеряли радиоактивность водной фазы [6]. Контролем служили пробы, не содержащие клеток.

Результаты и обсуждение

Сравнили поглощение макрофагами при 37°C нативных и частично гидролизованных пепсином 125 I-ЛПНП. Степень протеолиза частично гидролизованных ЛПНП составляла 8—10 %. Ранее было найдено, что при такой степени протеолиза еще не происходит заметной агрегации и денатурации ЛПНП [1]. Измерение радиоактивности макрофагов, инкубированных в течение 5 ч с 125 I-ЛПНП показало, что поглощение ЛПНП клетками значительно увеличивается после их частичного протеолиза пепсином. Так, для проб, содержащих 20 мкг белка ЛПНП в 1 мл, поглощение нативных и частично гидролизованных ЛПНП составляло 0,2 и 0,395 мкг на 1 мг клеточного белка соответственно. Разница в поглощении нативных и частично гидролизованных ЛПНП возрастала при увеличении концентрации ЛПНП в пробах до 200 мкг/мл (по белку). В этих условиях поглощение нативных и модифицированных ЛПНП составляло 1,0 и 2,1 мкг на 1 мг клеточного белка соответственно. Повышенное поглощение частично гидролизованных пепсином ЛПНП сопровождалось более интенсивным их

деградацией макрофагами. В пробах, содержащих 200 мкг белка ЛПНП в 1 мл, деградация нативных и модифицированных ЛПНП, оцениваемая по приросту в инкубационной среде количества ТХУ-растворимых радиоактивных продуктов, составляла соответственно 3,83 и 12,85 мкг на 1 мг клеточного белка.

Природа более эффективного поглощения клетками частично гидролизованных пепсином ЛПНП не ясна. Для характеристики специфичности этого процесса проанализировали влияние возрастающих концентраций «холодных» (т. е. не меченных ^{125}I) нативных и обработанных пепсином ЛПНП на взаимодействие макрофагов с фиксированным количеством меченных ^{125}I ЛПНП, модифицированных пепсином. Результаты этих исследований, приведенные на рис. 1, указывают на конкурирующее влияние «холодных» модифицированных ЛПНП на деградацию радиоiodированных модифицированных ЛПНП. Наличие такой конкуренции свидетельствует о существовании на макрофагах специфических насыщаемых участков взаимодействия с ЛПНП, частично гидролизованными пепсином. Судя по кривым, приведенным на рис. 2, макрофагам присущ также и неспецифический ненасыщаемый путь деградации модифицированных пепсином ЛПНП. Это следует из сохранения значительной деградации модифицированных пепсином ^{125}I -ЛПНП в присутствии избытка «холодных» модифицированных ЛПНП. Из рис. 1 следует также, что «холодные» нативные ЛПНП в меньшей степени тормозят деградацию модифицированных пепсином ^{125}I -ЛПНП, чем «холодные» ЛПНП, обработанные пепсином.

Эти данные могут свидетельствовать о наличии на макрофагах двух типов насыщаемых участков, с которыми взаимодействует модифицированный пепсином ЛПНП. Участки одного типа взаимодействуют не только с модифицированными, но и с нативными ЛПНП. Участки второго типа специфически связывают ЛПНП, частично гидролизованные пепсином.

Для сопоставления этих связывающих участков с описанным в литературе рецептором макрофагов для ацетилированных ЛПНП [7] проанализирована деградация ^{125}I -ЛПНП в

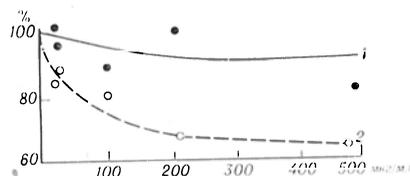


Рис. 1. Деградация ^{125}I -ЛПНП, частично гидролизованных пепсином, перитонеальными макрофагами мыши в присутствии немеченных нативных ЛПНП (1) и ЛПНП, частично гидролизованных пепсином (2).

По оси абсцисс — содержание в пробе немеченных нативных и частично гидролизованных пепсином ЛПНП (в мкг белка ЛПНП на 1 мл); по оси ординат — деградация ^{125}I -ЛПНП (в %).

Каждая проба содержала ^{125}I -ЛПНП, частично гидролизованные пепсином, в концентрации 27,5 мкг/мл (по белку). За 100% принимали деградацию ^{125}I -ЛПНП, модифицированных пепсином, в отсутствие немеченных ЛПНП. Каждая точка — среднее по данным двух параллельных исследований.

присутствии возрастающих концентраций «холодных» ацетилированных, нативных и модифицированных пепсином ЛПНП. Полученные результаты (см. рис. 2) свидетельствуют о том, что немеченные нативные и гидролизованные пепсином ЛПНП не конкурируют с ацетилированными ^{125}I -ЛПНП за взаимодействие с макрофагами. Ингибирующее влияние на деградацию ^{125}I -ацетил-ЛПНП оказывали лишь «холодные» ацетилированные ЛПНП. Отсюда следует, что более эффективное поглощение макрофагами ЛПНП, модифицированных пепсином, нельзя объяснить их «узнаванием» рецепторами для ацетилированных ЛПНП.

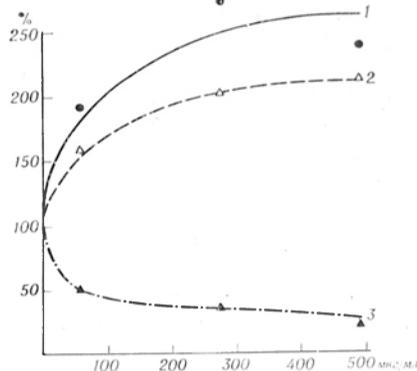


Рис. 2. Деградация ^{125}I -ацетил-ЛПНП перитонеальными макрофагами мыши в присутствии немеченных нативных (1), частично гидролизованных пепсином (2) и ацетилированных (3) ЛПНП.

По оси абсцисс — содержание в пробе (в мкг белка ЛПНП на 1 мл) немеченных нативных, частично гидролизованных пепсином и ацетилированных ЛПНП; по оси ординат — деградация ^{125}I -ацетил-ЛПНП (в %). Каждая проба содержала ^{125}I -ЛПНП в концентрации 30 мкг/мл (по белку). За 100% принимали деградацию ацетилированных ^{125}I -ЛПНП в отсутствие немеченных ЛПНП.

Необходимо отметить, что ранее [3] наблюдалось более интенсивное поглощение макрофагами ЛПНП, обработанных трипсином. В этой публикации высказано предположение о близости механизмов проникновения в макрофаги трипсинизированных и ацетилированных ЛПНП. Что касается пепсина, то полученные нами данные свидетельствуют о наличии на макрофагах специфических центров связывания частично протеолизированных пепсином ЛПНП, которые отличаются от центров связывания ацетилированных ЛПНП.

Таким образом, полученные данные позволяют высказать предположение, что модифицированные пепсином ЛПНП поглощаются макрофагами как по насыщаемому, так и по ненасыщаемому путям более эффективно, чем нативные ЛПНП. Это следует из того, что разница в поглощении нативных и модифицированных ЛПНП имеет место в областях как низких концентраций, при которых преобладают насыщаемые взаимодействия, так и высоких, когда преобладает ненасыщаемое связывание. Повышенное поглощение частично протеолизированных ЛПНП сопровождается более интенсивной их деградацией клетками. Увеличение поглощения и деградации модифицированных пепсином ЛПНП макрофагами может указывать на их большую атерогенность. В пользу этого свидетельствует и описанный в литературе параллелизм процессов деградации белка и внутриклеточного накопления эфиров холестерина в макрофагах, инкубированных с ацетилированными ЛПНП [7].

В настоящее время трудно сказать, отличаются ли макрофагальные участки связывания модифицированных пепсином ЛПНП от описанных в литературе рецепторов для β -липопротеидов очень низкой плотности и комплексов ЛПНП с декстрансульфатом [5]. Для решения этого вопроса необходимы дальнейшие исследования.

Авторы выражают признательность ст. науч. сотр. Института паразитологии и тропической медицины А. А. Лу-

рье за помощь в проведении радиоизотопных исследований и благодарят проф. В. О. Шпикитера за помощь при обсуждении результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Карманский И. М. // *Вопр. мед. химии.* — 1977. — № 4. — С. 530—534.
2. Климов А. Н., Никульчева Н. Г. Липопротеиды, дислипопротеидемии и атеросклероз. — Л., 1984.
3. Попов А. В. // Липопротеиды высокой плотности и атеросклероз. М., 1983. — С. 159—166.
4. Basu S. K., Goldstein Y. L., Anderson R. G. W., Brown M. S. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.* — 1976. — Vol. 73. — P. 3178—3182.
5. Brown M. S., Goldstein J. L. // *Ann. Rev. Biochem.* — 1983. — Vol. 52. — P. 223—261.
6. Goldstein J. L., Basu S. K., Brunschede G. Y., Brown M. S. // *Cell.* — 1976. — Vol. 7. — P. 85—95.
7. Goldstein J. L., Ho Y. K., Basu S. K., Brown M. S. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.* — 1979. — Vol. 76. — P. 333—337.
8. Havel R. J., Eder H. A., Bragdon J. H. // *J. clin. Invest.* — 1955. — Vol. 34. — P. 1345—1353.
9. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // *J. biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
10. Mc Farlane A. S. // *Nature.* — 1958. — Vol. 182. — P. 53.
11. Knight B. L., Soular A. K. // *Biochem. J.* — 1982. — Vol. 202. — P. 145—152.

Поступила 23.10.85

A NATURE OF INTERACTION BETWEEN MACROPHAGES AND BLOOD SERUM LIPOPROTEINS OF LOW DENSITY, PARTIALLY HYDROLYZED BY PEPSIN

G. G. Kovaleva, I. M. Karmansky

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

Effect of partial proteolysis of 125 I-low density lipoproteins (LDL) from blood serum on their interaction with a culture of mice peritoneal macrophages was studied. Absorption and degradation of the LDL by macrophages was distinctly increased after 10% hydrolysis with pepsin. Degradation of 125 I-LDL, hydrolyzed partially by pepsin, in the cells was less inhibited by unlabelled native LDL as compared with unlabelled but modified with pepsin LDL. Macrophages appear to contain specific sites for binding of LDL hydrolyzed partially by pepsin; these sites were distinct from receptors for acetylated LDL as shown by competitive analysis.

С. М. Ершиков

ИНТЕНСИВНОСТЬ ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗА И СОДЕРЖАНИЕ УГЛЕВОДОВ В ТКАНИ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ГОПОКИНЕЗИИ

Кафедра биохимии Ярославского медицинского института

Гипокинезия, действуя как мощный стрессор, приводит к существенным нарушениям метаболизма углеводов в тканях [12, 14]. Установлено, что в организме, длительное время находящемся в состоянии функционального напряжения, важную роль в поддержании углеводного гомеостаза играет глюконеогенез [9]. Сведения о состоянии его при ограничении двигательной активности немногочисленны [7, 8, 13], систематического изучения новообразования глюкозы в тканях не проводилось.

Основной глюконеогенной тканью является печень [5], поэтому интенсивность биосинтеза глюкозы в организме в целом определяется скоростью новообразования глюкозы в печени.

В настоящем исследовании проводится сопоставление показателей интенсивности печеночного глюконеогенеза *in vivo* из некоторых субстратов в различные сроки обездвиживания и содержания в ткани печени глюкозы и гликогена.

Методика

Опыты проводили на 92 беспородных белых крысах исходной массой 170—200 г (из них 40 — контрольная группа). Всех крыс содержали на стандартном рационе, рекомендованном Институтом питания АМН СССР. Ограничения двигательной активности достигали содержанием животных в индивидуальных клетках-пеналах из органического стекла. Крыс декантировали на 1, 3, 7, 15 и 30-е сутки гипокинезии. Перед забоем крысы голодали в течение 16—18 ч. Интенсивность глюконеогенеза определяли методом инкубации тканевых срезов по [19] с некоторыми изменениями по [1] и [17]. Все процедуры по подготовке срезов к инкубации проводили в рефрижераторной камере при температуре 0—4 °С. Срезы печени промывали в охлажденном физиологическом растворе. Затем по 70—80 мг срезов помещали в конические колбы объемом 25 мл, содержащие 4 мл кресс-рингеровского бикарбонатного буфера, рН 7,4 с добавлением одного из субстратов (L-аланин, L-аспарагиновая, L-глутаминовая, пировиноградная, α -кетоглутаровая, янтарная кислоты и глицерин) в конечной концентрации 0,01 M. Растворы субстратов готовили *ex tempore*. Параллельно исследовали пробу без добавления субстратов. Инкубацию осуществляли в аэробных условиях

при 40 °С и постоянном покачивании в течение 1 ч. Количество глюкозы в инкубационной среде определяли глюкозооксидазным методом [4] после удаления белков. Содержание белка в срезах измеряли по методу Лоури [20]. Скорость глюконеогенеза выражали в микромолях глюкозы в час в расчете на 10 мг белка срезов.

В сыворотке крови определяли концентрацию глюкозы глюкозооксидазным методом [4]. Измеряли также содержание глюкозы [2] и гликогена [16, 18] в ткани печени. Для каждого исследуемого срока гипокинезии изучали те же показатели и у отдельной группы контрольных животных; при статистической обработке результаты контрольных проб объединяли, так как в каждой из групп они были практически одинаковыми.

Результаты и обсуждение

Интенсивность глюконеогенеза в ткани печени контрольных животных из эндогенных субстратов была выражена незначительно (см. таблицу). Введение в среду инкубации различных предшественников увеличивало скорость синтеза глюкозы в 1,5—3 раза в зависимости от используемого вещества. Наибольшая глюконеогенная активность отмечалась при добавлении к срезам аспарагиновой и янтарной кислот. В несколько меньших количествах глюкоза синтезировалась из глутамата, аламина и α -кетоглутарата. Минимальная скорость глюконеогенеза в наших исследованиях была характерна для пировиноградной кислоты и глицерина. Полученные цифры согласуются с данными литературы о глюкозопродуцирующей способности срезов печени у интактных крыс [10].

Пребывание животных в условиях ограничения подвижности сопровождалось изменениями интенсивности глюконеогенеза в ткани печени. Уже на 1-е сутки гипокинезии отмечалось усиление новообразования глюкозы из всех использовавшихся источников, но различия были достоверны лишь для скорости глюконеогенеза из глицерина и эндогенных субстратов. Однако значительный дефицит гликогена и умеренное снижение содержания глюкозы в ткани печени свидетельствуют о том, что интенсивность процессов распада углеводов в организме

Образование глюкозы из различных субстратов срезами печени крыс при гипокинезии (в ммоль за 1 ч на 10 мг белка)

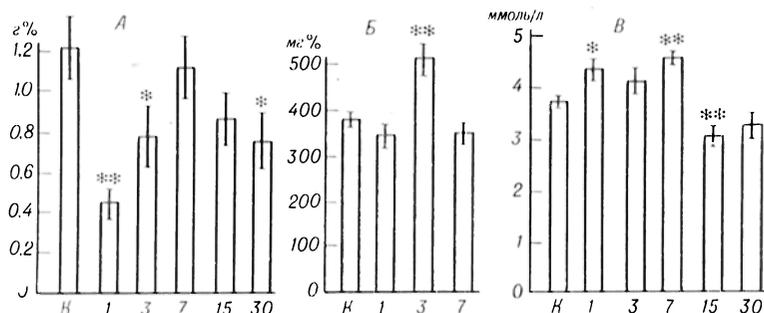
Добавленный субстрат	Контроль	Гипокинезия, сутки				
		1-е	3-е	7-е	15-е	30-е
Без субстрата	0,28±0,02 (28)	0,47±0,09*	0,32±0,06 (6)	0,53±0,07**	0,32±0,05 (8)	0,36±0,05 (7)
Аланин	0,61±0,05 (28)	0,81±0,20 (7)	0,82±0,17 (6)	1,08±0,12**	0,55±0,08 (7)	0,81±0,11 (7)
Аспарагиновая кислота	0,74±0,08 (29)	1,16±0,33 (7)	0,89±0,16 (7)	1,75±0,23**	0,89±0,17 (8)	0,97±0,15 (7)
Глутаминовая кислота	0,62±0,07 (28)	0,91±0,27 (7)	0,99±0,14* (7)	1,49±0,20** (6)	0,83±0,14 (8)	0,97±0,16* (7)
Пировиноградная кислота	0,42±0,05 (29)	0,66±0,20 (7)	0,57±0,14 (6)	0,83±0,14** (6)	0,51±0,06 (8)	0,44±0,09 (7)
α-Кетоглутаровая кислота	0,54±0,06 (26)	0,69±0,12 (6)	0,86±0,11** (7)	1,37±0,21** (6)	0,66±0,13 (8)	0,88±0,16* (7)
Янтарная кислота	0,67±0,06 (27)	1,16±0,26 (7)	1,19±0,20* (7)	1,65±0,11** (6)	0,84±0,16 (8)	0,86±0,11 (7)
Глицерин	0,26±0,03 (19)	0,74±0,17* (6)	0,55±0,11 (6)	0,71±0,12** (6)	0,48±0,07 (6)	—

Примечание. Статистически достоверные различия по отношению к контролю обозначены: одной звездочкой — $p < 0,05$; двумя звездочками — $p < 0,01$; в скобках — количество животных.

на 1-е сутки обездвиживания преобладает над интенсивностью их новообразования.

На 3-и сутки гипокинезии отмечалось некоторое снижение интенсивности глюконеогенеза в целом по сравнению с предыдущим сроком. В то же время содержание глюкозы в печени заметно повышалось, а содержание гликогена составляло уже 67% от уровня контроля. Это, по-видимому, свидетельствует о возрастании адаптационных возможностей организма животных.

Наиболее значительное усиление процессов глюконеогенеза из всех субстратов наблюдалось в печени на 7-е сутки ограничения подвижности. Глюконеогенная способность печени в конце первой недели настоящего эксперимента согласуется с данными литературы о высокой активности ключевого фермента глюконеогенеза — фосфоэнолпируваткарбоксикиназы [13] — и повышенном содержании его субстрата — щавелевоуксусной кислоты [3] — в ткани печени крыс на 7-е сутки обездвиживания.



Содержание гликогена (А) и глюкозы (Б) в печени, глюкозы в сыворотке крови (В) крыс при гипокинезии.

Статистически достоверные различия по отношению к контролю обозначены: одной звездочкой — $p < 0,005$; двумя звездочками — $p < 0,01$; по оси абсцисс буквой «К» обозначены контрольные показатели, цифрами — сроки гипокинезии (сутки).

Высокие концентрации глюкокортикоидов в крови экспериментальных животных в ранние сроки гипокинезии [6], обеспечивающие стимуляцию процессов глюконеогенеза [15], активируют и гликогенсинтетазу печени, в результате чего запасы гликогена восстанавливаются почти полностью (см. рисунок). Усиленное включение новообразованной глюкозы в гликоген приводит к некоторому снижению в печени уровня глюкозы.

На 15-е сутки гипокинезии глюконеогенная способность ткани печени по сравнению с предыдущим сроком исследования заметно снижается; скорость глюконеогенеза в присутствии всех применявшихся субстратов не обнаруживает достоверных различий с контролем. Уровень гликогена в ткани при этом вновь снижается, отмечается достоверная гипогликемия.

К 30-м суткам обездвиживания для ряда показателей тканевого обмена характерна тенденция к стабилизации и даже нормализации [12]. Однако уровень гликемии не достигает контрольного [14], что наблюдалось и в наших опытах. Оставалось пониженным и содержание гликогена в печени. Видимо, некоторая активизация процессов глюконеогенеза к концу первого месяца обездвиживания не в состоянии удовлетворить сохраняющиеся повышенные потребности организма в глюкозе.

Таким образом, в настоящем исследовании выявлены фазовые изменения интенсивности глюконеогенеза в печени в условиях гипокинезии. Вслед за возрастанием скорости биосинтеза глюкозы в ранние сроки обездвиживания в дальнейшем наблюдается ее стабилизация, не обеспечивающая повышенные потребности организма в углеводах. Исходя из этого, представляется важной разработка способов и средств стимуляции процессов новообразования глюкозы с целью ресинтеза углеводов в организме, находящемся в условиях ограничения подвижности. Стимуляция глюконеогенеза [11] позволит скорректировать и некоторые другие отрицательные эффекты обездвиживания (накопление лактата в тканях, связанные с этим сдвиги кислотно-щелочного равновесия) и может занять заметное место в комплексной профилактике и терапии гипокинетического синдрома.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Балыбина М. Д., Ильин В. С.* // *Вопр. мед. химии.* — 1967. — № 5. — С. 489—491.
2. *Вилкова В. А.* // *Методы биохимических исследований: (Липидный и энергетический обмен)* / Под ред. М. И. Прохоровой. — Л., 1982. — С. 234—236.
3. *Ганин Ю. А.* // *Изменения метаболизма у животных при гипокинезии.* — Ярославль, 1984. — С. 4—18.
4. *Городецкий В. К.* // *Современные методы в биохимии.* — М., 1964. — Т. 1. — С. 311—316.
5. *Кендыш И. П.* *Регуляция углевого обмена.* — М., 1985.
6. *Курцер Б. М.* *Функционально-морфологические аспекты патологических состояний.* — Кишинев, 1982. — С. 151—160.
7. *Махо Л., Немет Ш., Палкович М.* и др. // *Косм. биол.* — 1980. — № 3. — С. 26—29.
8. *Немет Ш., Тигранян Р. А.* // *Там же.* — 1982. — № 1. — С. 77—80.
9. *Панин Л. Е.* *Биохимические механизмы стресса.* — Новосибирск, 1983.
10. *Поступаев В. В., Литонян Э. М.* // *Бюл. exper. биол.* — 1974. — № 12. — С. 19—21.
11. *Фармакологическая коррекция утомления* / Бобков Ю. Г., Виноградов В. М., Катков В. Ф. и др. — М., 1984.
12. *Федоров И. В.* *Обмен веществ при гиподинамии.* — М., 1982.
13. *Хасина Э. И., Дардымов И. В., Брехман И. И.* // *Косм. биол.* — 1983. — № 5. — С. 55—58.
14. *Черный А. В.* // *Там же.* — 1975. — № 1. — С. 23—27.
15. *Exton J. H.* // *Glucocorticoid Hormone Action* / Ed. J. D. Baxter, G. G. Rousseau. — Berlin, 1979. — P. 535—546.
16. *Good C. A., Kramer M., Somogyi M.* // *J. biol. Chem.* — 1933. — Vol. 100, N 2. — P. 395—397.
17. *Hanson R. W.* // *Biochem. Educ.* — 1981. — Vol. 9, N 3. — P. 89—91.
18. *Kemp A., Kils A.* // *Biochem. J.* — 1954. — Vol. 56, N 4. — P. 646—648.
19. *Krebs H. A., Notton B. M., Hems R.* // *Ibid.* — 1966. — Vol. 101, N 3. — P. 607—617.
20. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* // *J. biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.

Поступила 21.10.85

INTENSITY OF GLUCONEOGENESIS AND CONTENT OF CARBOHYDRATES IN LIVER TISSUE OF RATS WITH HYPOKINESIA

S. M. Yershirov

Chair of Biochemistry, Medical School, Yaroslavl

Phase alterations in the intensity of gluconeogenesis were observed in 92 rats subjected to hypokinesia within 1-30 days. At early periods of fixation of the animals gluconeogenesis was increased in all the tissues studied; the activation was especially distinct within the first 7 days of the experiment. Intensity of gluconeogenesis was similar to control values within 15 days of hypokinesia and a slight activation was detected within 30 days. Content

of glucose was maximal in liver tissue within 3 days but the glycogen level was distinctly decreased in all the periods of experiments except of the 7th day. The pattern of gluconce-

nesis in liver tissue as well as content of carbohydrates should be taken into consideration in the course of profilaxis and treatment of the unfavourable after-effects of hypokinesia.

УДК 616.12+616.36]-008.939.633.2-02:613.863

Ф. З. Меерсон, М. П. Явич

РОЛЬ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В ПОСТСТРЕССОРНЫХ ИЗМЕНЕНИЯХ СИНТЕЗА РНК В СЕРДЦЕ И ПЕЧЕНИ

НИИ общей патологии и патологической физиологии АМН СССР, Москва

После завершения однократного стрессорного воздействия вслед за катаболической фазой, выражающейся в снижении синтеза белков и концентрации РНК, а также в повышении распада белков, закономерно развивается более длительная анаболическая фаза, характеризующаяся противоположным комплексом изменений [1]. Дальнейшее изучение молекулярных механизмов этих стадий показало, что в катаболической фазе снижается активность РНК полимеразы I и II — ферментов, ответственных за синтез рибосомной и матричной РНК (рРНК и мРНК). В анаболической стадии активность РНК полимеразы I значительно превышает контрольный уровень, а активность РНК полимеразы II восстанавливается до контрольных величин [3]. Указанные изменения имеют существенное биологическое значение, так как активация синтеза РНК в анаболической стадии потенцирует формирование самых различных долговременных реакций организма — от образования временных связей до реакций иммуногенеза [1]. В связи с этим исследование синтеза нуклеиновых кислот и белков после стрессорного воздействия представляет несомненный интерес.

Цель данной работы состояла в изучении роли обнаруженных в последние годы цитозольных белковых факторов, повышающих скорость транскрипции [2], в реализации стадийных изменений синтеза РНК после перенесения иммобилизационного стресса.

Методика

Опыты были поставлены на белых крысах-самцах массой 180—200 г. Животных фиксировали за конечности в положении на спине в течение 6 ч. Иммобилизационный стресс такого рода сопровождается развитием язвенных пор-

жений желудка. Крысы забивали немедленно после прекращения стрессорного воздействия и через 12, 24 и 48 ч.

Цитозольную фракцию (фракцию S-100) выделяли из сердца и печени по методу [7] с некоторыми модификациями [2]. Ткани гомогенизировали в растворе (1:3), содержащем 0,25 М сахарозы, 0,025 М KCl, 0,050 трис-HCl pH 7,9, 2 мМ дитиотрептола, 0,10 мМ ЭДТА. Гомогенат центрифугировали при 105 000 г в течение 1 ч при температуре 3 °С. Полученную надосадочную жидкость диализировали в течение 18 ч при температуре 3—4 °С против раствора, содержащего 0,25 М сахарозы, 0,1 М KCl, 0,05 М трис-HCl pH 7,9, 0,5 мМ дитиотрептола и 2 мМ ЭДТА. Диализат осветляли центрифугированием. Действие цитозоля на синтез РНК изучали в условиях бесклеточной системы, содержащей ядра, изолированные сахарозным методом из клеток сердца и печени [2, 5]. Для приготовления цитозоля сердца и печени объединяли сердца и печень 5 животных.

Инкубационная среда (0,5 мл) для определения активности РНК полимераз содержала следующие компоненты (в микромолях): для РНК полимеразы I (система I) — трис-HCl pH 7,9—50, KCl — 25, MgCl₂—6, (NH₄)₂SO₄ — 17, ГТФ и ЦТФ — 0,6, АТФ — 2, УТФ — 0,06, креатинфосфат — 5, креатинфосфокиназу и 2 мкКи ¹⁴C-УМФ. Для определения активности РНК полимеразы II использовали ту же инкубационную смесь, только вместо MgCl₂ в систему вводили 2 мкмоль MnCl₂ и концентрация сернокислого аммония составляла 160 мкмоль (система II). Реакцию инициировали добавлением ядерной суспензии (50 мкг ДНК). Для подавления активности РНК полимеразы II в систему I вводили α-аманитин (1 мкг/1 мл). Цитозольную фракцию добавляли из расчета 8—10 мг белка на 1 мл. Инкубацию проб проводили при температуре 36 °С в течение 15 мин. После инкубации к пробам добавляли 10 % раствор ТХУ, содержащий 0,04 М пирофосфата натрия, и отмывали на миллиметровых фильтрах типа «Luifs» [2]. Радиоактивность образцов определяли с помощью сцинтилляционного счетчика в толуоловом растворителе, содержащем РРО и РОРОР, и выражали в импульсах в минуту на пробу.

Об изменении синтеза РНК судили по включению радиоактивного уридинмонофосфата (¹⁴C-УМФ) в кислотонерастворимую фракцию ядер. Ранее было показано, что это включение зависит от присутствия ДНК, добавленных трифосфатов и на 95 % подавляется актиномицином D [2]. Включение ¹⁴C-УМФ в системе

I отражает по существу синтез рРНК, поскольку активность РНК полимеразы III очень низкая [7], а синтез мРНК был ингибирован α -аманитином. В системе II в основном синтезируется ДНК-подобная РНК [2].

Результаты и обсуждение

В I серии экспериментов в бесклеточную систему, содержащую ядра печени и сердца животных, не подвергавшихся стрессу, добавляли цитозоль животных, перенесших и не перенесших стресс (контрольный цитозоль). Результаты этих опытов представлены в табл. I. Из табл. I видно, что активность РНК полимеразы I в присутствии цитозоля сердца и печени животных, подвергнутых стрессорному воздействию, по сравнению с контрольной цитоплазматической фракцией изменяется. Так, цитозоль, выделенный из

Таблица I

Влияние цитозоля сердца и печени животных, подвергнутых стрессорному воздействию, на синтез РНК в ядрах сердца и печени контрольных животных

Условия опытов	Включенные ^{14}C -УМФ и РНК, нмп/млн на пробу	
	система I	система II
Ядра сердца + цитозоль сердца:		
цитозоль контрольный	400	700
» после завершения стрессорного воздействия:		
немедленно	300	730
через 12 ч	500	750
» 24 ч	580	730
» 48 ч	460	720
Ядра печени + цитозоль сердца:		
цитозоль контрольный	1500	—
» после завершения стрессорного воздействия через 24 ч	1800	—
Ядра печени + цитозоль печени:		
цитозоль контрольный	2000	3000
» после завершения стрессорного воздействия:		
немедленно	1400	3000
через 12 ч	2300	3300
» 24 ч	2900	2900
» 48 ч	2500	2950

Примечание. Каждая цифра — результат 3 опытов. В каждом опыте использовано: для выделения ядер сердца 10 животных, ядер печени 3 животных; цитозоль сердца и печени выделяли от 5 животных.

сердца и печени животных немедленно после удаления стрессорного фактора, понижает активность РНК полимеразы I в ядрах соответствующих органов в среднем на 25 и 30 % по сравнению с контролем. Цитозоль, полученный из сердца и печени животных через 12, 24 и 48 ч после удаления стрессорного фактора, напротив, повышает активность РНК полимеразы I как в ядрах сердца, так и в ядрах печени. При этом в присутствии цитозоля, выделенного через 12, 24, 48 ч после завершения стресса, активность РНК полимеразы I в ядрах сердца возрастает по сравнению с контролем на 20, 45 и 15 % соответственно, а в ядрах печени — на 15, 46 и 20 % соответственно. Таким образом, как в сердце, так и в печени наибольшей активностью характеризуется цитозоль, полученный от животных через 1 сут после завершения стресса. Этот активный постстрессорный цитозоль был испытан в бесклеточной системе синтеза РНК в перекрестных опытах. К ядрам печени добавляли активный постстрессорный и контрольный цитозоль, выделенный из сердца, а в систему, содержащую ядра сердца, вводили такой же цитозоль печени. Как видно из табл. I, цитозоль, полученный из сердца через 1 сут после завершения стресса, увеличивает активность РНК полимеразы I в ядрах печени на 20 % по сравнению с контролем. Различие в действии постстрессорного и контрольного цитозоля печени на синтез РНК в ядрах сердца было малозаметно, поскольку цитозоль контрольной печени весьма активен и очень резко — в 6—7 раз — повышает активность РНК полимеразы I в ядрах сердца [2].

Следует заметить, что в настоящем исследовании, как и в наших прежних опытах, при обработке цитоплазматической фракции протеолитическим ферментом проназой ее активность полностью исчезала [2].

Во всех исследованных вариантах активность РНК полимеразы II в присутствии цитозоля животных, подвергнутых стрессу, по сравнению с цитозолем контрольных не изменялась.

Во II серии экспериментов мы добавляли контрольный и постстрессорный цитозоль в бесклеточную систему, содержащую ядра клеток сердца и печени животных, подвергавшихся стрессу. Клеточные ядра получали от

Таблица 2

Влияние цитозоля сердца и печени на синтез рРНК в ядрах сердца и печени животных, подвергнутых стрессорному воздействию

Условия опытов	Включение ^{14}C -УМФ в рРНК, имп/мин на пробу	
	I опыт	II опыт
Ядра сердца, выделенные непосредственно после стрессорного воздействия, + цитозоль сердца:		
контрольного	300	320
непосредственно после стрессорного воздействия через 1 сут	250	240
Ядра сердца, выделенные через 1 сут после стрессорного воздействия, + цитозоль сердца:		
контрольного	460	500
через 1 сут после стрессорного воздействия	550	600
Ядра печени, выделенные непосредственно после стрессорного воздействия, + цитозоль печени:		
контрольной	1250	1250
непосредственно после стрессорного воздействия через 1 сут	1050	1000
Ядра печени, выделенные через 1 сут после стрессорного воздействия, + цитозоль печени:		
контрольный	2400	2600
через 1 сут после стрессорного воздействия	3000	3100

Примечание. В каждом опыте ядра сердца выделяли из 10 животных, печени — из 5 животных, подвергнутых стрессорному воздействию. Цитозоль сердца и печени выделяли от 5 животных.

животных непосредственно после прекращения стрессорного воздействия и через 1 сут. Ранее было показано, что активность рРНК полимеразы I в первом случае снижается, а во втором максимально увеличена [1].

Результаты этих опытов представлены в табл. 2. Из табл. 2 видно, что активность рРНК полимеразы I в ядрах, изолированных из сердца и печени животных непосредственно после завершения стресса, в присутствии контрольного и активного постстрессорного цитозоля выше, чем при добавлении цитозоля сердца и печени, выделенного сразу после удаления стрессорного фактора. В ядрах сердца эти величины соответственно уве-

личены в среднем на 26 и 58 %, в ядрах печени — на 25 и на 40—47 %. Из табл. 2 вытекает, что активный постстрессорный цитозоль повышает РНК-полимеразную активность ядер сердца и печени, выделенных от животных через 1 сут после завершения стрессорного воздействия. По сравнению с контрольной цитоплазматической фракцией эти величины составляют 20 и 20—25 % соответственно.

В результате стрессорной реакции в цитоплазме клеток сердца и печени изменяется активность белковых факторов, повышающих скорость синтеза рРНК. Первоначальный эффект этой реакции состоит в том, что активность указанных факторов понижается. В дальнейшем развитие стрессорной реакции приводит к увеличению активности цитоплазматических факторов, повышающих скорость синтеза рРНК, причем максимум этого увеличения наблюдается через 1 сут после завершения воздействия. Подобная динамика изменений при стрессе нами была обнаружена для активности рРНК полимеразы I в ядрах сердца и печени [1]. Таким образом, снижение и увеличение активности белковых факторов транскрипции в цитоплазме и активности рРНК полимеразы I в ядрах клеток обоих органов совпадают во времени. Оценивая это положение, следует иметь в виду, что белковые факторы, повышающие скорость синтеза рРНК, выделены из ядер некоторых клеток — тимуса теленка, асцитных клеток Эрлиха [4, 5]. Соответственно можно предположить, что белковые факторы ядра и цитоплазмы, повышающие скорость транскрипции, одни и те же или в ядрах они частично модифицированы. Синтезируясь на полирибосомах, эти факторы, вероятно, по мере необходимости транспортируются в ядро и там регулируют скорость транскрипции. Скорость их синтеза и концентрация в нуклеоплазме, очевидно, определяются физиологическим состоянием клетки. В этом отношении интересно отметить, что в наших опытах активный постстрессорный цитозоль увеличивал активность рРНК полимеразы I в ядрах сердца и печени контрольных животных в два раза больше, чем в соответствующих ядрах, осуществляющих повышенный синтез рРНК, — в ядрах сердца и печени через 1 сут после завершения стрессор-

ного воздействия. Вероятно, насыщенность нуклеоплазмы факторами транскрипции на данном этапе стрессорной реакции была выше, чем в контроле.

В целом наши данные свидетельствуют о том, что стрессорное воздействие вызывает в клетках сердца и печени изменение активности цитоплазматических белковых факторов, повышающих синтез рРНК. Ранее подобное явление было нами выявлено при обусловленном гиперфункцией [2] компенсаторном росте сердца и печени. Таким образом, активация белковых факторов цитоплазмы, участвующих в транскрипции, является важным молекулярным механизмом в регуляции скорости синтеза рРНК при адаптационных реакциях организма, для реализации которых необходимо развитие определенных структурных изменений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Меерсон Ф. З., Павлова В. И., Сухих Г. Т. и др. // Пат. физиол. — 1982. — № 5. — С. 3—14.
2. Явич М. П., Меерсон Ф. З. // Вопр. мед. химии. — 1983. — № 6. — С. 105—112.
3. Явич М. П., Меерсон Ф. З. // Бюл. exper. биол. — 1985. — № 9. — С. 277.
4. Benson R. H., Spindler S. R., Hodo H. J., Blatti P. S. // Biochemistry (Wash.). — 1978. — Vol. 17. — P. 1387—1396.
5. Pogo A., Alfrey V., Mirsky A. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1966. — Vol. 56. — P. 550—557.

6. Ueno K., Sekimizu K., Obinata M. et al. // Biochemistry (Wash.). — 1981. — Vol. 20. — P. 634—640.
7. Weil A., Luse D., Segal A. et al. // Cell. — 1979. — Vol. 18. — P. 469—484.

Поступила 18.10.85

ROLE OF CYTOPLASMIC FACTORS IN POST-STRESSORY ALTERATIONS OF RNA SYNTHESIS IN HEART AND LIVER TISSUES

F. Z. Meerson, M. P. Yavich

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

Effect of protein factors from heart and liver cytoplasm (S-100 fraction) on activity of RNA polymerases I and II was studied in isolated nuclei of heart and liver tissues under conditions of immobilization stress. Activity of the cytosol factors, stimulating ribosomal RNA (rRNA) synthesis, was altered during the post-stressory period. Immediately after immobilization the activity of the cytosol was decreased at the catabolic phase. Within a day the activity was distinctly increased at anabolic phase of the stressory reaction. The active post-stressory cytosol was studied in the cell-free system containing nuclei from heart and liver tissues of animals subjected to stress and of the control animals. The active post-stressory cytosol increased the rate of rRNA synthesis in corresponding nuclei of heart and liver tissue, while synthesis of rRNA was increased 2-fold in nuclei of control animals as compared with heart and liver nuclei, isolated within a day after termination of stress. Activation of the cytoplasmic factors stimulating the transcription rate is concluded to be of importance for regulation of rRNA synthesis under adaptation conditions.

УДК 616.36-008.939.53-02:615.915.547.262]-092.9

М. М. Рахимов, О. Н. Горбатая, Л. П. Пенькова

ИЗМЕНЕНИЕ ФОСФОЛИПИДНОГО СОСТАВА МЕМБРАН МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ ИМ ЭТАНОЛА

Ташкентский университет им. В. И. Ленина

Важную информацию о состоянии различных органов и организма в целом при патологических изменениях может дать исследование функции выделенных из организма большого митохондрий [2, 4, 6]. Показано, что разные виды патологии — гепатит, колит, тепловой стресс, голодание, гипоксия, аноксия — приводят к образованию в мембранах митохондрий так называемых «скрытых повреждений» [1], которые проявляются в резком снижении устойчивости полиферментных систем органелл к повреждающим

воздействиям (нагреванию, действию фосфолипаз и протеаз и т. д.). Ранее мы предположили, что образование «скрытых повреждений» связано с изменением структуры и состава митохондриальных мембран в результате действия эндогенной липолитической системы [7], и показали, что такие изменения фосфолипидного состава мембран действительно происходят при разных видах патологии [1, 3]. В связи с этим представляется интересным выяснение вопроса о влиянии алкоголя на фосфолипидный состав

митохондрий. В литературе имеется много данных о влиянии алкоголя на структуру и функции биологических мембран, причем многие гипотетические схемы, объясняющие влияние алкоголя на организм, включают как необходимое звено изменение фосфолипидного состава мембран [16, 18]. Известно, что этанол влияет на фосфолипиды мозга [19], культуральных клеток [14], тонких кишок [17], печени, почек, сердца, селезенки [9—11]. К сожалению, все эти результаты получены на целых клетках, данных о влиянии алкоголя на фосфолипидный состав мембран митохондрий в литературе нет. Между тем, изучение митохондрий — оргanelл, играющих центральную роль в клеточном метаболизме и наиболее быстро реагирующих на любые внешние воздействия, — могло бы дать важную информацию о такой тяжелой патологии, как алкоголизм.

В настоящей работе представлены данные о влиянии алкоголя на фосфолипидный состав мембран митохондрий печени крыс.

Методика

Исследования проводили на крысах-самцах массой 180—200 г, разделенных на три группы. 1-я группа — контроль, животным 2-й группы вводили этанол внутривенно в виде 30 % водного раствора в течение 21 дня при постепенно возрастающей дозе (от 0,1 до

2,5 мл этанола на 1 кг массы животного), животные 3-й группы получали этанол с жидким кормом (дозы и время введения были такими же, как во 2-й группе). Митохондрии выделяли, как описано ранее [2], промывали дважды для очистки от микросом. Фосфолипиды эцетрагировали по методу [12] и разделяли при помощи двухмерной тонкослойной хроматографии на силикагеле марки КСК. Фосфолипиды обнаруживали при помощи метода [22] и количественно определяли по фосфору [5]. Выделение фосфолипазы Д и ферментативный синтез фосфатидилэтанола проводили по предложенной ранее методике [8]. Активность глюкозо-6-фосфатазы измеряли методом [15]. Активность фосфолипазы Д определяли по холину [20] (субстрат — фосфатидилхолин) и по этаноламину [13] (субстрат — фосфатидилэтаноламин). Ферментативную реакцию проводили следующим образом: на суспензию митохондрий в ацетатном буфере, рН 5,6 (0,4 мг/мл по белку), воздействовали ультразвуком (44 кГц, 10 мин), добавляли субстрат (3 мМ), CaCl_2 (4 мМ), диэтиловый эфир (20 % по объему) и инкубировали в течение 1 ч при 40 °С при интенсивном перемешивании.

Результаты и обсуждение

Как видно из рис. 1, в митохондриальных мембранах животных, получавших этанол (2-я и 3-я группы), обнаруживается новый фосфолипид, который отсутствовал в контрольной группе (пятно № 7 на рис. 1). Пятна остальных фосфолипидов выявлены во всех 3 группах. Поскольку новый фосфолипид определяется только у животных, получавших этанол, можно предположить, что это фосфатидилэтанол. Для проверки этого предположения был синтезирован фосфатидилэтанол при помощи фосфолипазы Д, выделенной из среднеазиатской редьки, осуществляющей реакцию трансалкилирования в том случае, если субстратом являются фосфолипид и свободный спирт [8]. Продукты ферментативной реакции, в которых субстратами были фосфатидилхолин и этанол, анализировали при помощи тонкослойной хроматографии. Хроматограмма представлена на рис. 2. В реакции образуются 2 продукта: фосфатидиловая кислота (продукт гидролитического действия фосфолипазы Д) и фосфатидилэтанол (продукт трансалкилирующего действия фосфолипазы Д). Сравнивая рис. 1 и 2, можно заметить, что пятно неизвестного фосфолипида на рис. 1 соответствует пятну фосфатидилэтанола на рис. 2.

Отметим, что образование фосфатидилэтанола в общих фракциях фосфолипидов из различных органов крыс

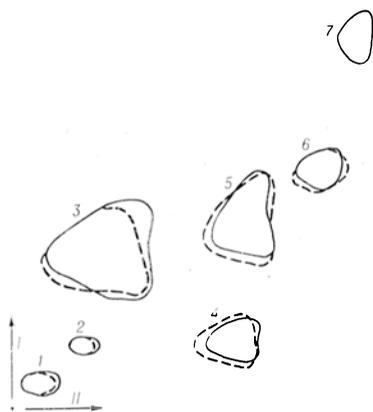


Рис. 1. Хроматограмма митохондриальных фосфолипидов печени крыс, получавших этанол (сплошная линия), и контрольных животных (пунктирная линия).

I направление — хлороформ : метанол : 28 % аммиак (65 : 25 : 5).

II направление — бутанол : уксусная кислота : вода (60 : 20 : 20).

1 — фосфатидилсерин, 2 — фосфатидилinosит, 3 — фосфатидилхолин, 4 — лизофосфатидилэтаноламин, 5 — фосфатидилэтаноламин, 6 — кардиолипин, 7 — неизвестный фосфолипид.

сы при хроническом введении этанола ранее было обнаружено в работах [10, 11]. Авторы этих работ считают, что образование фосфатидилэтанола связано с действием эндогенной фосфолипазы Д (ее наличие в микросомах различных животных тканей можно считать доказанным [21]), которая катализирует в присутствии этанола трансалкилирование мембранных фосфолипидов, т. е. замену из спиртовых остатков (холина, этаноламина и т. д.) на этанол.

Возможно, что аналогичным образом образуется фосфатидилэтанол и в митохондриях печени крыс, «потреблявших» алкоголь. В связи с этим возникает вопрос о существовании фосфолипазы Д в митохондриях. Измерение активности фосфолипазы Д в митохондриях с использованием экзогенных субстратов показало, что в случае гидролиза фосфатидилхолина она равна 0,061 мкмоль холина на 1 мг в час, в случае фосфатидилэтаноламина — 0,570 мкмоль этаноламина на 1 мг в час. Обнаруженная активность не может объясняться только примесями микросом (активность фосфолипазы Д в митохондриях в 7,8 раз ниже, чем в надмитохондриальном супернатанте, тогда как удельная активность глюкозо-6-фосфатазы, маркерного фермента на микросомы, ниже в 13,1 раз). Это означает, что фосфолипаза Д действительно присутствует в митохондриях. Не исключено поэтому, что аномальный фосфолипид — фосфатидилэтанол — синтезируется в самих митохондриях. Однако для проверки этого предположения необходимы эксперименты с изолированной из митондрий фосфолипазой Д в модельной системе фосфолипид — этанол.

Введение крысам этанола не только вызывает появление в их митохондри-

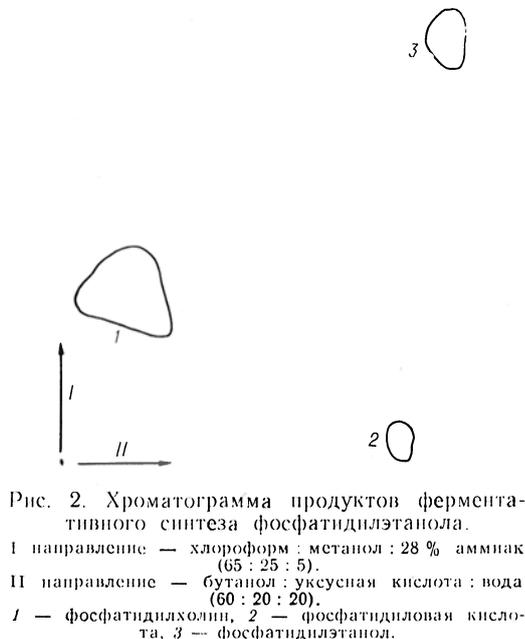


Рис. 2. Хроматограмма продуктов ферментативного синтеза фосфатидилэтанола.

I направление — хлороформ : метанол : 28 % аммиак (65 : 25 : 5).
II направление — бутанол : уксусная кислота : вода (60 : 20 : 20).
1 — фосфатидилхолин, 2 — фосфатидиловая кислота, 3 — фосфатидилэтанол.

ях аномального фосфолипида, но и изменяет соотношение митохондриальных фосфолипидов (см. таблицу). Относительное содержание фосфатидилхолина у животных обеих экспериментальных групп возрастает по сравнению с контролем (на 26—28 %). Содержание фосфатидилэтаноламина, напротив, уменьшается. Меньше становится также кардиолипина и лизофосфатидилэтаноламина. Этанол, введенный с жидким кормом, вызывает значительное уменьшение относительного содержания фосфатидилсерина, а при внутрибрюшинном его введении содержание этого фосфолипида практически не изменяется по сравнению с контролем. Содержание фосфатидилинозита снижается у животных обеих экспериментальных групп, но более значительно — при внутрибрюшинном введении. Аномальный фосфолипид —

Фосфолипидный состав митондрий печени крыс при введении этанола, % от общего фосфолипидного фосфора митондрий ($M \pm m$)

Фосфолипид	Группы животных		
	1-я (n=6)	2-я (n=7)	3-я (n=7)
Фосфатидилсерин	3,7±0,4	3,5±0,2	1,1±0,1
Фосфатидилинозит	2,4±0,1	1,5±0,1	2,0±0,3
Фосфатидилхолин	44,8±2,8	57,3±4,1	56,7±3,5
Лизофосфатидилэтаноламин	5,3±0,3	3,1±0,3	2,4±0,2
Фосфатидилэтаноламин	40,2±1,7	31,2±2,3	34,7±2,8
Кардиолипин	3,6±0,3	1,9±0,2	1,3±0,1
Фосфатидилэтанол	—	1,5±0,1	1,8±0,2

фотфатидилэтанол — составляет у крыс 2-й и 3-й группы соответственно 1,5 и 1,8 % от общего количества фосфолипидов митохондрий.

Таким образом, хроническое введение этанола внутрибрюшинно и с жидким кормом крысам обуславливает изменение фосфолипидного состава мембран митохондрий печени. При этом в митохондриях обнаруживается аномальный фосфолипид — фосфатидилэтанол. Поскольку изменение фосфолипидного состава, как известно, значительно отражается на функционировании митохондрий, проявлении и липидзависимых функций, активности полиферментных систем, подверженности органелл действию повреждающих факторов, включая стрессовые и патологические состояния организма [1, 3, 7], можно полагать, что при действии этанола значительно изменяется состояние энергообеспечения клетки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алматов К. Т. Изучение деградации полиферментных систем внутренней мембраны митохондрий в норме и патологии и их стабилизация: Дис. канд. биол. наук. — Ташкент, 1978.
2. Алматов К. Т., Агзамов Х., Рахимов М. М., Туракулов Я. Х. // Вопр. мед. химии. — 1982. — № 4. — С. 50—56.
3. Алматов К. Т., Миргалипов Д. Т., Гулямов Т., Рахимов М. М. // Всесоюзный симпозиум по биохимии липидов: 4-й: Тезисы докладов. — Киев, 1983. — С. 22.
4. Алматов К. Т., Рахимов М. М. // Вопр. мед. химии. — 1978. — № 6. — С. 740—747.
5. Кейтс М. Техника липидологии: Пер. с англ. — М., 1975. — С. 28.
6. Мусаев Х. Н., Алматов К. Т., Рахимов М. М., Ахмеров Р. // Вопр. мед. химии. — 1981. — № 6. — С. 763—768.
7. Рахимов М. М. // Биологические мембраны и мембраноактивные соединения. — Ташкент, 1985. — С. 267—291.
8. Рахимов М. М., Мадьяров Ш. Р., Бабаев М. У. // Узб. биол. журн. — 1979. — № 3. — С. 7.

9. Селевич М. И., Островский Ю. М. // Вопр. мед. химии. — 1983. — № 3. — С. 13—17.
10. Alling C., Gustavsson L., Anggard S. // FEBS Lett. — 1983. — Vol. 152. — P. 24—28.
11. Anggard S., Benthin L., Gustavsson L., Alling C. // Alcoholism. — 1984. — Vol. 8. — P. 251.
12. Bligh E. G., Dyer W. J. // Canad. J. Biochem. Physiol. — 1959. — Vol. 37. — P. 911—917.
13. Dawson R. M. S., Hemington N. // Biochem. J. — 1967. — Vol. 102. — P. 76—81.
14. Keegan R., Wilce P. A., Ruczkal-Pietzak E., Shanley B. C. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1983. — Vol. 114. — P. 985—990.
15. Koid H., Oda T. // Clin. chim. Acta. — 1959. — Vol. 4. — P. 53—59.
16. Littleton I. M. // J. roy. Soc. Med. — 1983. — Vol. 76. — P. 593—601.
17. Mansbach C. M. // J. Lipid Res. — 1983. — Vol. 24. — P. 1310—1320.
18. Melgaard B. // Acta neurol. scand. — 1983. — Vol. 67. — P. 131—142.
19. Nhamuro P. T., John G. R., Littleton J. M. // Biochem. Pharmacol. — 1982. — Vol. 31. — P. 3936—3938.
20. Shapiro B. // Biochem. J. — 1953. — Vol. 53. — P. 663—669.
21. Taki T., Kanfer J. N. // J. biol. Chem. — 1979. — Vol. 254. — P. 9761—9765.
22. Vaskovsky V. E., Latyshev N. A. // J. Chromatogr. — 1975. — Vol. 115. — P. 246—249.

Поступила 25.11.85

ALTERATIONS OF PHOSPHOLIPID COMPOSITION IN LIVER MITOCHONDRIAL MEMBRANES OF RATS TREATED WITH ETHANOL

M. M. Rakhimov, O. N. Gorbataya, L. P. Pen'kova

State University, Tashkent

Phospholipid composition was studied in liver mitochondrial membranes of rats consuming ethanol for a long time. A new phospholipid phosphatidyl ethanol was found in the membranes, which appears to be formed due to the action of endogenous phospholipase D. The phospholipase D activity was measured in mitochondria using direct evaluation. Administration of ethanol led to alteration in the ratio of mitochondrial phospholipids.

УДК 612.014.46:615.9]-064:612.015.1:577.152.112].014.46:615.355:577.152.112

К. Е. Герасимов, И. Б. Цырлов

ИНДУКЦИЯ МИКРОСОМНЫХ МОНООКСИГЕНАЗ ИЗОПРОПИЛЬНЫМ ПРОИЗВОДНЫМ АМИНОПИРИНА

Институт клинической и экспериментальной медицины Сибирского отделения АМН СССР, Новосибирск

Монооксигеназные реакции биотрансформации ксенобиотиков катализируются системой микросомных окислительно-восстановительных перенос-

чиков, ключевым из которых является цитохром P-450 [1]. Одна из форм микросомного цитохрома P-450 — N-деметилаза, субстратами которой

служат лекарственные средства — аминопирин, этилморфин, бензфетамин [6]. Так, аминопирин подвергается N-деметилированию в микросомах печени по —N(CH₃)₂ положению, трансформируясь в 4-аминоантипирин [11]. Вторым продуктом реакции является формальдегид, который в неизменном виде или в форме конъюгата выводится из организма путем экскреции.

В экспериментах с фенобарбиталом хлорированными изомерами нафталина и бифенила выявлено, что монооксигеназные индукторы так называемого «фенобарбиталового» типа реализуют свой эффект исходной молекулой, а не продуктами микросомного метаболизма [16]. Поэтому представлялось реальным перевести типичные субстраты цитохрома P-450 в индукторы его биосинтеза путем направленной химической модификации той позиции в молекуле субстрата, которая подвергается окислению в активном центре фермента. Ранее были получены прямые доказательства этого положения: введение метильной группы в ω — 1 позицию алифатической цепи типичного субстрата амобарбитала сопровождалось выраженным индуцирующим действием производного на содержание и активность микросомного цитохрома P-450 [7].

В настоящей работе изучали действие производного аминопирина — 4-изопропиламиноантипирин (ИПААП) на монооксигеназные системы печеночных клеток. Показан активный de novo синтез микросомного цитохрома P-450 в печени обработанных ИПААП крыс, сопровождающийся возрастанием его монооксигеназной активности.

Методика

Опыты проводили на крысах-самцах Вистар (питомник «Столбовая» АМН СССР) массой 180—200 г.

ИПААП вводили внутривенно из расчета ежедневной дозы 100 мг на 1 кг массы тела в течение 1, 2, 3 и 4 сут. Животных декапитировали под эфирным наркозом на следующие сутки после последней инъекции.

Выделяли микросомную фракцию печени, определяли содержание цитохрома P-450 и микросомного белка как описано ранее [16].

N-деметилирование аминопирин проводили по методу [13].

Все спектральные измерения проводили на дулучевом, двулучевом спектрофотометре Hitachi-556.

Реакцию двойной иммунодиффузии по Оух-

терлони проводили как описано в работе [14]. Количество специфичной формы цитохрома P-450 в микросомах определяли методом ракетного иммуноэлектрофореза [12] с использованием антител, приготовленных против фенобарбиталового цитохрома P-450.

В экспериментах по включению радиоактивной аминокислоты индукторы вводили за 16 ч до умерщвления животных, затем за 8 и 4 ч до декапитации внутривенно вводили L — [1 — ¹⁴C]-лейцин (Amersham) в суммарной дозе 0,5 мКи/кг. Автофлюорографию пластинок геля после SDS — ПААГ электрофореза микросомных белков проводили по методу [8], используя счетчик Mark-III.

Имуноглобулины типа G (анти-P-450) любезно предоставлены В. М. Мининим.

Результаты и их обсуждение

Ранее были поставлены эксперименты по выявлению индуцирующей способности аминопирин в отношении монооксигеназной системы печени. При этом исходили из разработанного ранее положения, что индукторы «фенобарбиталового» типа стимулируют биосинтез монооксигеназ своей исходной молекулой [3, 16]. Поэтому, хотя аминопирин при однократной инъекции крысам не является индуктором [10], при введении этого ксенобиотика по схеме 80 мг на 1 кг массы тела 3 раза в сутки, т. е. при постоянном поддержании высокой концентрации аминопирин в клетках печени, был обнаружен индуцирующий эффект [2].

В настоящей работе применен другой подход. Вместо частых инъекций больших доз аминопирин предпринята попытка так модифицировать его молекулу, чтобы блокировать положение N-деметилирования и таким образом добиться как пролонгирования его действия в организме, так и проявления индуцирующей способности модифицированного аналога.

С этой целью было синтезировано производное аминопирин — ИПААП (синтез проводил В. В. Мартин, Институт органической химии Сибирского отделения АН СССР, по методу [9]), в котором две метильные группы в —N(CH₃)₂ положении заменены изопропильной группой (рис. 1).

Для проверки скорости биотрансформации ИПААП его инкубировали в присутствии избытка НАДФН с микросомами печени контрольных животных; при этом какой-либо убыли НАДФН или субстрата обнаружено не было. Инкубация ИПААП с микросомами не влияла на дифференциаль-

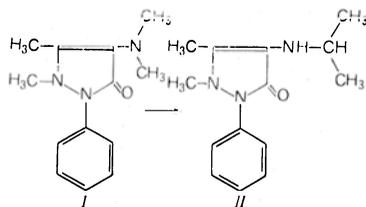


Рис. 1. Модификация структуры аминопирина. I — аминопирин, II — ИПААП.

ный спектр цитохрома Р-450. Таким образом установлено, что ИПААП характеризуется замедленной биотрансформацией в микросомах печени и большим временем полужизни в организме, нежели аминопирин. Другими авторами было показано, что с мочой у крыс выводится только 3% введенной дозы ИПААП [6], что хорошо согласуется с нашими данными. Это производное аминопирина не оказывает инактивирующего влияния на цитохром Р-450.

Общее количество спектрально регистрируемого цитохрома Р-450 при индукции возрастает, достигая максимального уровня, равного 1,17 нмоль гемопротенда на 1 мг микросомного белка (см. таблицу). Параллельно с увеличением содержания цитохрома Р-450 наблюдается нарастание активности N-деметилирования аминопирина в ИПААП-микросомах. К концу 4-х суток индукции $V_{\text{макс}}$ реакции деметилирования возрастает до величин, близких к наблюдаемым при фенобарбиталовой индукции — 2,6 нмоль НСНО/мин/нмоль цитохрома Р-450 (см. таблицу). Для сравнения следует отметить, что при многократном вве-

Характеристика микросом печени крыс при разной длительности введения ИПААП

Параметр	Длительность индукции, сут			
	1	2	3	4
Содержание цитохрома Р-450, нмоль на 1 мг белка	0,62	1,07	1,14	1,17
Скорость N-деметилирования аминопирина, нмоль НСНО/мин на 1 мг белка	1,06	2,55	3,0	3,11
Содержание фенобарбиталового цитохрома Р-450, измеренное методом ракетного иммуноэлектрофореза, %	17	23	25	36

дении аминопирина скорость реакции N-деметилирования этого субстрата не превышает 2 нмоль НСНО/мин/нмоль цитохрома Р-450.

ИПААП-микросомы были охарактеризованы также с помощью методов иммунохимического анализа. В системе двойной иммунодиффузии Оухтерлони зарегистрированы полосы преципитации между солюбилизированными микросомами и антисывороткой, содержащей антитела против фенобарбиталового цитохрома Р-450. Таким образом, можно считать N-деметилазу аминопирина одной из индуцируемых фенобарбиталом форм цитохрома Р-450.

Методом ракетного иммуноэлектрофореза показано существенное возрастание содержания этой формы цитохрома Р-450, которое к концу 4-х суток индукции составляет 33—36% от общего количества СО-связывающего гемопротенда. Характерно, что при фенобарбиталовой индукции содержание специфичной формы не превышает уровня 40% [4].

Следует отметить, что при многократном введении крысам больших доз аминопирина содержание данной формы монооксигеназы достигает 32% от общего содержания микросомного цитохрома Р-450. Таким образом, поддержание высокой концентрации аминопирина в гепатоцитах реально заменить введением в значительно меньших дозах модифицированного (слабометаболизирующегося) производного этого лекарственного вещества. К тому же по ряду параметров индуцирующий эффект последнего превосходит эффект индукции аминопирином.

При электрофоретическом разделении микросомных белков в SDS-РААГ установлена молекулярная масса индуцированного гемопротенда — 51 000 дальтон (рис. 2 см. на вклейке).

С помощью радиоизотопных методов у индуцированных ИПААП животных было показано увеличение включения L-[1-¹⁴C]-лейцина в микросомные полипептиды, что свидетельствует об их активном *de novo* синтезе. Эффективность включения меченого лейцина у животных, предварительно получавших ИПААП, в 2,5 раза превосходит таковую в контрольной группе животных и в 1,4 раза — животных, которым многократно вводили аминопирин (рис. 3).

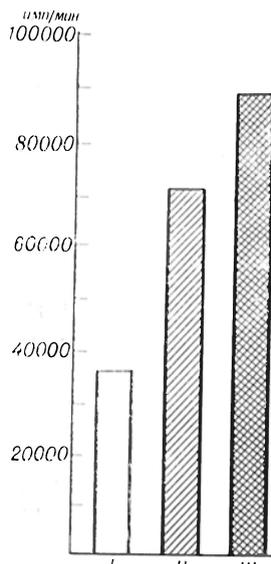


Рис. 3. Эффективность включения меченого ^{14}C -лейцина в микросомы печени крыс. I — контроль, II — индукция аминопирином, III — индукция ИПААИ.

Автофлюорографией пластинок геля после SDS — ПААГ электрофореза микросомных препаратов показано, что увеличение содержания полипептидного мономера с молекулярной массой 51 000 дальтон (рис. 4 см. на вклейке) обусловлено его *de novo* синтезом, а не является результатом замедленной деградации.

Рассмотренные в данной работе свойства и характеристики преиндуцированных ИПААИ микросом позволяют заключить, что блокирование позиции N-деметилирования в молекуле аминопирина переводит этот субстрат монооксигеназы в индуктор этого фермента. Полученные данные наряду с экспериментами с использованием производного амобарбитала — метиламобарбитала [7], подтверждают тезис о возможности перевода типичных субстратов цитохрома P-450 в индукторы путем их направленной химической модификации.

Практически, поскольку ксенобиотики с заблокированной специфичной для P-450 позицией характеризуются слабой биотрансформацией в микросомах и большим временем полужизни в организме, реально использовать пролонгированность действия и индуцирующие свойства таким образом модифицированных ксенобиотиков (в первую очередь лекарственных средств и пестицидов). Пролонгированные тера-

певтические эффекты таких лекарственных препаратов (к примеру, снотворных, успокаивающих и т. д.) могут усиливаться вследствие сопровождающейся индукции монооксигеназных реакций в печеночных клетках, в первую очередь при явлениях холестаза при механических желтухах [15], при слабой активности ферментов биотрансформации в перинатальный период [5], а также при других случаях слабой детоксикационной функции печени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. — М., 1975. — С. 131.
2. Герасимов К. Е., Митрофанов Д. В., Цырлов И. Б. // Фармакол. и токсикол. — 1986. — № 3. — С. 86–89.
3. Ляхович В. В., Цырлов И. Б. Индукция ферментов метаболизма ксенобиотиков. — Новосибирск, 1981.
4. Мишин В. М., Гуткина Н. И. // Вопр. мед. химии. — 1985. — № 2. — С. 68–72.
5. Соради И. Основы и педиатрические аспекты фармакогенетики. — Будапешт, 1984.
6. Хирц Ж. Аналитические методы исследования метаболизма лекарственных веществ: Пер. с франц. — М., 1975.
7. Цырлов И. Б. Индукция ксенобиотиками и особенности функционирования мембраносвязанных монооксигеназ: Автореф. дис. д-ра биол. наук. — JL, 1982.
8. Chamberlain J. P. // *Analyt. Biochem.* — 1979. — Vol. 98. — P. 132–135.
9. *Chemical Abstracts.* // 1955. — P. 2521.
10. Conney A. H. // *Pharmacol. Rev.* — 1967. — Vol. 19. — P. 317–366.
11. La Du B. N., Mandel H. G., War E. L. // *Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition.* — Baltimore, 1971. — P. 37–54.
12. Pickett C. B., Jeter R. Z., Morin J., Lu A. Y. H. // *J. biol. Chem.* — 1981. — Vol. 256. — P. 8815–8820.
13. Smuckler E. A., Arrhenius E., Hullin T. // *Biochem. J.* — 1967. — Vol. 103. — P. 55–64.
14. Thomas P. E., Reik I. M., Ryan D. E., Lewin W. // *J. biol. Chem.* — 1981. — Vol. 256. — P. 1044–1052.
15. Tsyrllov I. B., Polyakova N. E., Gromova O. A. et al. // *Biochem. Pharmacol.* — 1979. — Vol. 28. — P. 1473–1478.
16. Tsyrllov I. B., Zakharova N. E., Gromova O. A., Lyakhovich V. V. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1976. — Vol. 421. — P. 44–56.

Поступила 27.11.85

INDUCTION OF MICROSOMAL MONOOXYGENASES BY MEANS OF AMINOPYRINE ISOPROPYL DERIVATIVES

K. E. Gerasimov, I. B. Tsyrllov

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

As shown in experiments with phenobarbital and chlorine isomers of naphthalene and biphenyl, the monooxygenase inducers of "phenobar-

bital" series caused their effect as unchanged molecules. Basing on this fact typical substrate of cytochrome P-450 aminopyrine was transformed into inductor of the enzyme biosynthesis by means of specific chemical modification of $-N(CH_3)_2$ -group in the substrate molecule, which is N-demethylated in the enzyme active site.

Effects of 4-isopropyl aminoantipyrine on the liver cell monoxygenase systems were studied. Synthesis of microsomal cytochrome P-450 was activated in liver tissue of rats, treated with 4-isopropyl aminoantipyrine, which was accompanied by simultaneous increase in the enzyme monoxygenase activity.

УДК 616.151.514-07:616.155.25-008.939.633.2

Т. Б. Мареева, Я. М. Соковнина, И. И. Вотрин

ЗНАЧЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ АДЕНИННУКЛЕОТИДОВ В ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ ГЕМОФИЛИИ А

НИИ медицинской энзимологии АМН СССР, Москва

Тромбоциты человека играют фундаментальную роль в гемостазе и поддержании сосудистой целостности. Современное представление о тромбообразовании базируется на участии в этом процессе целого ряда веществ: простагландинов, тромбоксанов, цАМФ, Ca^{++} , ферментов. Определенное место в этом процессе занимают адениловые нуклеотиды. Они играют важную роль в энергетическом обеспечении этапов гемостаза — агрегации, реакции высвобождения, ретракции кровяного сгустка, а также служат регуляторными факторами межклеточного обмена. Для полного понимания роли адениннуклеотидов в механизме нарушений требуется точная информация об их концентрации в различных отделах тромбоцитов.

Согласно данным литературы, адениннуклеотиды, содержание которых в тромбоцитах достигает 80—87 % от общего количества пуриновых и пиримидиновых производных, представлены несколькими «пулами», отличающимися по своей функции и находящимися в

разных органеллах тромбоцитов (рис. 1) [5, 14, 15]. Значительные количества АТФ и АДФ содержатся в плотных гранулах и не участвуют в метаболических процессах, освобождаются клеткой вместе с другими компонентами гранул. Это так называемый пул хранения, играющий важную роль в агрегации тромбоцитов. В цитоплазме, митохондриях, мембране адениннуклеотиды представлены так называемым метаболическим пулом, обеспечивающим энергетические реакции клетки и частично утилизирующимся в процессе реакции высвобождения. В этом пуле около 50 % АДФ плотно связано с F-актином. О метаболизме этой связанной АДФ известно очень мало [4]. Следует отметить, что при инкубации тромбоцитов с радиоактивными предшественниками — $[8-^{14}C]$ -аденином, $[8-^{14}C]$ -аденозином, $[^{32}P]$ -ортофосфатом — «метка» включается только в метаболический пул. Плотные гранулы «метку» не включают и содержание в них адениннуклеотидов может быть определено лишь химическими метода-

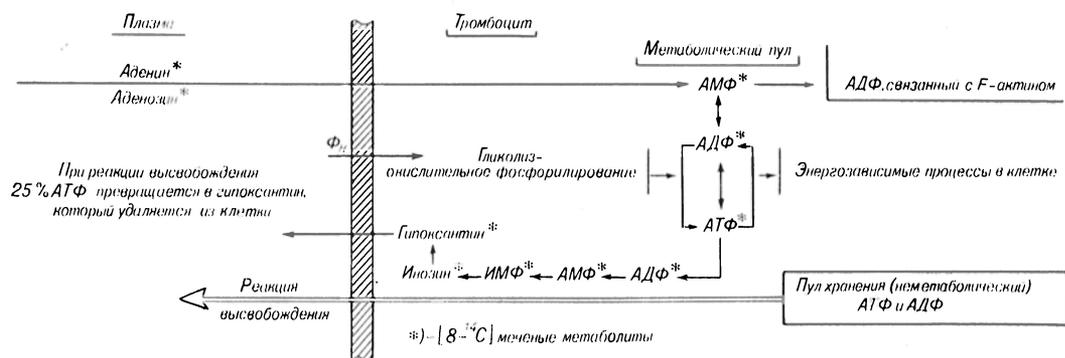


Рис. 1. Распределение адениннуклеотидов тромбоцитов крови.

ми. На этом принципе и основано определение АТФ и АДФ в различных отделах тромбоцитов.

В настоящее время описана гетерогенная группа заболеваний, объединенная общим названием «синдром дефекта пула хранения», диагностическим признаком которого является недостаточность плотных гранул и их компонентов [9, 12, 6]. Среди этих заболеваний такие различные по своей природе, как альбинизм [7], синдром Херманского — Пудлака [17], синдром Чеднака — Хигаси [2], синдром Вискотта — Олдрича [1] и др. Снижение внутриклеточного содержания адениннуклеотидов в тромбоцитах отмечалось также у больных лейкоемией (при хроническом гранулоцитарном лейкозе, остром лейкозе), ряде миелопролиферативных заболеваний — полицитемии, тромбоцитемии, миелофиброзе [6, 10, 11, 13, 14].

Настоящая работа посвящена исследованию уровня адениннуклеотидов с целью выявления возможных механизмов дисфункции тромбоцитов при гемофилии А.

Методика

Адениннуклеотиды определяли в тромбоцитах доноров и больных гемофилией А. В качестве антикоагулянта использовали 3,8 % раствор цитрата натрия в соотношении 1:9. Плазму, обогащенную тромбоцитами, получали центрифугированием при 250 g в течение 30 мин при 4 °С. Количество тромбоцитов подсчитывали под световым микроскопом. На рис. 2 представлены методы экстракции и определения адениннуклеотидов в различных от-

делах тромбоцитов. При исследовании общего количества адениннуклеотидов использовали суспензию тромбоцитов, отмытых от белков плазмы раствором, содержащим: 0,13 M NaCl, 0,02 M Трис-HCl, 0,003 M ЭДТА, 0,015 M глюкозу, pH 7,4 (система 1). Кислоторастворимые экстракты адениннуклеотидов готовили как описано [5, 15]), используя 6,6 HClO₄, с последующей нейтрализацией 2M K₂CO₃, охлаждали и осадок перхлората калия удаляли центрифугированием при 12 000 g в течение 10 мин при 4 °С. В полученном после центрифугирования нейтрализованном экстракте определяли АТФ и АДФ на люминиметре — 1250 LKB — Wallac биоломинесцентным методом, используя люциферин-люциферазный коммерческий реагент фирмы «LKB». Количество АДФ измеряли после предварительного фосфорилирования пируваткиназой (ПК) в присутствии фосфоэнолпирувата (ФЭП) [8], используя препараты фирмы «Boehringer». Биоломинесцентный метод определения АТФ и АДФ прост, удобен, чувствителен и позволяет определять 10⁻¹¹ M АТФ.

Для определения АТФ и АДФ в пуле хранения тромбоцитов проводили реакцию высвобождения в течение 5 мин при 37 °С в присутствии 5 МЕ/мл тромбина. При реакции высвобождения происходит выделение АТФ и АДФ из плотных гранул, а также серотонина и кальция. По окончании реакции высвобождения вносили охлажденный 77 mM ЭДТА pH 7,4 и центрифугировали при 1700 g в течение 10 мин. К 1 объему полученного экстракта добавляли 1 объем 96 % спирта и в надосадочной жидкости, полученной после центрифугирования, определяли уровень АТФ и АДФ биоломинесцентным методом, как описано выше и указано на рис. 2.

Интенсивность включения радиоактивных предшественников в адениннуклеотиды метаболического отдела измеряли после инкубации тромбоплазмы с ¹⁴C-аденином (0,2 мкКи на 1 мл) в течение 2 ч при 37 °С [3]. По окончании инкубации пробы центрифугировали при 1700 g в течение 10 мин при 4 °С. Полученный осадок отмывали от «метки» 2 раза, используя систему 1, и затем проводили экстракцию

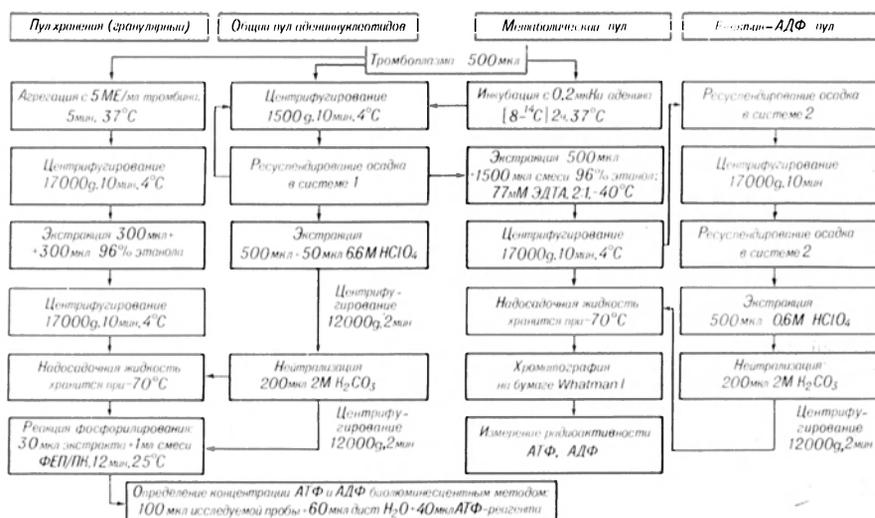


Рис. 2. Экстракция и определение адениннуклеотидов в различных пулах тромбоцитов.

охлажденной до -40°C смесью ЭДТА/этанол (1 объем 77 мМ ЭДТА рН 7,4+9 объемов 96 % этанола).

Полученный экстракт хранили при -70°C до определения в нем адениннуклеотидов. Осадок, полученный после центрифугирования экстракта, промывали дважды раствором, содержащим 0,15 М NaCl и 77 мМ ЭДТА, рН 7,4; этанол 96 % (1 : 9) в соотношении 1 : 1 (система 2), затем экстрагировали 0,6 М HClO_4 (5), центрифугировали при 1200 г в течение 2 мин и в нейтрализованном экстракте определяли Г-актин-АДФ [4]. АДФ, связанный с Г-актином в форме полимера, недоступен для элиминации. Радиоактивность адениннуклеотидов (АДФ и АТФ) определяли после разделения смеси методом хроматографии на бумаге Whatman № 1 в системе растворителей n-бутанол : ацетон : ацетон : уксусная кислота : NH_3 (25 %) : H_2O в отношении 45 : 15 : 10 : 2 : 28.

Содержание адениннуклеотидов рассчитывали в пикомолях на 10^9 тромбоцитов. Общую радиоактивность выражали в импульсах в 1 мин на 10^9 тромбоцитов. Удельную радиоактивность адениннуклеотидов выражали в импульсах в 1 мин на 1 нмоль соответствующего нуклеотида по формуле, описанной в работе [10].

$$\text{удельная радиоактивность АДФ} = \frac{\text{АДФ имп/мин}/10^9 \text{ тромб}}{\text{АДФ нмоль}/10^9 \text{ тромб}} \text{ (общее содержание).}$$

Результаты и обсуждение

Определение адениннуклеотидов в различных пулах тромбоцитов позволяет судить о значимости каждого из них для нормальной функции тромбообразования.

Полученные нами данные определения адениннуклеотидов тромбоцитов доноров и больных гемофилией А суммированы в табл. 1 и 2. Уровень адениннуклеотидов доноров соответствует данным литературы [10, 14]. Необходи-

мо подчеркнуть, что при определении содержания дифосфонуклеотидов и трифосфонуклеотидов в тромбоцитах и их органеллах все процедуры их выделения, хранения, хроматографического разделения проводили параллельно с коммерческими препаратами АТФ и АДФ, чтобы нивелировать возможные ошибки.

При исследовании общего количества адениннуклеотидов выявлены изменения содержания АТФ и АДФ тромбоцитов больных гемофилией А (см. табл. 2). Наблюдается снижение уровня АТФ и АДФ при соотношении АТФ/АДФ, равном 2,4, в сравнении с нормой 1,8.

При изучении адениннуклеотидов в гранулах хранения отмечено значительное уменьшение (в 2,4 раза) уровня АДФ у больных гемофилией при незначительном изменении содержания АТФ. При сравнении величина соотношения АТФ/АДФ у больных гемофилией в пуле хранения заметно увеличена и равна в среднем $1,5 \pm 0,2$ в сравнении с нормой $0,7 \pm 0,03$, что связано в большей степени со снижением уровня АДФ в гранулах хранения. Значительное снижение содержания АДФ и увеличение соотношения АТФ/АДФ в пуле хранения могут быть информативным показателем, указывающим на нарушение в уровне адениннуклеотидов, по-видимому, сопровождаемое патологическими изменениями функциональной активности тромбоцитов. Следует подчеркнуть, что низкий уровень АДФ в пуле хранения не коррелирует с содержанием АТФ, но коррелирует с недостаточностью Ca^{++} [9]. Весьма вероятно, что интенсив-

Таблица 1

Адениннуклеотиды тромбоцитов доноров

Показатель	АТФ	АДФ	АТФ/АДФ
Общий пул, нмоль/ 10^9 клеток	$51,4 \pm 4,2$ (10)	$28,4 \pm 2,5$ (10)	$1,8 \pm 0,1$ (11)
Пул хранения, нмоль/ 10^9 клеток	$11,8 \pm 0,6$ (11)	$15,6 \pm 1,1$ (12)	$0,7 \pm 0,0$ (12)
Метаболический пул, или интенсивность включения $[8-^{14}\text{C}]$ — аденина, имп/мин/ 10^9 клеток	$5070,0 \pm 544,9$ (11)	$834,2 \pm 82,4$ (11)	$6,1 \pm 0,3$ (11)
Г-актин АДФ, имп/мин/ 10^9 клеток	—	$455,4 \pm 54,4$ (9)	—
Удельная радиоактивность, имп/мин/нмоль	$112,8 \pm 13,7$ (11)	$32,3 \pm 4,4$ (11)	—

Примечание. В скобках — число больных.

Адениннуклеогиды тромбоцитов крови больных гемофилией А

Показатель	АТФ	АДФ	АТФ/АДФ
Общий пул, нмоль/10 ⁹ клеток	41,7±3,7 (10)	17,3±1,2 (10)	2,4±0,1 (10)
Пул хранения, нмоль/10 ⁹ клеток	8,6±0,9 (10)	6,6±1,1 (10)	1,5±0,2 (10)
Метаболический пул, или интенсивность включения [8- ¹⁴ C]-аденина, имп/мин/10 ⁹ клеток	5321,0±712,1 (6)	916,3±148,2 (6)	6,0±0,4 (6)
F-актин АДФ, имп/мин/10 ⁹ клеток	—	468,1±61,1 (6)	—
Удельная радиоактивность, имп/мин/нмоль	168,8±27,3 (8)	63,6±1,2 (8)	—

Примечание. В скобках — число больных.

ность синтеза АТФ и АДФ в гранулах тромбоцитов различна.

При радиохимическом исследовании адениннуклеотидов метаболического пула не выявлено отклонений у больных гемофилией по сравнению с нормой. Соотношение АТФ/АДФ у доноров и больных гемофилией было примерно одинаковым и составляло соответственно $6,1 \pm 0,3$ и $6,0 \pm 0,4$, т. е. содержание АТФ и АДФ постоянно и поддерживается за счет гликолиза и окислительного фосфорилирования.

Наблюдается отчетливое увеличение удельной радиоактивности АТФ и АДФ у больных гемофилией, отражающее дефицит адениннуклеотидов в гранулах хранения.

Сравнительное изучение АДФ — F-актина продемонстрировало включение радиоактивной «метки», как и в случае других адениннуклеотидов метаболического пула. Из представленных в табл. 1 и 2 данных видно, что около 50 % радиоактивности от общего количества включения «метки» в АДФ обнаружено в АДФ — F-актине в тромбоцитах как доноров, так и больных гемофилией.

Таким образом, в результате исследований получена новая дополнительная информация об изменениях в содержании АТФ и АДФ в гранулах хранения тромбоцитов больных гемофилией и отсутствии отклонений в метаболическом отделе. Данные исследований позволяют прийти к выводу о биохимическом дефекте адениннуклеотидов в пуле хранения больных гемофилией А и возможности использования определения АДФ и АТФ в гранулах хранения и их удельной радиоактивности в

качестве показателей дисфункции тромбоцитов.

Наши экспериментальные данные об уменьшении адениннуклеотидов тромбоцитов при гемофилии А подтверждают мнение ряда исследователей [16] о дефекте гранул хранения на уровне мегакариоцитов, поскольку адениннуклеотиды, находящиеся в плотных гранулах тромбоцитов, не синтезируются и не вступают в реакции обмена с адениннуклеотидами, участвующими в метаболических процессах. Следовательно, изменения в уровне адениннуклеотидов отражают первоначальные нарушения в структуре и развитии мегакариоцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Baldine M. G. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1972. — Vol. 201. — P. 437.
2. Boxer G. J., Holmsen H., Robkin C. et al. // Brit. J. Haemat. — 1977. — Vol. 35. — P. 521—533.
3. Cowan D. H., Graham R. G., Baunach D. // J. clin. Invest. — 1975. — Vol. 56. — P. 188—200.
4. Daniel J. L., Robkin L., Molish J. R., Holmsen H. // J. biol. Chem. — 1979. — Vol. 254. — P. 7870—7873.
5. Daniel J. L., Molish J. K., Holmsen J. // Biochem. biophys. Acta. — 1980. — Vol. 632. — P. 444—452.
6. Gerrard J. M., Stoddard S. F., Shapiro R. S. et al. // Brit. J. Haemat. — 1978. — Vol. 40. — P. 597—607.
7. Hardistry R. M., Mills D. C. B., Kotsur Ard K. // Ibid. — 1972. — Vol. 23. — P. 679—689.
8. Holmsen H., Storm E., Day H. J. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1972. — Vol. 46. — P. 489—501.
9. Holmsen H., Weiss H. J. // Ann. Rev. Med. — 1979. — Vol. 30. — P. 119—134.
10. Holmsen H., Weiss H. J. // Blood. — 1972. — Vol. 39. — P. 197—209.

11. Nishimura J. // *Thrombos. Haemost.* — 1979. — Vol. 41. — P. 787—95.
12. Pareli F. J., Day H. J., Mills D. C. B. // *Blood.* — 1974. — Vol. 44. — P. 789—800.
13. Pareli F. J., Gugliotto L. // *Thrombos. Haemost.* — 1982. — Vol. 47. — P. 84—89.
14. Summerfield G. P., Keenan J. P., Brodie N. J., Bellingham A. J. // *Clin. Lab. Haemat.* — 1981. — Vol. 3. — P. 257—271.
15. Ugurbil K., Holmsen H., Shulman R. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.* — 1969. — Vol. 76. — P. 2227—2231.
16. Weiss H. J. // *New Engl. J. Med.* — 1975. — Vol. 293. — P. 580—588.
17. White J. G., Edson J. R., Desnick S. J., Witkop G. J. // *Amer. J. Path.* — 1971. — Vol. 63. — P. 319—330.

Поступила 10.01.86

IMPORTANCE OF ADENINE NUCLEOTIDES FOR FUNCTIONAL ACTIVITY OF THROMBOCYTES IN HEMOPHILIA A

T. B. Mareeva, Ya. M. Sokovnina, I. I. Votrin

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

Content of adenine nucleotides was studied in various pools of thrombocytes from donors and from patients with hemophilia A. Biochemical deficiency of adenine nucleotides appears to occur in the pool of thrombocytes obtained from patients with hemophilia A; estimation of ADP and ATP in the storage granules as well as of the nucleotides specific radioactivity may serve as a criterion of thrombocyte disfunction.

УДК 612.332.4:612.321.5

Т. Ю. Демина

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ДИПЕПТИДАЗ В ТОНКОЙ КИШКЕ КРЫС

Институт питания АМН СССР, Москва

Дипептидазы участвует в заключительных стадиях гидролиза белка. Особый интерес при исследовании дипептидазной активности представляет связь кишечных ферментов с апикальной мембраной энтероцитов.

Работы А. М. Уголева и соавт. показывают, что дипептидазы в основном локализованы на внешней поверхности мембраны [5]. Многими исследователями было отмечено, что дипептидазы легко переходят в промывные растворы. Впервые это было обнаружено при фракционировании клеток слизистой оболочки тонкой кишки крыс [6]. Позднее наблюдали спонтанную солюбилизацию дипептидаз тонкой кишки свиней в экспериментах *in vitro*. Феномен спонтанной солюбилизации дипептидаз тонкой кишки имеет место в опытах не только *in vitro*, но и *in vivo*, однако считают, что в последнем случае его значение в переваривании пептидов невелико. По-видимому, этот процесс наряду с десквамацией кишечных клеток является ответственным за пептидазную активность кишечного содержимого.

В настоящее время внимание исследователей все больше привлекают вопросы, связанные с функционированием ферментов конечных стадий гидролиза вне зоны мембранного пищеварения [2]. Особый интерес представляет вопрос о слизистых наложениях. Под этим термином понимают слой слизи, покрывающий эпителий тонкой кишки

и тесно соприкасающийся с гликокаликсом. Все вещества, транспортируемые из полости кишки в кровь, проходят через слой слизистых наложений и подвергаются воздействию содержащихся в нем ферментов [1].

Целью данной работы явилось сравнение глициллейциновой и аланилаланиновой дипептидазных активностей в различных зонах пищеварения.

Методика

В работе использовали крыс Вистар массой 200—250 г. Животных содержали на общепитательном рационе. Перед забоем крысы голодали в течение 36 ч. Источником ферментов служили химус, слизистые наложения и эпителий тонкой кишки после удаления слизистых наложений. Метод выделения слизистых наложений будет описан в специальной работе. Материал от каждой крысы анализировали отдельно. Активность дипептидаз определяли описанным ранее методом [4]. Исследуемый материал гомогенизировали. 0,2 мл гомогената смешивали с 2 мл 10 мМ раствора дипептида, приготовленного на трис-НСI-буфере, и инкубировали 10 мин при постоянном перемешивании, добавляя 4 мл 96 % этанола и спектрофотометрировали при 220 нм. Активность выражали в микромолях на 1 мл белка в 1 мин. Общий белок в образцах определяли с помощью амидо черного [3]. Для определения дипептидазной активности в качестве субстратов использовали глицил-L-лейцин и D,L- α -аланил-D,L- α -аланин.

Результаты и обсуждение

Из полученных результатов (см. таблицу) следует, что дипептидазная активность слизистых наложений выше

Активность кишечных дипептидаз в различных участках тонкой кишки крыс (в мкмоль на 1 мг белка в 1 мин)

Дипептидаза	Субстрат	Материал	Проксимальный отдел	Дистальный отдел
Глициллейциновая	Глицил-L-лейцин	Гомогенат эпителия	3,29±0,40 (4)	4,06±0,66 (3)
		Слизистые наложения	5,11±1,20 (4)	5,62±1,54 (5)
Аланилаланиновая	D,L-аланил-D, L-α-аланин	Промывные воды тонкой кишки	—	4,20±1,78 (4)
		Гомогенат эпителия	1,73±0,47 (5)	3,52±1,21 (4)
		Слизистые наложения	5,08±1,28 (5)	3,52±0,72 (5)
		Промывные воды тонкой кишки	—	9,35±2,41 (4)

Примечание. В скобках — число животных.

активности гомогената эпителия стенки кишки. При этом необходимо учитывать, что слизистые наложения отделялись от поверхности эпителия неполностью. Некоторая часть слизистых наложений оставалась связанной с эпителием и попадала в исследуемый гомогенат. Эти данные подтверждались морфологическим контролем до и после снятия слизистых наложений.

Глициллейциновая дипептидазная активность гомогената эпителия проксимального отдела тонкой кишки ниже дипептидазной активности слизистых наложений проксимального отдела тонкой кишки на 35,6 %. Глициллейциновая дипептидазная активность гомогената эпителия дистального отдела тонкой кишки на 67,8 % ниже дипептидазной активности слизистых наложений этого отдела. Аланилаланиновая дипептидазная активность гомогената эпителия проксимального отдела тонкой кишки на 66 % ниже дипептидазной активности слизистых наложений проксимального отдела тонкой кишки.

Суммарная дипептидазная активность слизистых наложений проксимального отдела тонкой кишки на 50,8 % выше дипептидазной активности гомогената эпителия. Суммарная дипептидазная активность слизистых наложений дистального отдела тонкой кишки на 17 % выше дипептидазной активности гомогената эпителия того же отдела.

Суммарная дипептидазная активность промывных вод была выше дипептидазной активности слизистых наложений и гомогената эпителия. Например, активность дипептидаз в промывных водах дистального отдела была выше активности слизистых наложений этого отдела на 32,5 % и гомогената эпителия — на 44 %. Для объ-

яснения этих данных можно сделать несколько предположений. Дипептидазы солюбилизировали 0,9 % физиологическим раствором, введенным в просвет кишки, в связи с чем начальный этап гидролиза мог достаточно интенсивно проходить за пределами слизистых наложений, т. е. в химусе, а затем продолжаться в слизистых наложениях и на мембранах энтероцитов.

Возможно также, что при промывании кишечника физиологическим раствором происходят частичное разрушение слизистых наложений и переход их в раствор, введенный в просвет кишки, вместе с дипептидазами.

Кроме того, не исключено, что ферментативная активность наиболее высока на границе химуса и слизистых наложений, в связи с чем при промывании кишки происходит активная солюбилизация дипептидаз в промывные воды.

Из проведенного опыта можно сделать следующие выводы: дипептидазы, синтезируемые клетками кишечного эпителия, секретируются в слизистые наложения, а отсюда переходят в просвет кишки, где и начинаются первые этапы кишечного гидролиза, который затем более интенсивно происходит в слизистых наложениях тонкой кишки.

Изучение дипептидазной активности слизистых наложений может иметь большое значение для диагностики и изучения заболеваний, связанных с нарушением расщепления белка в желудочно-кишечном тракте, например при врожденных или приобретенных энзимопатиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бандурко Л. Н., Бродский Р. А., Гальперин Ю. М., Лазарев П. И. // Бюл. экспер. биол. — 1982. № 2. — С. 160—163.

2. Гальперин Ю. М., Лазарев П. И. // Журн. общ. биол. — 1985. — Т. 46. — С. 160—163.
3. Дэвени Т., Гергей Я. Амнокислоты, пептиды и белки: Пер. с англ. — М., 1976.
4. Тарвид И. Л., Кушак Р. И. // Лаб. дело. — 1983. — № 5. — С. 57—59.
5. Уголев А. М. Мембранное пищеварение. — Л., 1972.
6. Robinson G. B. // Biochem. J. — 1963. — Vol. 88. — P. 162—168.

Поступила 13.09.85

LOCALIZATION OF DIPEPTIDASES IN RAT SMALL INTESTINE

T. Yu. Demina

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

GlyLeu- and AlaAla-dipeptidase activities were studied in various zones of digestion: in mucosal deposit of small intestine, in epithelium of homogenate free of mucosal deposit and in washing water of small intestine. The highest rate of the dipeptidase activity was found in washing water of small intestine; at the same time, the activity in mucosal deposit exceeded

its level in homogenate of small intestine epithelium. The dipeptidase, which are synthesized in small intestine epithelial cells, are apparently accumulated in mucosal deposit and then diffused into intestinal lumen, where the first steps of intestinal digestion occurred, while the most effective intestinal digestion proceeded in mucosal deposit.

УДК 612.397.2:577.112.856

А. Н. Климов, Н. П. Терюкова, Л. И. Поликарпова, Д. В. Иоффе,
Н. М. Калашникова, А. В. Попов, А. Г. Виноградов, В. Т. Лозовский

О КАТАБОЛИЗМЕ НАТИВНЫХ И МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЛИПОПРОТЕИДОВ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ В ОРГАНИЗМЕ КРОЛИКА

Отдел биохимии НИИ экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

Установлено, что катаболизм липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) совершается в большей степени в паренхиматозных клетках печени и в меньшей — в эпителиальных клетках тонкой кишки [26]. Однако неясно, каким путем совершается захват ЛПВП этими клетками: с помощью рецептор-опосредуемого или неспецифического эндоцитоза. Имеющиеся литературные данные по этому вопросу противоречивы. Паренхиматозные клетки печени имеют рецепторы к апропротеинам (апо) В и Е липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), очень низкой плотности (ЛПОНП), β -ЛПОНП, ЛПВП₁ и ЛПВП_{хс} [11, 27], получившие название апо В,Е-рецепторов. Гепатоциты человека, обезьяны, собаки и свиньи, помимо апо В,Е-рецепторов, содержат также независимые апо Е-рецепторы, способные связывать ЛПВП_{хс}, ремнантные частицы хиломикрон и подфракции ЛПВП, обогащенные апо Е [3]. Найдено, что в составе апо В и апо Е содержится большое количество несущих положительный заряд аргининовых и лизиновых остатков, усиливающих сродство этих полипептидов к апо В,Е-рецепторам фибробластов, заряженным отри-

цательно [14]. Показано, что ЛПВП крысы взаимодействуют с клетками печени посредством специфических рецепторов, тогда как ЛПВП человека захватываются путем неспецифического эндоцитоза [17, 27]. Одной из причин этого различия может быть наличие высокого содержания апо Е в ЛПВП крысы, который конкурирует с апо В ЛПНП за специфические рецепторы. Кроме того, найдено, что апропротеины ЛПВП₃, в частности апо А-1, содержащие тирозин, ответственны за взаимодействие с рецепторами фибробластов кожи человека [4]. Вместе с тем известно, что мембраны клеток печени от лиц с семейной гомозиготной гиперхолестеринемией, не содержащие апо В,Е-рецепторы, способны связывать человеческий апо А-1 ЛПВП, выделенных из плазмы крови, лишенной апо Е [9]. Наряду с этим обнаружено, что человеческие ЛПВП₃ с блокированными аргининовыми и лизиновыми остатками, антитела к апо А-1 и апо А-11 человека так же, как и человеческие нативные ЛПВП₃ (с дефицитом апо Е), конкурируют с апо А-1 за специфические места связывания на мембранах клеток печени, тогда как ЛПНП, ЛПВП₃ с блокированными ти-

розновыми остатками и антитела к апо В не препятствуют связыванию апо А-I этими же рецепторами [9]. Кроме того, рецепторы ЛПВП на фибробластах кожи человека связывают апо А-I, апо А-II и апо С-III в большей степени, чем апо В и апо Е [23].

Задачей данного исследования являлось изучение скорости элиминации внутривенно введенных гомологичных (нативных и модифицированных) и гетерологичных ЛПВП из плазмы крови здоровых кроликов, распределения радиоактивной метки в ряде органов кролика после внутривенного введения ему гомологичных (нативных и модифицированных) ^{125}I -ЛПВП и захвата кроличьих ^{125}I -ЛПВП (нативных и модифицированных) мышинными перитонеальными макрофагами *in vitro*. Решение этой задачи позволило бы выяснить, связан ли катаболизм ЛПВП с участием специфических рецепторов к апо этих липопротеидов у кроликов, наиболее часто используемых в качестве модели для изучения экспериментального атеросклероза.

Показано [14], что блокирование положительно заряженных гуанидиновых групп аргинина и ϵ -аминогрупп лизина ЛПНП, повышая отрицательный заряд липопротеидной частицы, устраняет ее взаимодействие с апо В, Е-рецепторами фибробластов. С другой стороны, блокирование СООН-групп-ЛПНП увеличивает положительный заряд частиц и повышает их способность связываться этими же рецепторами фибробластов [2]. С учетом этих данных в наших исследованиях в качестве модифицированных ЛПВП были использованы метилированные ЛПВП с олокированными ϵ -аминогруппами лизина и ЛПВП с блокированными тирозиновыми группами без изменения их заряда, ЛПВП с блокированными гуанидиновыми группами и сукцинилированные ЛПВП с блокированными ϵ -аминогруппами лизина с увеличенным отрицательным зарядом, а также ЛПВП с блокированными СООН-группами, т. е. повышенным положительным зарядом.

Методика

Опыты были проведены на здоровых кроликах-самцах породы шиншилла массой тела около 3 кг. Изучали скорость элиминации нативных человеческих, лошадиных, собачьих, крысиных и кроличьих (нативных и модифицированных) ^{125}I -ЛПВП из плазмы крови

кролика, а также распределение кроличьих (нативных и модифицированных) ^{125}I -ЛПВП в печени, почках, надпочечниках, селезенке, тонкой кишке и лимфатических узлах после их внутривенного введения. Кроме того, проведены исследования по изучению захвата кроличьих нативных и модифицированных ^{125}I -ЛПВП мышинными перитонеальными макрофагами *in vitro*.

Выделение ЛПВП и их подклассов производили из плазмы крови здорового донора, лошади, собаки, кролика и крысы. ЛПВП выделяли из плазмы после предварительного осаждения ЛПНП и ЛПОНП по методу [6]. Последующее выделение общей фракции ЛПВП производили при центрифугировании в ультрацентрифуге «Spinco 2-65 В» при 17°C (d 1,21), 45 000 об/мин в течение 24 ч. Верхний слой ЛПВП отделяли, диализовали 20 ч против 0,15 М NaCl, содержащего 0,01 % ЭДТА, при 5°C . Чистоту фракции контролировали с помощью дискового электрофореза в полиакриламидном геле [11]. Подклассы ЛПВП₂ и ЛПВП₃ из плазмы крови выделяли последовательным ультрацентрифугированием (d 1,125 и 1,21 соответственно) после предварительного удаления ЛПНП и ЛПОНП, как описано выше.

Блокирование лизиновых остатков ЛПВП производили путем метилирования натрий-боргидридом и формальдегидом [25], обработку аргининовых остатков ЛПВП — бутадином [13], тирозиновых остатков — тетрагидрометаном [18], СООН-групп — N,N-диметил-1,31-пропандиамином (ДПДА) [2], сукцинилирование ЛПВП — янтарным ангидридом [19].

Мечение радиоактивным йодом (^{125}I) осуществляли монойодхлоридным методом [8]. Определение радиоактивности ЛПВП производили в γ -сосудах фирмы «Koch-Light» (Англия) на сцинтилляционном счетчике «Uniflux-III» фирмы, «Nuclear-Chicago» (США). 95 % меченых ЛПВП осаждалось 10 % трихлоруксусной кислотой, т. е. радиоактивность была связана преимущественно с белковым компонентом ЛПВП. Содержание белка во фракции ЛПВП определяли по методу Лоури [12].

^{125}I -ЛПВП вводили внутривенно в дозе 2,0—2,5 мг (по белку) с удельной радиоактивностью $(2,0\text{—}4,0) \cdot 10^7$ имп на 1 мг белка в 1 мин. Кровь брали из краевой вены противоложного уха через 5 мин, 4, 8 и 24 ч после введения ЛПВП. О содержании ЛПВП в плазме крови судили по величине ^{125}I -радиоактивности меченых ЛПВП. Скорость фракционного катаболизма (СФК) ЛПВП рассчитывали по методу, приведенному ранее [16], и выражали количеством элиминированных ЛПВП к введенной дозе (принятой за 1,0) за сутки. Все представленные величины СФК отражают средние данные по материалам 4—5 опытов.

Изучение распределения радиоактивной метки в органах кролика производили через 1 ч после внутривенного введения им нативных и сукцинилированных ^{125}I -ЛПВП. Животных умерщвляли воздушной эмболией и выделяли печень, почки, надпочечники, селезенку, лимфатические узлы и тонкую кишку. Органы освобождали от соединительной и жировой ткани, удаляли содержимое тонкой кишки. Затем (для удаления крови) с помощью шприца ткани промывали холодным

СФК гомологичных (нативных и модифицированных) и гетерологичных ^{125}I -ЛПВП после внутривенного введения кролику

№ серии опытов	^{125}I -ЛПВП	СФК, сут $^{-1}$	P
<i>Гомологичные ЛПВП, общая фракция</i>			
1	Нативные	$0,78 \pm 0,05$	—
2	Сукциниллированные	$2,03 \pm 0,33$	$P_{1,2} < 0,01$
3	Метилированные	$1,02 \pm 0,13$	$P_{1,3} > 0,1$
4	Модифицированные бутандионом	$0,79 \pm 0,08$	$P_{1,4} > 0,8$
5	Модифицированные ДПДА	$0,84 \pm 0,03$	$P_{1,5} > 0,2$
6	Модифицированные тетранитрометаном	$1,57 \pm 0,21$	$P_{1,6} < 0,01$
<i>Гомологичные ЛПВП, подклассы</i>			
7	ЛПВП ₂ нативные	$0,64 \pm 0,03$	$P_{6,7} > 0,5$ $P_{6,8} > 0,3$ $P_{8,9} > 0,2$
8	ЛПВП ₂ , модифицированные бутандионом	$0,67 \pm 0,03$	
9	ЛПВП ₃ нативные	$0,70 \pm 0,05$	
10	ЛПВП ₃ , модифицированные бутандионом	$0,78 \pm 0,03$	
<i>Гетерологичные ЛПВП, общая фракция</i>			
11	ЛПВП человека	$1,03 \pm 0,07$	$P_{1,11} < 0,05$ $P_{1,12} > 0,1$ $P_{1,13} < 0,001$ $P_{1,14} < 0,001$
12	ЛПВП лошади	$0,63 \pm 0,07$	
13	ЛПВП собаки	$1,36 \pm 0,09$	
14	ЛПВП крысы	$2,00 \pm 0,04$	

0,15 М NaCl, содержащим 0,01 % ЭДГА. ^{125}I -радиоактивность выражали в процентах радиоактивности от введенной дозы на 1 г ткани.

Изучение захвата кроличьих нативных и сукциниллированных ^{125}I -ЛПВП мышинными перитонеальными макрофагами было проведено в пластиковых чашках Петри в CO_2 -инкубаторе при 37°C в течение 4 ч. Свежевыделенные макрофаги брали в опыт в количестве 2 млн. клеток на пробу. После трехкратной отмывки макрофагов фосфатным буфером Далбека их заливали средой Игла, содержащей нативные или сукциниллированные ^{125}I -ЛПВП (удельная радиоактивность $5,6\text{--}5,9 \cdot 10^6$ имп на 1 мг белка в 1 мин) в концентрации 50 мкг/мл по белку и 5 мг/мл нелипопротеидных белков сыворотки. Оценку захвата меченых ЛПВП макрофагами проводили по методу, описанному в работе [7]. Представленные величины захвата кроличьих нативных и сукциниллированных ^{125}I -ЛПВП мышинными перитонеальными макрофагами отражают данные 4 опытов.

Результаты

1. Элиминация нативных и модифицированных гомологичных ^{125}I -ЛПВП из плазмы крови кроликов после их внутривенного введения

Как следует из табл. 1, СФК общей фракции всех модифицированных ЛПВП после внутривенного введения здоровому кролику оказалась очень близкой или же была выше таковой для нативных ЛПВП. Следует под-

черкнуть, что только сукциниллированные ЛПВП и ЛПВП с блокированными тирозиновыми остатками удалялись из плазмы крови со скоростью, значительно превышающей скорость элиминации не только нативных, но и всех остальных модифицированных ЛПВП. СФК нативных кроличьих ЛПВП₂ и ЛПВП₃ оказалась близкой. Не обнаружено достоверных различий и между СФК ЛПВП₂ и ЛПВП₃ нативных и с блокированными аргининовыми остатками.

2. Элиминация гомологичных и гетерологичных ^{125}I -ЛПВП из плазмы крови кроликов после их внутривенного введения

Из данных табл. 1 следует также, что СФК общей фракции кроличьих и лошадиных ЛПВП оказалась близкой (соответственно 0,78 и 0,63 в сутки; различие статистически недостоверно) и несколько более высокой для человеческого ЛПВП (1,03 в сутки; $P < 0,05$) и особенно высокой для собачьих и крысиных ЛПВП (соответственно в 1,8 и 2,6 раза выше; $P < 0,001$).

3. Распределение радиоактивности в органах кроликов после внутривенного введения им нативных и сукциниллированных гомологичных ^{125}I -ЛПВП

Распределение радиоактивности (в % от введенной дозы на 1 г ткани) в организме кролика через 1 ч после внутривенного введения гомологичных нативных или сукцинизированных ^{125}I -ЛПВП

Орган	^{125}I -ЛПВП		
	нативные ($n=4$)	сукцинизированные ($n=5$)	P
Почки	$0,061 \pm 0,014$	$0,084 \pm 0,008$	$>0,1$
Надпочечники	$0,057 \pm 0,012$	$0,038 \pm 0,004$	$>0,1$
Печень	$0,028 \pm 0,007$	$0,033 \pm 0,004$	$>0,5$
Селезенка	$0,023 \pm 0,006$	$0,092 \pm 0,014$	$\leq 0,01$
Тонкая кишка	$0,023 \pm 0,006$	$0,017 \pm 0,002$	$>0,3$
Лимфатические узлы	$0,010 \pm 0,002$	$0,21 \pm 0,001$	$\leq 0,01$

В табл. 2 представлено распределение радиоактивности в тканях через 1 ч после внутривенного введения кролику нативных или сукцинизированных гомологичных ^{125}I -ЛПВП. Наибольшая радиоактивность после введения кролику нативных ЛПВП обнаружена в почках и надпочечниках (соответственно 0,061 и 0,057 %), тогда как в печени, селезенке и тонкой кишке этот показатель в 2—2,6 раза ниже. Наиболее низкой в этой серии опытов была радиоактивность в лимфатических узлах (0,010 %).

Иная картина обнаружена после введения кролику сукцинизированных ^{125}I -ЛПВП. Здесь наиболее высокая радиоактивность по сравнению с опытами, в которых использовали нативные ^{125}I -ЛПВП, отмечалась в селезенке и лимфатических узлах (соответственно в 3,9 и 2,1 раза выше). Что касается других органов и тканей, то распределение радиоактивной метки в них после введения йодированных сукцинизированных ЛПВП не подвергалось существенным изменениям.

4. Захват кроличьих нативных и сукцинизированных ^{125}I -ЛПВП мышечными перитонеальными макрофагами *in vitro*

Захват кроличьих нативных ^{125}I -ЛПВП мышечными перитонеальными макрофагами через 4 ч после их инкубации был равен $0,33 \pm 0,01$ нг белка на 1 мкг белка клеток макрофагов в 1 мин. Интенсивность захвата кроличьих сукцинизированных ^{125}I -ЛПВП при этих же условиях инкубации была выше в 1,5 раза ($P < 0,001$) и составила $0,51 \pm 0,02$ нг белка на 1 мкг клеточного белка в 1 мин.

Обсуждение

Полученные результаты показали, что после внутривенного введения кро-

лику гетерологичных ЛПВП только лошадиные ЛП элиминировались со скоростью, близкой к скорости элиминации гомологичных ЛПВП. Все остальные гетерологичные ЛПВП — человеческие, собачьи и особенно крысиные — элиминировались из кровотока значительно быстрее гомологичных.

Сравнительное изучение элиминации из крови кроликов нативных и химически модифицированных гомологичных ЛПВП после их внутривенного введения показало, что сукцинизированные ЛПВП и ЛПВП с блокированными тирозиновыми остатками выводились из кровяного русла значительно быстрее нативных ЛП. Важно при этом отметить, что сукцинизированные ЛПВП, обладающие увеличенным отрицательным зарядом, показали наиболее высокую СФК. Что касается ЛПВП с блокированными тирозиновыми остатками, то эти аминокислотные остатки апо, как отмечалось выше, участвуют во взаимодействии ЛПВП с рецепторами фибробластов кожи человека [4]. С этой точки зрения, блокирование тирозиновых остатков ЛПВП должно замедлить скорость их элиминации из кровотока. Однако, как показали результаты настоящего исследования, этого не произошло в условиях целостного организма кролика. Скорость элиминации других модифицированных гомологичных ЛПВП — метилированных, с блокированными СООН-группами и блокированными аргининовыми остатками достоверно не отличались от скорости элиминации нативных гомологичных ЛПВП. Ранее на культуре гепатоцитов было показано, что кроличьи ЛПВП₂ с блокированными аргининовыми остатками захватываются гепатоцитами кролика в меньшей степени, чем нативные ЛПВП₂ [22]. И здесь, следовательно, блокиро-

вание аргининовых остатков должно привести к замедлению элиминации ЛПВП из кровотока. Однако, как следует из результатов наших исследований, подобный эффект не был обнаружен в опытах *in vivo*.

В связи с изложенным следует отметить также исследования, отрицающие роль апо ЛПВП в их взаимодействии с клеткой. Так, было обнаружено [23], что фибробласты кожи, эндотелиальные и гладкомышечные клетки связывают человеческие ЛПВП₃, обработанные трипсином, даже более интенсивно, чем нативные ЛП. В этой же работе было найдено, что липидные везикулы, не содержащие белка, также связывают ЛПВП₃. По мнению авторов, во взаимодействии ЛПВП₃ с указанными типами клеток специфические рецепторные белки не принимают никакого участия. Связывание же ЛПВП₃ совершается с липидами, находящимися на поверхности этих клеток.

Результаты настоящего исследования показали также, что радиоактивная метка, введенная в ЛПВП, распределяется в равной степени в почках, надпочечниках, печени и тонкой кишке после введения кролику как нативных, так и сукцинизированных ¹²⁵I-ЛПВП. Однако интенсивность накопления радиоактивности после введения сукцинизированных ¹²⁵I-ЛПВП в отличие от нативных ¹²⁵I-ЛПВП в органах ретикулоэндотелиальной системы (РЭС) (селезенке и лимфатических узлах) оказалась в несколько раз выше.

При инкубации кроличьих нативных и сукцинизированных ЛПВП с перитонеальными макрофагами мыши последние захватывали сукцинизированные ЛПВП в 1,5 раза интенсивнее, чем нативные ЛПВП. Ранее также было показано, что химически модифицированные ЛПВП (ацетиленные, ацетоацетиленные или обработанные малоновым диальдегидом) с увеличенным отрицательным зарядом в 20 раз интенсивнее катаболизируются макрофагами, чем нативные ЛПВП [10]. Кроме того, непаренхиматозные клетки печени крысы активнее захватывают и деградируют ацетиленные ЛПВП по сравнению с нативными ЛПВП [24]. Согласно исследованиям Брауна и Гольдштейна [5], проведенным в опытах *in vitro*, нативные и ацетиленные ЛПВП захватываются

разными рецепторами макрофагов, причем захват и катаболизм последних протекают более интенсивно. Эти факты позволяют предположить, что различия в скорости катаболизма ЛП, нативных и модифицированных химическим путем, обусловлены неодинаковой активностью рецепторов клеток РЭС. На основании результатов настоящего исследования и литературных данных можно сделать заключение, что более быстрая элиминация введенных внутривенно кролику гомологичных сукцинизированных ЛПВП обусловлена их захватом клетками РЭС и, можно полагать, деградацией в этих клетках. По-видимому, высокая СФК кроличьих ЛПВП с заблокированными тирозиновыми остатками после их введения кролику также обусловлена более активным захватом этих ЛП клетками РЭС.

Согласно литературным данным, элиминация модифицированных ЛПВП из кровотока человека, обезьяны, кролика и крысы происходит медленнее, чем элиминация нативных ЛПВП [15, 20, 21]. На основании таких опытов можно сделать заключение, что у человека и этих животных большая часть ЛПВП катаболизируется при участии рецептор-опосредуемого пути захвата ЛПВП клетками паренхиматозного и соединительнотканного типа и меньшая часть — при участии неспецифического пути захвата клетками макрофагального типа. В наших опытах, как отмечалось, модифицированные ЛПВП удалялись из тока крови не медленнее, а быстрее, чем нативные. На основании этого можно сделать заключение, что у кролика большая часть, если не все ЛПВП, катаболизируется без участия специфических клеточных рецепторов. В пользу этого свидетельствуют и данные Слэйтер и соавт. [21], которые показали, что холестерин, активирующий синтез рецепторов ЛПВП в печени, вызывает у кролика снижение содержания холестерина в плазме крови лишь за счет уменьшения холестерина ЛПВП без изменения концентрации холестерина ЛПВП.

И, наконец, более высокая скорость элиминации из кровотока кролика почти всех исследованных гетерологичных ЛПВП свидетельствует о том, что судьба последних также связана с активностью клеток РЭС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Маграчева Е. Я. // Вopr. мед. химии. — 1973. — № 6. — С. 652—655.
2. Basu S. K., Goldstein J. L., Anderson R. G., Brown M. S. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1976. — Vol. 73. — P. 3178—3182.
3. Bersol T. P., Mahley R. W. // Atherosclerosis: Mechanisms and Approaches to Therapy / Ed. N. E. Miller. — New York, 1983. — P. 143—152.
4. Brinton E. A., Oram J. F., Chen C. H. et al. // Arteriosclerosis. — 1983. — Vol. 3. — P. 497.
5. Brown M. S., Goldstein J. L. // Ann. Rev. Biochem. — 1983. — Vol. 52. — P. 223—261.
6. Bursvein M., Scholnick N. R., Morfin R. // J. Lipid Res. — 1970. — Vol. 11. — P. 583—595.
7. Goldstein J. L., Ho Y. K., Basu S. K., Brown M. S. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1979. — Vol. 76. — P. 333—337.
8. Helmkamp R. W., Contreras M. A., Izzo M. J. // Int. J. appl. Radiat. Isotop. — 1967. — Vol. 18. — P. 747—757.
9. Hoeg J. M., Demosky S. J., Edge S. B. et al. // Arteriosclerosis. — 1985. — Vol. 5. — P. 228—237.
10. Hoff H. F. // Artery. — 1979. — Vol. 6. — P. 178—187.
11. Kovanen P. T., Bilheimer D. W., Goldstein J. L. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1981. — Vol. 78. — P. 1194—1198.
12. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
13. Mahley R. W., Innerarity T. L., Pitas R. et al. // Ibid. — 1977. — Vol. 252. — P. 7279—7286.
14. Mahley R. W., Weisgraber K. H., Innerarity T. L. // Biochim. biophys. Acta. — 1979. — Vol. 575. — P. 81—91.
15. Mahley R. W., Weisgraber K. H., Melchior G. W. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1980. — Vol. 77. — P. 225—229.
16. Matthews C. M. E. // Phys. Med. Biol. — 1975. — Vol. 2. — P. 36—53.
17. Nakai T., Otto P. S., Kennedy D. L., Whayne T. F. // J. biol. Chem. — 1976. — Vol. 251. — P. 4914—4921.
18. Re G. G., Koper I. M. // Biochemistry (Wash.). — 1975. — Vol. 14. — P. 4492—4498.
19. Scanu A., Pollard H., Reader W. // J. Lipid Res. — 1968. — Vol. 9. — P. 342—349.
20. Shepherd J., Bicker S., Lorimer A. R., Packard C. J. // Ibid. — 1979. — Vol. 20. — P. 999—1006.
21. Slater H. R., Packard C. J., Bicker S., Shepherd J. // J. biol. Chem. — 1980. — Vol. 255. — P. 10210—10213.
22. Soltys P. A., Portman O. W., O'Malley J. P. // Biochim. biophys. Acta. — 1982. — Vol. 713. — P. 300—314.
23. Tabas I., Tall A. R. // Circulation. — 1984. — Vol. 70. — Suppl. 11. — P. 11—43.
24. Wandel M., Norum K. R., Berg T., Ose L. // Studies on the Lipoprotein Catabolism in Isolated Rat Liver Cells / Ed. L. Ose. — Oslo, 1980. — P. 1—10.
25. Weisgraber K. H., Innerarity T. L., Mahley R. W. // J. biol. Chem. — 1978. — Vol. 253. — P. 9053—9062.
26. Whayne T. F. // High-Density Lipoproteins / Ed. C. Day. — New York, 1981. — P. 177—191.
27. Windler E. E. T., Kovanen P. T., Chao Y. S. et al. // J. biol. Chem. — 1980. — Vol. 255. — P. 10464—10471.

Поступила 10.09.85

CATABOLISM OF NATIVE AND MODIFIED HIGH DENSITY LIPOPROTEINS IN RABBITS

A. N. Klimov, N. P. Terjukova, L. I. Polikarpova, D. V. Ioffe, N. M. Kalashnikova, A. G. Vinogradov, A. V. Popov, V. T. Losovsky

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

Rates of fraction catabolism of rabbit and horse total ¹²⁵I-high density lipoproteins (HDL) were shown to be similar in rabbits, after intravenous administration, while catabolism of human, dog and, especially, of rat lipoproteins occurred at the higher rate as compared with rabbit HDL. Rabbit HDL containing modified ε-aminogroups, or guanidine groups, or carboxyl groups and native HDL were quite similarly eliminated from circulation of healthy animals, whereas the lipoproteins with modified tyrosine residues and, especially, succinated HDL exhibited the highest rate of elimination. Radioactivity of spleen tissue and lymphatic glands was several-fold higher after intravenous administration of succinated homologous ¹²⁵I-HDL into rabbits as compared with the effect of native homologous ¹²⁵I-HDL; in kidney, adrenal glands, liver tissue and small intestine the level of radioactivity was analogous after treatment with both homologous native and succinated ¹²⁵I-HDL. During incubation with mice peritoneal macrophages modified lipoproteins were captured 1.5-fold more effectively as compared with native HDL. The data obtained suggest that the type of HDL catabolism prevailed in rabbits, which did not involve specific cell receptors to apoprotein components of these lipoproteins.

Г. О. Меликсетян, З. С. Мкртчян, Ж. И. Акопян

ОЧИСТКА И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА ИЗОФЕРМЕНТА ММ КРЕАТИНКИНАЗЫ ИЗ СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ ЧЕЛОВЕКА

Институт экспериментальной биологии АН Армянской ССР, Ереван

Креатинкиназа (АТФ-креатинфосфотрансфераза; КФ 2.7.3.2) катализирует обратную реакцию фосфорилирования креатина с использованием Mg-АТФ. Фермент играет важную роль в энергетическом метаболизме клетки, особенно в мышечной и сердечной тканях. Согласно результатам исследований последних лет, основное количество энергии переносится от митохондрий к местам ее использования в миофибриллах и во внемитохондриальных системах молекулами фосфокреатина с участием разных изоферментов креатинкиназы [8]. В клетках сердечной мышечной ткани содержится 4 изофермента: ММ, ВВ, МВ и митохондриальная креатинкиназа. Они отличаются друг от друга электрофоретической подвижностью, иммунохимическими свойствами и аминокислотным составом [6].

Многочисленные исследования изофермента ММ из разных биологических источников выявили функциональную неидентичность субъединиц, которая, по-видимому, играет важную роль в регуляции биологической активности фермента в клетке [12, 19].

Настоящая работа посвящена выделению и очистке изофермента ММ креатинкиназы из сердечной мышцы человека и изучению некоторых физико-химических и кинетических параметров фермента.

Методика

Выделение и очистку креатинкиназы проводили по методу [22], заменив конечный этап фракционирования ее изофермента ММ на КМ-сефадексе афинной хроматографией на сефарозе с иммобилизованным цибакроном F3G-A, которая была получена по методу [11] с некоторой модификацией.

К 50 г сефарозы, отмытой от метиолата, добавили 0,5 г цибакрона в 50 мл воды и 10 мл 22 % NaCl. Смесь встряхивали на качалке в течение 100 мин, затем добавили 1 часть Na_2CO_3 до получения 1 % раствора. Эту смесь встряхивали еще 4—5 дней после чего промывали водой, 1 М KCl и опять водой (200 мл).

После разделения изоферментов ММ и МВ на сефадексе А-50 низкосолевую фракцию, содержащую изофермент ММ, нанесли на афинную колонку размером 1,6×25 см,

предварительно уравновешенную стартовым буфером следующего состава: 20 мМ трис-ацетатный буфер, 5 мМ Mg $(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 0,4 мМ этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) и 0,2 мкМ дитиотреитол, pH 6,9. Колонку промывали 2 объемами этого буфера. Десорбцию изофермента ММ проводили 0,15 М NaCl, приготовленным на том же буфере pH 8,5. Скорость нанесения и последующего элюирования 24 мл/ч. Элюаты, содержащие ММ-креатинкиназную активность, объединили и диализовали в течение 18 ч против 20 мМ трис-ацетатного буфера pH 7,0, содержащего 0,4 мМ ЭДТА и 2 мкМ дитиотреитол. Препарат фермента хранили при -18°C в 33 % глицерине или замораживали порциями по 2—3 мл. Активность препарата снижалась в течение 2 мес в 1,5 раза и сохранялась на том же уровне в течение года. Количество белка определяли методом Лоури [17] и спектрофотометрически, используя коэффициент $E_{280} = 7,4 \cdot 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ [18].

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) проводили, как описано в работах [16, 26], используя 7,5 % гели, в течение 2 ч. Гели окрашивали в 0,2 % растворе куамси. Промывали 7 % уксусной кислотой и сканировали на «Gel scanner ISCO» (США). Определение молекулярной массы ферментного препарата проводили электрофорезом в ПААГ [5] в присутствии 0,1 % додецилсульфата натрия (SDS) с использованием следующих белковых маркеров: бычий сывороточный альбумин (67 000), яичный альбумин (43 000), альдолаза (37 000), химотрипсин (25 000).

Активность фермента в обратной реакции определяли колориметрическим методом [13]. Реакционная смесь объемом 0,15 мл содержала: 1,3 мМ АДФ, 1,6 мМ креатинфосфат, 10 мМ Мо-ацетат и 0,15 М трис-ацетатный буфер pH 6,7 при 37°C . Реакцию начинали добавлением креатинфосфата. После инкубации в течение 1 мин при 37°C реакцию останавливали добавлением 0,2 мл 1 % щелочного раствора α -нафтола, а затем добавляли 0,1 мл 0,25 % раствора диацетила. Окрашенный раствор разбавляли 2 мл воды и определяли количество образовавшегося креатина колориметрически при 520 нм на спектрофотометре СФ-26. За единицу активности принимали количество (в микромолях) креатина, образовавшегося за 1 мин на 1 мг белка.

В работе были использованы креатинфосфат, АДФ, трис, дитиотреитол, N, N, N, N-тетраметилэтилендиамин фирмы «Reanal» (ВНР), ДЭАЭ-сефадексе А-50, сефароза 4-В фирмы «Pharmacia» (Швеция), цибакрон голубой F3C фирмы «Serva» (ФРГ).

Результаты и обсуждение

Последовательность этапов и результаты очистки приведены в табли-

Очистка ММ креатинкиназы из сердечной мышцы человека

Способ очистки	Общий белок, мг	Общая активность, ед.	Удельная активность, ед/мг	Выход, %	Степень очистки
Исходный экстракт	6 300	21 374	7	100	1
Фракционирование NH_4Cl и этанолом	1878	14 336	38	67	5
Фракционирование на ДЭАЭ-сефадексе А-50	42	9 160	66	42	10
Аффинная хроматография на сефарозе с иммобилизованным цибакроном	14	1 297	468	6	67

це. Наиболее эффективным этапом была аффинная хроматография, в результате которой достигнута 67-кратная очистка при удельной активности фермента 460 ед. на 1 мг белка.

По данным электрофореза, полученный препарат фермента гомогенен в условиях сохранения нативной структуры. При электрофорезе в присутствии 0,1 % SDS ферментному препарату соответствуют 2 близлежащие полосы (рис. 1, а, б), что указывает на различие в молекулярных массах субъединиц фермента. Аналогичные результаты получены на креатинкиназе из мышц кролика [19]. Кроме того, имеются данные о различной первичной структуре субъединиц ММ креатинкиназы из скелетных мышц свиньи [23].

Молекулярная масса субъединиц препарата ММ креатинкиназы из сердечной мышцы человека соответствует 39 000—40 000 (рис. 1, в).

Исследование температурной зависимости показало, что оптимальная температура для ферментативной активности ММ креатинкиназы 37 °С.

Исследование рН-зависимости креатинкиназной активности в направлении образования АТФ показало, что фермент проявляет активность в диапазоне рН от 5,0 до 8,0 с оптимумом рН в диапазоне 6,0—6,7 (рис. 3).

Зависимость каталитической активности фермента от концентрации креатинфосфата в реакционной смеси подчиняется уравнению Михаэлиса — Ментен и может быть линеаризована в координатах Лайнуивера — Бэрка. Константа Михаэлиса для креатинфосфата равна $3,2 \cdot 10^{-3}$ М.

Иная картина наблюдается при исследовании зависимости начальных скоростей креатинкиназной реакции от

концентрации АДР в присутствии и в отсутствие ионов Mg^{2+} . Хотя до сих пор истинными субстратами креатинкиназной реакции считаются только металл-нуклеотидные комплексы [15, 25], в наших экспериментах было получено 40—50 % сохранение каталитической активности и в отсутствие ионов Mg^{2+} . Чтобы исключить случай-

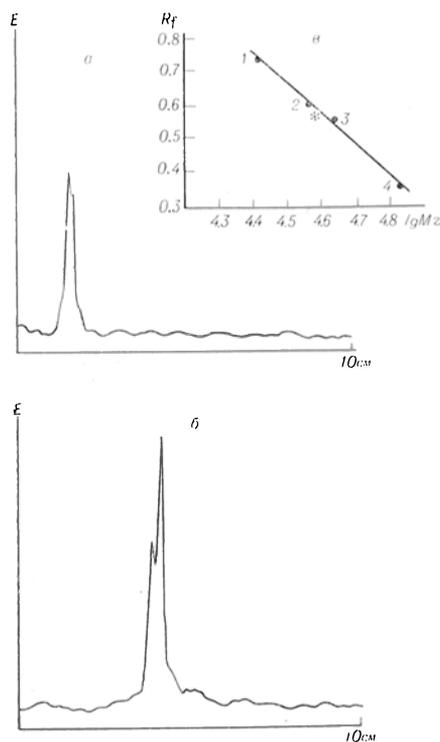


Рис. 1. Определение гомогенности и мол. массы ММ креатинкиназы диск-электрофорезом в ПААГ.

а — в условиях сохранения нативной структуры фермента; б — в присутствии 0,1 % SDS; в — определение молекулярной массы фермента в присутствии 0,1 % SDS с использованием маркеров. 1 — химотрипсин (25 000); 2 — альдолаза (37 000); 3 — яичный альбумин (43 000); 4 — бычий сывороточный альбумин (67 000). Звездочкой отмечен изофермент ММ креатинкиназы.

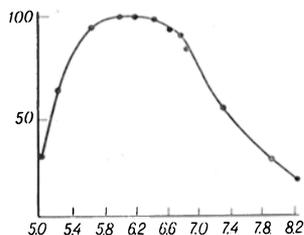


Рис.1

Соотношение концентраций

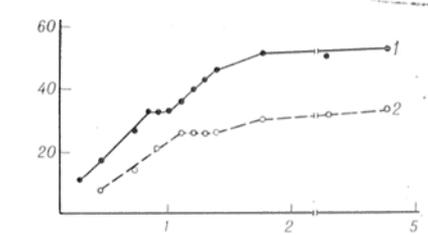


Рис.2

Mg^{2+} и АДФ во всех экспериментах было

Рис. 3. Зависимость активности ММ креатинкиназы (в %) от pH среды в реакции образования креатина.

Рис. 2. Зависимость начальных скоростей креатинкиназной реакции (в мкмоль/мин) от концентрации АДФ (в мМ) в присутствии (1) и в отсутствие (2) ионов Mg^{2+} при pH 6,6.

величиной постоянной, равной 3.

ное присутствие ионов Mg^{2+} в реакционной смеси, был использован триацетатный буфер, содержащий 4мМ ЭДТА.

В экспериментах по зависимости начальных скоростей креатинкиназной реакции от концентрации АДФ в присутствии и в отсутствие ионов Mg^{2+} при pH 6,6 были получены кривые с промежуточным плато (рис. 2). Следует отметить, что одними из первых ферментов, для которых наблюдались зависимости V от S с промежуточным плато, были пируваткиназа из печени крысы [10] и фенилаланин-4-гидроксилаза из печени крысы [14], относящиеся к числу аллостерических ферментов. Предполагают, что фермент может находиться в двух взаимопревращающихся формах, одна из которых характеризуется гиперболической зависимостью V от S , а другая — S -образной.

Существует мнение [24], что промежуточное плато может быть обусловлено особым характером взаимодействия активных центров в молекуле фермента, когда отрицательные кооперативные взаимодействия центров сменяются на положительные по мере насыщения активных центров в молекуле фермента субстратом.

Возможность появления промежуточного плато связывают с наличием в системе нескольких форм аллостерического фермента, характеризующихся разной степенью кинетической коо-

перативности по субстрату или относительно медленной изомеризацией фермента под действием субстрата [3].

Аналогичные результаты были получены также на препарате креатинкиназы из скелетных мышц кролика и митохондриальной креатинкиназы для зависимости начальных скоростей реакции от концентрации креатина и Mg^{+2} -АТФ [7] и Mg^{2+} -АДФ [9]. Характер подобных кривых объясняют присутствием двух форм фермента с разной четвертичной структурой.

Мы предполагаем не только наличие различных кинетических форм фермента, связанных с динамическим процессом ассоциации-диссоциации, но также и существование изначально неэквивалентности нуклеотидсвязывающих центров субъединиц.

Ранее функциональная неидентичность субъединиц уже была показана нами для ММ креатинкиназы из скелетных мышц кролика. Субъединицы M и M' отличаются друг от друга по электрофоретической подвижности в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии 0,1 % SDS, по сродству к АТФ и АДФ и по оптимуму pH максимальной активности, которая для одной субъединицы находится в пределах 5,0—5,8, а для другой — 7,6—8,2 [19].

Исходя из этого, зависимость активности ММ креатинкиназы из сердечной мышцы человека от концентрации АДФ исследовали при pH 7,6 и 5,2 (рис. 4). Видно, что и при pH 7,6, и при pH 5,2

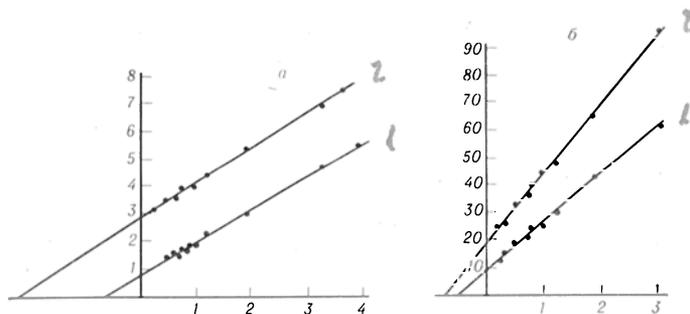


Рис. 4. Зависимость начальных скоростей креатинкиназной реакции в мкмоль⁻¹·мин от концентрации АДФ (в мМ⁻¹) в обратных координатах при pH 7,6 (а) и при 5,2 (б).

1 — в присутствии ионов Mg^{2+} ; 2 — в отсутствие ионов Mg^{2+} .

как в отсутствие, так и в присутствии ионов Mg^{2+} зависимость скорости реакции от концентрации АДФ подчиняется закону Михаэлиса — Ментен. Величины K_M при pH 7,6 для АДФ и Mg-АДФ, вычисленные в координатах Лайнуивера — Бэрка, равны $1,8 \cdot 10^{-3}$ и $0,4 \cdot 10^{-3} M$ соответственно. При pH 5,2 величина K_M для АДФ равна $1,6 \cdot 10^{-3} M$, а для Mg-АДФ — $1,2 \cdot 10^{-3} M$. Сравнение величин K_M показало, что ионы Mg^{2+} увеличивают сродство субстрата в 4 раза при pH 7,6 и в 1,3 раза при pH 5,2. Присутствие их существенно влияет и на величину V_{max} , увеличивая ее в 2—2,5 раза при обоих значениях pH. Если предположить, что ММ креатинкиназы из сердечной мышцы человека состоит из различных субъединиц (о чем свидетельствуют данные электрофореза в ПААГ в присутствии 0,1 % SDS), имеющих оптимум ферментативной активности при разных значениях pH, то можно сказать, что субъединица, функционирующая при pH 5,2, в меньшей степени нуждается в присутствии ионов Mg^{2+} , чем субъединица, функционирующая при pH 7,6. Кроме того, присутствие ионов Mg^{2+} еще более выявляет неидентичность поведения субъединиц по отношению к комплексу Mg-АДФ. Величины K_M для этого субстрата, полученные при pH 7,6 и 5,2, различаются в 3 раза, в то время как для АДФ величины K_M при указанных pH почти не различаются.

Разное сродство нуклеотидсвязывающих центров субъединиц креатинкиназы из скелетных мышц кролика отмечено в работах [1, 2, 19]. Кроме того, показано, что креатинкиназа взаимодействует с аналогом АТФ и в отсутствие ионов Mg^{2+} , причем с большей эффективностью. Величины K_d комплексов креатинкиназы с γ -(N-(2-хлорэтил)-N-метил)амид АТФ соответствуют 1,0 мМ в отсутствие ионов Mg^{2+} и 1,5 мМ в их присутствии, а величины максимальных скоростей инактивации составляют $2,1 \cdot 10^{-3}$ и $1,2 \cdot 10^{-3} c^{-1}$ соответственно [4].

Следует отметить, что двухвалентные катионы металлов активируют креатинкиназу через поляризационные эффекты и экранирующий заряд путем координации переносимой фосфорильной группы [20, 21]. В то же время анионы, являющиеся аналогом переносимой фосфорильной группы в

абортном комплексе, связываются с комплексом E — АДФ — креатин и в отсутствие двухвалентного металла, хотя и сознательно уменьшенным сродством [18]. По-видимому, в активном центре креатинкиназы существуют дополнительные детерминанты взаимодействия аниона с ферментом, возможно, группа $\epsilon-NH_2$ остатка лизина.

Следовательно, выяснение положения металла в активном комплексе отдельных субъединиц дало бы возможность определить механизм креатинкиназной реакции и пути регуляции ее активности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бунева В. И., Горикова П. И., Лаврик О. И. и др. // Молекул. биол. — 1980. — № 6. — С. 1308—1312.
2. Денисов А. Ю., Невинский Г. А., Лаврик О. И. // Биоорг. химия. — 1982. — Т. 8, № 7. — С. 72—79.
3. Курганов Б. И. Аллостерические ферменты. — М., 1978. — С. 27—61.
4. Невинский Г. А., Газарянц М. Г., Лаврик О. И. // Биоорг. химия. — 1984. — Т. 10, № 5. — С. 656—665.
5. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. — М., 1981. — С. 56—58.
6. Сакс В. А. // Успехи биол. химии. — 1983. — Т. 24. — С. 40—64.
7. Четверикова Е. П., Кринская А. В., Рыбин В. В. и др. // Биохимия. — 1970. — Т. 35. — С. 953—961.
8. Четверикова Е. П. // Успехи биол. химии. — 1975. — Т. 12. — С. 43—68.
9. Четверикова Е. П., Розанова Н. А. // Биохимия. — 1977. — Т. 42. — С. 481—489.
10. Bailey E., Stripe F., Taylor C. B. // Biochem. J. — 1968. — Vol. 108. — P. 427.
11. Baird J. K., Sherwood R. F., Carr R. I. G., Atkinson A. // FEBS Lett. — 1976. — Vol. 70. — P. 61—66.
12. Bickerstaff G. F., Price N. C. // Int. J. Biochem. — 1978. — Vol. 9. — P. 1—8.
13. Ennor A. H., Rosenberg H. // Biochem. J. — 1952. — Vol. 51. — P. 606—610.
14. Fisher D. B., Kaufman S. // J. biol. Chem. — 1973. — Vol. 248. — P. 4345.
15. Kenion G. L., Reed G. H. // Advanc Enzymol. — 1983. — Vol. 54. — P. 367—426.
16. Hedrick S. T., Smith G. H. // Arch. Biochem. — 1968. — Vol. 126. — P. 155—164.
17. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
18. Milner-Whitl E. I., Watts D. S. // Biochem. J. — 1971. — Vol. 122. — P. 727—740.
19. Nevinsky G. A., Ankilova V. N., Lavrik O. I. et al. // FEBS Lett. — 1982. — Vol. 149. — P. 36—40.
20. Reed G. H., Burns R. A. // J. biol. Chem. — 1978. — Vol. 253. — P. 4153—4158.
21. Reed G. H., Leygh T. S. // Biochemistry (Wash.), 1980. — Vol. 19. — P. 5472—5480.
22. Roberts R. // Meth. Enzymol. — 1982. — Vol. 90. — P. 185—195.
23. Takasawa T., Shiokawa H. // J. Biochem. — 1983. — Vol. 93. — P. 389—395.

24. Teipel J., Koshland D. E., Jr. // *Biochemistry* (Wash.). — 1969. — Vol. 8. — P. 4556.
 25. Walls D. S. // *The Enzymes* / Ed. P. D. L. Boyer. — New York, 1973. — Vol. 8. — P. 383—455.
 26. Weber K., Osborn M. J. // *J. biol. Chem.* — 1969. — Vol. 244. — P. 4406—4412.

Поступила 01.11.85

PURIFICATION AND SOME PROPERTIES OF KREATINE KINASE MM FROM HUMAN HEART MUSCLE

G. O. Meliksetyan, Z. S. Mkrtchyan, Zh. I. Akopyan

Institute of Experimental Biology, Academy of Sciences of the Armenian SSR, Yerevan

Homogenous preparation of creatine kinase MM isoenzyme was isolated from human heart muscle using affinity chromatography on Sepha-

rose containing immobilized Cibachron blue F3G-A. The enzyme was active at a wide range of pH 5.0-8.0 exhibiting maximal activity at pH 6.0-6.7. Dependence of the initial rate of creatine kinase reaction on the ADP concentration at pH 6.6 in presence or absence of Mg^{2+} did not follow the Michaelis-Menten kinetics, while hyperbolic dependence was found at pH 7.6 and pH 5.2. In presence of Mg^{2+} K_m value for ADP at pH 7.6 and pH 5.2 was decreased 4-fold and 1.3-fold, respectively, whereas V_{max} was increased 2-fold and 2.5-fold, respectively. Besides, K_m value for Mg^{2+} -ADP at pH 7.6 was 3-fold higher than at pH 5.2, while these K_m values were similar for ADP. The data obtained suggest that in human heart functional dissimilarity of creatine kinase MM subunits appears to occur, which is of importance in regulation of transphosphorylation.

УДК 616.12-008.331.1-07:[616.153.1:577.152.34]-074

В. В. Карпицкий, Р. И. Якубовская, Т. С. Пасхина

КОНТАКТНО-АКТИВИРУЕМЫЙ И ИММУНОРЕАКТИВНЫЙ ПРЕКАЛЛИКРЕИН В ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ

Крымский медицинский институт, Симферополь, Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Калликреин плазмы крови (КФ 3.4.21.8) является ключевым ферментом в инициации важных физиологических процессов — кининогенеза, свертывания крови, фибринолиза [5, 6, 20], активации ренин-ангиотензиновой системы [12, 17]. Эти процессы в определенной степени могут влиять на состояние регионарной и центральной гемодинамики в норме и при патологии, в том числе при артериальной гипертензии.

Многими авторами показано изменение уровня прекалликреина у больных с различными стадиями и вариантами гипертонической болезни — ГБ [2, 4, 9, 10]. В этих работах изменения в системе прекалликреин — калликреин определяли по аргинин-эстеразной активности плазмы крови после ее активации каолином [16] или трипсином [7]; в последнем случае после частичной очистки прекалликреина. Однако малая специфичность использованных в этом случае субстратов и возможность влияния на определение прекалликреина по методу [16] ингибиторов калликреина [2, 4, 5] ограничивают их использование.

В данной работе для определения уровня прекалликреина в плазме крови при различных гемодинамических вариантах ГБ использовали метод прямого количественного иммунохимического определения и функциональный метод [16]. В работе описаны способ получения высокоочищенного препарата калликреина плазмы крови человека, антисыворотки к нему и метод количественного иммунохимического определения прекалликреина в плазме крови.

Методика

Высокоочищенный препарат калликреина для иммунизации был получен из донорской сыворотки крови. Метод выделения и очистки включал следующие этапы: негативную хроматографию прекалликреина на ДЭАЭ-сефадексе А-50 при pH 8,0; позитивную сорбцию прекалликреина при pH 6,0 на СП (сульфонил)-сефадексе К-50; активирование прекалликреина трипсин-сефарозой 4В; аффинную хроматографию калликреина ТИСБ (трипсиновый ингибитор соевых бобов)-сефарозе 4В (иммобилизованный ТИСБ); негативную аффинную хроматографию очищенного препарата на сефарозе 4В с иммобилизованными кроличьими антителами к IgG человека. Полученный препарат был гомогенен

при электрофорезе в ПАГ (7,5 %) и в ПАГ (7,5 %) с 0,1 % додецилсульфатом натрия. Его удельная активность составляла 20 мкмоль БАЭЭ (этиловый эфирбензоил-L-аргинина) за 1 мин на 1 мг белка. Кининоподобная активность соответствовала образованию примерно 100 мкг-экв брадикинина за 1 мин на 1 мг белка. По данным титрования трасилолом, содержание активного калликреина в препарате составляло 95 ± 5 %. Выход белка в сыворотке крови составил 0,065 % от исходной концентрации (степень очистки в 1538 раз), эстеразная активность — 62 %. Препарат быстро утрачивал активность при хранении в низко- и изосмолярных растворах, при повторном размораживании и прогревании до температуры 56°C в течение 15 мин. Препарат сохранял активность при хранении в 0,5 М растворе NaCl и замораживании (-20°C).

Для получения антисыворотки к калликреину иммунизировали 4 кроликов породы шиншилла массой тела 3,0—3,5 кг. Цикл иммунизации состоял из 4 инъекций антигена с интервалом 14 дней. 300 мкг препарата в 1 мл 0,5 М раствора NaCl смешивали с 1 мл полного адьюванта Фрейнда. Каждому кролику вводили 0,5 мл полученной водно-масляной эмульсии внутривенно, в 5 точек по 0,1 мл. В каждую из 4 инъекций кролику вводили по 75 мкг антигена. Через 10 дней после 4-й инъекции производили взятие 40—50 мл крови. Через 42 дня повторно инъекцировали антиген в прежней дозировке и вновь производили взятие крови. Аналогичным образом реиммунизацию повторяли дважды. В целом было получено 4 пула преципитирующей антисыворотки к плазменному калликреину человека (АКС) — АКС I, II, III, IV. По данным радиальной иммунодиффузии, для количественного определения антител [1] их активность соответственно составляла 15,0, 28,2, 51,1, 70,4 мкг калликреина, связываемого 1 мл АКС. В работе использованы более активные АКС — III и IV.

Исследование моноспецифичности АКС, гомогенности препарата калликреина, перекрестных реакций между ним и прекалликреином проводили методом линейного иммуно-

электрофореза и встречной иммунодиффузии по Оухтерлони [3].

Количественное определение прекалликреин-калликреинового антигена в плазме крови человека проводили методом радиальной иммунодиффузии по Манчини [19] на стеклянных пластинах размером 13×18 см с использованием 1,5 % геля агарозы (фирма «Koch-Light», Англия) в 0,02 М барбиталовом буфере pH 8,6. Разогретый гель охлаждали до 50°C и смешивали с АКС. Для заливки геля использовали U-образную рамку из оргстекла, зажатую между 2 пластинами, чем достигалась стандартная толщина слоя геля (1,2 мм). После застывания в геле пробивали лунки диаметром 2 мм (объем лунки 3,7 мкл), в которые вносили исследуемые образцы плазмы крови, разведенные барбиталовым буфером в 8 раз, а также разведения стандартного раствора калликреина, в качестве которого использовали стабильный при хранении, частично очищенный препарат калликреина (полученный на стадии аффинной хроматографии на ТИСБ-сефарозе), содержащий 7 мкг калликреина в 1 мл крови. Иммунодиффузия длилась 48 ч. После этого гель отмывали от непреципитировавшихся белков, высушивали, согласно [1], и зону преципитации окрашивали кумаси ярко-синим (фирма «Sigma», США). Затем измеряли диаметр зоны преципитации разведений стандартного раствора и строили калибровочный график, по которому рассчитывали количество прекалликреин-калликреинового антигена в опытных образцах плазмы.

Определение контактно-активируемого (КА) прекалликреина в плазме крови человека проводили методом [16] с использованием тозил-L-аргинин метилового эфира — ТАМЭ (фирма «Sigma», США). Метод основан на регистрации прироста аргинин-эстеразной активности прекалликреина, активированного при обработке плазмы крови каолином на 1-й минуте инкубации.

Измерение уровней КА и иммунореактивного (ИР) прекалликреина в плазме крови проведено у 15 здоровых лиц, у 23 больных с пограничной гипертонией, у 21 больного ГБ I стадии, у 21 больного ГБ II ста-

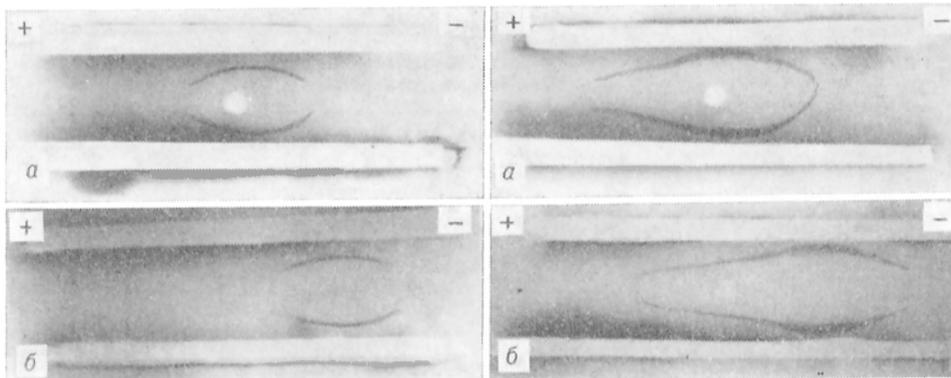


Рис. 1. Иммуноэлектрофорез прекалликреина (А) и плазмы крови человека (Б) с антисывороткой к плазменному калликреину человека.

Иммуноэлектрофорез проводили на предметных стеклах размером $7,6 \times 2,7$ см в 1,5 % геле агарозы (а) и агара (б), 0,02 М барбиталовый буфер pH 8,6, содержащий 0,01 % азида натрия. Толщина геля 2 мм. Диаметр лунки 2 мм. Сила тока 10 мА, градиент потенциала 5 В. Время электрофореза 2,5 ч. В траншеи вынесено по 250 мкл АКС. Иммунодиффузия 6 сут. Окраска кумаси ярко-синим. Плазма крови разведена 1 : 32. Концентрация прекалликреина 4,5 мкг/мл.

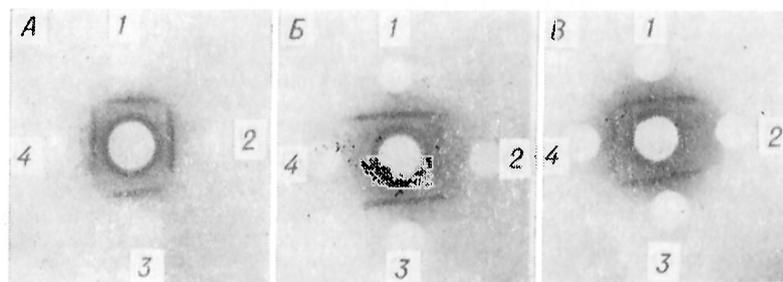


Рис. 2. Иммунодиффузия по Оухтерлони.

Размер пластины 4,5×4,5 см. 1,5 % гель агарозы в 0,02 М барбиталовом буфере pH 8,6. Толщина геля 2 мм. Диаметр центральной лунки 6 мм, боковых — 5 мм. Расстояние между центральной и боковыми лунками 8 мм. Время иммунодиффузии 5 сут. Окраска кумаси ярко-синим.
 А — в центральной лунке АКС. 1 — высокоочищенный калликренн, 2 — прекалликреин, 3 — высокоочищенный калликренн, 4 — плазма крови человека (1 : 32). Б — в центральной лунке АКС. 1, 3 — высокоочищенный калликренн, 2, 4 — тот же препарат, но прогретый при 56°С в течение 15 мин. В — в центральной лунке АКС. 1, 3 — высокоочищенный калликренн, 2 — лиофилизированный калликренн, 4 — лиофилизированный прекалликреин.

дии. Стадии ГБ диагностировали в соответствии с рекомендациями ВОЗ (1978 г). Группы больных и здоровые лица были однородны по полу, возрасту, массе тела. Содержание прекалликреина определяли в плазме крови, взятой в покое и непосредственно после 5-минутной нагрузочной пробы на велоэргометре, на субмаксимальном уровне. До и после пробы, перед взятием крови, фиксировали артериальное давление (АД) и параметры центральной гемодинамики методом тетраполяриной реографии [8].

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены результаты линейного иммуноэлектрофореза, на котором видно, что препарат прекалликреин (до стадии активирования иммобилизованным трипсином) и нативная плазма крови человека при иммуноэлектрофорезе с АКС образуют одну дугу преципитации. Это указывает на моноспецифичность АКС и свиде-

тельствует о гомогенности препарата калликренна, использованного для иммунизации. Последнее согласуется с данными электрофореза в ПАГ и титрования трасилолом. При иммунодиффузии по Оухтерлони (рис. 2) наблюдали полную иммунохимическую идентичность между высокоочищенным препаратом калликренна и прекалликреином, а также между ними и иммунореактивным материалом плазмы крови человека. Это согласуется с данными ряда авторов, показавших иммунохимическую идентичность между калликреином и прекалликреином [11, 13, 23]. Следует отметить, что прогревание при 56°С или лиофилизация препарата калликренна, приводящие к инактивации ферментативной активности, резко снижают проявление антигенных свойств (см. рис. 2). Эти воздействия не изменяют свойства пре-

Таблица 1
Содержание иммунореактивного (ИР) и контактно-активируемого (КА) прекалликреина в плазме крови у больных с различными стадиями ГБ ($M \pm m$)

Показатель	Здоровые (n=15)	Больные		
		с пограничной гипертензией	ГБ I стадии (n=21)	ГБ II стадии (n=21)
ИР прекалликреин, мкг/мл	37,7±1,0	39,5±1,2	39,4±1,0	40,0±0,9
КА прекалликреин мкМ ТАМЭ, мл/ч	67,9±2,8	87,7±3,7***	81,0±4,3*	59,3±2,9*
Ингибитор калликренна, усл. ед.	1,04±0,05	1,00±0,05	0,94±0,03	0,86±0,06*
АД _{ср} , мм. рт. ст.	94,4±2,4	106,6±1,1**	115,4±1,1**	127,7±2,8***
МОК, л/мин	5,58±0,24	6,06±0,36	5,52±0,22	5,84±0,44
Общее периферическое сопротивление сосудов (дин·с) × ×см ⁻⁵	1401±80	1535±102	1887±87***	2018±184**

Примечание. Достоверность различий по сравнению со здоровыми лицами: одна звездочка $p < 0,05$, две — $p < 0,01$, три — $p < 0,001$.

калликреина вступать в реакцию precipitation.

Таким образом, проведенные иммунохимические исследования свидетельствуют о моноспецифичности АКС, полученной при иммунизации кроликов высокоочищенным препаратом калликреина из сыворотки крови человека, а также о возможности ее использования для специфического иммунохимического количественного определения прекалликреин-калликреинового антигена в плазме крови человека.

Результаты определения уровней ИР и КА прекалликреина в плазме крови больных с различными стадиями ГБ в сопоставлении с основными параметрами центральной гемодинамики представлены в табл. 1. Уровень КА прекалликреина был достоверно повышен у больных с пограничной гипертонией (на 29,1 %) и ГБ I стадии (на 19,2 %) и снижен при ГБ II стадии (на 12,7 %) по сравнению с таковым у здоровых лиц. При прогрессировании ГБ и нарастании системного периферического сопротивления сосудов наблюдали закономерное снижение уровня КА прекалликреина, что сопровождалось также закономерным уменьшением активности ингибитора калликреина. Это особенно заметно при сравнении показателей у больных с пограничной гипертонией и ГБ II стадии. В то же время иммунохимическое определение прекалликреина (прекалликреин-калликреинового антигена) не выявило достоверных различий между больными и здоровыми, хотя определенная тенденция к увеличению отмечена при прогрессировании ГБ.

Дозированная физическая нагрузка у здоровых лиц вызвала достоверное увеличение уровня КА прекалликреина на 11,8 % и снижение активности ингибитора калликреина на 15,4 %. Уровень ИР прекалликреина увеличивался минимально — на $1,4 \pm 1,0$ мкг/мл. У больных ГБ уровень ИР прекалликреина при нагрузке достоверно ($p < 0,001$) повышался в пределах 4,5—5 % от исходного, у больных с пограничной гипертонией — на $1,7 \pm 0,6$ мкг/мл, при ГБ I стадии — на $2,0 \pm 0,7$ мкг/мл, при ГБ II стадии — на $1,8 \pm 0,5$ мкг/мл. Уровень КА прекалликреина и активность ингибитора калликреина у больных ГБ с различными стадиями под влиянием нагрузки практически не изменялись по ус-

редненным показателям, что было обусловлено различным вектором сдвига в индивидуальных показателях. В связи с этим проанализирован в зависимости от вектора сдвига уровень КА прекалликреина, превышающий 10 % от исходного. Были выделены 3 группы: 1-я — прекалликреин увеличивается на 10 % и более от исходного уровня; 2-я — прекалликреин снижается на 10 % и более; 3-я — прекалликреин не изменяется (колебания в пределах ± 10 %). Кроме того, на основе оценки прироста минутного объема крови (МОК) у здоровых лиц при нагрузке больные были разделены на 3 группы: 1-я — с гиперкинетической реакцией МОК, характерной для здоровых лиц; 2-я — с гипокинетической (прирост МОК менее нижней границы для здоровых лиц); 3-я — с промежуточной. Данные проведенного анализа представлены в табл. 2, из которой следует, что при повышении уровня КА прекалликреина, которое сопровождалось и увеличением активности ингибитора калликреина, наблюдали увеличение ударного (УОК) и МОК и снижение сосудистого сопротивления до степени, характерной для здоровых лиц. Напротив, при снижении уровня КА прекалликреина, которое ассоциировалось и с уменьшением активности ингибитора калликреина, наблюдали значительно меньшую степень прироста МОК, отсутствие увеличения УОК и гораздо меньшую степень снижения сосудистого сопротивления. Взаимосвязь между типом реагирования уровня КА прекалликреина и ингибитора калликреина с гемодинамической структурой прессорной реакции АД у больных ГБ в ответ на нагрузочный тест также выявлялась при сравнении в группах с ее различной структурой. Из данных табл. 2 видно, что для гиперкинетической реакции характерно повышение уровня КА прекалликреина и активности ингибитора калликреина, для гипокинетической — снижение обоих показателей, для промежуточной — их относительная неизменность. Следует отметить, что исходные показатели в выделенных группах достоверно не различались.

Уровень ИР прекалликреина, несмотря на полярные сдвиги уровня КА прекалликреина, у больных в выделенных группах претерпевал односторонние изменения — достоверно уве-

Иммунореактивный (ИР) и контактно-активируемый (КА) прекалликреин плазмы крови при различных сдвигах КА прекалликреина и различной гемодинамической структуре прессорной реакции АД под влиянием физической нагрузки у здоровых и больных ГБ

Группа обследуемых	n	Изменение показателей, % к исходному уровню до физической нагрузки										
		ИР прекалликреин	p	КА прекалликреин	p	ингибитор калликреина	p	АД _{ср}	p	УОК	МОК	общее периферическое сопротивление сосудов
Здоровые	15	+3,7		+11,8	<0,05	-15,4	<0,05	+14,2	0,01	+30,0	+121,9	-43,8
Больные ГБ												
Тип сдвига КА прекалликреина:												
повышение >10 %	19	+5,7	0,01	+19,7	<0,001	+20,2**	0,01	+9,1	0,01	+28,1	+94,0	-45,7
снижение <10 %	21	+4,0	<0,05	-18,1***	<0,001	-33,0*	<0,001	+8,8	0,01	-3,5**	+33,0**	-19,0**
не изменяется ±10 %	25	+4,8	0,01	-1,2*		-4,0		+14,6		+12,9	+62,0*	-25,7
Тип гемодинамической структуры прессорной реакции АД:												
гиперкинетический	25	+4,6	0,01	+12,5	0,01	+16,5***		+10,1		+33,4	+110,4	-48,0
гипокинетический	25	+4,0	0,01	-11,0**	<0,001	-28,3		+10,2		-9,4**	+20,2**	-7,0***
промежуточный	15	+5,6	0,01	-4,0**		-7,8		+14,2		+13,2	+62,9	-31,5

Примечание. Достоверность различий по сравнению со степенью сдвига у здоровых лиц: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$, по сравнению с исходным состоянием: черта $p < 0,05$, две черты 0,01, три черты 0,001.

личивался на 4—5 % от исходного.

В настоящей работе предпринята попытка сравнительного определения прекалликреина в плазме крови у здоровых и больных ГБ количественными и функциональными методами. Полученные результаты согласуются с данными литературы. В наших исследованиях содержание ИР прекалликреина у здоровых лиц колебалось в пределах от 32 до 45 мкг/мл (в среднем 37,7 мкг/мл). По данным других авторов [18, 23], количество прекалликреинового антигена в плазме крови здоровых лиц варьировало от 29 до 44 мкг/мл (в среднем 39,9 мкг/мл). Близкие величины приведены в работе [13] — от 33 до 66 мкг/мл, в среднем 55 мкг/мл. ТАМЭ-эстеразным методом регистрации активированного прекалликреина, а также с помощью специфического хромогенного трипептидного субстрата (H—D—Pro—Phe—Arg—pNA) [15] мы определяли повышенный уровень КА прекалликреина у больных ГБ.

Прямой корреляции между уровнем КА и ИР прекалликреина у больных ГБ в покое и при физической нагрузке нами не выявлено. При анализе этого противоречия следует учитывать обнаруженную нами и другими исследователями [11, 13, 23] иммунохимическую идентичность прекалликреина и калликреина. Поэтому постепенные (при прогрессировании ГБ) и срочные (в ответ на нагрузку) сдвиги уровня КА прекалликреина в сторону снижения, сопровождающиеся и убылью активности ингибитора калликреина, можно расценивать как признак активации калликреин-кининовой системы крови (потребление факторов регуляции активности) в условиях повышенного сосудистого сопротивления, так как суммарное количество прекалликреин-калликреинового антигена изменяется мало. Причиной такой активации могут стать дефекты эндотелия сосудов при ГБ, возникающие в результате увеличения скорости тока крови и напряжения сдвига [14], что создает условия для контактной активации фактора Хагемапа. Данное предположение согласуется с современными представлениями о структурно-функциональной организации и механизмах активации калликреин-кининовой системы крови [5, 6, 20].

Увеличение уровня КА прекалликре-

ина на ранних стадиях гипертонии и у больных с гиперкинетической структурой прессорной реакции АД при нагрузке нельзя рассматривать как повышение синтеза или выброс из депо, потому что это не сопровождается коррелирующим увеличением уровня ИР прекалликреина. Возможно, в этих условиях увеличенный уровень КА прекалликреина отражает особенности функционирования комплекса: фактор Хагемапа (XII) — прекалликреин — высокомолекулярный кининоген — ингибиторы при ГБ. Данные особенности могут влиять на содержание как уровня КА, так и ИР прекалликреина. Так, при добавлении к нормальной плазме высокомолекулярного кининогена эстеразная активность прекалликреина увеличивается на 30 % [22], а содержание прекалликреинового антигена не изменяется [13]. В плазме крови с дефицитом высокомолекулярного кининогена прекалликреиновый антиген не выявляется, а после полной реконструкции определяется лишь 30 % от нормального антигена [13].

Увеличение эстеразной активности прекалликреина в присутствии высокомолекулярного кининогена связывают с тем, что последний защищает процесс активирования прекалликреина от влияния С1-ингибитора и других антипротеаз [21, 22]. Однако эти ингибиторы могут маскировать антигенные детерминанты калликреина [13] и, тем самым влиять на результаты определения прекалликреин-калликреинового антигена в плазме крови.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о важности сдвигов КА прекалликреина при ГБ и указывают на необходимость исследования других механизмов ограничения депрессорной функции калликреин-кининовой системы крови при ГБ (торможения активации, изменения метаболизма конечного продукта и рецепции к нему и пр.).

ЛИТЕРАТУРА

1. Богущий Б. В., Карпицкий В. В., Козаченко Ю. И., Гуз С. Я. // Тер. арх. — 1979. — № 6. — С. 70—73.
2. Иммунохимический анализ / Под ред. Л. А. Зильбера. — М., 1968.
3. Карпицкий В. В. // Пат. физиол. — 1982. — № 4. — С. 86—89.
4. Пасхина Т. С. // Целенаправленный поиск новых сердечно-сосудистых препаратов. — Рига, 1980. — С. 50—70.

5. Пасхина Т. С. // Вестн. АМН СССР. — 1982. — № 9. — С. 50—56.
6. Пасхина Т. С., Кринская А. В. // Вопр. мед. химии. — 1974. — № 6. — С. 660—663.
7. Путикарь Ю. Т., Большов В. М., Елизарова И. А. и др. // Кардиология. — 1977. — № 7. — С. 85—90.
8. Руководство по количественному иммуноэлектрофорезу / Под ред. Н. Акальсьен и др.: Пер. с англ. — М., 1977.
9. Свищенко Е. П., Гомазков О. А., Заноздра И. С. и др. // Кардиология. — 1984. — № 3. — С. 79—83.
10. Чернова И. А., Некрасова А. А., Ланцберг Л. А. // Там же. — 1976. — № 5. — С. 46—50.
11. Bagdasarian A., Lahiri B., Talamo R. et al. // J. clin. Invest. — 1974. — Vol. 54. — P. 1444—1454.
12. Blumberg A., Sealy J., Atlas S. et al. // J. Lab. clin. Med. — 1981. — Vol. 97. — P. 771—778.
13. Bouma B., Kerbirou D., Vlooswijk R., Griffin J. // Ibid. — 1980. — Vol. 96. — P. 693—709.
14. Boyd G. W. // Clin. exp. Pharmacol. — 1980. — Vol. 7. — P. 541—544.
15. Bruhn H. D., Brück M., Albert J. P. // Acta chir. scand. — 1982, Suppl. 509. — P. 133—135.
16. Colman R. W., Mattler L., Sherry S. // J. clin. Invest. — 1969. — Vol. 48. — P. 23—32.
17. Derckx F. H. M., Schalekamp M. P. A., Schalekamp M. A. D. H. // Clin. Sci. — 1981. — Vol. 61. — P. 2955—2958.
18. Fisher C. A., Schmaier A. H., Addonizio V. P., Colman R. W. // Blood. — 1982. — Vol. 59. — P. 963—970.
19. Mancini C., Carbonara A. O., Heremans J. F. // Immunochemistry. — 1965. — Vol. 2. — P. 235—254.
20. Moyal H. Z. // Rev. Physiol. Biochem. — 1978. — Vol. 84. — P. 143—202.
21. Schapira M., Scott C. F., Colman R. W. // Biochemistry (Wash.). — 1981. — Vol. 20. — P. 2738—2743.
22. Scott C. F., Colman R. W. // J. clin. Invest. — 1980. — Vol. 65. — P. 413—422.
23. Scott C. F., Liu C. Y., Colman R. W. // Europ. J. Biochem. — 1979. — Vol. 100. — P. 77—83.

Поступила 01.11.85

CONTACT-ACTIVATED AND IMMUNOREACTIVE PREKALLIKREIN IN BLOOD PLASMA OF PATIENTS WITH HYPERTENSION

V. V. Karpitsky, R. I. Yakubovskiy, T. S. Paskhina

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

Alterations in activity of kaolin-activated (contact-activated, CA) and immunoreactive (IR) prekallikrein were studied in blood plasma of healthy persons and of patients with hypertension under conditions of rest and of dose-dependent physical loading. CA prekallikrein was dissimilarly altered depending on the type of hemodynamic structure of the pressure reaction (arterial pressure): content of CA prekallikrein was increased in hyperkinetic type and — decreased in hypokinetic type. Content of IR prekallikrein, measured by means of radial immunodiffusion using monospecific antiserum, was similar in healthy persons and in the patients at rest and after physical exercises. It was increased slightly but did not correlate with CA prekallikrein alterations. As content of CA- and IR-prekallikreins did not correlate in the disease dynamics and after physical exercises, functional impairments may cause activation of blood plasma prekallikrein in hypertension. A procedure for isolation of highly purified preparation of kallikrein, production of monospecific antiserum to prekallikrein are described. Immunochemical studies and quantitative estimation of IR-prekallikrein were carried out.

УДК 612.822.1.015.1:577.152.261].014.46:615.357.814.34:577.175.343

Р. И. Потапенко

ВЛИЯНИЕ ВАЗОПРЕССИНА НА АКТИВНОСТЬ Na, K-АТФазы СИНАПТИЧЕСКИХ МЕМБРАН ГОЛОВНОГО МОЗГА ВЗРОСЛЫХ И СТАРЫХ КРЫС

Институт геронтологии АМН СССР, Киев

За последние годы резко вырос интерес исследователей к нейропептидам, в том числе к вазопрессину, характеризующемуся чрезвычайным разнообразием биологических эффектов. Полученные к настоящему времени факты позволяют считать, что вазопрессин является модулятором нейрональной активности. Установлено его участие в процессах обучения и памяти как у

животных, так и у человека [12]. Имеются данные о положительном влиянии вазопрессина на консолидацию следов памяти [7, 12]. Вазопрессин находит клиническое применение при различных нарушениях памяти у человека [7, 9], для повышения эффективности условнорефлекторной терапии [5]. Наряду с этим показана его роль в патогенезе гипертензии, особенно в пожи-

лом возрасте [11]. Вместе с тем молекулярные механизмы эффектов вазопрессина на центральную нервную систему (ЦНС) до конца не выяснены.

Целью настоящего исследования было изучение влияния вазопрессина на транспортную Na, K-АТФазу (КФ 3.6.1.3) синаптических мембран. Na, K-АТФаза нервных окончаний имеет прямое отношение к трансмембранным процессам, к формированию электровозбудимости мембраны нейронов. Показано, что выработка условных рефлексов сопряжена с активацией Na, K-АТФазы нейронов, особенно синапсов. С учетом модулярного характера действия пептидов [1] изучение влияния вазопрессина на активность Na, K-АТФазы синаптических мембран в геронтологическом аспекте представляет особый интерес. Известно, что одним из основных проявлений старения ЦНС является снижение памяти и способности к обучению [15]. Наряду с этим имеются указания на изменение в процессе старения содержания вазопрессина в гипофизе и гипоталамусе [19], его концентрации в крови людей и экспериментальных животных [10, 19]. Вместе с тем влияние пептида на Na, K-АТФазу мозга не изучено.

Методика

В работе использовали 7—8-месячных (взрослых) и 25—27-месячных (старых) беспородных крыс-самцов. Животных умерщвляли мгновенной декапитацией. Синапсомы выделяли из 10% гомогенатов, приготовленных раздельно из коры больших полушарий и ствола головного мозга на 0,32 М сахарозе с 0,01 М триса и 0,005 М ЭДТА (рН 7,5), по методу [13]. Синаптические мембраны получали, подвергнув синапсомы гипотоническому шоку путем инкубации в деионизированной воде из расчета 3 мл на 1 г ткани при 0°C в течение 30 мин. Синаптические мембраны ресуспендировали в 0,3 М сахарозе, определяли белок модифицированным методом Лоури [16], замораживали и хранили при -20°C не более 2 сут (в течение

этого времени активность и другие свойства фермента не изменялись). Общую АТФазную активность определяли в среде (конечный объем 1 мл) следующего состава (в мМ): трис — 50, NaCl — 100, KCl — 20, MgCl₂ — 3, АТФ — 3 (рН 7,5), 50—60 мкг белка синаптических мембран. В пробы добавляли вазопрессин в количестве 0,1 мл. Реакцию начинали внесением субстрата и инкубировали 15 мин при 37°C. Останавливали реакцию добавлением холодного раствора трихлоруксусной кислоты (конечная концентрация 5%). Об АТФазной активности судили по накоплению P_i [18] в среде инкубации. Активность Na, K-АТФазы рассчитывали как разность между общей и Mg-АТФазной активностью, которую определяли в отсутствие в среде инкубации ионов натрия (NaCl эквивалентно замещался KCl).

В работе использовали реактивы: натриевую соль АТФ, трис («Ренал»), вазопрессин («Koch-Light»), додецилсульфат («Sigma»), остальные реактивы отечественного производства классификации х.ч. Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики [8].

Результаты и обсуждение

Из представленных в таблице данных видно, что синаптические мембраны из коры и ствола мозга различаются по величине активности Na, K-АТФазы. В стволе головного мозга активность фермента выше. С возрастом Na, K-АТФазная активность синаптических мембран, а также активность Mg-АТФазы не изменяются.

Влияние вазопрессина на активность Na, K- и Mg-АТФаз зависит от его концентрации, определяется отделом мозга и возрастом крыс. Подобно нейромедиаторам [16] и собственные данные) действие пептида имеет двухфазный характер: низкие концентрации (10⁻⁷, 10⁻⁶ М) стимулируют Na, K-АТФазу, высокие (10⁻⁴, 10⁻³ М) подавляют ее активность (рис. 1). Более выраженные изменения активности фермента обнаруживаются независимо от возраста животных в стволе мозга, где в соответствии с данными литературы

АТФазная активность (в мкмоль P_i · мг белка⁻¹ · ч⁻¹) синаптических мембран из коры и ствола головного мозга крыс разного возраста

Возраст животных, мес	Кора		Ствол	
	Na, K-АТФаза	Mg-АТФаза	Na, K-АТФаза	Mg-АТФаза
7—8	20,2 ± 1,6 (16)	24,7 ± 1,3 (16)	27,5 ± 1,9* (16)	23,3 ± 1,3 (16)
25—27	17,4 ± 1,4 (14)	27,1 ± 1,9 (14)	25,9 ± 1,8* (14)	25,3 ± 1,2 (14)

Примечание. Звездочка — статистически значимые различия между корой и стволом. В скобках — число опытов.

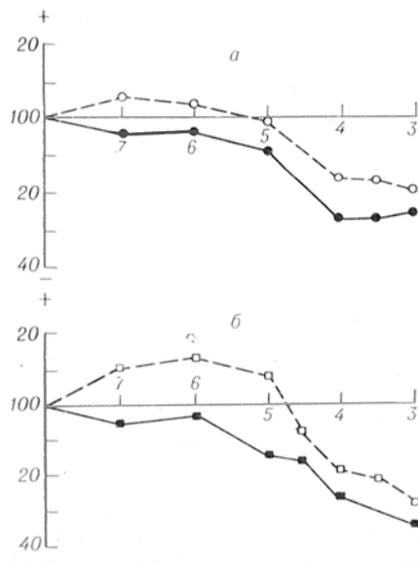


Рис. 1. Зависимость активности Na, K-АТФазы синаптических мембран из коры (а) и ствола (б) головного мозга крыс разного возраста от концентрации вазопрессина.

Здесь и на рис. 2 по оси ординат — изменение активности фермента, % по отношению к исходному уровню (принят за 100%); по оси абсцисс — $-\lg$ концентрации вазопрессина, М. Прерывистая линия — взрослые, сплошная — старые крысы.

[14] содержание вазопрессина наиболее высокое.

Статистически значимая активация транспортной АТФазы низкими концентрациями вазопрессина выявляется лишь в стволе головного мозга взрослых крыс ($p < 0,05$), хотя некоторое увеличение активности (по среднеарифметическим значениям) наблюдается в этой возрастной группе и в коре. У старых крыс в отличие от взрослых стимуляция активности Na, K-АТФазы под влиянием вазопрессина не обнаружено ни в одном из изученных отделов. Ингибирующий эффект пептида выявляется на синаптических мембранах из коры и ствола головного мозга у животных обоих возрастов, причем он увеличивается по мере нарастания концентрации вазопрессина. Обращает на себя внимание более резкое подавление активности транспортной АТФазы в синаптических мембранах из мозга старых крыс. У взрослых животных угнетение активности Na, K-АТФазы составляет в зависимости от концентрации в коре мозга 15—18% ($p < 0,05$ — $p < 0,01$), а в стволе 21—26% ($p < 0,01$). У старых крыс тормозящий эффект соответственно составляет в коре 25—27% ($p < 0,05$), в стволе — 24—32% ($p <$

$< 0,001$). Необходимо отметить, что концентрация пептида 10^{-5} М является как бы пограничной между низкими и высокими. При ее использовании не выявляется каких-либо статистически значимых изменений активности транспортной АТФазы.

Угнетение под влиянием высоких концентраций вазопрессина Na, K-АТФазы сопровождается увеличением активности Mg-АТФазы. Стимуляция Mg-АТФазной активности синаптических мембран из коры и ствола головного мозга у животных обеих возрастных групп одинакова. Как видно из представленных на рис. 2 данных, максимальная активация этого фермента у взрослых крыс составляет в коре головного мозга 21% ($p < 0,001$), в стволе 24% ($p < 0,01$), у старых — соответственно 21% ($p < 0,05$) и 19% ($p < 0,01$). Реципрокный характер изменений активности Na, K- и Mg-АТФаз выявлен и другими исследователями [3, 4] при иных экспериментальных воздействиях. Низкие концентрации вазопрессина не изменяют активности Mg-АТФазы.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что вазопрессин в опытах *in vitro* оказывает регулирующее влияние на активность Na, K- и Mg-АТФаз. Особый интерес с точки зрения функциональной активности головного мозга представляет активация транспортной АТФазы нервных окончаний низкими концентрациями вазопрессина, сменяющаяся по мере их увеличения ингибирующим эффектом. Обращает внимание отсутствие активирующего влияния пептида у старых крыс при наличии угнетения

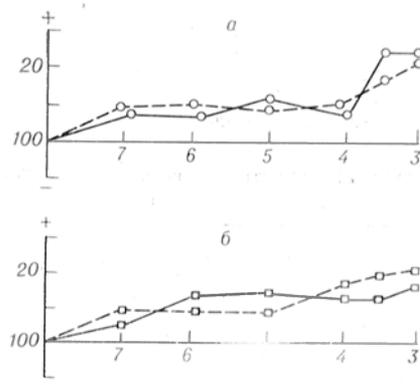


Рис. 2. Зависимость активности Mg-АТФазы синаптических мембран из коры (а) и ствола (б) головного мозга крыс разного возраста от концентрации вазопрессина.

активности Na, K-АТФазы высокими его концентрациями. Можно полагать, что установленные в исследованиях *in vitro* эффекты вазопрессина имеют физиологическое значение. Ранее [2] показано изменение энергетического обмена, в том числе активности Na, K- и Mg-АТФаз, в отдельных структурах головного мозга при внутривенном введении вазопрессина. По-видимому, факторы, способствующие резкому увеличению концентрации этого пептида в нервной ткани, могут негативно сказаться на функции головного мозга, особенно в старом организме.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин И. П. // *Вопр. мед. химии.* — 1984. — № 3. — С. 2—7.
2. Богацкая Л. П., Потапенко Р. И. // *Там же.* — № 6. — С. 106—110.
3. Высоцина Т. К., Попова П. К. // *Журн. эволюц. биохим.* — 1978. — № 2. — С. 171—174.
4. Глебов Р. П., Шевцов В. В., Гришанкова И. Д. и др. // *Бюл. Экспер. биол.* — 1971. — № 10. — С. 36—38.
5. Иваницкий А. М., Пятов И. Д., Стрелец В. В. и др. // *Цейрохимия.* — 1984. — № 1. — С. 21—27.
6. Кометиани З. П., Джаришвили Т. Я., Цакадзе Л. Г. // *Биохимия.* — 1975. — Т. 40, № 5. — С. 1039—1046.
7. Медведев В. И., Бахарев В. Д., Гречко А. Т. и др. // *Физиология человека.* — 1980. — № 5. — С. 771—775.
8. Монцевичоте-Эрингене Е. В. // *Пат. физиол.* — 1964. — № 4. — С. 71—78.
9. Морозов Г. В., Иваницкий А. М. // *Вопр. мед. химии.* — 1984. — № 4. — С. 63—68.
10. Фролькис В. В., Головченко С. Ф., Пугач

- Б. В. // *Физиол. журн. СССР.* — 1976. — Т. 62, № 4. — С. 586—593.
11. Фролькис В. В., Головченко С. Ф., Медведь В. И. и др. // *Успехи физиол. наук.* — 1983. — Т. 14, № 2. — С. 56—82.
12. De Wied D. // *Central Regulation of the Endocrine System.* — New York, 1979. — P. 297—314.
13. Hajos F. // *Brain Res.* — 1975. — Vol. 93. — N 3. — P. 485—489.
14. Hawthorn J., Ang T. Y., Jenkins J. // *Ibid.* — 1980. — Vol. 197. — N 1. — P. 75—81.
15. Le Poncin-Lafitte M., Lamproglou Y., Duterle D. et al. // *Eur. J. Neurol.* — 1983. — Vol. 22, N 2. — P. 13—14.
16. Markwell M. A. K., Haas S. M., Rieber L. L. et al. // *Analyt. Biochem.* — 1978. — Vol. 87, N 1. — P. 206—210.
17. Nagy K., Zs.-Nagy V., Bertoni-Freddari C. et al. // *Arch. Geront.* — 1983. — Vol. 2, N 1—2. — P. 23—26.
18. Rathun W., Bellach V. // *Analyt. Biochem.* — 1968. — Vol. 28, N 1. — P. 436—445.
19. Zbuzek V. K., Wu W. H. // *Exp. Geront.* — 1982. — Vol. 17, N 2. — P. 133—138.

Поступила 02.12.86

EFFECT OF VASOPRESSIN ON ACTIVITY OF Na⁺, K⁺-ATPASE IN SYNAPTIC MEMBRANES OF ADULT AND OLD RAT BRAIN

R. I. Potapenko

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

Vasopressin regulated *in vitro* the activity of Na⁺, K⁺-ATPase in synaptic membranes from rat brain cortex and brain stem. Low concentrations of the peptide activated the enzyme, high concentrations — inhibited. The effect was most distinct in brain stem. Age-dependent effects of vasopressin on the Na⁺, K⁺-ATPase activity were observed. Basal activity of the enzyme was not altered in synaptic membranes with ageing.

УДК 617.741-004.1-092:617.741-008.939.15-074

М. А. Бабичаев, А. И. Деев

МОДИФИКАЦИЯ МЕМБРАННЫХ СТРУКТУР ПРИ КАТАРАКТЕ

Московский научно-исследовательский институт глазных болезней им. Гельмгольца
Минздрава РСФСР

Основным фактором, обуславливающим помутнение хрусталика, является уменьшение растворимости кристаллинов. В случае типичной старческой катаракты из ядерной зоны помутневших хрусталиков выделяются конгломераты высокомолекулярных белков, устойчивых к действию мочевины [6]. Такие агрегаты, стабилизируемые ковалентными сшивками, могут быть лишь частично диссоциированы под действием агентов, восстанавливающих S—S-связи [12]. В состав указанных агрегатов

входят липиды, которые обнаруживаются в цитоплазматической белковой фракции хрусталика. Поскольку в прозрачном хрусталике большая часть липидов локализуется в мембранах [5], можно предположить, что в агрегации кристаллинов участвуют процессы, вызывающие повреждение липидного слоя плазматических мембран хрусталиковых волокон. При этом помутнение хрусталика сопровождается переходом мембранных липидов в цитоплазматическую белковую фракцию

[8]. Ранее был установлен факт активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) при катаракте [1]. Учитывая, что ПОЛ является одним из распространенных механизмов образования конгломератов мембранных белков, мы предположили, что одной из причин агрегации белков хрусталика может быть структурное повреждение плазматических мембран как результат их перекисной модификации.

Цель данной работы — выяснение вопроса о том, связаны ли структурно-биохимические характеристики помутнения хрусталика с модификацией мембран хрусталиковых волокон на различных этапах развития катаракты.

Методика

В работе использовали хрусталики человека с различной степенью помутнения ($n = 34$), полученные при операциях. Прозрачные хрусталики человека извлекали из донорских глаз ($n = 5$), постулавших из банка. Сразу же после взятия материала проводили экстракцию липидов из хрусталика по методу Фолча [10] путем гемогенизирования ткани в 20 объемах хлороформ-метанольной смеси (2:1) с добавлением антиоксиданта 4-метил-2,6-дитретбутилфенола (0,5 мг/100 мл) в течение 10 мин. После фильтрования полученная проба расслаивалась в делительной воронке в течение 5—8 ч. Для расслаивания добавляли воду до соотношения 7:1. Все операции проводили при 0°C. Нижнюю хлороформную фракцию упаривали. О содержании фосфолипидов судили по результатам определения органического фосфора [13]. Количество общих липидов, содержащихся в экстракте, определяли гравиметрически, а также по характерному поглощению в области 206—210 нм липидного образца после растворения в 4 мл смеси метанол — гептан (5:1). Накопление начальных продуктов окисления липидов оценивали спектрофотометрически по поглощению дисендовых копьюгатов при 232 нм, характеризующему уровень гидроперекисей полиненасыщенных жирных кислот, а также по поглощению при 274 нм вторичных продуктов ПОЛ, сопряженных трисенов и кетодисенов [4], на спектрофотометре «Hitachi-557» (Япония). О содержании конечных флуоресцирующих продуктов ПОЛ судили по интенсивности флуоресценции липидного экстракта при длине волны возбуждения 365 нм и испускания 420—440 нм [7] на спектрофлуориметре «Hitachi-MPF-4». Содержание исходного материала в образцах выравнивали по количеству фосфолипидов. Спектрофлуориметр калибровали в начале каждого дня измерений по стандартному раствору сульфата хирина (1 мкг/мл в 0,1 н. H_2SO_4) при длинах волн испускания флуоресценции 435 нм и возбуждения 365 нм. Для электронной микроскопии цельные хрусталики фиксировали 4% глутаровым альдегидом, приготовленным на 0,1 М фосфатном буфере pH 7,2—7,4, а затем 1% раствором OsO_4 и промывали 50% этиловым спиртом.

Хрусталики дегидратировали в спиртах восходящей концентрации, абсолютном ацетоне и заключали в эпоп. Срезы для электронной микроскопии готовили перпендикулярно поверхности в области срединной зоны хрусталика на ультрамикротоме LKB 200 и контрастировали азотнокислым свинцом по Рейнольдсу. Образцы просматривали в электронном микроскопе «JEM-100 В» при увеличении 20 000. Протяженность мембран на срезе оценивали с помощью курвиметра, степень везикуляции мембран — по извитости линий, соответствующих мембранам, на электронных микрофотографиях. В качестве меры извитости мембран использовали отношение протяженности мембран на анализируемом участке к отрезку прямой, соединяющему концы анализируемого участка.

Результаты

Известно, что на начальных этапах эмбрионального развития хрусталика его волокна на электронных микрофотографиях имеют вид продольных упорядоченных тяжей, окруженных плазматическими мембранами [3]. Согласно общепринятому представлению, помутнение хрусталика связано с увеличением числа и размеров белковых агрегатов в его ткани [12]. Однако, как видно из представленных электронных микрофотографий (рис. 1, а—д), при старении хрусталика и развитии его помутнения, когда образования указанных агрегатов еще не отмечается, плазматические мембраны хрусталиковых волокон уже претерпевают существенные изменения. В тех случаях, когда хрусталик еще сохраняет свою прозрачность, отмечают наиболее ранние изменения упорядоченности структуры плазматических мембран продольных волокон, которые образуют характерные «шпиковидные» выпячивания и «гнездовидные» углубления (см. рис. 1, а). По мере прогрессирования помутнения хрусталиковые волокна становятся все более неупорядоченными, их электронная плотность увеличивается, мембраны образуют большее число выпячиваний и закручиваний. При этом радиус кривизны мембранных частиц существенно уменьшается. Дальнейшее развитие помутнения хрусталика (см. рис. 1, б, в) характеризуется образованием типичных «волновидных» мембранных структур, формирующих множественное число завитков вокруг электронноплотных центров. Подобные извитые структуры, различающиеся по количеству и форме, распространяются экс-

центрично от хрусталикового волокна. Завивающиеся мембраны хрусталиковых волокон по направлению к периферии хрусталикового волокна образуют характерные сжатия и расширения пространств между соседними волокнами. Вид подобных образований напоминает ожерелье. На стадии зрелой катаракты, биохимически характеризующейся формированием в хрусталике крупных высокомолекулярных белковых агрегатов [12], происходит дальнейшая модификация мембранных структур хрусталика. Указанная стадия развития катаракты характеризуется тем, что извитые фрагменты мембран хрусталиковых волокон становятся центральной частью массы аморфного вещества и приобретают вид глобул различного размера (100—900 нм) с электронно-плотным гранулярным содержанием (см. рис. 1, *з, д*). При этом волоконные или мембранные структуры более не определяются и волокна превращаются в обширные массы глобулярных структур. На этом этапе происходит потеря свободных от глобул мембранных структур. Сначала образуются небольшие глобулы (100—200 нм), наполненные гранулярным материалом, вероятно, белковой природы той же плотности, что и цитоплазма хрусталиковых волокон, а затем глобулы промежуточного размера (200—500 нм), содержащие агрегаты высоких плотности и дисперсности. Вероятно, потеря свободных мембран хрусталиковых волокон связана с тем, что указанные мембраны участвуют в образовании белковых агрегатов. Более крупные глобулы (величиной 600 нм и более) образуются из более мелких. На поздних стадиях помутнения хрусталика глобулы становятся все более агрегированными, промежуточные филаменты исчезают. На этом этапе вещество хрусталика заполнено в основном белковыми агрегатами. Значительное светорассеяние, сопровождающее образование указанных белковых агрегатов, зависит от соотношения длины волны падающего света, размера и концентрации глобул.

Поскольку ПОЛ является одним из механизмов модифицирующего действия на структурно-функциональную организацию биологических мембран, была предпринята попытка сопоставить ультраструктурные нарушения в

мембранах хрусталиковых волокон при катаракте с концентрацией образующихся продуктов ПОЛ на соответствующих стадиях помутнения хрусталика. На рис. 2—4 представлены результаты определения различных молекулярных продуктов ПОЛ, обнаруживаемых в липидных экстрактах, выделенных из хрусталиков на различных стадиях развития катаракты. Как видно, содержание гидроперекисей, имеющих сопряженные двойные связи (дисеновые конъюгаты) и определяемых по характерному максимуму в УФ-спектре при 232 нм, первичных молекулярных продуктов ПОЛ, возрастает на начальных стадиях развития помутнения вплоть до стадии почти зрелой катаракты. Существенно, что при окислении модельных биологических мембран уровень указанных молекулярных продуктов ПОЛ достигает максимума в первые минуты инкубации, а затем медленно убывает [2]. Концентрация конечных флуоресцирующих продуктов ПОЛ неуклонно возрастает в ходе развития катаракты. Аналогично, в случае окисления модельных липидов, уровень накопления конечных продуктов ПОЛ — флуоресцирующих шиффовых оснований увеличивается в более поздние промежутки времени инкубации мембран. Таким образом, динамика накопления продуктов ПОЛ в ходе развития катаракты соответствует известным представлениям о временном увеличении образования гидроперекисей и непрерывном накоплении конечных продуктов ПОЛ при автоокислении липидов в биологических мембранах.

Как видно из таблицы, при изучении изменений ультраструктуры мембран хрусталиковых волокон в процессе развития катаракты обнаружены 3 эффекта. На ранних стадиях в зоне помутнения хрусталика липиды и белок-липидные комплексы мембран, которые в норме тесно связаны с другими липидными компонентами мембраны хрусталикового волокна, переходят из мембранной фракции в цитозольную, плазматические мембраны при этом образуют характерные выпячивания, углубления и фрагменты (см. рис. 1). При прогрессировании помутнения отмечаются дальнейшая фрагментация мембран, уменьшение радиуса кривизны мембранных фрагментов (см. коэффициент извитости мембран), увеличение

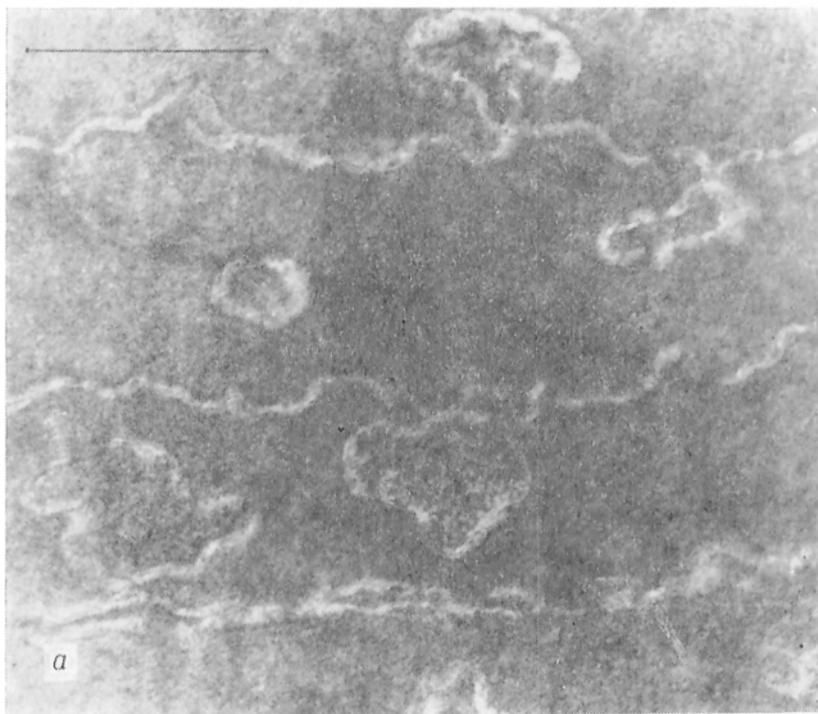


Рис. 1. Электронные микрофотографии хрусталиковых волокон катарактальных хрусталиков человека.

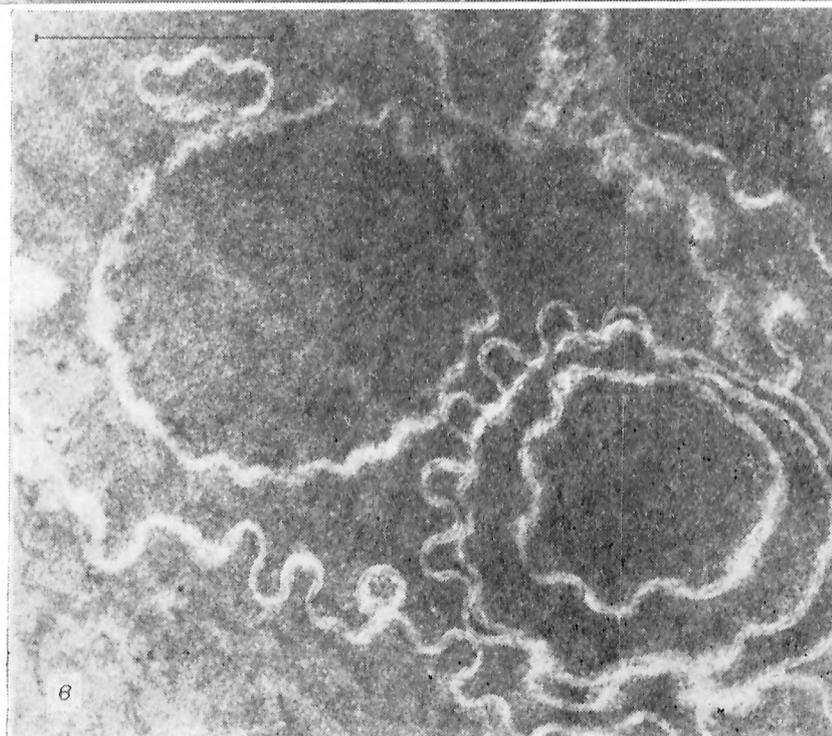
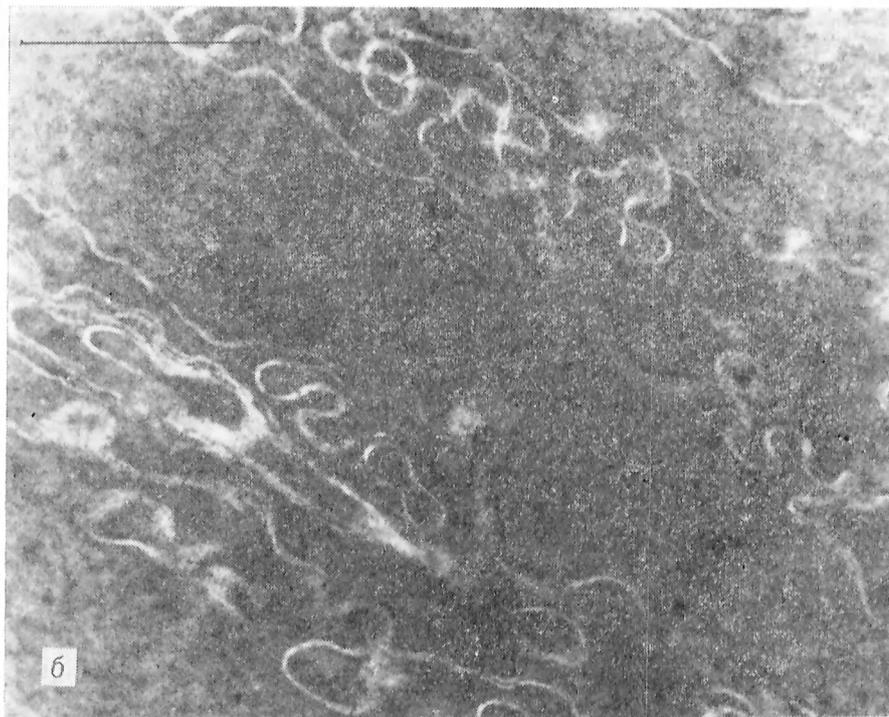
a — начальная катаракта. Срединная зона хрусталика. Видна упорядоченная структура продольных хрусталиковых волокон с «пищковидным» выпячиванием и «гнзедовидными» углублениями плазматической мембраны;

поверхности мембран хрусталиковых волокон, приходящихся на единицу площади волокна (см. рис. 1, *A* и *B*). На стадии выраженного помутнения хрусталика происходит образование крупных (600 нм) примембранных агрегатов, потеря свободных мембран (см. рис. 1, *a* и *б*).

Накопление молекулярных продуктов ПОЛ и структурные изменения в мембранах на различных стадиях развития катаракты

Стадия катаракты	Продукты ПОЛ			Ультраструктурная характеристика повреждения мембран		
	дипероксидные конъюгаты A_{232} на 1 мг липидов	трипероксидные конъюгаты A_{274} на 1 мг липидов	флуоресцирующие шиффовые основания, отн. ед.	коэффициент «вязкости» мембран, отн. ед.	относительная поверхность мембран, $\mu\text{км}^2$ среза 13,5 $\mu\text{км}^2$ среза	наличие глобул и их размер
Прозрачный хрусталик (5)	$1,86 \pm 0,16$	$0,45 \pm 0,06$	$1,0 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,1$	$13,5 \pm 1,1$	Глобулы отсутствуют
Начальная катаракта (6)	$2,38 \pm 0,18$	$0,58 \pm 0,12$	$1,0 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,1$	$27,5 \pm 3,1$	Единичные глобулы (90—150 нм)
Незрелая катаракта (10)	$2,52 \pm 0,12$	$0,66 \pm 0,05$	$2,4 \pm 0,5$	$3,1 \pm 0,2$	$34,5 \pm 5,2$	Отдельные глобулы (200—300 нм)
Почти зрелая катаракта (8)	$2,80 \pm 0,18$	$0,76 \pm 0,06$	$3,0 \pm 0,7$	$1,7 \pm 0,2$	$17,0 \pm 1,2$	Множественные глобулы (400—550 нм)
Зрелая катаракта (10)	$2,20 \pm 0,15$	$0,44 \pm 0,07$	$4,1 \pm 0,7$	$0,8 \pm 0,1$	$13,8 \pm 1,1$	Сливание глобул (500 нм — 1 $\mu\text{км}$)

Примечание. В скобках указано число исследованных хрусталиков.

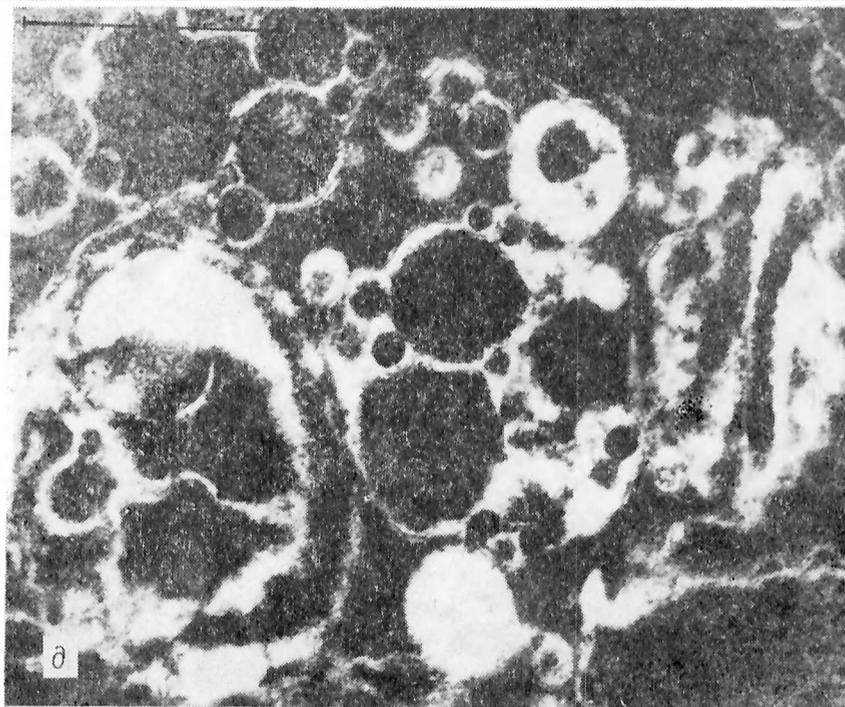
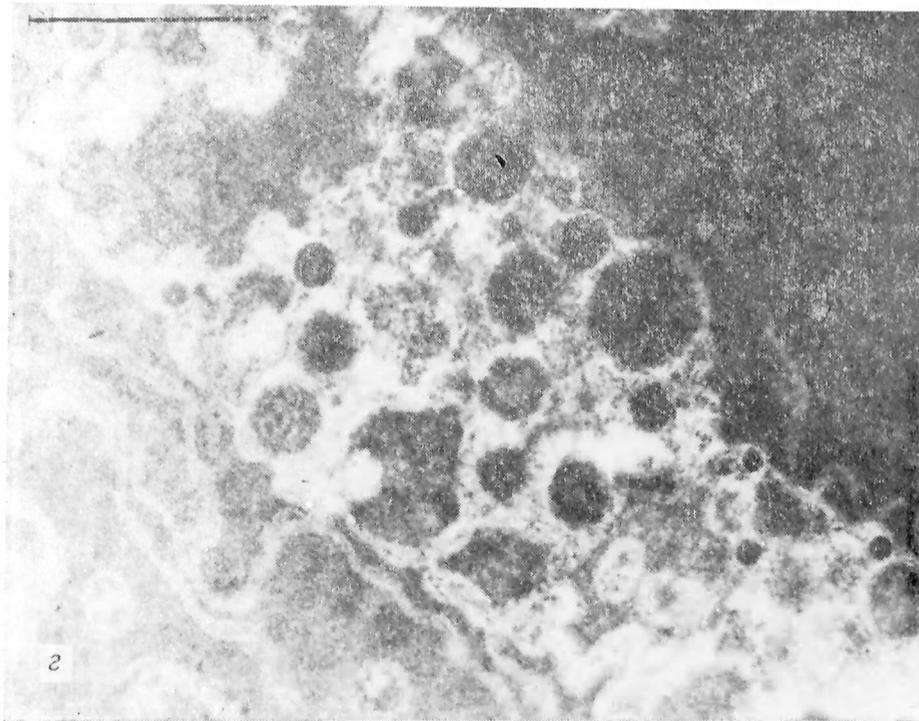


б, в — незрелая катаракта. Срединная зона хрусталика. Плазматические мембраны хрусталиковых волокон образуют нерегулярно расположенные закручивания;

Обсуждение

Какие свойства гидроперекисей фосфолипидов хрусталиковых мембран и продуктов их дальнейших окислитель-

ных превращений могут быть ответственны за наблюдаемое нарушение структурной организации плазматических мембран хрусталиковых волокон? Гидрофобность амфифильных молекул



z — ядерная катаракта; d — зреющая катаракта. Срединная зона хрусталика. Определяются частично дезинтегрированные хрусталиковые волокна, характеризующиеся потерей свободных мембран и образованием глобулярных структур различного размера и плотностей, часть из которых сливается. Отметка на фотографии — 1 мкм.

фосфолипидов определяется их углеводородными цепями, укорочение которых при окислительной деструкции гидроперекисей или их химическая мо-

дификация, приводящая к появлению в жирном ациле полярных гидроксильных и карбонильных групп, неизбежно отразится на их гидрофильно-

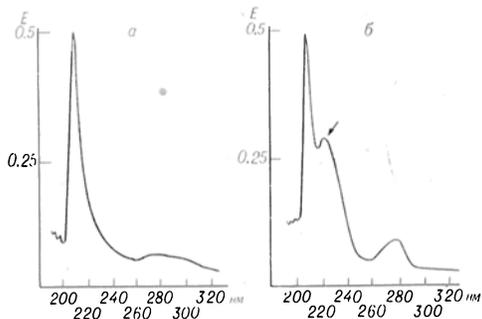


Рис. 2. УФ-спектры поглощения липидных экстрактов из хрусталиков.

a — норма; *b* — почти зрелая катаракта. Стрелкой указан максимум, характерный для поглощения дневных конъюгатов.

гидрофобном балансе [11]. Такие модифицированные молекулы приобретают свойства детергентов, аналогичных лизофосфолипидам, которые образуются под действием фосфолипазы A_2 . Таким образом, в результате ПОЛ в мембране хрусталикового волокна появляются модифицированные кислородом фосфолипиды, способные увеличивать гидрофильность плазматической мембраны и нарушать липид-липидные и белок-липидные взаимодействия. Детергентное действие продуктов окисления фосфолипидов, накапливающихся в мембранах хрусталиковых волокон при катаракте, позволяет дать качественное объяснение наблюдаемому на-

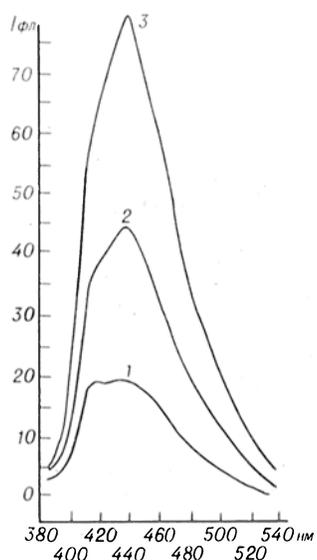


Рис. 3. Характерные спектры флуоресценции липидных экстрактов из хрусталиков при длине волны возбуждения 365 нм.

1 — норма; *2* — незрелая катаракта; *3* — зрелая катаракта.

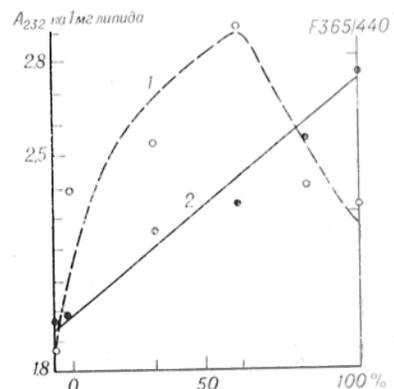


Рис. 4. Динамика накопления продуктов перекисного окисления липидов при помутнении хрусталика.

1 — дневные конъюгаты; *2* — флуоресцирующие продукты ПОЛ. По оси абсцисс — степень помутнения хрусталика (в %). Количественную оценку степени помутнения хрусталиков проводили путем измерения относительных площадей зон помутнения на телевизионном анализаторе изображений со слайда.

рушению организации плазматических мембран. Модифицированные кислородом молекулы фосфолипидов, встраиваясь в бислою, изменяют его геометрию, уменьшая площадь его гидрофобной части, увеличивая кривизну его поверхности за счет уменьшения радиуса мембранной частицы. Этот эффект, по-видимому, и лежит в основе фрагментации мембран и образования более мелких везикул при катаракте. Не исключено также, что изменение геометрии бислоя хрусталиковых мембран может происходить под влиянием комплексообразования фосфолипидов с ионами Ca^{2+} .

Каковы механизмы образования межмолекулярных белковых сшивок при катаракте? Поскольку среди продуктов ПОЛ имеются бифункциональные соединения типа диальдегидов, представляющие собой поперечно сшивающие реагенты, возможно, что одной из причин полимеризации мембранных белков при катаракте является их взаимодействие с этими продуктами ПОЛ. В пользу этого свидетельствует накопление флуоресцирующих продуктов ПОЛ при катаракте. Другая причина образования полимеров кристаллинов может быть связана с тем, что продукты ПОЛ быстро инактивируют SH-группы белков и приводят к истощению системы восстановленного глутатиона в хрусталике. Наряду с этим ковалентное сшивание белков хрусталика возможно в результате их взаимодействия со свободными радика-

лами липидов, возникающими в ходе ПОЛ. В связи вышеуказанным следует отметить, что накопления даже небольшого количества окисленных липидов в мембранах вполне достаточно для индукции дальнейшего окисления белков [9].

Приведенные данные дают основания полагать, что перекисное повреждение мембран хрусталиковых волокон при катаракте не просто сопровождает ее развитие, а является инициаторной причиной указанного заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабичаев М. А., Шведова А. А., Архипенко Ю. В., Каган В. Е. // Бюл. эксп. биол. — 1985. — С. 299—301.
2. Козлов Ю. П., Каган В. Е., Архипенко Ю. В. Молекулярные механизмы повреждения кислородом системы транспорта Ca^{2+} в саркоплазматическом ретикулуме мышц. — Иркутск, 1983. — С. 30—31.
3. Bloemendal H., Zweers A., Vermorken F. et al. // Cell. Different. — 1972. — Vol. 1. — P. 91—106.
4. Bolland J. L., Koch H. P. // J. chem. Soc. — 1945. — Vol. 7. — P. 445—447.
5. Broekhuysse R. M. // The Human Lens in Relation to Cataract / Eds K. Elliot, D. Fitzsimons. — Amsterdam, 1973. — P. 135—149.
6. Broekhuysse R. M., Kuhlmann E. D. // Exp. Eye Res. — 1974. — Vol. 19. — P. 297—302.
7. Chio K. J., Tappel A. L. // Biochemistry (Wash.). — 1969. — Vol. 8. — P. 2821—2827.
8. Cottier E., Obara Y., Toftness B. // Biochim. biophys. Acta. — 1978. — Vol. 530. — P. 267—278.
9. Dahle L. K., Hill E. G., Holman R. T. //

Arch. Biochem. — 1962. — Vol. 98. — P. 253—261.

10. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. H. // J. biol. Chem. — 1957. — P. 226. — P. 497—509.
11. Helenius A., Simons K. // Biochim. biophys. Acta. — 1975. — Vol. 415. — P. 29—79.
12. Spector A. // Invest. Ophthalmol. — 1984. — Vol. 25. — P. 130—145.
13. Vaskovsky V. S., Kostetsky E. Y. // J. Lipid Res. — 1968. — Vol. 9. — P. 396—400.

Поступила 11.02.86

MODIFICATION OF MEMBRANE STRUCTURES IN CATARACT

M. A. Babizhaev, A. I. Deev

Helmholtz Institute of Ophthalmology, Moscow

Early alterations relating to lenticular opacity occurred long before large protein aggregates formation in the lens and in plasma membranes of lens fibres. At the first step of human cataract development membranes contained typical knobs, sockets and fragments. Then, with development of cataract, further fragmentation and undulation of lens membranes were observed; surface of the fibre membranes was increased. At the later steps of lenticular opacity partially desintegrated fragments of lens fibres were detected, free membrane structures disappeared and the globules containing protein-lipid complexes of various size and density were formed; these globules were involved in lenticular opacity. With growing of cataract lipid fraction of the lens accumulated primary (hydroperoxides), secondary (diene conjugates and diene ketons) and the end products (Shiff bases) of lipid peroxidation. Ultrastructure modification of membranes in cataract appear to occur in response to accumulation of the lipid peroxidation products. This suggests that lipid peroxidation not only accompany the cataract development but may be among the main pathogenic factors of the disease.

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 616.155.32-008.939.15-074

Н. П. Таранова, Л. В. Говорова

МИКРОМЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩИХ ЛИПИДОВ В ЛИМФОЦИТАХ И ДРУГОМ БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

Ленинградский НИИ детских инфекций Минздрава РСФСР и Институт физиологии им. И. П. Павлова АН СССР, Ленинград

Для оценки состояния мембранных структур лимфоцитов, макрофагов, нейтрофилов и других клеток белой крови в норме и при различных патологических состояниях необходимы точные сведения о содержании и состава

ве липидов в этих клетках. Однако современные методы непригодны для определения содержания общих липидов в лимфоцитах и других клетках белой крови, так как их чувствительность недостаточна для определения содержания липидов в том количестве лимфоцитов, которое можно получить из имеющихся в распоряжении исследователя 5—6 мл периферической крови (порядка $3\text{--}6 \cdot 10^6$ лимфоцитов, масса которых составляет 4—5 мг). Так, гравиметрический метод [2] требует не менее 0,2—1,0 г ткани и не обеспечивает достаточной точности определения из-за необходимости упаривать большие объемы липидного экстракта в сосудах, масса которых обычно на 2—3 порядка превышает таковую липидного остатка. Более точный колориметрический, сульфо-фосфорно-ванилиновый метод [1, 6] также непригоден для исследования суспензии лимфоцитов, так как требует 50 мг биологического материала, что на порядок больше, чем масса лимфоцитов, доступная для анализа. Кроме того, этот метод не лишен погрешностей, связанных с возможностью участия в цветной реакции с фосфорно-ванилиновым реактивом ненелипидных примесей, в частности углеводов, присутствующих в любых клетках.

Целью настоящей работы была разработка достаточно чувствительного и точного микрометода, пригодного для определения содержания суммарных липидов в лимфоцитах и других клетках белой крови или в любом другом биологическом материале.

Методика

Лимфоциты выделяли из 2 мл гепаринизированной периферической крови по методу [4] на градиенте верографина ($1,076 \text{ г/см}^3$) с последующей трехкратной промывкой 0,8 % NaCl. Осадок лимфоцитов суспендировали в 0,3 мл 0,8 % NaCl. Чистоту выделенной фракции лимфоцитов и их целостность контролировали при помощи светооптической микроскопии и количество клеток в суспензии подсчитывали в камере Горяева. Из 2,0 мл крови обычно получали $1,5\text{--}3,0 \cdot 10^6$ лимфоцитов.

Суммарные липиды экстрагировали из суспензии клеток по методу [3] смесью хлороформ — метанол (2 : 1), применяя для этой цели хлороформ для тонкослойной хроматографии (ТСХ), или обычный хлороформ, высушенный над безводным Na_2SO_4 и перегнанный. Метанол высушивали над K_2CO_3 и перегоняли.

Для гидролиза сухого остатка липидов применяли концентрированную H_2SO_4 (98 %, плотность 1,8365), хранившуюся в условиях,

не допускавших поглощения паров воды, либо концентрированную H_2SO_4 , выдерживающую пробу Савая. Для приготовления стандартного раствора триолеина (8 г/л) и для его разведения использовали перегнанный 96 % этанол. Фосфорно-ванилиновый реактив для цветной реакции (ванилин 10 ммоль/л + ортофосфорная кислота 11 моль/л) готовили следующим образом: 0,6 % водный раствор ванилина смешивали с концентрированной H_3PO_4 в соотношении 1 : 4 (об/об). Для этих целей можно также использовать готовый стандартный раствор триолеина и готовый фосфорно-ванилиновый реактив из набора «Общие липиды» фирмы «Лаксма» (ЧССР).

Результаты и обсуждение

Принцип метода: липиды экстрагируют из суспензии клеток хлороформ-метаноловой смесью, отмывают липидный экстракт от ненелипидных примесей, концентрируют липиды, упаривая растворитель, и гидролизуют сухой остаток липидов в минимальном объеме (0,2 мл) концентрированной H_2SO_4 , после чего проводят цветную реакцию гидролизата с фосфорно-ванилиновым реактивом и определяют содержание липидов в пробе по интенсивности окраски продуктов реакции.

Механизм реакции: ненасыщенные липиды реагируют с H_2SO_4 при нагревании смеси с образованием карбонового аниона; H_3PO_4 эстерифицирует ОН-группу ванилина; карбоновый ион взаимодействует с активированной карбонильной группой фосфата ванилина; в результате реакции образуется стабилизированный окрашенный комплекс.

Чтобы найти оптимальные условия определения общих липидов в минимальном количестве биологического материала была проделана предварительная работа по подбору количества липидов в пробе, объема H_2SO_4 для гидролиза и фосфорно-ванилинового реактива и их соотношения для цветной реакции, объема окрашенной жидкости для фотометрирования, по проверке стабильности окраски и пр. На основе результатов этих предварительных исследований был разработан микрометод, описание которого приводится ниже.

Липиды экстрагируют из 0,3 мл суспензии лимфоцитов 20-кратным объемом смеси хлороформ — метанол (2 : 1), прогревают при 55°C на водяной бане в течение 15 мин с последую-

щей фильтрацией через обезжиренный фильтр в мерный цилиндр или мерную пробирку на 10—15 мл с притертой пробкой. Для удаления нелипидных примесей к экстракту добавляют 0,75% раствор KCl (из расчета 1 мл на 5 мл экстракта), энергично встряхивают 2—3 мин до образования белой эмульсии и оставляют на сутки. После расслоения эмульсии на 2 фазы верхний водно-метаноловый слой удаляют, а нижний слой промывают дважды, добавляя по 1 мл «теоретической верхней фазы» (смесь хлороформ : метанол : H₂O — 3 : 48 : 47). Нижнюю хлороформную фазу (общий липидный экстракт лимфоцитов) доводят хлороформ-метаноловой смесью до определенного объема (в нашем случае до 4 мл), объем записывают.

Для определения содержания общих липидов 0,5 мл липидного экстракта переносят в тонкостенную пробирку (10×1 см), упаривают досуха на водяной бане при 55 °С, добавляют 0,2 мл концентрированной H₂SO₄ и помещают на 15 мин в кипящую водяную баню для гидролиза липидов, после чего штатив с пробирками переносят в холодную водяную баню. Затем отбирают 0,05 мл гидролизата в сухую пробирку, добавляют 0,75 мл фосфорнованилинового реактива, тщательно перемешивают содержимое и оставляют на 45 мин в темноте для развития окраски. Интенсивность розовой окраски продуктов реакции измеряют при длине волны 540 нм (зеленый светофильтр) на микрофотоэлектроколориметре МКМФ-1 в кювете с толщиной слоя 5 мм (объем жидкости 0,8 мл)

против пробы контроля, в котором обрабатывали 0,5 мл хлороформа так же, как исследуемую пробу. Одновременно с липидными экстрактами аналогичным образом обрабатывают 3—4 разведения стандартного раствора триолеина для проверки калибровочной кривой. Содержание общих липидов в пробе липидного экстракта лимфоцитов находят по калибровочной кривой, для построения которой стандартный раствор триолеина (8 г/л) разводят в 20 раз этиловым спиртом или хлороформом и обрабатывают аликвотные порции рабочего раствора стандарта (400 мкг/мл) от 10 до 200 мкг (что соответствует 2,5—5,0 мкг триолеина в 0,05 мл гидролизата, отобранного для цветной реакции), так же как липидный экстракт лимфоцитов. Содержание общих липидов в лимфоцитах выражают в микрограммах на 10⁶ клеток. Расчет производят с учетом количества лимфоцитов в суспензии, общего объема липидного экстракта, объема, взятого для анализа и объема гидролизата, взятого для цветной реакции.

В целях проверки стабильности и воспроизводимости получаемых результатов сопоставляли данные анализы параллельных проб при построении калибровочных кривых с использованием стандартных растворов триолеина при различных сроках хранения. Результаты, представленные в табл. 1, свидетельствуют о стабильности и хорошей воспроизводимости калибровочной кривой в течение 5 мес, т. е. срока проведения исследований. При этом разброс величин экстинкции для каж-

Таблица I
Воспроизводимость калибровочной кривой для определения общих липидов при E₅₄₀ (толщина слоя 5 мм)

Количество липидов в 0,05 мл гидролизата стандарта, мкг	Стандарт I		Стандарт II	
	дата проведения исследований			
	19.04	16.07	26.08	30.09
2,5	0,035±0,000	0,037±0,000	0,040±0,002	0,042±0,002
5,0	0,075±0,000	0,070±0,002	0,080±0,002	0,085±0,005
10,0	0,150±0,005	0,140±0,005	0,150±0,005	0,155±0,010
20,0	0,305±0,010	0,315±0,005	0,320±0,010	0,325±0,010
30,0	0,465±0,010	0,460±0,010	0,460±0,015	0,475±0,010
40,0	0,600±0,015	0,600±0,010	0,630±0,020	0,610±0,020
50,0	0,765±0,015	0,780±0,010	0,800±0,015	0,790±0,020
Число параллельных проб	3	4	3	3

Результаты определения общих липидов при E₅₄₀ в липидном экстракте из лимфоцитов периферической крови детей

Пациент	Количество лимфоцитов в исследуемой суспензии, · 10 ⁶	Объем анализируемого липидного экстракта, мл	Параллельные пробы			Содержание липидов, мкг	
			I	II	III	в 1,0 мл экстракта	в 10 ⁶ лимфоцитов
А	4,2	0,5	0,400	0,410	0,405	204,0	195,3
		1,0	0,820	0,810	0,815	208,0	198,1
Б	2,0	0,5	0,147	0,150	0,140	76,0	152,0
		1,0	0,295	0,290	0,300	74,0	148,0
В	1,8	0,5	0,210	0,210	0,205	100,0	222,2
		0,5	0,200	0,205	0,210	100,0	222,2
		1,0	0,405	0,400	0,410	102,0	226,7

дой концентрации липидов был незначительным и средняя ошибка не превышала 2%. Это позволяет при исследовании лимфоцитов не строить каждый раз новую калибровочную кривую (от 2,5 до 50 мкг в пробе гидролизата), а ограничиваться 3 пробами стандарта — 5, 10 и 15 мкг липидов в 0,05 мл гидролизата (соответственно 20, 40 и 60 мкг в пробе стандарта для гидролизата) в связи с тем, что содержание липидов в исследуемых пробах липидного экстракта лимфоцитов обычно не превышает этих границ.

Для проверки стабильности и воспроизводимости результатов определения общих липидов предлагаемым способом было определено их содержание в 3 параллельных пробах липидного экстракта лимфоцитов периферической крови 3 детей, причем в разных объемах того же липидного экстракта. Полученные данные, представленные в табл. 2, свидетельствуют о хорошей стабильности и воспроизводимости результатов анализа параллельных проб в широком диапазоне колебаний количества липидов в пробе. Средняя ошибка параллельных определений в этих экстрактах не превышает 2%.

Таким образом, предлагаемый метод позволяет стандартизировать условия исследования и повышает точность и специфичность анализа, так как предварительная экстракция липидов хлороформметаноловой смесью и очистка экстрактов позволяют отделить нелипидные примеси, мешающие определению, и исключают погрешность, неизбежную при непосредственном исследовании суспензии клеток за счет варьирующего количества клеток в аликвоте суспензии. Предусмотренное в этом методе концентрирование

липидов за счет упаривания липидного экстракта досуха и уменьшения объема гидролизата и фосфорно-ванилинового реактива позволяет в 10 раз повысить чувствительность сульфопосфорно-ванилинового метода определения общих липидов и сделать его пригодным для определения содержания липидов в ничтожно малом количестве биологического материала — порядка 4—5 мг.

Предлагаемый метод апробирован в Ленинградском НИИ детских инфекций Минздрава РСФСР. Исследованы лимфоциты периферической крови 16 практически здоровых детей в возрасте от 3 до 6 лет и установлено, что содержание общих липидов колеблется от 115,2 до 299,7 мкг на 10⁶ лимфоцитов. Это свидетельствует о том, что предлагаемый метод позволяет определять микроколичества липидов, содержащихся в лимфоцитах, и использовать для этой цели всего (1,5—3,0) · 10⁶ клеток, которые могут быть получены из 1,5—2,0 мл крови. При этом большая часть липидного экстракта (3 из 4) остается для исследования других показателей липидного состава лимфоцитов.

Предлагаемый метод может быть рекомендован для использования с целью определения содержания общих липидов не только в лимфоцитах, но и в других клетках крови человека и экспериментальных животных, а также в липидных экстрактах из других тканей, клеток и субклеточных органелл.

ЛИТЕРАТУРА

1. Колб В. Г., Камышников В. С. Справочник по клинической химии. — Минск, 1982. — С. 201—203.
2. Прохорова М. И., Тушикова З. И. Большой

- практикум по углеводному и липидному обмену. — Л., 1965. — С. 107.
3. Folch Y., Lees M., Sloane-Stanly G. // J. biol. Chem. — 1957. — Vol. 227. — P. 497—509.
4. Mendes N. F., Miki S. S., Peixinho Z. F. // J. Immunol. — 1974. — Vol. 113. — P. 534—536.
5. Zollner N., Kirsch K. // Z. ges. exp. Med. — 1962. — Bd 135. — S. 545—561.

Поступила 30.03.86

MICROMETHOD FOR ESTIMATION OF TOTAL LIPIDS IN LYMPHOCYTES AND OTHER BIOLOGICAL MATERIAL

N. P. Taranova, L. V. Govorova

Institute of Child Infections, Ministry of Public Health of the RSFSR, I. P. Pavlov Institute of Physiology, Academy of Sciences of the USSR, Leningrad

A micromethod, developed for estimation of total lipids in lymphocytes, other blood cells and body tissues, involved extraction of lymphocyte suspension with chloroform-methanol mixture, elimination of non-lipid impurities by means of the extract washing, concentration of the lipid fraction and hydrolysis of dry pellet in minimal volume of concentrated H_2SO_4 . After

reaction of the hydrolyzate with phosphorus-vanillin reagent the colour intensity of the reaction products was measured. The procedure described was sensitive and enabled to estimate lipids in minimal volume of biological material; in the lymphocyte fraction isolated from 2 ml of peripheric blood total lipids were measured with accuracy of 1-2 mg.

УДК 616.153.962.3-074:543.545

Г. В. Загоруйко, Г. Ю. Ажицкий, Г. В. Троицкий

ДВУХМЕРНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ПРОДУКТОВ ОГРАНИЧЕННОГО ГИДРОЛИЗА СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ФОКУСИРОВАНИЯ В БОРАТ-ПОЛИОЛЬНОЙ СИСТЕМЕ

Крымский медицинский институт, Симферополь

За последнее время в биохимии получили большое развитие методы сравнительного анализа белков и отдельных полипептидов с применением двухмерного фракционирования. В хорошо известной методике O'Farrell P. H. в первом направлении используют изоэлектрофоретическую систему (ИЭФС) с амфолинами, а во втором — ступенчатый электрофорез в присутствии додецилсульфата Na (ДДС Na) [5]. Однако ИЭФС в амфолинах дает различные комплексы с белками, фон при окрашивании и затрудняет идентификацию пептидов из-за их общей природы с амфолинами [6]. Борат-полиольное изоэлектрическое фокусирование позволяет проводить эффективное разделение пептидов, что было показано на дипептидах [2].

Для того чтобы фракционировать сложные пептидные смеси с отдельными компонентами разной молекулярной массы, в том числе продукты ограниченного пепсинового гидролиза альбумина человека, использовали изоэлектрическое фокусирование в борат-полиольной системе в сочетании с известным методом SDS-фореза в градиенте полиакриламидного геля (ПААГ).

Методика

В работе использовали альбумин сыворотки крови доноров, L-цистеин х.ч., пепсин («Sigma», США), мочевины х.ч., сахарозу («Serva», ФРГ). ПААГ готовили на реактивах фирмы «Reanal» (ВНР). Мономер сывороточного альбумина человека (САЧ) выделяли методом препаративного электрофореза на вертикальных блоках ПААГ [1]. Чистоту препарата контролировали методом диск-электрофореза с использованием трис-глицериновой буферной системы [3]. После элюирования альбумина для защиты SH-групп добавляли L-цистеин из расчета 5 моль на 1 моль альбумина.

Продукты ограниченного гидролиза САЧ пепсином получали ранее описанным методом в присутствии каприловой кислоты [4]. Получено 3 больших фрагмента САЧ и несколько минорных. Продукты гидролиза диализовали в течение суток против дистиллированной воды. Затем проводили ИЭФС фрагментов в 7% ПААГ с использованием трис-боратной системы. В качестве исходного раствора использовали 0,1 М раствор борной кислоты, оттитрованный 0,2 М триса до pH 7,0. Для приготовления градиентного ряда pH готовили два раствора: раствор № 1 — 4 мг рибофлавина на 100 мл буфера и раствор № 2 — 600 мл буферного раствора + 0,24 мл ТЭМЕД + 24 мл раствора № 1.

Градиент pH в интервале 4,0—7,0 создавали глицерином ч.д.а. от 0 до 55% на растворе № 2. Десять фракций градиентного ряда содержали 7% цианогум-41 («Serva», ФРГ) и 6 М мочевины. Стандартные стек-

лянные трубки (внутренний диаметр 0,5 см, длина 10 см) в виде пакета помещали в химический стакан и перистальтическим насосом поделывали поочередно все растворы градиентного ряда, начиная с самого щелочного. После 4 ч фотополимеризации трубки с гелем помещали в прибор для вертикального диск-электрофореза ИЭФА-1. В верхнюю часть каждой трубки вносили по 100 мкг образца, содержащего 10 % сахарозы. Изоэлектрическое фокусирование проводили в течение 24 ч при градиенте потенциала 12 В/см. После ИЭФС гелевые столбики извлекали, делали 2 продольных среза. Один слой геля — контрольный — окрашивали кумасси R = 250 с последующим отмыванием 6 % CH_3COOH , второй слой служил для измерения pH. Третью часть гелевого столбика использовали при анализе во втором направлении.

Во втором направлении фрагменты САЧ разделяли электрофорезом в пластинке ПААГ размером 12×12 см и толщиной 1 мм. В качестве рабочего геля до уровня 2 см ниже верхнего края пластинки полимеризовали линейный градиент концентрации ПААГ (7—25 %) в 0,375 М трис-НСl pH 8,9 с добавлением 0,1 % ДДС Na, стабилизированный сахарозой. Формирующий гель представлял собой 4,7 % ПААГ, полимеризованный в 0,125 М трис-НСl pH 6,8 с 0,1 % ДДС Na.

В полость над пластинкой помещали цилиндрок геля и полимеризовали его в растворе 4,7 % ПААГ. В качестве верхнего электроодного буфера использовали трис-глициновый буфер с 0,1 % ДДС Na pH 8,3 и лидирующим красителем бромфеноловым синим. Электрофорез вели 5 ч при силе тока 20 мА и напряжении 220 В на пластинку. После электрофореза гель извлекали, белки фиксировали сутки в растворе, содержащем 57 г ТХУ, 17 г сульфосалициловой кислоты, 150 мл этанола в 500 мл дистиллированной воды. Для окрашивания белковых пятен использовали 0,1 % раствор кумасси R = 250 в 50 % этаноле и 10 % уксусной кислоты в течение 4 ч при 40 °С. Гель отмывали 6 % уксусной кислотой.

Результаты и обсуждение

Одномерный электрофорез продуктов ограниченного гидролиза САЧ пепсином в градиенте ПААГ (4—25%) с 0,1 % ДДС Na дает 7 белковых полос, включая нерасщепленный альбумин, который служит внутренним маркером. Зона содержит 3 больших фрагмента с молекулярной массой около 44 000, 32 000 и 29 000 Д и более мелкие пептиды, молекулярная масса которых не превышала 24 000 Д (рис. 1, см. на вклейке). ИЭФС в борат-полиольной системе продуктов гидролиза САЧ выявляет 8 белковых зон в диапазоне pH от 5,1 до 6,5 (рис. 2, см. на вклейке). Последующий SDS-форез (второе направление) в градиенте ПААГ дает 11 белковых пятен, хорошо различимых после окрашивания кумасси R = 250 (рис. 3, см. на вклейке). Этот результат свидетельствует о воз-

можности разделить пептиды с близкими значениями pI и повысить разрешающую способность метода. С целью демонстрации возможности применения метода борат-полиольного ИЭФС в сочетании с SDS-форезом в градиенте ПААГ приведена фотография пептидной карты продуктов ограниченного пепсинового гидролиза САЧ.

При проведении ИЭФС продуктов гидролиза САЧ необходимо вводить 6 М мочевины для лучшего растворения компонентов. В отсутствие мочевины продукты пептического гидролиза в борат-полиольной системе не разделяются. Необходимо обратить внимание на тот факт, что при разрушении градиента pH перед электрофорезом во втором направлении возможно размывание белковых зон, что ведет к размыванию пятен на карте. Чтобы избежать потерь белка при электрофорезе и улучшить разрешающую способность метода, гелевый столбик после ИЭФС необходимо вымачивать в течение 2 мин в 0,3 М HCl, а затем подсушить его фильтровальной бумагой.

Таким образом, сочетание ИЭФС в борат-полиольной системе с тонкослойным SDS-форезом в градиенте ПААГ улучшает разрешающую способность метода при фракционировании белков и пептидов. Полученные данные позволяют рекомендовать описанный метод для идентификации белков и изучения продуктов их гидролиза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ажицкий Г. Ю., Багдасарьян С. Н. // Лаб. дело. — 1975. — № 12. — С. 712—714.
2. Ажицкий Г. Ю., Шарова Т. К., Хирса Л. Н., Троицкий Г. В. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 1. — С. 48—51.
3. Маурер Г. Диск-электрофорез: Пер. с нем. — М., 1971.
4. Geisow M. J., Beaven G. H. // Biochem. J. — 1977. — Vol. 161. — P. 619—625.
5. O'Farrell P. H. // J. Biol. Chem. — 1975. — Vol. 250. — P. 4007—4021.
6. Righelli P. G., Chillemi F. // J. Chromatogr. — 1978. — Vol. 157. — P. 248—251.

Поступила 16.08.85

TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS OF THE PRODUCTS OBTAINED AFTER LIMITED HYDROLYSIS OF HUMAN BLOOD SERUM ALBUMIN USING ISOELECTRIC FOCUSING IN BORATE-POLYOL SYSTEM

G. V. Zagorul'ko, G. Yu. Azhitsky, G. V. Troitsky

Crimean Medical School, Simpheropol

A procedure developed involved isoelectrofocusing in borate-polyol system and thin-layer electrophoresis in polyacrylamide gel gradient

containing sodium dodecylsulfate of the products of human blood serum albumin obtained after partial hydrolysis. The first dimension isoelectrofocusing in borate-polyol system allowed to separate peptides with close values of pI and to increase the procedure sensitivity. The

procedure may be recommended for identification of proteins, for estimation of the protein degradation in hydrolysis as well as for studies of peptide maps of albumin under normal and pathological states.

ХРОНИКА

УДК 612.822.1:[547.95:547.943]+615.31:[547.95:547.943].03:061.3(47+57)«1985»

В. Д. Слепушкин

О I ВСЕСОЮЗНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ «НЕЙРОПЕПТИДЫ: ИХ РОЛЬ В ФИЗИОЛОГИИ И ПАТОЛОГИИ»

I Всесоюзная конференция по нейропептидам была проведена 19—20 ноября 1985 г. в Томске на базе Сибирского филиала (СФ) Всесоюзного кардиологического научного центра (ВКНЦ) АМН СССР. Конференция была организована Минздравом СССР совместно с Академией медицинских наук СССР и Всесоюзным кардиологическим научным центром. В работе конференции приняло участие 60 делегатов из 40 научных и учебных заведений Минздрава СССР, АМН СССР, Минздрава РСФСР, АН СССР, ВАСХНИЛ, Министерства высшего и среднего специального образования СССР, АН союзных республик — Белорусской, Латвийской и Армянской.

В 1-й день на пленарном заседании было заслушано 5 докладов.

В докладе доктора мед. наук В. А. Виноградова (ВКНЦ АМН СССР, Москва) были представлены данные исследования пептидов с цитопротективной активностью. В частности, один из синтетических аналогов энкефалинов — даларгин, синтезированный в лаборатории синтеза пептидов, — разрешен Фармакологическим комитетом Минздрава СССР для клинических испытаний в качестве противоязвенного средства. Имеется клинический опыт использования этого препарата, показавший его эффективность. В докладе рассмотрены превращения даларгина в организме, его фармакокинетика, синтез новых препаратов, лишенных опиоидной активности, возможности создания лечебных препаратов из группы нейропептидов для перорального применения.

В докладе доктора мед. наук В. Д. Слепушкина (СФ ВКНЦ АМН СССР, Томск) сообщены итоги исследований нейропептидов в эксперименте и внедрения даларгина в клиническую практику согласно региональной кооперативной программе «Нейропептиды» в рамках Сибирской программы РОИМЭКС-2. Показано, что в механизме действия нейропептидов при ряде экстремальных ситуаций участвуют снижение активности симпатико-адреналовой системы, нормализация нейрогуморальных систем и метаболизма, уменьшение активности перекисного окисления липидов. Установлено, что даларгин может быть успешно использован для ограничения зоны инфаркта миокарда. Обсуждали использование даларгина у больных

с острым инфарктом миокарда и облитерирующим атеросклерозом. Рассмотрены перспективы использования нейропептидов, в частности для лечения шока и атеросклероза.

Доклад В. К. Луценко (Институт общей патологии и патологической физиологии АМН СССР, Москва) посвящен факторам пептидной природы, обуславливающим латерализацию мышечного тонуса в условиях генерации патологически усиленного возбуждения. Показано, что указанные факторы имеют небольшую молекулярную массу, термоустойчивы, инактивируются пептидазами.

В докладе проф. А. И. Белкина (Московский НИИ психиатрии) указано, что даларгин у больных хроническим алкоголизмом ослаблял явления абстиненции. Действие даларгина зависело от психоэмоционального поведения больного и от исходного состояния нейрогуморальных систем (содержания АКТГ и кортизола).

Доклад проф. О. Б. Ильинского (ВКНЦ АМН СССР, Москва) был посвящен участию нейропептидов, в том числе и вещества Р, в процессах репарации. Под влиянием энкефалинов, вещества Р происходил процесс регенерации кожных ран, переломов, инфарктированного миокарда. Докладчик отметил успешное применение даларгина для лечения тугоухости у детей, сформулировал концепцию об участии нейропептидов в организации структурного гомеостаза.

В докладе проф. Р. И. Кругликова (Институт высшей нервной деятельности АН СССР, Москва) приведены данные об участии нейропептидов различных классов в процессе обучения и консолидации памяти.

На последующих заседаниях был заслушан ряд докладов по изучению структуры, биологических свойств и клинических аспектов применения нейропептидов. Так, в сообщениях С. А. Булгакова (Минздрав СССР, Москва) и Н. Н. Ламборт (МОНИКИ) отмечено успешное применение даларгина в комплексном лечении больных с язвенной болезнью желудка и язвенного колита. С. А. Титова (Институт скорой помощи им. Н. В. Склифосовского, Москва) и Н. Г. Крицка (СФ ВКНЦ АМН СССР, Томск) показали, что даларгин способствует излечению при экспериментальном