

ТОМ XXXIII

ВЫПУСК 3

МАЙ — ИЮНЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

ВОПРОСЫ  
МЕДИЦИНСКОЙ  
ХИМИИ



МОСКВА МЕДИЦИНА 1987



---

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. И. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВКИН, Л. А. ЛОКШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАН-  
ЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ, Е. Л. РОЗЕНФЕЛЬД, Ю. А. РОМАКОВ (ответствен-  
ный секретарь), В. А. САКС, С. Е. СЕВЕРИН, В. Б. СПИРИЧЕВ, В. А. ТУТЕЛЬЯН

---

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БАЕВ А. А. (Москва)  
БЕЛИЦЕР В. А. (Киев)  
БЫЧКОВ С. М. (Москва)  
КОНС АНТИНОВ А. А. (Хабаровск)  
КУДРЯШОВ Б. А. (Москва)  
ЛЯХОВИЧ В. В. (Новосибирск)  
ПАСХУНА Т. С. (Москва)

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

---

Л. П. Алексеенко, В. Н. Орехович

## НОВОЕ В ПРОБЛЕМЕ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ РЕГУЛЯЦИИ: ЭНДОКРИННАЯ ФУНКЦИЯ СЕРДЦА (Обзор)

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Центральный орган кровообращения — сердце — изучается со времен глубокой древности, и, казалось бы, в настоящее время невозможны какие-либо фундаментальные научные открытия в области его структуры или физиологии. Однако это не так: одна из очень важных его функций оставалась до последнего времени неизвестной. В 1983—1985 гг. начата публикация серии работ, показавших, что сердце является эндокринным органом. Его предсердия синтезируют и секретируют в кровь пептидные гормоны, регулирующие диурез, экскрецию электролитов с мочой и сосудистый тонус. Располагая такой регуляторной системой, сердце способно освобождаться от избыточного объема циркулирующей жидкости и регулировать артериальное давление. В настоящее время эта проблема является одной из «горячих точек» в биохимии. Количество публикуемых работ приобретает лавинообразный характер. За очень короткий срок пептиды предсердий были выделены, определена их первичная структура и осуществлен химический синтез. В настоящее время эти пептиды поступают в продажу: их названия можно встретить в коммерческом каталоге фирмы «Sigma» за 1986 г.

Выявление эндокринной системы сердца является одним из фундаментальных современных открытий. Оно коренным образом изменяет наши представления о регуляции гемодинамики в организме, о механизме сохранения кардиоваскулярного гомеостаза. Пептидная регуляторная система сердца — это релаксантная, сосудорасширяющая система; до ее открытия в механизме становления гомеостаза рас-

сматривались только прессорные, сосудосуживающие системы: ренин-ангиотензиновая и системы нейронов, секретирующих норадреналин [9]. Ключевая роль карбоксикацептсина — ангиотензинпревращающего фермента — в регуляции ренин-ангиотензин-кининовой системы была открыта в Институте биологической и медицинской химии группой сотрудников во главе с В. Н. Ореховичем [17]. Регуляторная система сердца в становлении сосудистого гомеостаза как бы противопоставлена этим прессорным системам. Пептиды предсердий расслабляют кровеносные сосуды в присутствии ангиотензина II и норадреналина даже тогда, когда их концентрации на порядок превышают концентрацию атриопептидов. Сердце, таким образом, обладает возможностью отменять химические сигналы, посылаемые клеткам другими регуляторными системами [16]. Основное действие атриопептидов направлено на почки. Они снижают резистентность сосудов почек, усиливают клубочковую фильтрацию, стимулируют выведение ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$ , угнетая их реабсорбцию в дистальных каналах нейронов [13, 36]. Действие на почки усиливается вследствие подавления прессорного воздействия на почки ангиотензина II и угнетения стимулированной секреции альдостерона, задерживающего ионы  $\text{Na}^+$  в организме [7, 34].

Фармакологические исследования показали, что действие пептидов предсердий начинается быстро и в течение 1—2 мин достигает максимума. Диурез и экскреция ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  усиливаются в десятки раз, но выведение ионов  $\text{K}^+$  повышается слабо. После однократного введения животному экс-

тракта предсердий или раствора синтетического пептида их действие заканчивается в течение 20 мин.

Открытие эндокринной системы сердца, по-видимому, совершит переворот в клинической медицине: традиционные представления о генезе сердечно-сосудистых заболеваний, болезней почек, спонтанных гипо- и гипернатриемий будут пересмотрены и, очевидно, будут созданы новые лекарственные средства и принципиально новые методы лечения этих болезней. Есть основания надеяться, что успешная разработка этой проблемы позволит лечить заболевания, в настоящее время считающиеся неизлечимыми.

В обзоре будут рассмотрены вопросы, касающиеся секреторной функции предсердий, химической природы и структуры атриопептидов и их предшественника, стимуляции секреции атриопептидов, рецепторов на их клетках-мишенях, их биологической активности, способов тестирования и распространения их в организме, значения этих пептидов для медицинской практики.

Честь открытия эндокринной системы сердца принадлежит канадскому исследователю гистохимику Де Болду [9, 10]. К настоящему времени опубликовано несколько обзоров по атриопептидам [11, 19, 24, 44, 52, 55].

В 50-е годы текущего столетия гистологи заметили, что мышечные клетки (кардиоциты) предсердий коренным образом отличаются от кардиоцитов желудочков [40]. При электронной микроскопии было выявлено, что кардиоциты предсердий содержат в своей саркоплазме округлые плотные для электронов гранулы, а в кардиоцитах желудочков такие гранулы отсутствуют. Естественно, в 50—60-е годы природу этих гранул выявить не могли, предполагали [54], что они служат местом накопления и хранения катехоламинов. Спустя десятилетие с помощью электронного микроскопа были выявлены и другие, не менее существенные отличия кардиоцитов желудочков от кардиоцитов предсердий: в структуре последних наблюдаются интенсивно развитый шероховатый эндоплазматический ретикулум, большое количество цистерн аппарата Гольджи и связанных с ними микровезикулярных элементов [37]. «Специфические гранулы предсердий» тесно

связаны с аппаратом Гольджи и явно происходят из него. Весь этот комплекс органелл очень напоминает структуру типичных секреторных клеток, таких, как клетки поджелудочной железы или гипофиза — органов, продуцирующих полипептидные гормоны. Однако прошли десятилетия, прежде чем удалось установить, какие именно вещества синтезирует и секретирует в кровь сердце и какова функция вырабатываемых сердцем гормонов.

В 70-е годы из мочи и плазмы крови человека и животных извлекали некий неочищенный материал, усиливающий экскрецию ионов  $\text{Na}^+$  с мочой [11]. Однако его природа и тканевое происхождение установлены не были. Тогда же физиологи показали, что механическое раздражение барорецепторов предсердий вызывает обильное выделение мочи и электролитов; это приводит к снижению циркулирующего объема жидкости у подопытных животных [23]. Такой же эффект наблюдается и при введении экстракта предсердий [11]. Экстракты миокарда желудочков такого действия не оказывают. В настоящее время с помощью флюоресцентных антител и современной микроскопической техники получены прямые доказательства, что диуретический эффект связан именно с секреторными гранулами, содержащими специфические атриопептиды [58]. Считают [1], однако, что видимые в электронном микроскопе гранулы связаны с формой хранения пептидов. Хранящийся в гранулах высокомолекулярный материал требует дальнейшего процессинга, чтобы стать секретуемой формой атрионатрийуретического фактора (ANF).

Итак, диуретическим и натрийуретическим свойствами обладают пептиды, синтезируемые и секретируемые предсердиями млекопитающих. Они получили общее название «атрионатрийуретический фактор» (ANF). Синонимы этого распространенного названия: кардионатрины, атриопептины, аурикулины, пептиды предсердий, атриопептиды.

Клетки миокарда предсердий оказались дуалистичными по своей природе. С одной стороны, это типичные мышечные сократительные клетки, а с другой — типичные эндокринные секреторные клетки, осуществляющие многоступенчатые процессы синтеза и

секреции пептидов. Клетки миокарда предсердий, выполняющие столь схожие функции, как мышечное сокращение и функции эндокринной клетки, по-видимому, в организме млекопитающих уникальны. Они модулируют свою сократительную функцию, так сказать, дистанционно, снижая объем циркулирующей жидкости путем воздействия секретируемого пептидами на почки, освобождая сердце от избыточного объема и тем самым поддерживая кардиоваскулярный гомеостаз.

Пептиды выделены из предсердий обычными методами препаративной биохимии пептидов [1, 18, 49, 50]. Пептиды в экстрактах предсердий гетерогенны. Биологической активностью обладают пептиды с мол. массой от 3000 до 44 000. Высокомолекулярные формы под действием протеолитических ферментов переходят в более активные низкомолекулярные пептиды [16, 26]. Расшифровка последовательности показала, что все они содержат от 21 до 126 аминокислотных остатков и являются фрагментами одной и той же молекулы большей молекулярной массы [75]. Первичная структура атриопептидов установлена многочис-

ленными авторскими коллективами и подтверждена химическим синтезом. Атриопептиды синтезированы с помощью твердофазного синтеза и в настоящее время являются коммерческими препаратами.

Атриопептиды экстрагированы из предсердий человека, обезьяны, собаки, свиньи, кролика, крысы, мыши, лягушки [55]. Все они дают реакцию преципитации с антителами против одного и того же вида, что свидетельствует об их близкой структуре. 28-членные атриопептиды человека и крысы различаются только одним замещением в молекуле: 12-й остаток метионина в молекуле человека заменен на изолейцин в молекуле крысы [50] (рис. 1). Существуют данные о пептидах, подобных атриопептидам, у беспозвоночных (у москитов и моллюсков).

Атриопептиды млекопитающих независимо от размера молекулы имеют общую характерную структуру. У всех пептидов дисульфидная связь между остатками цистеина образует 17-членную кольцевую структуру (см. рис. 1). Эта кольцевая структура обязательна для проявления биологической активности: восстановление дисульфида

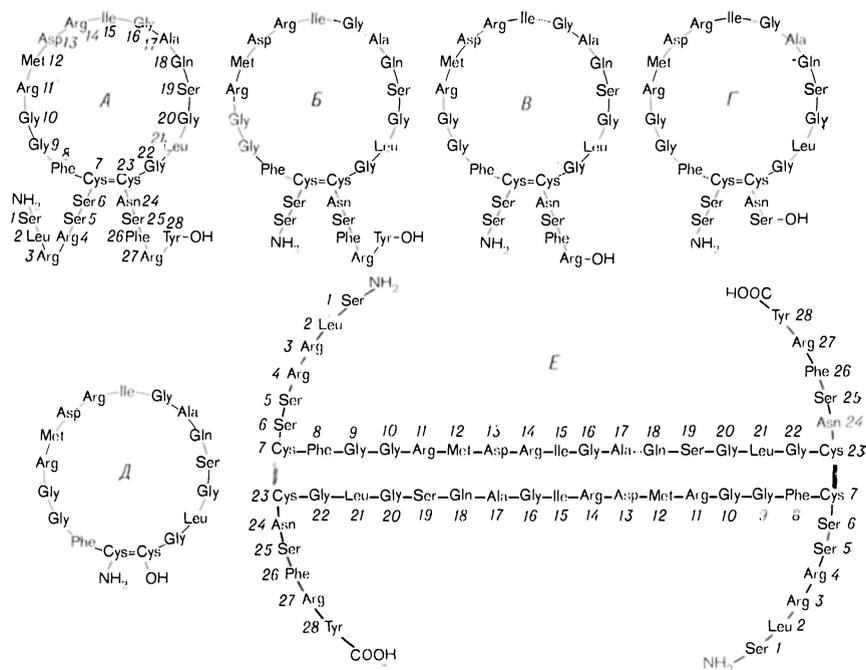


Рис. 1. Первичная структура пептидов атрионатрийуретического фактора (атриопептидов).

*A* — 28-членный кардионатрин,  $\alpha$ -натрийуретический пептид человека (у крысы в положении 12 изолейцин вместо метионина); *B* — атриопептин III; *B* — атриопептин II; *C* — атриопептин I; *D* — атриопептин 1-кольцо; *E* —  $\beta$ -натрийуретический пептид человека — антипараллельный димер.

приводит к потере биологической активности [50]. От остатков цистеина отходят 2 пептидные ветви — С-концевой и N-концевой участки молекулы. Количеством аминокислотных остатков на этих участках и отличаются друг от друга пептиды атрионатрийуретического фактора. Эти пептиды образовались из одной общей молекулы предшественника в результате ее ограниченного протеолиза, прошедшего на разном удалении от кольцевой структуры. Пока трудно сказать, все ли выделенные пептиды действительно присутствуют в предсердиях, или же какие-то из них являются артефактом и образуются под действием присутствующих в экстракте протеиназ в процессе выделения. В предсердиях человека недавно обнаружен и атриопептид необычной структуры, который назван  $\beta$ -натрийуретическим пептидом человека [38] (см. рис. 1, *E*). Это антипараллельный димер, образованный двумя дисульфидными связями между 7-м и 23-м и 23-м и 7-м остатками цистеина 28-членных молекул-мономеров. Пептид активен; его активность по сравнению с активностью пептида-мономера пролонгирована: если действие мономера с внутренней дисульфидной связью продолжается 20—30 мин, то действие пептида димера длится в 2 раза дольше.

В настоящее время определена и первичная структура предшественника пептидов предсердий. Выделена мРНК, осуществлен синтез предшественника в бесклеточной системе [55]. Определены нуклеотидный состав и последовательность кДНК. Копии кДНК, комплементарные высокомолекулярным пептидам атрионатрийуретического фактора, были клонированы в *E. coli*. Нуклеотидная последовательность кДНК кодирует белки в 151 остаток в молекуле предшественника человека и в 152 остатка в молекуле предшественника крысы [25, 62, 75]. В табл. 1 приведены их аминокислотные последовательности. Кроме того, там приведена также последовательность фрагмента еще одного вазоактивного пептида предсердий — кардиодилатина. Первые 25—24 остатка в молекуле предшественников соответствуют последовательности «сигнального» пептида, отщепляемого от синтезирующейся пептидной цепи при ее перемещении от полисом в каналы ше-

роховатого эндоплазматического ретикулула. Далее расположена 30-членная последовательность кардиодилатина, отличающегося по структуре и свойствам от пептидов атрионатрийуретического фактора. В его молекуле нет кольцевых структур, а также цистеиновых остатков, содержится 2 остатка пролина, имеется 3 остатка метионина и т. д. Кардиодилатин, оказывая мощное релаксантное действие на гладкую мускулатуру аорты и почечной артерии, диуретическим и натрийуретическим свойствами не обладает. За последовательностью кардиодилатина следует гликозилированный пептид с неизвестной функцией. Пептиды атрионатрийуретического фактора занимают С-концевое положение. В С-концевой области находится 2 остатка цистеина, замыкающих в этих пептидах кольцевую структуру.

Из приводимых в табл. 1 последовательностей можно видеть, что предшественники атриопептидов млекопитающих обладают большим сходством. Консервативное сходство генов, кодирующих синтез атриопептидов животных отдаленных видов, подтверждает гипотезу о том, что кодируемые пептиды играют большую роль в становлении кардиоваскулярного гомеостаза. Мутации этих генов могут быть связаны с различными патологическими состояниями. Выделяя клоны генов, можно теперь изучать роль атриопептидов при гипертензии и врожденных поражениях сердца.

Совсем недавно считалось, что структура атриопептидов и их предшественников уникальна [47, 68]. По данным, полученным с помощью компьютера, их сходство с каким-либо полипептидным соединением статистически незначимо. Однако при рассмотрении структуры молекулы предшественника фактора роста эпидермиса, состоящей из сегментов последовательностей фактора роста эпидермиса и сегментов последовательностей пептидов неизвестной функции, было проведено сравнение с первичной структурой других известных полипептидов [32]. В компьютер были заложены данные о первичной структуре 2600 соединений. Оказалось, что отдельные области структуры предшественника фактора роста эпидермиса гомологичны первичной структуре предшественника атриопептидов начиная с 42-го по

## Аминокислотная последовательность общего предшественника атрионатрийуретического фактора (ANF) и кардиодилатина

		10		20	
Человек	NH <sub>2</sub> Met—Ser—Ser—Phe—Ser—Thr—Thr—Thr—Val—Ser—Phe—Leu—Leu—Leu—Leu—Ala—Phe—Gln—Leu—Leu—Gly				—Gln—
Крыса	NH <sub>2</sub> Met—Gly— — — — Ile— — Lys—Gly—Phe— — — Phe—Leu— — Ala— — Trp— — Pro				—His—
	25	30	35	40	
Человек	—Thr—Arg—Ala	—Asn—Pro—Met—Tyr—Asn—Ala—Val—Ser—Asn—Ala—Asp—Leu—Met—Asp—Phe—Lys—Asp—Leu—Leu—			
Крыса	—Ile—Gly—	— — — Val— — Ser— — — — — Thr— — — — — — — — — — — — — — — — — —			
Свинья	—NH <sub>2</sub> —	—Asn—Pro—Val— — Gly—Ser— —			
(фрагмент)					
	45	50	55	60	65
Человек	—Asp—His—Leu—Glu—Glu—Lys—Met—Pro—Leu—Glu—Asp—			Glu—Val—Val—Pro—Pro—Gln—Val—Leu—Ser—Glu—Pro—	
Крыса	— —			—Met— —	
Свинья	— —			—Leu—Glu—Asp— OH	
фрагмент)					
	70	75	80	85	
Человек	—Asn—Glu—Glu—Ala—Gly—Ala—Ala—Leu—Ser—Pro—Leu—Pro—Glu—Val—Pro—Pro—Trp—Thr—Gly—Glu—Val—Ser—Pro—				
Крыса	—Thr—Asp— —				—Asn— — —
	90	95	100	105	110
Человек	—Ala—Gln—Arg—Asp—Gly—Gly—Ala—Leu—Gly—Arg—Gly—Pro—Trp—Asp—Ser—Ser—Asp—Arg—Ser—Ala—Leu—Lys—				
Крыса	—Ser— —			—Pro— —	
	115	120	125	130	135
Человек	—Ser—Lys—Leu—Arg—Ala—Leu—Leu—Thr—Ala—Pro—Arg—Ser—Leu—Arg—			Arg—Ser—Ser—Cys—Phe—Gly—Gly—Arg—Met—	
Крыса	— —			— —	
	140	145	150		
Человек	—Asp—Arg—Ile—Gly—Ala—Gln—Ser—Gly—Leu—Gly—Cys—Asn—Ser—Phe—Arg—Tyr—OH				
Крыса	— —			—150—Arg—Arg—OH	

Примечание. Идентичные аминокислотные остатки последовательности предшественника АНФ человека в молекуле предшественника крысы и кардиодилатине свиньи не приводятся, за исключением N-концевых; 15-й остаток в крысином предшественнике и соответствующий 33-му во фрагменте структуры свиного предшественника отсутствуют. В рамки заключены: сигнальная последовательность (1—21), последовательность кардиодилатина (26—55) и последовательность ANF (127—151). Остатки, образующие в молекуле АНФ дисульфидную связь, подчеркнуты.

150-й остаток. Предполагают, что оба предшественника имеют общее эволюционное происхождение. Возможно, что из соответствующих сегментов предшественника фактора роста эпидермиса вычлениются пептиды, биологическая активность которых сходна с активностью атриопептидов [32].

Тестирование атриопептидов проводят 5 различными способами. Их активность определяют как *in vivo*, так и *in vitro*. Введение крысам синтетических атриопептидов (а также экстрактов предсердий или каких-либо биологических жидкостей, содержащих атриопептиды) в микрограммовых или наномольных количествах вызывает дозозависимое усиление диуреза и экскреции  $\text{Na}^+$  с мочой [8]. Величина активности атриопептидов может быть определена по величине расслабления препаратов аорты (колец, полосок), спазм которых вызывается ангиотензином II или норадреналином [16], а также по расслаблению препарата прямой кишки цыпленка, спазм которой вызывается карбаколом [16]. Разработаны радиоиммунологические [5, 27, 46] и иммуногистохимические [58] методы определения концентрации и распределения атриопептидов в организме.

Наибольшей биологической активностью по разработанным тестам обладают 33-25-членные пептиды [38, 50, 68]. Активность более длинных пептидов меньше примерно в 10 раз [47]. В табл. 2 приведены данные о биологической активности различных атриопептидов, содержащих разное число аминокислотных остатков на С- и N-концах молекул. Активности первых четырех пептидов (28-, 25-, 24- и 23-членных) как будто бы одинаковы по четырем упомянутым тестам. Удаление С-концевого тирозина не уменьшает диуретического и натрийуретического действия препарата и его спазмолитической активности на препаратах аорты и кишки [22]. Однако более поздние исследования показали, что с утратой тирозинового остатка атриопептид (атриопептин II) приобретает новые качества: он вызывает спазм коронарной артерии сердца [72], несмотря на свои релаксантные, спазмолитические свойства в опытах *in vitro*. Последующее отщепление С-концевого дипептида фенилаланил-аргинина (см. табл. 2) приводит к резкой дис-

Т а б л и ц а 2

Активность пептидов атрионатрийуретического фактора в зависимости от последовательности аминокислотных остатков на С- и N-концевых участках их молекул

Названия пептидов и их аминокислотные последовательности	Активность			
	диуретическая	натрийуретическая	<i>in vitro</i> (кровеносные сосуды)	спазмолитическая
Кардионатрин; $\alpha$ -натрийуретический пептид человека: Ser—Leu—Arg—Arg—Ser—Ser—Cys—S—S—Cys—Asn—Ser—Phe—Arg—Tyr—OH	++	++	+	+
IV-АНФ крыс: Arg—Ser—Ser—Cys—S—S—Cys—Asn—Ser—Phe—Arg—Tyr—OH	++	++	+	+
Атриопептин III: Ser—Ser—Cys—S—S—Cys—Asn—Ser—Phe—Arg—Tyr—OH	++	++	+	+
Атриопептин II: Ser—Ser—Cys—S—S—Cys—Asn—Ser—Phe—Arg—OH	++	++	+	+
Атриопептин I: Ser—Ser—Cys—S—S—Cys—Asn—Ser—OH	+	+	—	+
Дез-Сер-С-атриопептин I: Ser—Ser—Cys—S—S—Cys—Asn—OH	±	±	—	+
Дез-Сер-атриопептин I: Ser—Cys—S—S—Cys—Asr—Ser—OH	+	+	—	+
Атриопептин I-кольцо: Cys—S—S—Cys—OH	—	—	—	+

социации свойств: пептид (атриопептин I) полностью утрачивает спазмолитическую активность на кровеносных сосудах, но еще сохраняет значительную спазмолитическую активность на препарате кишки. Диуретическая и натрийуретическая активность у такого пептида также резко снижена [22]. В предсердиях, по-видимому, существует специальный механизм, предотвращающий накопление атриопептина II в сердце. Так, в предсердиях обнаружена специфическая дипептидилкарбокسينпептидаза [29, 30], близкая по свойствам к ангиотензинпревращающему ферменту, отщепляющая от атриопептина II дипептид фенилаланил-аргинин. Превращая его в атриопептин I, лишенный вазоактивных свойств, упомянутый фермент защищает сердце от возможности ишемии. Отсутствие активности этого фермента в миокарде желудочков подчеркивает направленность его действия на атриопептиды. Дальнейшее удаление с C-конца остатков серина не приводит к исчезновению спазмолитической активности на препарате кишки. Что касается деградации N-концевого участка молекулы, то, по данным одних авторов, он может быть уменьшен до 2 остатков серина без потери активности по приводимым в табл. 2 тестам, а по данным других авторов, 24-членный атриопептин III в 10 раз слабее по биологической активности по сравнению с 28-членным пептидом, имеющим гексапептид  $\text{SFR} - \text{LEU} - \text{ARG} - \text{ARG} - \text{SER} - \text{SER}$  на N-конце [61]. 17-Членный пептид — кольцевая структура — активностью не обладает. Таким образом, для проявления биологической активности необходимы дисульфидные связи в молекуле, а также и концевые ветви определенной структуры. Ограниченный протеолиз концевых участков, по-видимому, изменяет направленность биологического действия атриопептидов.

В опытах *in vivo* на крысах 28-членный атриопептид усиливает выделение мочи в 30 раз, ионов  $\text{Na}^+$  в 90 раз, хлоридов в 50 раз. Наблюдается также некоторое, не столь выраженное усиление выведения ионов  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  и фосфатов [55].

Механизм секреции пептидов предсердий и его регуляция еще только изучаются. В опытах *in vitro* показано [65], что 3 эндогенных вещества

(ацetylхолин, адреналин и вазопрессин) являются специфическими стимуляторами секреции пептидов предсердий. Их действие опосредуется через мускариновые холинергические,  $\alpha_1$ -адренергические рецепторы и через рецепторы вазопрессина сосудистого типа  $v_1$ . Возбуждение этих рецепторов, а также секреция атриопептидов не сопровождаются активацией аденيلاتциклазы и синтезом ц3,5-АМФ. Возбуждение этих рецепторов приводит к синтезу внутриклеточного инозитол-1,4,5-трифосфата, являющегося еще одним внутриклеточным посредником между внешним химическим сигналом и ферментативными системами, участвующими в физиологическом ответе клетки.

В опытах *in vivo* показано, что атриопептиды секретируются в ответ на введение 0,9 % раствора натрия хлорида, механического растяжения предсердий, а также при введении различных прессорных агентов [48]. Предсердия реагируют выбросом атриопептидов при повышении артериального давления.

Исследования природы и количества секретируемых в кровь атриопептидов пока немногочисленны. На перфузируемых переживающих сердцах кролика, собаки и крысы показано, что высокомолекулярные атриопептиды в кровь не секретируются [61, 66]. Они являются предшественниками низкомолекулярных форм и в предсердиях подвергаются обычному для предшественников процессингу. Предполагается, что в кровь секретируется только один пептид типа 28-членный атриопептид [66]. При стимуляции секреции вазопрессинном [61] в плазме крови крысы присутствует главным образом 28-членный пептид (см. табл. 2 и рис. 1). Ему сопутствует 24-членный атриопептин III, но концентрация его в плазме в 10 раз ниже. Полагают, что предсердиями секретируется в кровь 28-членный атриопептид, а 24-членный является продуктом его деградации. Хотя оба пептида эквивалентны в снижении почечной резистентности у собак, 28-членный пептид оказывает более мощное диуретическое и натрийуретическое действие. При превращении его в 24-членный пептид модифицируется его действие, ослабляется стимуляция экскреции во-

ды и электролитов, а действие на сосуды почки остается прежним.

Радиоиммунологические и иммуногистохимические методы позволили исследовать распространение атриопептидов в организме и определить их содержание в тканях и биологических жидкостях. При исследовании органов крысы было установлено, что, кроме миокарда предсердий, атриопептиды содержатся в плазме крови, гипоталамусе [27, 67] и нейронах мозга [58]. Содержание иммунореактивных атриопептидов в миокарде предсердий крысы неодинаково. В правом предсердии их в 1,5 раза больше, чем в левом: в среднем 87 и 53 пмоль на 1 мг ткани соответственно [67]. В гипоталамусе их содержание на несколько порядков ниже, чем в предсердиях: в среднем 5 пмоль на 1 г ткани, в плазме крови содержится в среднем 150 фмоль на 1 мл. При введении животному поваренной соли содержание иммунореактивного атриопептида увеличивается более чем в 2 раза, а в гипоталамусе уровень атриопептидов снижается. Данные радиоиммунологических исследований были подтверждены результатами биологического определения активности.

В мозге (гипоталамус, варолиев мост) обнаружены нейроны, синтезирующие и секретирующие атриопептиды. Особый интерес представляют нейроны гипоталамуса, расположенные в антеровентральной области III желудочка, т. е. в той области, где повреждение структур у экспериментальных животных приводит к резкому изменению содержания жидкости и электролитов в организме. Обнаружение нервных связей в этой области с нейронами, секретирующими атриопептиды, дает основание считать, что эти нейроны принимают участие в регуляции водно-солевого баланса. Показано [58], что из области III желудочка содержащиеся атриопептиды нервные волокна тянутся к парабрахмальному ядру, включенному в сердечно-сосудистую регуляцию.

Так и на пептидах предсердий повторяется наблюдавшаяся ранее закономерность: пептиды, секретируемые различными клетками соматических тканей, обнаруживаются в соответствующих нейронах мозга. Это наблюдалось ранее для холецистокинина, кишечного вазоактивного пептида, ни-

сулина, ангиотензина, нейротензина, субстанции P, кальцитонина и других пептидов. Такое центральное «дублирование» пептидов соматических тканей до сих пор остается непонятным. Предполагают, что в центральной нервной системе они модулируют те же самые физиологические процессы, на которые направлено их действие в соматических тканях, углубляя и генерализуя эти процессы. По-видимому, и секреция атриопептидов нейронами мозга связана с интеграцией регуляторных систем, направленных на поддержание кардиоваскулярного гомеостаза.

Интересно отметить, что из гемолизата эритроцитов экстрагируется какой-то, по-видимому, пептидный материал, способный усиливать в 10 раз диурез и экскрецию ионов  $\text{Na}^+$  с мочой [63]. Пока неизвестно, имеет ли этот материал какое-либо отношение к пептидам атрионатрийуретического фактора. Во всяком случае, этот материал — не дигоксиноподобный фактор, поскольку молекулярная масса извлекаемого из эритроцитов материала больше 1000, тогда как дигоксиноподобный фактор имеет молекулярную массу порядка 500 дальтон.

Действие атриопептидов осуществляется через рецепторный аппарат клеток-мишеней. Высокоспециализированные рецепторы атриопептидов обнаружены на плазматических мембранах почечных клеток, гладких мышц аорты и артерий, на эндотелии сосудов, на плазматических мембранах клеток коры надпочечников [33, 51, 60]. Обнаружены рецепторы атриопептидов и в мозге [57]. Пептиды предсердий обладают высоким сродством к этим рецепторам: константа диссоциации пептид-рецепторного комплекса  $10^{-10}\text{M}$  [51].

Взаимодействие атриопептидов с рецепторами сопровождается активацией мембранно-связанной гуанилатциклазы, накоплением циклического гуанозинмонофосфата и одновременным снижением активности фосфодиэстеразы циклического гуанозинмонофосфата [28, 73]. Действие атриопептидов на гуанилатциклазную систему в данном случае специфично, поскольку антитела к очищенному природному атриопептиду угнетают накопление цГМФ.

На основании этих данных сделан

вывод, что внутриклеточным посредником при атриопептид-рецепторном взаимодействии является цГМФ. В опытах *in vivo* введение экстракта предсердий крысам в 28 раз усиливает выведение цГМФ с мочой [28] параллельно усилению диуреза и экскреции ионов  $\text{Na}^+$ . Показано, что действие атриопептидов не опосредуется простагландинами и дофамином [20].

Данные о действии атриопептидов на аденилатциклазную систему противоречивы. Одни авторы утверждают, что атриопептиды являются специфическими ингибиторами аденилатциклазы [4], другие исследователи ингибирующего действия на эту систему не находят [70].

Исследование биологического действия атриопептидов в опытах *in vivo* и *in vitro* на переживающих перфузируемых почках и периферических артериях показало, что действие этих пептидов избирательно направлено на почки [20, 53]. Введение экстрактов предсердий в изолируемую перфузируемую почку вызывает  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый диуретический и натрийуретический ответ [13]. Клубочковая фильтрация увеличивается при этом более чем в 2 раза, скорость истечения мочи — более чем в 7 раз, абсолютная экскреция ионов  $\text{N}^+$  усиливается в 15 раз. Пептиды предсердий, кроме непосредственного действия на дистальные каналы нефронов, где они угнетают реабсорбцию ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$ , усиливают выведение [14, 34] этих электролитов опосредованно, путем угнетения секреции альдостерона [7] — стероидного гормона надпочечников, задерживающего выведение  $\text{Na}^+$  почками. Атриопептиды тормозят только стимулированную кортикотропином или ангиотензином II секрецию альдостерона и не снижают его исходный (нестимулированный) уровень секреции.

Исследовано действие 28-членного синтетического пептида на функцию почек здоровых мужчин-добровольцев [43]. Введение атриопептида в дозах 50 мкг и 125 мкг [69] никакого педомогания не вызывало, не вызывало и снижения артериального давления. При однократном и одномоментном введении 50 мкг атриопептида усиление диуреза, экскреции электролитов и увеличение клиренса креатинина начались через 5 мин после инъекции,

достигало максимума через 10—20 мин и заканчивалось через 45 мин. Такая же примерно картина наблюдалась при непрерывном введении 125 мкг атриопептида в течение 30 мин. При введении 50 мкг атриопептида клиренс эндогенного креатинина усиливался транзитивно в 3 раза по сравнению с исходным уровнем. Экскреция ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  увеличивалась в 3—4 раза, экскреция  $\text{K}^+$  практически не увеличивалась. Период полужизни введенного 28-членного атриопептида очень короткий. После внутривенного введения 50 мкг этого пептида через 1 мин наблюдалось увеличение его содержания в плазме крови в 30 раз по сравнению с первоначальным уровнем, через 5 мин оно превышало исходный уровень только в 2 раза, а через 10 мин достигало исходного уровня. По-видимому, этот атриопептид играет важную роль в регуляции почечной функции и становлении водно-солевого гомеостаза. Синтетический атриопептид рассматривают как потенциальное терапевтическое средство при сердечных и почечных болезнях.

Некоторые исследователи рассматривают атриопептид как идеальный диуретик, не оказывающий побочного действия [55]. В эквимолярных отношениях атриопептид в 1000 раз эффективнее фуросемида, он не угнетает  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазу, а также не влияет на экскрецию катехоламинов и дофаминна, не выводит ионов  $\text{K}^+$  с мочой [55].

В плазме периферической крови человека содержится 10—70 нг/л иммунореактивного атриопептида [31]. Эти данные были получены у 36 здоровых мужчин с помощью радиоиммунологического метода, позволяющего определять более 95 % синтетического атриопептида в тех же условиях.

Данные, касающиеся действия атриопептидов и экстрактов предсердий на артериальное давление и сердечную деятельность, противоречивы. По данным одних авторов [53], введение атриопептидов и экстрактов предсердий не снижает артериального давления (в остром опыте у анестезированных крыс) и не влияет на сердечную деятельность; по данным других авторов [55], артериальное давление снижалось дозозависимо на 40 мм рт. ст. [55]. По-видимому, такие расхождения связаны с условиями постановки опыта и структурой вводимых атрио-

пептидов. При введении внутривенно или внутриа­териально 28-членного атриопептида человека анестезированным собакам установлено, что это соединение расслабляет почечную ар­терию более избирательно, чем бедренную, позвоночную, сонную и коронарную артерию [35]. Эта же закономерность наблюдалась и *in vitro* на препаратах соответствующих артерий. Вводимый пептид снижает системное артериальное давление, но не частоту сердечных сокращений. Иную картину наблюдали другие исследователи [2] после внутривенных введений анестезированным крысам экстракта крысиных предсердий (0,2 мл экстракта соответствует экстракту предсердий одной крысы и вызывает через 5 мин 10-кратное усиление диуреза). В этих опытах развивалось быстрое (в течение 1 мин) снижение артериального давления — в среднем на 20 мм рт. ст. Оно сопровождалось расстройством сердечной деятельности. Частота сердечных сокращений снижалась до 25 в минуту, минутный объем сердца уменьшался не только за счет снижения частоты сердечных сокращений, но и за счет уменьшения ударного объема крови. Периферические кровеносные сосуды расслаблялись; снижение артериального давления было связано не только с расширением периферических кровеносных сосудов, но и с неспособностью сердца компенсировать это расширение увеличением минутного объема. Усиление почечной экскреции в данном случае не может быть причиной гипотензии, поскольку наибольшее снижение артериального давления наблюдалось в тот период, когда выделилось всего 200 мкл мо-

чи. Кроме того, такая же гипотензия наблюдалась при введении экстракта нефрэктомированным в остром опыте крысам. У ваготомированных крыс введение экстракта предсердий не вызвало ни снижения артериального давления, ни расстройства сердечной деятельности. Атриопептиды подавляют секрецию ренина у собак и крыс.

В настоящее время исследователи единодушно признают атриопептидную систему сердца постоянным неизменным компонентом процесса становления кардиоваскулярного гомеостаза, таким же, как и противоположно направленная ренин-ангиотензин-альдостероновая система. Высокая диуретическая и натрийуретическая активность атриопептидов позволяет считать эту систему ключевой в регуляции объема внеклеточной жидкости и сохранения баланса электролитов [44, 56].

Такие представления вносят существенные коррективы в существовавшие до недавнего времени представления о регуляции сосудистого тонуса и артериального давления. Процесс сохранения кардиоваскулярного гомеостаза при участии двух регуляторных систем — релаксантной атриопептидной и прессорной ренин-ангиотензиновой — можно представить в виде схемы (рис. 2). В центре схемы расположены почки, поскольку именно через этот парный орган обе системы осуществляют выведение или задержку воды и электролитов. При увеличении объема жидкости в кровяном русле и при повышении артериального давления реагируют барорецепторы предсердий, рефлекторно стимулирующие секрецию в кровь атриопептида, обладаю-

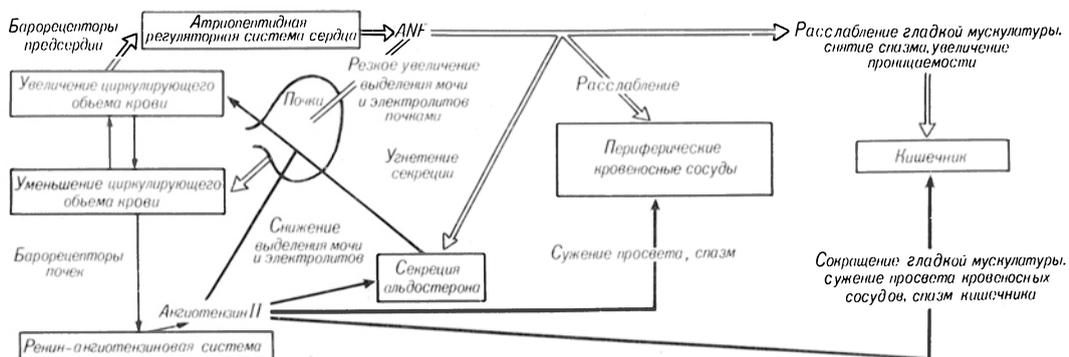


Рис. 2. Взаимосвязь между депрессорной атриопептидной и прессорной ренин-ангиотензиновой системами в процессе становления гомеостаза.

Объяснение в тексте.

щего специфическим действием на почки, гладкую мускулатуру артерий и кишечника. При его действии усиливается клубочковая фильтрация, резко снижается реабсорбция  $\text{Na}^+$ , который является главным осмотическим регулятором количества воды в крови и межклеточном пространстве. Расслабление артериол под действием атриопептида и отток воды из кровяного русла к тканям являются дополнительным резервом уменьшения объема циркулирующей жидкости в кровеносном русле, особенно при экстремальных состояниях. Расслабление гладкой мускулатуры кишечника, увеличение проницаемости его кровеносных сосудов способствуют удалению избытка воды и через кишечник. При этом атриопептид тормозит все функции эффекторов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, а также секрецию ренина и альдостерона. Продолжительность действия атриопептида контролируют тканевые протеиназы, природа которых в настоящее время еще не установлена.

Уменьшение циркулирующего объема крови улавливают барорецепторы почек. Они рефлекторно стимулируют выделение в кровь протеолитического фермента ренина из юктагломерулярного аппарата [56]. Ренин отщепляет из растворенного в плазме крови белка ангиотензиногена 10-членный пептид — предшественник прессорного ангиотензина II, в который предшественник и превращается при действии на него другого протеолитического фермента — карбоксикапепсина (ангиотензинпревращающего). Образующийся прессорный пептид ангиотензина II связывается рецепторами гладкой мускулатуры, что приводит к спастическому сжатию мышечных клеток, уменьшению просвета сосудов, а следовательно, и к уменьшению объема сосудистого русла. Ангиотензин II снижает диурез и экскрецию электролитов как непосредственно, путем снижения скорости клубочковой фильтрации вследствие спазма мезангиальных клеток гломерул [56], так и опосредованно, стимулируя секрецию альдостерона, усиливающего реабсорбцию  $\text{Na}^+$ . Ангиотензин II контролирует также и тонус кишечника, провоцируя спазм его гладкой мускулатуры [56]. Действие ангиотензина II на препараты различных отделов кишечника проявляет-

ся при концентрации  $10^{-10}$  М. Вазоконстрикция артериол, снижение диуреза и экскреции электролитов приводят к повышению артериального давления, увеличению объема крови в артериальной части кровеносного русла. Это воспринимается барорецепторами предсердий и в процесс поддержания гомеостаза вновь включается депрессорная атриопептидная система, отменяющая стимулы ренин-ангиотензинной системы. Концентрация ангиотензина также контролируется протеолитическими ферментами, получившими общее название «ангиотенгиназы». Таким образом, в норме обе системы взаимного уравновешивают друг друга. С нарушением этого равновесия связаны тяжелейшие патологические состояния.

Исследования атриопептидной системы сердца при различных заболеваниях еще только начаты, но судя по тому, что мы только что узнали об этой системе, в клинической медицине в связи с ее открытием начинается новая эра. Сейчас даже трудно представить себе, какие области и разделы медицины затронет это открытие. Несомненно, что оно коснется в первую очередь сердечно-сосудистых заболеваний, болезней почек и, очевидно, расстройств водно-солевого обмена.

В настоящее время известно, что у лабораторных животных — сирийских хомячков, страдающих врожденной кардиомиопатией (сердечная недостаточность, расширение сердца, отеки), активность атриопептидов в предсердиях снижена в 3 раза [15], но содержание иммунореактивных атриопептидов в предсердиях при этом увеличено. Считается, что молекулы атриопептидов дефектны и не способны нормально выполнять свою функцию [3]. Исследования содержания иммунореактивных атриопептидов в плазме крови больных, страдающих врожденными заболеваниями сердца, показали, что сердечная недостаточность, особенно ее тяжелые формы, сопровождается значительным повышением содержания иммунореактивных атриопептидов [31, 69]. Их высокая концентрация была найдена в плазме венозной крови больных с пароксизмальной суправентрикулярной тахикардией и связанной с ней транзиторной полнурией [69]. При тяжелой сердечной недостаточности

сти уровень атриопептидов повышается в 10 раз [31] как в периферической венозной крови, так и в крови из правого предсердия, взятой при катетеризации последнего. При лечении такого больного уровень атриопептидов снижался параллельно уменьшению отечности и достигал нормального уровня при исчезновении отеков. К сожалению, авторы в своих исследованиях ограничились только радионуклеоническими исследованиями и не приводят данные о биологической активности у больных с врожденной сердечной недостаточностью.

Исследовались атриопептиды в эксперименте и клинике при артериальной гипертензии. Показано, что экстракты предсердий спонтанно гипертензивных крыс оказывают меньшее диуретическое и натрийуретическое действие по сравнению с экстрактами предсердий нормотензивных животных [64]. Введение спонтанно гипертензивным крысам экстрактов предсердий здоровых крыс снижает артериальное давление, усиливая диурез и экскрецию ионов натрия [64]. Синтетические атриопептиды (типа атриопептина III) снижают артериальное давление, усиливают почечный кровоток у спонтанно гипертензивных крыс [41, 42]. Атриопептиды нормализуют артериальное давление у крыс, гипертензия у которых была вызвана хроническим введением норадреналина [74]. Длительное непрерывное введение атриопептидов снижает высокое артериальное давление у крыс, гипертензия у которых была вызвана пережатием почечной артерии [21]. Полагают, что нормализация артериального давления происходит в данном случае как вследствие вазодилатации, так и в результате уменьшения объема циркулирующей крови. Очевидно, определенное состояние секреторной функции миокарда предсердий может иметь особое значение при операциях на сердце. В опытах на крысах показано, что удаление ушка правого предсердия в 2—3 раза снижает диуретический и натрийуретический ответ на увеличение объема циркулирующей крови [71].

Существуют указания на возможность лечения атриопептидами геморрагического шока [53]. Как известно, шок, вызванный кровопотерей, сопровождается выделением в кровь раз-

личных эндогенных вазоконстрикторов. Они вызывают мощный спазм сосудов почек, который может приводить к канальцевому некрозу и гибели почек. В этих случаях для лечения применяют дофамин. В низких концентрациях он избирательно расслабляет сосуды почек, а при передозировке может вызвать их дополнительный спазм. В этих случаях не следует вводить антагонист дофамина галоперидол, поскольку он блокирует и расслабляющее действие дофамина на сосуды почки. Введение в этих условиях атриопептида может быть более эффективным методом лечения геморрагического шока, поскольку атриопептиды снимают действие эндогенных вазоконстрикторов в дозах, в 10 раз меньших, чем дозы веществ, вызвавших спазм.

Будущим конструкторам искусственного сердца теперь придется позаботиться о том, чтобы сердце было не только механическим насосом. Придется, по-видимому, ввести в его конструкцию дозирующие устройства, выделяющие атриопептиды в ответ на соответствующие физиологические стимулы.

Очевидно, с нарушением синтеза и секреции атриопептидов связаны и тяжелейшие расстройства — гипо- и гипернатриемии, которые, по данным, приводимым в обзоре [6], могут быть причиной тяжелых необратимых повреждений мозга, приводящих к потере трудоспособности и смерти.

В связи с разработкой проблемы атриопептидов, особенно тех ее аспектов, которые непосредственно связаны с клинической медициной, можно надеяться, что многие считающиеся неизлечимыми болезни будут успешно излечиваться. Совершенно очевидно, что назревает острая необходимость развивать исследования по атриопептидам в нашей стране.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ackermann U., Irizawa T. G. // Amer. J. Physiol. — 1984. — Vol. 247, N 4. — Pt 2. — P. R750—R752.
2. Ackermann U., Irizawa T. G., Mijlojevic S., Sonnenberg H. // Canad. J. Physiol. Pharmacol. — 1984. — Vol. 62. — P. 819—826.
3. Ackermann U., Irizawa T. G., Mijlojevic S. et al. // IRCS Med. Sci. Biochem. — 1985. — Vol. 13. — P. 641—643.
4. Anand-Srivastava M. B., Franks D. J., Camlin M., Genest J. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1984. — Vol. 121. — P. 855—862.

5. *Arendt R. M., Stangl E., Zühringer J.* et al. // FEBS Lett. — 1985. — Vol. 189. — P. 57—61.
6. *Ariefj A. J.* // Clin. Endocr. — 1984. — Vol. 13. — P. 269—294.
7. *Atarashi K., Mulrow P. J., Franco-Saenz R.* et al. // Science. — 1984. — Vol. 224. — P. 992—994.
8. *Bold de A. J.* // Canad J. Physiol. Pharmacol. — 1982. — Vol. 60. — P. 324—330.
9. *Bold de A. J.* // J. molec. cell. Cardiol. — 1978. — Vol. 10. — P. 717—724.
10. *Bold de A. J.* // Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.). — 1979. — Vol. 161. — P. 508—511.
11. *Bold de A. J.* // Science. — 1985. — Vol. 230. — P. 767—769.
12. *Bold de A. J., Flynn T. G.* // Life Sci. — 1983. — Vol. 33. — P. 297—302.
13. *Camargo M. J. F., Kleinert H. D., Atlas S. A.* et al. // Amer. J. Physiol. — 1984. — Vol. 246, N 4. — Pt 2. — P. F447—F456.
14. *Chartier L., Schiffrin E., Thibault G.* // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1984. — Vol. 122. — P. 174.
15. *Chimoskey J. E., Spielman W. X., Brandt M. A., Heidemann S. R.* // Science. — 1984. — Vol. 223. — P. 820—822.
16. *Currie M. G., Geller D. M., Cole B. R.* et al. // Science. — 1983. — Vol. 221. — P. 71—73.
17. *Elisseeva Y. E., Pavlichina L. V., Orechovich V. N., Alexeenko L. P.* // Clin. chim. Acta. — 1971. — Vol. 31. — P. 413—419.
18. *Flynn T. G., de Bold M., de Bold A. J.* // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1983. — Vol. 117. — P. 859—865.
19. *Flynn T. G., Davies P. L.* // Biochem. J. — 1985. — Vol. 232. — P. 313—321.
20. *Garcia R., Thibault G., Cantin M., Genest J.* // Amer. J. Physiol. — 1984. — Vol. 247, N 1. — Pt 2. — P. R34—R39.
21. *Garcia R., Thibault G., Gutkowska J.* et al. // Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.). — 1985. — Vol. 178. — P. 155—160.
22. *Geller D. M., Currie M. G., Siegel N. R.* et al. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1984. — Vol. 121. — P. 802—807.
23. *Goetz K. L., Bond C. C., Bloxham D. D.* // Physiol. Rev. — 1975. — Vol. 55. — P. 157—205.
24. *Grantham J. J., Edwards R. M.* // J. Lab. clin. Med. — 1984. — Vol. 103. — P. 333—336.
25. *Greenberg B. D., Bencen G. H., Seilhamer J. J.* et al. // Nature. — 1984. — Vol. 312. — P. 656—658.
26. *Currie M. G., Geller D. M., Cole B. R., Needleman P.* // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1984. — Vol. 81. — P. 1230—1233.
27. *Gutkowska J., Thibault G., Januszewicz M.* et al. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1984. — Vol. 122. — P. 593—601.
28. *Hamel P., Tremblay J., Pang S. C.* et al. // Ibid. — 1984. — Vol. 123. — P. 515—527.
29. *Harris R. B., Wilson I. B.* // Arch. Biochem. — 1984. — Vol. 233. — P. 667—675.
30. *Harris R. B., Wilson I. B.* // Int. J. Pept. Res. — 1985. — Vol. 26. — P. 78—92.
31. *Hartter E., Weissel M., Stummvoll H. K.* et al. // Lancet. — 1985. — Vol. 2. — P. 93—94.
32. *Hayashida H., Miyata T.* // FEBS Lett. — 1985. — Vol. 185. — P. 125—128.
33. *Hirata J., Tomita M., Yoshimi H., Ikeda M.* // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1984. — Vol. 125. — P. 562—568.
34. *Hirata J., Tomita M., Yoshimi H.* et al. // J. clin. Endocr. — 1985. — Vol. 61. — P. 677—680.
35. *Ishihara T., Aisaka K., Hamasaki S.* et al. // Life Sci. — 1985. — Vol. 36. — P. 1205—1215.
37. *Jaerson J. D., Palade G. E.* // J. Cell. Biol. — 1964. — Vol. 23. — P. 151—172.
38. *Kangawa K., Fukada A., Matsuo H.* // Nature. — 1985. — Vol. 313. — P. 397—399.
39. *Kangawa K., Matsuo H.* // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1984. — Vol. 118. — P. 131—139.
40. *Kisch B.* // Exp. Med. Surg. — 1956. — Vol. 14. — P. 99—112.
41. *Koike H., Sada T., Miyamoto M.* et al. // Europ. J. Pharmacol. — 1984. — Vol. 104. — P. 391—399.
42. *Kondo K., Kida O., Kangawa K.* et al. // Clin. exp. Hypertens. — 1985. — Vol. 7. — P. 1097—1108.
43. *Kuribayashi T., Nakazato M., Tanaka M.* et al. // New Engl. J. Med. — 1985. — Vol. 312. — P. 1436—1457.
44. *Larach J. H.* // Ibid. — Vol. 313. — P. 1330—1340.
45. *Larach J. H.* // Biochemical Regulation of Blood Pressure / Ed. R. L. Soffer. — New York, 1981. — P. 393—410.
46. *Larose P., Meloche S., Souichdu P.* et al. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1985. — Vol. 130. — P. 553—558.
47. *Lazure C., Seidah N. G., Chretien M.* et al. // FEBS Lett. — 1984. — Vol. 172. — P. 80—86.
48. *Manning P. T., Schwartz D., Katsube N. C.* et al. // Science. — 1985. — Vol. 229. — P. 395—397.
49. *Misono K. S., Grammer R. T., Fukumi H., Inagami T.* // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1984. — Vol. 123. — P. 444—451.
50. *Misono K. S., Fukumi N., Grammer R. T., Inagami T.* // Ibid. — 1984. — Vol. 119. — P. 524—529.
51. *Napier M. A., Vandlen R. L., Albers-Schönberg G.* et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1984. — Vol. 81. — P. 5946—5950.
52. *Needleman P., Adams S. P., Cole B. R.* et al. // Hypertension. — 1985. — Vol. 7. — P. 469—482.
53. *Oshima T., Currie M. G., Geller D. M., Needleman P.* // Circulat. Res. — 1984. — Vol. 54. — P. 612—616.
54. *Palade G. E.* // Anat. Rec. — 1961. — Vol. 139. — P. 262—275.
55. *Palluk R., Gadda W., Hoefke W.* // Life Sci. — 1985. — Vol. 36. — P. 1415—1425.
56. *Peach M. J.* // Biochem. Pharmacol. — 1981. — Vol. 30. — P. 2745—2752.
57. *Quirion R., Dalpe M., De Lean et al.* // Peptides. — 1984. — Vol. 5. — P. 1167—1172.
58. *Saper C. B., Standaert D. G., Currie M. G.* et al. // Science. — 1985. — Vol. 227. — P. 1047—1049.
60. *Schank D. B., Johnson L., Schwartz K.* et al. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1985. — Vol. 127. — P. 433—442.
61. *Schwartz D., Geller D. M., Manning P. T.* et al. // Science. — 1985. — Vol. 229. — P. 397—400.
62. *Seidman C. E., DUBY A. D., Choi E.* et al. // Ibid. — 1984. — Vol. 225. — P. 324—326.

63. *Selmeci L., Posch E., Kalman K., Harsing L.* // Life Sci. — 1985. — Vol. 36. — P. 1025—1032.
64. *Sonnenberg H., Milojevic S., Chong C. K., Veress A. T.* // Hypertension. — 1983. — Vol. 5. — P. 672—675.
65. *Sonnenberg H., Veress A. T.* // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1984. — Vol. 124. — P. 443—449.
66. *Sugawara A., Nakao K., Morii N. et al.* // Ibid. — 1985. — Vol. 129. — P. 439—446.
67. *Tanaka I., Misono K. S., Inagami T.* // Ibid. — 1984. — Vol. 124. — P. 663—668.
68. *Thibault G., Garcia R., Cantin M. et al.* // FEBS Lett. — 1984. — Vol. 167. — P. 352—356.
69. *Tikkanen I., Fyhroquist F., Melsärinne K., Leidenius R.* // Lancet. — 1985. — Vol. 2. — P. 66—69.
70. *Umemura S., Smyth D. D., Pettinger W. A.* // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1985. — Vol. 127. — P. 943—949.
71. *Veress A. T., Sonnenberg H.* // Amer. J. Physiol. — 1984. — Vol. 247, N 3. — Pt 2. — P. R610—R613.
72. *Wangler R. D., Breuhaus B. A., Oloro H. O. et al.* // Science. — 1985. — Vol. 230. — P. 558—561.
73. *Winqvist R. J., Faison E. P., Waldman S. A. et al.* // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1984. — Vol. 81. — P. 7661—7664.
74. *Yasujima M.* // Circulat. Res. — 1985. — Vol. 57. — P. 470—474.
75. *Zivin R. A., Condra J. H., Dixon R. A. F. et al.* // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1984. — Vol. 81. — P. 6325—6329.

Поступила 21.03.86

## NEW APPROACH TO CARDIOVASCULAR REGULATION: ENDOCRINE FUNCTION OF THE HEART

*L. P. Alexeenko, V. N. Orekhovich*

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

Besides generally known functions, the heart has also an endocrine function. Atrial cardiocytes, being typical secretory cells, released peptide hormones into the blood stream: atrial natriuretic peptide containing 28 amino acids and cardiodiolatin. The structure of atrial peptides was determined. It was shown that both derived from their common precursor, a protein containing 151 amino acid. The presence of specific receptors was demonstrated on plasmatic membranes of cells of kidney epithelium, arterial smooth muscle, arterial endothelium, kidney cortex and hypophysis. The interaction of atrial peptides with these receptors activated the guanylate cyclase system. The biological action of atrial peptides manifested itself in the quick, massive and instantaneous increase of diuresis and electrolyte excretion, elevation of clearance of creatinine, decrease of kidney vascular resistance, intensification of glomerular filtration, inhibition of stimulated secretion of aldosterone, relaxation of blood vessels, elimination of arterial and intestinal spasm induced by various endogenous and exogenous vasoconstrictors and correction of kidney hypertension. Various radioimmunoassays for detection of atrial peptides in human blood plasma were developed; it was shown that in patients with congestive failure the atrial peptide content was increased.

УДК 616.155.392-07:616.155.25-008.931-074(048.8)

*Я. М. Соковнина, И. И. Вотрин*

## ТРОМБОЦИТЫ — ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЙ ЭНЗИМОПАТИЙ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ КРОВИ (Обзор)

НИИ медицинской энзимологии АМН СССР, Москва

В последнее время большое применение находят методы определения активности ферментов в форменных элементах крови в целях исследования патогенеза заболеваний и разработки диагностических тестов.

Тромбоциты в этом отношении привлекают внимание многих специалистов среди биологов, биохимиков, клиницистов, и не только потому, что они играют решающую роль в гемостазе, но и потому, что они участвуют в механизме молекулярно-клеточных систем организма, определяющих состояние сосудов, воспалительные и другие физиологические реакции.

Функциональное состояние клетки определяется ее метаболическим ста-

тусом, который, в свою очередь, определяется количественным и качественным составом ферментов на данный момент. Последний детерминирован генетической программой, которая реализуется и может изменяться в ответ на изменения метаболического статуса по типу обратной связи.



В силу известных причин исследование роли ферментов в регуляции обмена веществ на безъядерных клетках (тромбоцитах) более оправдано.

В этом случае нивелируются два первых уровня (транскрипция и трансляция) и соответствующие обратные связи, а исследуемый фермент становится одним из главных факторов, с помощью которых осуществляется регуляция метаболизма.

Тромбоциты, образно выражаясь, являются цитоплазматическими «осколками» мегакариоцитов. Из одного мегакариоцита образуется в среднем 5000 тромбоцитов. Состав ферментов в них предопределен функциональной генотипической программой в мегакариоците и его предшественнике. Следовательно, при патологии кроветворной системы мы вправе ожидать в тромбоцитах изменения на уровне участвующих в метаболизме важнейших для их функционирования ферментов, и дезорганизацию ферментных систем можно рассматривать как раннее проявление поражения клеток крови.

В последних работах было продемонстрировано фенотипическое сходство между атипичными мегакариоцитами и тромбоцитами [20, 40, 57].

Тромбоциты уникальны в том отношении, что в них имеются резервные, не вступающие в метаболизм фонды активных соединений (АТФ, АДФ, пирофосфат и др.), которые формируются в процессе созревания мегакариоцита и освобождаются только в момент реакции высвобождения.

Тромбоциты являются быстро обменивающимися клетками. В среднем за 10 дней у человека обменивается до 40 г тромбоцитарной массы. Поэтому биохимические дефекты, обнаруживаемые в тромбоцитах при ряде патологических состояний, являются наиболее ранним отражением изменений на уровне кроветворного ростка.

За последнее время накопилось много фактов, свидетельствующих о взаимодействии, существующем между злокачественными заболеваниями и системой гемостаза. Имеются наблюдения, свидетельствующие об активирующем воздействии опухолей на тромбоциты и систему коагуляции и об обратном влиянии тромбоцитов на рост опухолей. Имеется строгая корреляция между способностью опухолевых клеток индуцировать агрегацию тромбоцитов *in vitro* [16, 51].

Известно, что все клетки гемопоэтического ряда происходят из одной мультипотентной клетки (стволовой),

способной к дифференцированию по всем росткам миело- и лимфопоэза. Вместе с тем стволовые или колониеобразующие клетки для миело- и лимфопротеративного ряда — это разные клетки. Предшественниками мегакариоцитов являются стволовые клетки миелопротеративного ряда [3].

Результаты экспериментальных и литературных наблюдений позволили предположить, что злокачественная трансформация при лейкозах происходит на высших ступенях гемопоэза и ведет к перепрограммированию генетической программы. Экспериментальное доказательство геномных перестроек представляется исключительно актуальным для медицины.

Выбор тромбоцитов как объекта исследований, отражающих наиболее ранние изменения в мегакариоцитарном ростке костного мозга, представляется обоснованным.

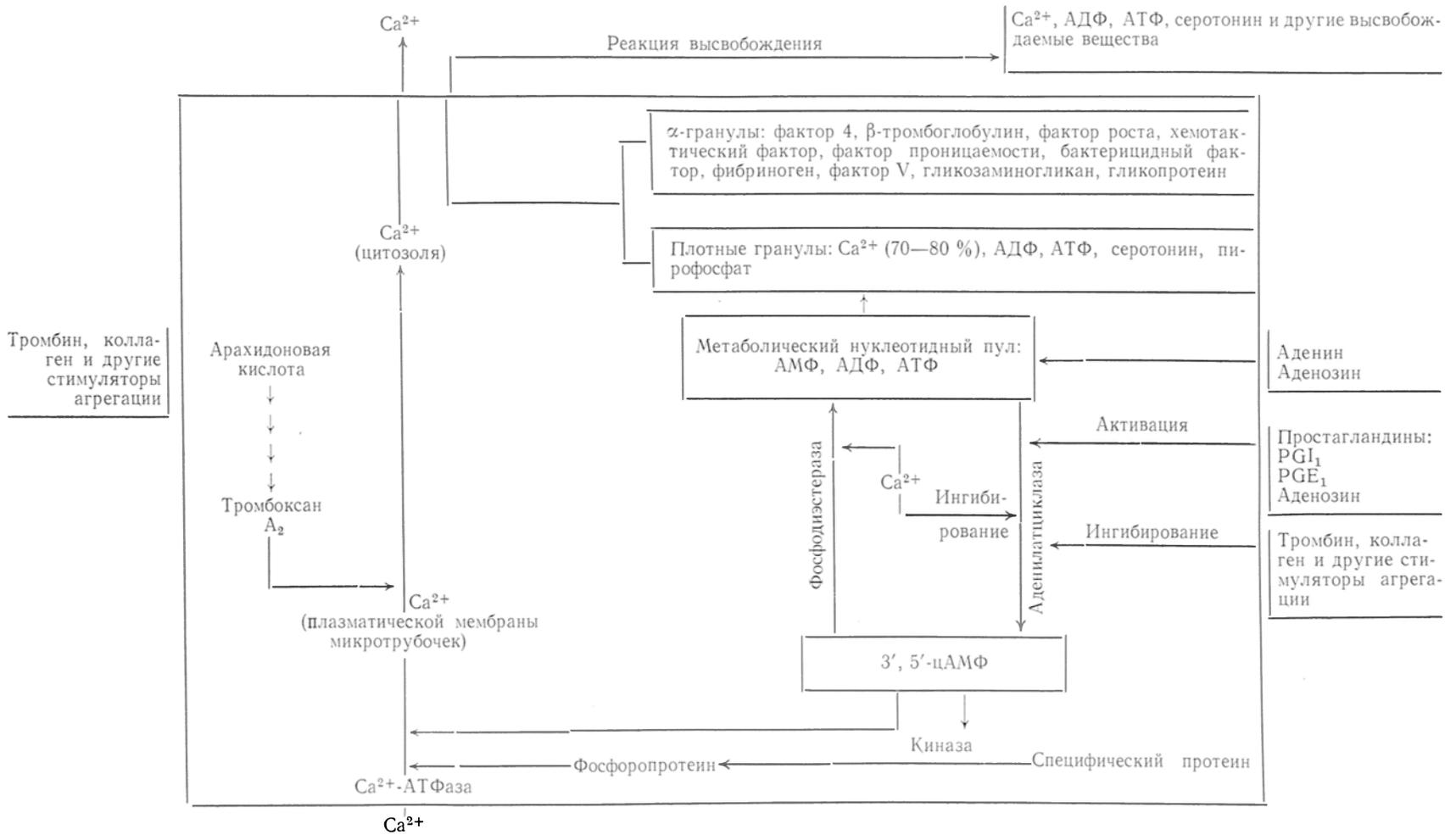
### *1. Молекулярные основы гемостатической функции тромбоцитов*

Основные функции тромбоцитов — сохранение целостности и ликвидация нарушений сосудистой стенки, остановка кровотечения (тромбообразование). Они выполняют роль триггеров в изменении агрегатного состояния крови и формировании тромба. Этот гемостатический потенциал тромбоцитов обусловлен присущими тромбоцитам свойствами: адгезией, агрегацией и реакцией высвобождения. На мембране тромбоцитов обнаружены также специфические рецепторы для соединений, индуцирующих адгезию и агрегацию тромбоцитов [6, 45]. Каждое функциональное состояние тромбоцитов обеспечивается определенным уровнем энергии [31]. В интактной клетке минимальный расход АТФ на поддержание жизнедеятельности покрывается за счет гликолиза и окислительного фосфорилирования. В настоящее время не вызывает сомнений, что тромбоциты имеют собственную систему энергоснабжения, которая на ультраструктурном уровне представлена митохондриями и зернами гликогена [15].

Различают 4 основные функциональные состояния тромбоцитов:

- изменение формы тромбоцитов и их адгезия к нитям коллагена;

Участие  $Ca^{2+}$ , цАМФ, адениловых нуклеотидов, простаглиндов в активации тромбоцитов



- агрегация, образование рыхлого белого тромба;
- высвобождение веществ плотных гранул (АТФ, АДФ, серотонина, пирофосфата,  $\text{Ca}^{2+}$ );
- высвобождение из  $\alpha$ -гранул факторов 3 и 4, фактора роста,  $\beta$ -тромбоглобулина, фибриногена, гликопротеина [32]. Кроме того, высвобождаются также ряд ферментов ( $\beta$ -глюкуронидаза, N-ацетилглюкозаминидаза,  $\beta$ -галактозидаза) [25].

Каждое из последующих активных состояний тромбоцитов в процессе тромбообразования требует все больших затрат энергии.

Формирование всех функциональных состояний или только некоторых из них зависит от природы индуктора. По совокупности данных литературы наиболее активным является тромбоин>коллаген>тромбоксан  $\text{A}_2$ >некоторые простагландины>АДФ. Действие агрегирующих агентов на тромбоциты приводит к перестройке метаболизма углеводов в сторону усиления гликолитических процессов.

В механизме активации тромбоцитов и сохранении «нейтрального отношения» их к эндотелию сосудов важнейшее значение имеют концентрационные изменения внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  (в частности, цитоплазматического), адениновых нуклеотидов, тромбоксана  $\text{A}_2$ , простагландинов, ц-АМФ [1, 24, 38, 39, 45] (схема 1). Наиболее обоснованная гипотеза в этом отношении сформулирована Holmsen [31]: «В основе механизма функционирования тромбоцитов лежит  $\text{Ca}^{2+}$ -стимулируемое, АТФ-зависимое сокращение тромбоцитарного актомиозина».

В тромбоцитах существует два «пула» ионов  $\text{Ca}^{2+}$ : один — резервный, локализованный в плотных гранулах (70—80 % всего внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ ), второй — метаболический (в плазматической мембране канальцевых систем клетки, а также в митохондриях).  $\text{Ca}^{2+}$  при активации тромбоксаном  $\text{A}_2$  переходит из микротрубочек в цитоплазму; повышение концентрации цитоплазматического  $\text{Ca}^{2+}$  приводит к активации тромбоцитов и агрегации. За время функционирования из плазмы в клетки активно поступает  $\text{Ca}^{2+}$  при участии  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой АТФазы. Сокращение тромбостенина — сократительного белка тром-

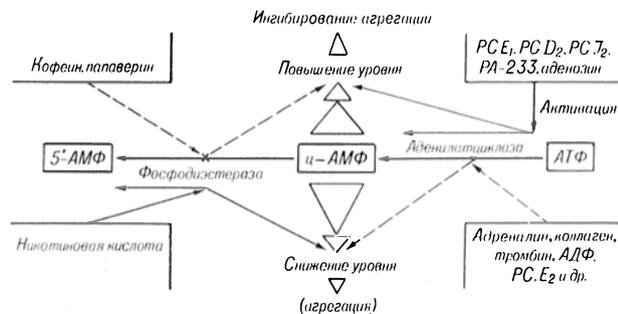
боцитов происходит также при участии  $\text{Ca}^{2+}$  метаболического резерва.

Как указывалось выше, для тромбоцитов характерно также наличие двух фондов адениновых нуклеотидов: резервного и метаболического, различающихся по своей функции. В тромбоцитах содержится в среднем 5—7 мкмоль АТФ на  $10^{11}$  клеток и 3,8 мкмоль АДФ на  $10^{11}$  клеток, что значительно превышает содержание этих соединений во многих тканях, включая мышечную [23, 48]. Значительная часть АТФ и АДФ содержится в плотных гранулах и не участвует в метаболических процессах; соотношение АТФ/АДФ, по данным литературы, составляет около 0,7 [55]. Этот так называемый «пул хранения» высвобождается из плотных гранул и играет важную роль в функционировании тромбоцитов. Примерно  $\frac{1}{3}$  адениннуклеотидов содержится в митохондриях, цитоплазме и клеточных мембранах, представляя «метаболический пул». Он обеспечивает все энергезависимые процессы в клетках при жизнедеятельности и функционировании (отношение АТФ/АДФ 8—10). Примерно 50 % АДФ этого пула связано с F-актином; о его метаболизме и роли почти ничего не известно [22, 52]. Серотонин также принимает участие в обеспечении нормального процесса местной вазоконстрикции и секретируется из гранул сопряженно с АДФ, АТФ,  $\text{Ca}^{2+}$  в момент реакции высвобождения.

Для количественной оценки метаболического фонда адениновых нуклеотидов обычно используют радиоизотопные методы с использованием меченых предшественников — аденина, аденозина, фосфата [21]. Плотные гранулы не включают «метку» и содержание в них адениновых нуклеотидов определяют обычно биOLUMИНЕСЦЕНТНЫМИ методами [28, 29].

Центральное место среди эффеКторов в регуляции обмена метаболических фондов  $\text{Ca}^{2+}$  и адениновых нуклеотидов, оказывающих влияние на интенсивность реакции агрегации и высвобождения, принадлежит ц-АМФ. Снижение концентрации ц-АМФ в тромбоцитах вызывает их активацию; увеличение концентрации — ингибирование. На рис. 1 суммированы некоторые известные данные по влиянию на аденилатциклазную систему эндоген-

Рис. 1. Схема влияния некоторых факторов на аденилатциклазную систему тромбоцитов.



ных биологически активных и лекарственных соединений [24, 38, 56]. Механизм ингибирования функции тромбоцитов ц-АМФ полностью не раскрыт. Вместе с тем известно, что ц-АМФ блокирует действие тромбосана  $A_2$ . Есть предположение, что образование ц-АМФ может приводить к резкому дефициту АТФ в связи с ее расходом в каскадном механизме активации под влиянием ц-АМФ гликогенолиза на активацию протеникиназы, фосфорилазы [46].

Следует отметить, что причиной нарушения гемостаза может быть также изменение уровня простагландинов и тромбосана  $A_2$ , являющихся сильными агрегирующими агентами.

В тромбоцитах обнаружена система ферментов: фосфолипаза  $A_2$ , расщепляющая фосфолипиды мембраны, что приводит к высвобождению арахидоновой кислоты, способной под действием циклооксигеназы тромбоцитов превращаться в циклические эндопероксиды ( $PG G_2$  и  $PG H_2$  и т. д.). Дальнейшее превращение образовавшихся эндопероксидов зависит от их локализации. В неповрежденной сосудистой стенке эндопероксид будет превращаться в простагландин и препятствовать формированию тромбоцитарного агрегата. В месте повреждения он будет превращаться в тромбосан  $A_2$ .

Механизм действия простагландина заключается в увеличении ц-АМФ, угнетении фосфолипазы  $A_2$  и соответственно агрегации. Таким образом, соединения, образующиеся из арахидоновой кислоты, приводят не только к образованию гемостатической пробки, но и препятствуют формированию и развитию последней [4, 27, 42, 49, 50].

Действие ц-ГМФ в тромбоцитах противоположно таковому ц-АМФ. Возможная роль регулятора функций

тромбоцитов для ц-ГМФ до настоящего времени не установлена [37].

Более подробно основы гемопоэза рассмотрены в работах, опубликованных ранее [2, 3, 5, 6].

## II. Исследование обмена адениновых нуклеотидов в тромбоцитах в норме и при гемофилии А

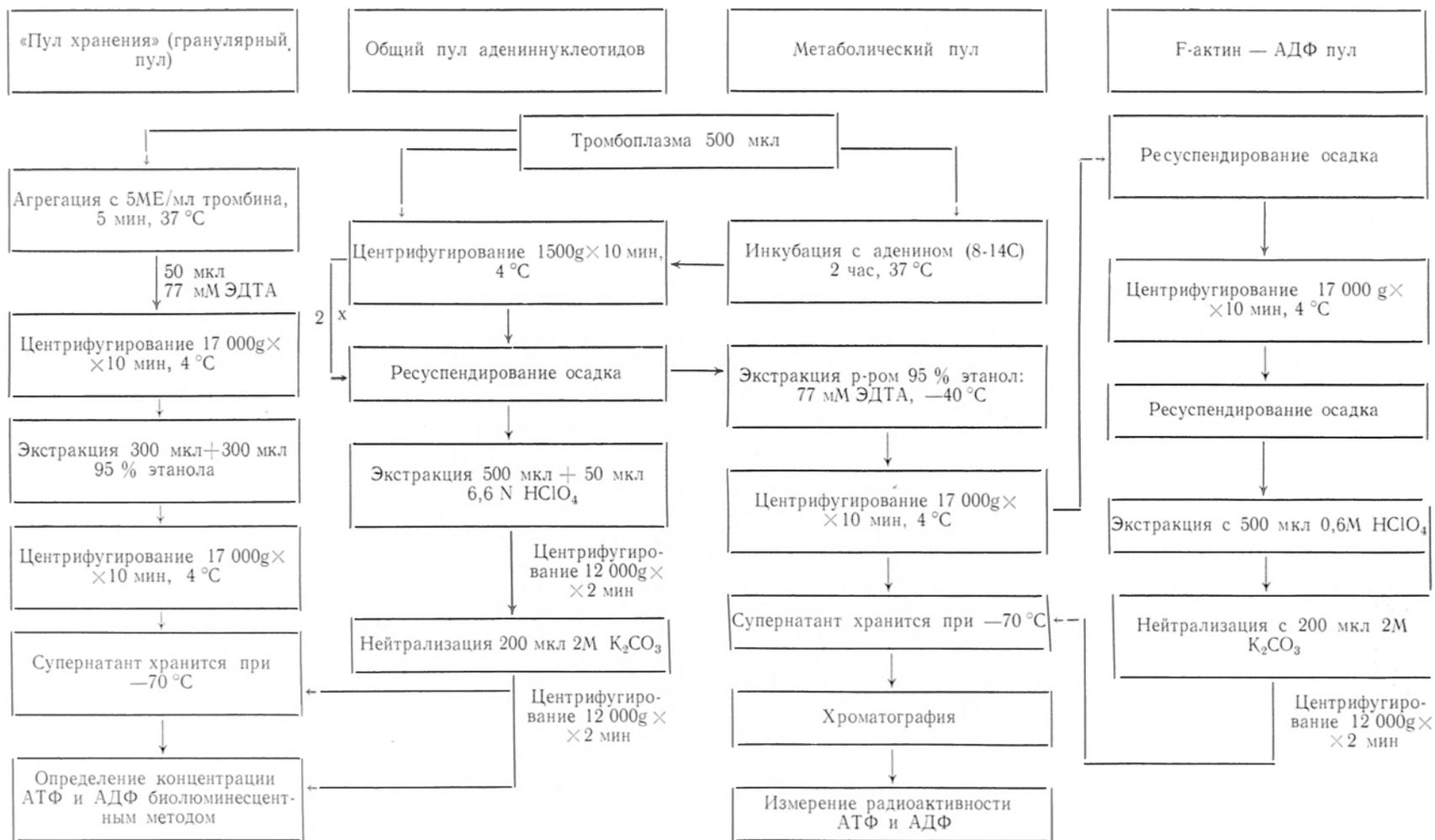
В свете обсуждаемой проблемы в целом возникает ряд существенных вопросов и главный из них: исследование метаболизма каких веществ в тромбоцитах и соответственно каких ферментных систем могло бы дать ту необходимую информацию, которая позволила бы констатировать генотипические изменения и квалифицировать данное заболевание как энзимопатию?

Первое, что обращает внимание, это уникальная особенность (в отличие от других клеток организма) к накоплению (на уровне мегакариота) в плотных гранулах резервного, неметаболизируемого фонда АТФ и АДФ. С ним, как было указано выше, связана гемостатическая функция тромбоцитов.

В настоящее время описана группа заболеваний с общим названием «синдром дефекта пула хранения», признаком которой является недостаточность плотных гранул и их химического состава [26, 32, 43]. Среди этих заболеваний такие, как альбинизм [30], синдром Германского — Пудлака [53], синдром Вискота — Олдрича [18], синдром Чедиака — Хигаси [19] и другие [41, 44, 48].

Второе (и это очень важно) запасаемые АТФ и АДФ требуют усиленного их синтеза и не столько за счет синтеза *de novo*, сколько за счет реутилизации оснований и нуклеозидов. Спо-

Схема экстракции и определения адениннуклеотидов в различных пулах тромбоцитов



Содержание адениннуклеотидов в тромбоцитах крови доноров и больных гемофилией А

Адениннуклеотиды	АТФ		АДФ		АТФ/АДФ	
	доноры	гемофилия А	доноры	гемофилия А	доноры	гемофилия А
Общий пул, нмоль/10 <sup>9</sup> клеток	51,4 ± 4,2 (10)	41,7 ± 3,7 (10)	28,4 ± 2,5 (10)	17,3 ± 1,2 (10)	1,8 ± 0,1 (11)	2,4 ± 0,1 (10)
«Пул хранения», нмоль/10 <sup>9</sup> клеток	11,8 ± 0,6 (11)	8,6 ± 0,9 (10)	15,6 ± 1,1 (12)	6,6 ± 1,1 (10)	0,7 ± 0,0 (12)	1,5 ± 0,2 (10)
Метаболический пул по включению 8- <sup>14</sup> С-аденина, нмп/млн/10 <sup>9</sup> клеток	5070,0 ± 544,9 (11)	5321 ± 712,1 (6)	834,2 ± 82,4 (11)	916,3 ± 148,2 (6)	6,1 ± 0,3 (11)	6,0 ± 0,4 (6)
F-актин АДФ, нмп/млн/10 <sup>9</sup> клеток	—	—	455,4 ± 54,4 (9)	468,1 ± 51,1 (6)	—	—
Удельная радиоактивность, нмп/нмоль	112,8 ± 13,4 (11)	168,8 ± 27,3 (8)	32,3 ± 4,4 (11)	63,6 ± 1,2 (8)	—	—

Примечание. Здесь и в табл. 2—5 в скобках—число больных.

способность тромбоцитов утилизировать, например, аденин также является не менее замечательной особенностью этих клеток по сравнению с другими. Это дает основание предположить, что ферментная система для утилизации пуриновых оснований занимает исключительно важное место, а отдельные ферменты могут служить маркерами возможных генотипических изменений (дефектов на уровне генома).

Поэтому представляет интерес сравнительное изучение содержания различных фондов адениновых нуклеотидов и активности ферментов, участвующих в метаболизме и реутилизации оснований и нуклеозидов. Определенные адениннуклеотидов в различных отделах тромбоцитов представлено на схеме 2.

При исследовании общего количества адениннуклеотидов выявлены изменения содержания АТФ и АДФ тромбоцитов больных гемофилией А (табл. 1). Наблюдается снижение уровня АТФ и АДФ при соотношении АТФ/АДФ, равном 2,4, по сравнению с нормой, равной 1,8.

При изучении адениннуклеотидов в гранулах хранения обращает на себя внимание значительное уменьшение (в 2,4 раза) АДФ у больных гемофилией при незначительном изменении содержания АТФ. Величина соотношения АТФ/АДФ у больных гемофилией в пуле хранения заметно увеличена и равна в среднем  $1,5 \pm 0,2$  (норма  $0,7 \pm 0,03$ ), что связано со снижением АДФ в гранулах хранения. Значительное снижение содержания АДФ и увеличение соотношения АТФ/АДФ в пуле хранения может быть информативным показателем, указывающим на

нарушение в уровне адениннуклеотидов и, по-видимому, сопровождаемое патологическими изменениями функциональной активности тромбоцитов. Следует подчеркнуть, что низкий уровень АДФ в пуле хранения коррелирует с недостаточностью  $Ca^{2+}$  [32].

Радиохимическое исследование адениннуклеотидов метаболического пула не выявило отклонений у больных гемофилией по сравнению с нормой. Отношение 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 в метаболическом пуле постоянно и поддерживается за счет гликолиза и окислительного фосфорилирования.

Наблюдается отчетливое увеличение удельной радиоактивности АТФ и АДФ у больных гемофилией, отражая дефицит адениннуклеотидов в гранулах хранения.

Сравнительное изучение АДФ—F-актина продемонстрировало включение радиоактивной метки, как и в случае других адениннуклеотидов метаболического пула. Из данных, представленных в табл. 2, видно, что около 50 % радиоактивности от общего количества включения «метки» в АДФ обнаружено в АДФ—F-актине, как в тромбоцитах доноров, так и в случае больных гемофилией.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об изменениях в содержании АТФ и АДФ в гранулах хранения тромбоцитов больных гемофилией и об отсутствии отклонений в метаболическом отделе. Они позволяют прийти к выводу о биохимическом дефекте в содержании адениннуклеоти-

Ферменты обмена пуринов тромбоцитов доноров и больных гемофилией А и В

Заболевание	Удельная активность, нмоль на 1 мг белка в 1 ч				
	АФРТ	ГГФРТ	АДА	ПНФ	5-нуклеотидаза
Гемофилия А	134,6±1,5 (12)	98,0±8,6 (12)	113,6±27,6 (3)	506,6±47,8 (11) 970,0 (2)	50,0±1,0 (6)
Гемофилия В	210,0±8,2 (10)	117,0±12,3 (8)	96,7±24,7 (5)	460,0±66,8 (5) 963,0 (2)	50,0±3,0 (5)
Доноры	235,0±2,3 (18)	222,0±4,8 (19)	110,0±28,9 (4)	839,0±19,0 (13)	41,0±3,4 (5)

дов в пуле хранения тромбоцитов больных гемофилией А и о возможности использования метода как теста на дисфункцию тромбоцитов.

Параллельно этим исследованиям мы проводили сравнительное изучение активности некоторых ферментов обмена пуриновых нуклеотидов. Теоретически в их обмене могут принимать участие более 20 различных ферментов (рис. 2). Однако внимание было уделено гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазе (ГГФРТ) и аденинфосфорибозилтрансферазе (АФРТ) как ключевым ферментам на пути утилизации пуриновых оснований. Но не только поэтому. Структурный ген ГГФРТ локализован в X-хромосоме, так же как и гены плазменных факторов VIII и IX, мутация которых приводит к нарушению свертывания крови. В зависимости от типа мутационных изменений на уровне генома можно ожидать при гемофилии А или В соответственно определенных изменений и на уровне фермента ГГФРТ. Вместе с тем ген АФРТ локализован в 16-й хромосоме. Представлялось интересным сравнить возможные изме-

нения двух указанных ферментов при различных формах гемофилии в целях выяснения степени перестройки генома при данных наследственных заболеваниях (количества затронутых генов). С этой же целью определяли активность других ферментов: пурипнуклеозидфосфориллазы (ПНФ) гуанозина, аденозиндезаминазы (АДА), 5'-нуклеотидазы, ксантиноксидазы [11, 12, 14]. Использованы методические разработки собственные и опубликованные в литературе [13, 17, 33, 36, 47, 54].

В комплексе обследования больных гемофилией входило определение прокагулянтной активности факторов VIII и IX, агрегации тромбоцитов в присутствии ристоминина и времени кровотечения. В результате проведенных исследований (см. табл. 2) выявлены особенности в изменении активности исследованных ферментов при гемофилии А и В. Активность АФРТ составляла 57 % при гемофилии А по сравнению с таковой в норме. При гемофилии В активность указанного фермента была в пределах нормы.

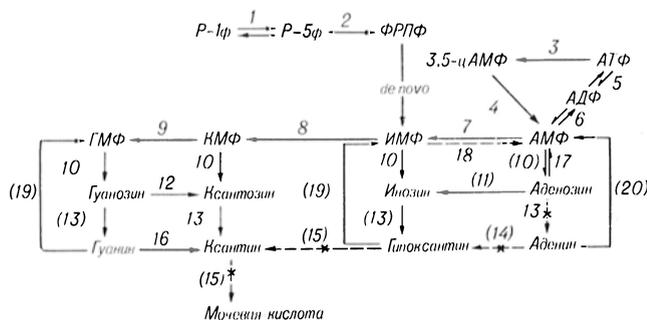


Рис. 2. Схема метаболизма пуринов в тромбоцитах доноров.

1 — фосфорибомутаза; 2 — фосфорибозилпрофосфатсинтетаза; 3 — аденилатциклаза; 4 — фосфоэстераза; 5 — Ca<sup>2+</sup>-зависимая АТФаза; 6 — фосфатаза (или 17); 7 — 5'-АМФ-дезаминаза; 8 — инозинмонофосфатдегидрогеназа; 9 — гуанозинмонофосфатсинтетаза; 10 — 5'-нуклеотидаза; 11 — АДА; 12 — гуанозиндезаминаза; 13 — ПНФ; 14 — аденинамниогидролаза (аденаза); 15 — ксантиноксидаза; 16 — гуанинамниогидролаза (гуаназа); 17 — нуклеозидкиназа; 18 — аденилосуцинатасинтетаза; 19 — ГГФРТ; 20 — АФРТ. В скобках — ферменты, исследуемые в лизатах тромбоцитов.

Активность ГГФРТ при гемофилии А составляла 44 % от активности его в норме. Аналогичное снижение ГГФРТ (52 %) наблюдалось и в случае гемофилии В. Нормальный уровень фермента был отмечен при обоих типах гемофилии, когда в качестве субстрата использовали гуанин. Сравнение удельной активности аденозиндезаминазы и 5'-нуклотидазы не выявило существенных различий по сравнению с нормой. При определении ПНФ наблюдалось снижение активности только у некоторых больных.

Данные, полученные при определении ГГФРТ в тромбоцитах больных гемофилией, послужили основанием для использования этого фермента в целях возможного выявления женщин-носительниц патологического гена гемофилии, что имеет важное значение для медико-генетического консультирования. Препятствием к решению проблемы диагностирования носительства является трудность надежного выявления женщин-кондукторов и определения степени риска рождения больного ребенка. Очень важное значение имеет разработка тестов, позволяющих выявить гетерозиготных носительниц гемофилии.

Обследовали женщин, у которых в семье констатировано рождение сыновей, больных гемофилией. Обследовали 10 семей. Все матери являлись носительницами гена гемофилии и имели риск рождения как больных сыновей, так и риск передачи носительства дочерям (рис. 3). Результаты, полученные при обследовании, демонстрируют снижение активности ГГФРТ в тромбоцитах женщин-носительниц и составляют в среднем  $125,2 \pm 9,4$  нмоль на 1 мг в 1 ч, т. е. 59 % от активности его в норме ( $222,0 \pm 4,8$  нмоль на 1 мг белка в 1 ч), и на биохимическом уровне подтверждают, что все матери являлись гетерозиготными. С помощью этого метода нам удалось выявить в

ряде семей также девочек-носительниц гемофилии, у которых, как и у матерей, был снижен уровень ферментативной активности (98,4 и 87,6 нмоль на 1 мг белка в 1 час соответственно). Следует отметить, что у гетерозиготных носительниц активность другого фермента АФРТ оставалась в пределах нормы.

Таким образом, были установлены факты изменения в активности ГГФРТ, АФРТ, заслуживающие внимания в плане дальнейших методических разработок для диагностики больных гемофилией, женщин-носительниц дефектных генов и диагностики сопутствующих заболеваний.

Проведена также оценка активности ГГФРТ в комплексе диагностических тестов на гетерозиготное носительство патологического гена гемофилии. В комплексе исследований входило параллельное определение прокоагулянтной активности VIII фактора (VIII:c) и антигена фактора (VIII R:Ag), а также анализ родословной семьи. На основании всех указанных показателей методом дискриминантного анализа рассчитывали установление носительства у возможных гетерозигот. Параллельно проводили определение ГГФРТ и наблюдали достоверное снижение ее активности как у облигатных, так и вероятных носителей. В тех случаях, когда вероятность гетерозиготного носительства по данным дискриминантного анализа оказывалась недостаточно высокой ( $P=42$  и  $76\%$ ), активность ГГФРТ была всегда снижена примерно в 2 раза по сравнению с нормой. Данные наших исследований позволяют предложить использование метода определения ГГФРТ для выявления гетерозиготного носительства гена классической гемофилии в сочетании с клинико-генеалогическим, иммунологическим и другими методами исследования.

Вместе с тем основной вывод заключается в следующем: функциональная неполноценность тромбоцитов при гемофилии обусловлена наследственной полигенного характера энзимопатией на уровне ферментов реутилизации пуриновых оснований и нуклеозидов, которая приводит к нарушению организации гранулярного, запасного фонда адениновых нуклеотидов в мегакариоцитах и их использованию в процессе реализации функции.

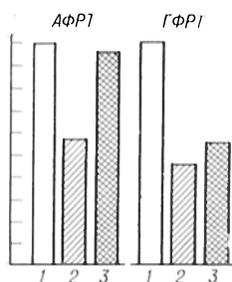


Рис. 3. Активность АФРТ, ГФРТ тромбоцитов в норме, при гемофилии А и у женщин-носительниц патологического гена. 1 — норма; 2 — гемофилия А; 3 — гетерозиготные носители. По оси ординат — активность (в %).

### III. Исследование дисферментемии пуринового обмена в тромбоцитах больных лейкозом

Исследование дисферментемии пуринового обмена в тромбоцитах при опухолевых гематологических заболеваниях имеет как практическое (для здравоохранения), так и общепатологическое значение. Согласно современным представлениям об этиологии лейкозных заболеваний, мы вправе ожидать изменений на уровне наиболее важных, ключевых ферментов обмена пуринов.

К настоящему времени накопилось данные, свидетельствующие о том, что злокачественные новообразования генетически детерминированы. При исследовании распространения, например, лейкозов в различных популяциях детей были получены результаты, которые объяснялись с позиции законов популяционной генетики. В частности, анализ показал, что частоты детских опухолей оставались стабильными от поколения к поколению и различались от популяции к популяции, что согласуется с законом Харди—Вайнберга и свидетельствует в пользу генетической концепции новообразований.

Онкогенная теория опухолевой трансформации сегодня объединяет в единый механизм вирусное, химическое или эпигенетическое происхождение раковой клетки. Пока не ясен механизм «включения» онкогена. Можно предположить, что в его основе лежат процессы транспозиции (в соответ-

ствии с промоторной гипотезой Г. П. Гергинева) [7]. По-видимому, речь идет об изменении генетической программы. Относительно предмета наших исследований мы должны, следовательно, предположить, что фенотипические изменения на уровне ферментов тромбоцитов — это результат перепрограммирования генома на уровне стволовой кроветворной клетки в процессе опухолевой трансформации. Интересные результаты были получены при исследовании аденазы (аденинамногидролазы КФ 3.5.4.2) в клетках периферической крови, фермента, который не обнаруживается в этих клетках у высших животных и человека при нормальной дифференцировке клеток [9].

Таблица 4

АДА и ПНФ тромбоцитов крови доноров и людей с различными гематологическими заболеваниями

Заболевание	Удельная активность, нмоль на 1 мг белка в 1 ч	
	АДА	ПНФ
Миелопролиферативные:		
хронический миелолейкоз	70,9±10,2 (10)	343±19,7 (11)
хронический миелолейкоз — бластная трансформация хронический миелолейкоз — мегакариобластный криз	90,0±14,7 (6)	340±34,4 (5)
Острый лейкоз:		
острый лимфобластный лейкоз	83,0 (1)	123 (1)
острый миелобластный лейкоз	65,0 (2)	282 (2)
Лимфопролиферативные:		
неходжкинская лимфома	28,0 (1)	680 (1)
хронический лимфолейкоз	229,0±42,6 (6)	1241±940,0 (4)
миелома	56,0±5,4 (3)	508±65,0 (7)
макроглобулинемия Вальденстрема	354,0±52,0 (4)	—
Норма	63,4±13,6 (5)	506±44,1 (5)
Хронический лимфолейкоз	63,7±6,8 (6)	532±75,8 (7)
Хронический миелолейкоз	132,0±25,0 (3)	978±60,6 (3)
Острый лейкоз		
Лимфома		
Тромбоцитемия		
Норма	135,0±18,6 (6)	832±2,1 (7)

Таблица 3

Аденаназная активность в форменных элементах крови доноров и людей с различными заболеваниями крови

Диагноз	Удельная активность аденазы, нмоль образованного гипоксантина на 1 мг белка за 1 ч		
	эритроциты	лейкоциты	тромбоциты
Норма	0,071±0,016 (3)	0 (3)	0 (3)
Хронический лимфолейкоз	0,051±0,006 (4)	0 (3)	1,52±0,14 (5)
Хронический миелолейкоз	0,026±0,06 (4)	0 (4)	1,96±0,45 (5)
Острый лейкоз	0,067±0,027 (4)	0 (3)	3,35±0,64 (5)
Лимфома	—	—	4,2
Тромбоцитемия	—	—	8,5

Аналогичные данные были получены при определении аденазы в тромбоцитах навнано, гамадрилов с разной выраженностью гемобластоза [10]. В табл. 3 представлены результаты этих исследований.

Тот факт, что аденазная активность, обнаруживаемая при опухолевых заболеваниях, в частности, при лейкозах, свидетельствует о том, что соответственная программа сохранена и может быть реализована. Механизм такого «молчания» и соответственно возобновленные функции данной генетической программы не изучены. Можно предположить, что мобильно-генетические элементы, играющие роль как в коммитировании клеток, так и в злокачественной трансформации, ответственны за инициацию экспрессии генов. Процессы транспозиции и обеспечивают, по-видимому, включение или выключение генов, ответственных за реализацию онкогенной программы.

В табл. 4 представлены данные по определению аденозиндезаминазы и уридинуклеозидфосфорилазы гуанозин-

на в тромбоцитах при различных гематологических заболеваниях. Первое, что обращает на себя внимание, это то, что практически во всех случаях имели место отклонения от нормальных величин.

Вместе с тем при острых и миело-пролиферативных лейкозах отмечается отчетливая однотипность фенотипических изменений, а именно снижение активности указанных ферментов. Что касается лимфопролиферативных заболеваний, то здесь имели место как снижение, так и повышение активности. Исключенне составляла макроглобулинемия Вальденстрема — АДД и ПНФ в пределах нормы.

Как уже отмечалось, функциональная неполноценность тромбоцитов при лейкозах обнаруживается еще до того, как появляются другие гематологические симптомы обострения заболевания. Выраженность функциональной недостаточности тромбоцитов при различных формах лейкозов очевидна. Результаты исследований, представленные в табл. 5, показали, что ми-

Таблица 5

Агрегационная активность тромбоцитов (в % от исходной) при гематологических заболеваниях

Заболевания	Агрегирующий агент					
	АДФ, $1,25 \times 10^{-6}$ М	АДФ, $1 \cdot 10^{-4}$ М	тромбин $0,4$ МЕ/мл	адреналин $1 \cdot 10^{-3}$ М	коллаген, $4$ мкг/мл	ристемина, $1,5$ мг/мл
Миело-пролиферативные заболевания:						
хронический миелолейкоз	$10,0 \pm 5,0$ (22)	$19,8 \pm 3,2$ (22)	$12,8 \pm 3,4$ (22)	$11,0 \pm 2,1$ (22)	$23,5 \pm 6,5$ (22)	—
	$64,0 \pm 10,0$ (7)	$85,0 \pm 5,0$ (7)	$81,6 \pm 6,4$ (7)	$68,0 \pm 15,0$ (7)	$90,0 \pm 10,0$ (7)	—
хронический миелолейкоз — бластная трансформация	—	$33,0 \pm 10,6$ (3)	—	—	$48,5$ (1)	$60,0$ (2)
острый лейкоз	$26,0$	$32,0$	$36,0$	$20,0$	—	—
Лимфо-пролиферативные:						
хронический лимфолейкоз	$17,3 \pm 7,0$ (3)	$34,6 \pm 4,4$ (5)	$19,0 \pm 3,7$ (3)	$23,8 \pm 4,2$ (3)	$27,5$ (1)	$20,0$ (1)
неходжкинская лимфома	$15,0$ (1)	$28,0 \pm 2,7$ (4)	$20,0$ (2)	$15,0$ (1)	$38,3 \pm 12,0$ (3)	$37,8 \pm 14,2$ (5)
макроглобулинемия Вальденстрема	—	$69,0$	—	—	$70,0$	$60,0$
миелома	—	$69,0 \pm 4,9$ (4)	—	—	$62,2 \pm 4,9$ (4)	$69,3 \pm 2,7$ (4)
Норма	30—40	50—60	70—80	50—60	50—60	48—91

Примечание. Прочерк — активность не определяли.

ло- и лимфопрлиферативные заболевания сопровождаются дисфункцией тромбоцитов по сравнению с таковой у здоровых под воздействием различных агрегирующих веществ, что свидетельствует о дефекте как первой, так и второй фазы агрегации. Нарушение второй фазы агрегации тромбоцитов, выявленное у обследованных больных под воздействием адреналина, коллагена, тромбина и высоких концентраций АДФ, позволяет говорить о дефекте запасных пулов в них и об истощении по типу болезни «запасных пулов» при этих заболеваниях. При определении внутриклеточного содержания адениннуклеотидов (АТФ, АДФ) в гранулах хранения была обнаружена гетерогенная группа больных хроническим миелолейкозом. Наблюдается уменьшение АДФ (в 4,61 раза) и в меньшей степени АТФ у ряда больных, а также содержание АТФ и АДФ в пределах нормы у других, что может быть результатом дефекта образования тромбоцитов и отражать первоначальные нарушения в самих мегакариocyтах, развивающихся под влиянием бластного окружения. Ряд авторов также предполагает, что в костном мозге при опухолевой трансформации существует популяция тромбоцитов как с нормальной, так и с нарушенной функциональной активностью их к разным агрегирующим агентам [34, 35].

Разброс в изменениях уровня функциональной и ферментативной активности может свидетельствовать о гетерогенности генетических изменений и факторов, их вызывающих.

С точки зрения энзимологии полезно в этих случаях использовать сравнительное изучение влияния различных факторов, например структурных аналогов пурина, металлов и температуры, на активность ферментов. Сравнивали влияние различных аналогов пуринов, у которых в 6-м положении пуринового кольца  $\text{NH}_2$ -группа замещена на хлоро-, меркапто-, метил-группы, а также аналоги пуринов, модифицированные в имидазольном кольце: 8-азааденина, 6-метиламинопурина, 6-хлорпуририбозид, аденина, 6-меркаптопурина, 6-хлорпурина, 2,6-дiamiнопурина, формицина, 6-метил-аденозина на активность аденозиндезаминазы тромбоцитов доноров (удельная активность  $135,0 \pm 18,6$  ед.) и боль-

ных хроническим миелолейкозом (удельная активность  $90,0 \pm 14,7$  ед.).

Установлено, что наибольший ингибирующий эффект наблюдался при использовании 8-азааденина, 6-метиламинопурина и 6-хлорпуририбозид. Азааденин в 4,6 раза более эффективен как ингибитор АДА тромбоцитов больных хроническим миелолейкозом по сравнению с нормой. 6-метил-аминопурин, 6-хлорпуририбозид ингибирует фермент при хроническом миелолейкозе в меньшей степени (в 1,8 раза). По характеру влияния другие ингибиторы не отличались от нормы.

При сравнительном изучении влияния металлов:  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Cs}^{2+}$  наиболее значительные изменения наблюдались при использовании  $\text{Mn}^{2+}$  (у доноров 30 % ингибирование, у больных хроническим миелолейкозом — 63 %).

При исследовании термолабильности аденозиндезаминазы отмечено, что фермент тромбоцитов при хроническом миелолейкозе более термолабилен.

Полученные результаты свидетельствуют об изменении каталитических свойств АДА тромбоцитов больных хроническим миелолейкозом по сравнению с нормой и данный подход может быть использован как для более ранней констатации фенотипических изменений, так и в качестве показателей аномалий фермента.

#### IV. Заключение

В заключение по представленным результатам и сделанным из них выводам хотелось бы акцентировать внимание на следующих основных положениях общего и частного характера:

— фенотипические изменения на уровне обмена пуриновых нуклеотидов в тромбоцитах, наблюдаемые при наследственной патологии и генетически опосредованных заболеваниях (лейкозах), с наибольшей вероятностью являются отражением генотипических изменений в процессе развития стволовых клеток или мегакариоцитов;

— при сравнении различных форм лейкозов и в пределах одной формы наблюдается значительный полиморфизм изменений. Полученные результаты не подтверждают известное мнение о том, что хронические формы лей-

козов являются результатом перестройки генома (интеграции вирусного генома) только на уровне колониеобразующих клеток; они в большей степени свидетельствуют о генотипических изменениях на уровне стволовых мультипотентных клеток;

— в перестройки генома при опухолевой трансформации могут вовлекаться гены, имеющие непосредственное отношение к дифференцировке клеток («промоторная» теория Г. П. Георгиева). Такое «вовлечение» приводит к нарушению дифференцировки клеток и к изменению наиболее уязвимых характерных путей метаболизма [7, 8].

Наше предположение сводится к тому, что уникальное свойство накапливать адениновые нуклеотиды в качестве неметаболизируемого фонда в гранулах (а их образование в процессе развития мегакариоцитов — неоспоримый дифференцировочный признак) обусловлено главным образом повышенной способностью этих нормальных клеток к реутилизации оснований и нуклеозидов и компартиментализации нуклеотидов. Результаты изменений на этом уровне как при гемофилии, так и при лейкозах, свидетельствуют в пользу этого предположения.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Андреев С. В., Кубатиев А. А. — В кн.: Современные проблемы тромбозов и эмболии. М., 1978. — С. 84—86.
2. Баркаган З. С. Тромбообразование и патология гемостаза. Томск, 1982. — 120 с.
3. Воробьев А. И. Руководство по гематологии. М., 1985. — С. 448.
4. Варфоломеев С. Д., Мевх А. Т. Простагландины — молекулярные биорегуляторы. М., 1985. — С. 308.
5. Гаврилов О. К., Кавешникова Б. Ф. // Проблемы и гипотезы в учении о свертываемости крови. М., 1981. — С. 75—100.
6. Гаврилов О. К., Козинец Г. И., Черняк Н. Б. Клетки костного мозга и периферической крови. М., 1985. — С. 288.
7. Георгиев Г. П. // Мол. биол., 1981. — Т. 15. — С. 261—273.
8. Сейц И. Ф., Князев П. Г., Федоров С. Н. // Вопр. онкологии, 1982. — № 28. — С. 95—98.
9. Соковнина Я. М., Дебов С. С. // Вопр. мед. химии, 1976. — № 1. — С. 117—119.
10. Соковнина Я. М., Дебов С. С., Яковлева Л. А., Цхакая Н. А. // Бюлл. Экспер. биол. и мед., 1977. — № 11. — С. 555—556.
11. Соковнина Я. М., Пестина Т. И., Чижова А. И., Тенцова И. А., Вотрин И. И. // Вестн. АМН СССР, 1984. — № 8. — С. 75—80.
12. Соковнина Я. М., Пестина Т. И., Тенцова И. А., Плюц О. П., Вотрин И. И. // Вопр. мед. химии, 1985. — № 7. — С. 76—79.
13. Соковнина Я. М., Мареева Т. Б., Плюц О. П., Вотрин И. И. // Вопр. мед. химии, 1985. — № 5. — С. 114—117.
14. Соковнина Я. М., Мареева Т. Б., Богданова Н. Н., Пестина Т. И., Вотрин И. И. // Всесоюзный биохимический съезд: 5-й. Киев, 1986. — С. 307—308.
15. Фермилен Ж., Ферстрате М. // Гемостаз. — М., 1984. — С. 192.
16. Al-Mondhiry H. // Amer. J. Haematol. — 1984. — Vol. 161. — P. 193—202.
17. Belfield A., Ellis G., Goldberg D. M. // Clin. Chem. — 1970. — Vol. 11. — P. 396—401.
18. Baldine M. G. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1972. — Vol. 201. — P. 437.
19. Boxer G. J., Holmsen H., Robkin C., Bang N. U., Boxer L. A., Balkner R. L. // Brit. J. Haematol. — 1977. — Vol. 35. — P. 521—533.
20. Benfeld-Barker M. E., Bainton O. F. // Blood. — 1982. — Vol. 59. — P. 472—481.
21. Cowan D. H., Graham R. G., Baunach D. // J. Clin. Invest. — 1975. — Vol. 56. — P. 188—200.
22. Daniel J. L., Robkin L., Molish J. R., Holmsen H. // J. Biol. Chem. — 1979. — Vol. 254. — P. 7870—7873.
23. Daniel J. L., Molish J. R., Holmsen H. // Biochem. Biophys. Acta. — 1980. — Vol. 632. — P. 444—452.
24. Dayal V. // Biochim. Biophys. Acta. — 1983. — Vol. 759. — P. 129—136.
25. Fukami M. H., Salganicoff L. // Thromb. and Haemost. — 1977. — Vol. 38. — P. 963—970.
26. Gerrard J. M., Stoddard S. F., Shapiro R. S. et al. // Brit. J. Haematol. — 1978. — Vol. 40. — P. 597—607.
27. Gorman R. R. // Fed. Proc. — 1979. — Vol. 38. — P. 83—88.
28. Holmsen H., Storm E., Day H. J. // Anal. Biochem. — 1972. — Vol. 46. — P. 489—501.
29. Holmsen H., Weiss H. J. // Blood. — 1972. — Vol. 39. — P. 197—209.
30. Hardisty R. M., Mills D. C. B., Kolsa-Ard K. // Brit. J. Haematol. — 1972. — Vol. 23. — P. 679—689.
31. Holmsen H. // Platelets, Production, Function, Transfusion and Storage. — 1974. — P. 207—221. Edited by M. G. Baldini & Sh. Ebbe Grune and Stratton, INC. New York, San Francisco, London.
32. Holmsen H., Weiss H. J. // Ann. Rev. Med. — 1978. — Vol. 30. — P. 119—134.
33. Heinz F. // J. Clin. Chem. Clin. Biochem. — 1980. — Vol. 18. — P. 781—788.
34. Weiss H. J. // New Engl. J. Med. — 1975. — Vol. 293. — P. 580—583.
35. Hirschhorn R., Roegner V., Jenkis T. // J. Clin. Invest. — 1979. — Vol. 64. — P. 1130—1139.
36. Kalckar H. M. // J. Biol. Chem. — 1947. — Vol. 167. — P. 429—475.
37. Laubscher A., Pletscher A. // J. Pharm. Pharmacol. — 1980. — Vol. 32. — P. 601—607.
38. Michel H., Caen J. P., Borg G. V. P. // Brit. J. Haematol. — 1976. — Vol. 33. — P. 27—38.
39. Miller O., Gorman R. // J. Cyclic Nucleotide Res. — 1976. — Vol. 2. — P. 67—79.
40. Miller J. L., Stuart M. J., Walenda R. W. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1982. — Vol. 107. — P. 752—759.

41. Nishimura J. // *Thromb. Haemost.*—1979. — Vol. 41. — P. 787—795.
42. Nahas N., Graf J. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*—1982. — Vol. 109. — P. 1035—1040.
43. Pareti F. J., Day H. J., Mills D. C. B. // *Blood.*—1974. — Vol. 44. — P. 789—800.
44. Pareti F. J., Gugliotto L. // *Thromb. Haemost.*—1982. — Vol. 47. — P. 84—89.
45. Pidar D., Montgomery R. R., Bennet I. S., Kunicki T. J. // *J. Biol. Chem.*—1983. — Vol. 258. — P. 12582—12586.
46. Scheider W. H. G. // *Platelets, Production, Function, Transfusion and Storage* / Eds. M. G. Baldini, Sh. E. Grune and Stratten, JNK—New York, 1974—P. 177—187.
47. Stoekler J. D. // *Methods Enzymology.* — 1978. — Vol. 51. — P. 530—538.
48. Summerfield G. P., Keenan I. P., Brodie N. J., Bellingham A. J. // *Clin. Lab. Haematol.*—1981. — Vol. 3. — P. 257—271.
49. Schafer A. J. // *Blood.*—1980. — Vol. 56. — P. 853—858.
50. Seiss W., Roth P., Weber P. C. // *Thromb. Haemost.*—1981. — Vol. 45. — P. 204—207.
51. Schwartz K. A., Slichter S. J., Harker L. A. // *Brit. J. Haematol.*—1982. — Vol. 51. — P. 17—24.
52. Ugurbil K., Holmsen H., Shulman R. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1979. — Vol. 76. — P. 2227—2231.
53. White J. G., Edson J. R., Desnick S. J., Wilkop G. J. // *Amer. J. Pathol.*—1971. — Vol. 63. — P. 319—330.
54. Weyden M. B., Bayley L. // *Clin. Chim. Acta.*—1978. — Vol. 82. — P. 179—184.
55. Whann J. // *Thromb. Haemost.*—1980. — Vol. 43. — P. 99—103.
56. Woerner P., Patscheke H. // *Thromb. Haemost.*—1981. — Vol. 21. — P. 201—206.
57. Wesemann W., Raha S. // *Europ. J. Cell. Biol.*—1985. — Vol. 37. — P. 117—122.

Поступила 09.06.86

УДК 612.745.1-08:[612.129:577.175+612.129:[547.95:547.943]-088.1

А. А. Вирю, Ж. Л. Тендзегольскис, К. М. Карельсон, К. П. Алев,  
Т. А. Смирнова

### ВЗАИМООТНОШЕНИЯ МЕЖДУ ИЗМЕНЕНИЯМИ СОДЕРЖАНИЯ $\beta$ -ЭНДОРФИНА И РЯДА ГОРМОНОВ В КРОВИ ВО ВРЕМЯ МЫШЕЧНОЙ РАБОТЫ

Кафедра спортивной физиологии и лаборатория гормональной регуляции мышечной деятельности Тартуского университета

Вместе с повышением активности гипофизарно-адренкортикальной системы при стрессовых воздействиях наблюдается увеличение содержания  $\beta$ -эндорфина в крови [15, 16]. То же обнаруживается при напряженных физических упражнениях [6, 7, 10]. Реакция гипофизарно-адренкортикальной системы на длительное стрессорное воздействие вообще [2], в том числе на продолжительные физические упражнения [1, 3], характеризуется полифазностью, в частности наступлением фазы субнормальной активности после первоначальной активации системы. Задачей настоящего исследования является выяснение изменений содержания  $\beta$ -эндорфина в крови при длительной мышечной работе, приводящей к появлению фазы субнормальной активности гипофизарно-адренкортикальной системы. Вместе с тем изучали также изменения в содержании кортизола, кортикотропина, соматотропина, инсулина и триглицеридов.

#### Методика

Обследовано 22 здоровых мужчины, разделенных на 3 группы: 1-я — 6 нетренированных студентов (возраст 18—23 года, масса тела 65—89 кг, рост 176—188 см); 2-я — 6 спортсменов-гребцов (2 мастера спорта, 1 кандидат в мастера спорта, 3 перворазрядника, возраст 17—22 года, масса 68—89 кг, рост 177—190 см); 3-я — 10 мужчин, занимающихся развитием выносливости в оздоровительных целях (возраст 21—39 лет, масса 61—82 кг, рост 170—184 см). Предварительно у всех обследуемых определяли максимальное потребление кислорода (МПК) с помощью ступенчато повышающихся нагрузок с 1-минутным финишным спуртом [5]. МПК (в мл·мин<sup>-1</sup> на 1 кг массы тела) составляло в 1-й группе 42—61 (в среднем 50,0±3,6), во 2-й — 50—63 (59,4±4,9), в 3-й — 40—71 (54,8±4,5). Утром с 9 до 11 ч (через 1 ч после стандартного завтрака) обследуемые выполняли 2-часовую работу на велоэргометре. Предлагалось поддерживать мощность работы, соответствующую 60% от уровня МПК. Определение потребления кислорода на 29, 59 и 119-й минуте работы показало, что на самом деле относительная интенсивность работы, судя по проценту использования аэробных возможностей организма, существенно варьировала. Так, потребление кислорода во время работы составляло 44—76%

Т а б л и ц а 1

Изменение содержания  $\beta$ -эндорфина в плазме крови (в нмоль·л<sup>-1</sup>) во время 2-часовой работы на велоэргометре ( $x \pm m$ )

Группа обследуемых	До работы	На 30-й минуте работы	На 60-й минуте работы	На 120-й минуте работы	Через 1 ч после работы
Нетренированные студенты (6)	7,8±3,5	7,5±2,8	3,3±1,6	4,9±0,9	—
Спортсмены (6)	11,4±5,5	16,0±6,1	7,6±3,4	36,5±10,3	—
Лица, занимающиеся оздоровительной физкультурой (10)	6,9±0,6	7,9±1,2	6,3±2,0	10,9±2,8	5,9±1,9

Пр и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2: в скобках — число обследуемых.

от МПК. Частота сокращений сердца находилась в пределах 150—180 ударов в минуту.

За 30 мин до начала работы обследуемым вводили в локтевую вену полиэтиленовую канюлю. Пробы венозной крови брали до работы, на 30, 60 и 120-й минуте работы. В 3-й группе пробы крови брали также через 1 ч после работы. Призму крови выделяли непосредственно с помощью рефрижераторной центрифуги. Содержание  $\beta$ -эндорфина определяли радиоиммунологически с помощью набора фирмы «Instituto Nuclear Corporation» при 2—4°C. У лиц 1-й группы в плазме крови определяли радиоиммунологически также содержание кортикотропина, соматотропина, кортизола, инсулина и трийодтиронина, используя для этого наборы фирмы «Sea-Ice-Sorin». У лиц 2-й и 3-й групп ограничивались определением кортизола, кортикотропина и соматотропина.

#### Результаты и обсуждение

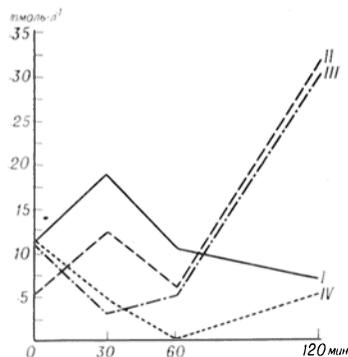
Исходный уровень  $\beta$ -эндорфина варьировал значительно между обследуемыми. В 3 случаях он был выше принятых норм (11,5, 23,5 и 38,0

нмоль·л<sup>-1</sup>). У одного обследуемого до работы не удалось обнаружить  $\beta$ -эндорфин в плазме крови. Варьировала также реакция содержания  $\beta$ -эндорфина в крови на мышечную работу. В этой связи средние данные, представленные в табл. 1, указывают лишь на тенденцию к увеличению концентрации  $\beta$ -эндорфина в течение первых 30 мин работы и выявляют статистически значимый прирост концентрации у спортсменов к концу работы. Индивидуальный анализ изменений выявил 4 варианта динамики (рисунок): 1) увеличение концентрации  $\beta$ -эндорфина в плазме крови в течение первых 30 мин, сменяющееся снижением до уровня ниже исходного; 2) двухпиковая кривая изменений с существенным увеличением концентрации нейронептида на 30-й и 120-й минуте работы; 3) повышенные концентрации

Т а б л и ц а 2

Распределение различных вариантов динамики изменений концентрации  $\beta$ -эндорфина в плазме крови у обследуемых различных групп и в зависимости от уровня максимального потребления кислорода

Группа обследуемых	1-й вариант — первоначальное увеличение концентрации, сменяющееся ее снижением	2-й вариант — двухпиковая кривая изменений	3-й вариант — увеличение концентрации лишь к концу работы	4-й вариант — снижение концентрации
Нетренированные студенты (6)	3	1		2
Спортсмены (6)	—	4	1	1
Лица, занимающиеся оздоровительной физкультурой (10)	3	4	2	1
Уровень МПК (в мл·мин <sup>-1</sup> ·кг <sup>-1</sup> ):				
40—53	5	3	1	1
55—71	2	7	1	2
Процент использования МПК во время работы:				
43—54	4	2	2	3
55—73	3	8	—	—



Четыре варианта динамики изменений концентрации  $\beta$ -эндорфина в плазме крови (I, II, III, IV).

нейропептида лишь к концу работы; 4) снижение содержания нейропептида в течение работы или небольшое его увеличение в течение последнего часа работы. Распределение этих вариантов (табл. 2) показывает, что спортсменная свойственна в основном двухпиковая кривая изменений (2-й вариант), а снижение концентрации нейропептида после его первоначального увеличения (1-й вариант) наблюдалось только у менее тренированных лиц (нетренированные студенты и лица, занимающиеся оздоровительной физкультурой). Дальнейший анализ распределения различных вариантов динамики с учетом уровня МПК и относительной мощности выполняемой работы показал, что обследуемым с высоким уровнем МПК (от 55 до 71 мл·мин<sup>-1</sup>·кг<sup>-1</sup>) была свойственна в основном высокая концентрация  $\beta$ -эндорфина в конце работы (2-й и 3-й варианты динамики). Отсутствие первоначального (в течение первых 30 мин) увеличения концентрации нейропептида (3-й и 4-й варианты) наблюдается только тогда, когда относительная мощность работы ниже 55 % от МПК.

Таким образом, полученные данные согласуются с результатами некоторых предшествующих исследований, указывающих на большие возможности продукции эндорфинов в тренированном организме [4, 12]. Отражением этого, очевидно, является высокий уровень  $\beta$ -эндорфина в крови в конце 2-часовой работы у обследуемых, обладающих высоким уровнем аэробной работоспособности.

Сопоставление изменений уровня  $\beta$ -эндорфина с изменениями концент-

Таблица 3

Изменение концентрации  $\beta$ -эндорфина и некоторых гормонов в крови во время 2-часовой мышечной работы у нетренированных студентов

Иследуемый показатель	Первая подгруппа (n=4)				Вторая подгруппа (n=2)			
	до работы	во время работы, мин			до работы	во время работы, мин		
		30-я	60-я	120-я		30-я	60-я	120-я
$\beta$ -Эндорфин, нмоль·л <sup>-1</sup>	13,3±6,7	35,7±2,75	14,8±9,6	5,5±1,7	2,2±1,4	2,2±1,5	1,2±0,5	3,4±1,3
Кортикотропин, пг·мл <sup>-1</sup>	95±17	133±69	207±101	64±5	40±4	32±7	83±35	30±4
Кортизол, нг·мл <sup>-1</sup>	244±12	287±8	259±1	187±34	237±4	162±27	143±13	124±42
Сомастатин, нг·мл <sup>-1</sup>	2,3±0,3	4,0±1,0	16,1±7,5	23±15,0	0,7±0,5	3,7±2,1	4,9±3,6	8,2±3,3
Инсулин, мЕд·мл <sup>-1</sup>	22±2	11±5	12±3	6±4	18±3	14±2	14±4	9±1
Триглицероны, нг·мл <sup>-1</sup>	1,71±0,32	1,72±0	1,76±0,03	1,45±0,40	1,70±0,10	1,70±0,11	2,01±0,31	1,71±0,11

рации кортикотропина и кортизола выявило общую согласованность (табл. 3). У тех нетренированных студентов, у которых выявилась четкая двухфазная динамика в уровне  $\beta$ -эндорфина, концентрации кортикотропина и кортизола увеличивались в течение 1-го часа работы и снижались до уровня ниже исходного в течение 2-го часа работы. При этом у всех этих обследуемых содержание кортикотропина и кортизола было выше исходного или на 30-й, или на 60-й минуте. У остальных нетренированных студентов закономерных изменений в содержании кортикотропина не обнаружилось, а содержание кортизола в крови снижалось в течение всей работы. Хорошая согласованность между изменениями концентраций  $\beta$ -эндорфина, кортизола и кортикотропина в крови наблюдалась во всех случаях у лиц, занимающихся оздоровительной физкультурой (см. рисунок). При 1-м и 2-м вариантах динамики по  $\beta$ -эндорфину уровни кортизола и кортикотропина повышались к 30-й минуте работы соответственно на  $150 \pm 30$  мг·мл<sup>-1</sup> и  $42 \pm 13$  пг·мл<sup>-1</sup>.

Таким образом, полученные данные подтверждают согласованность в стрессовой реакции содержания  $\beta$ -эндорфина в крови и активности гипофизарно-адренкортикальной системы, что заранее установлено по параллельному увеличению уровней  $\beta$ -эндорфина и кортикотропина при кратковременных физических упражнениях [6, 7, 10] и действия других стрессоров [15, 16]. Основой такого параллелизма считается происхождение кортикотропина и  $\beta$ -эндорфина из общего предшественника проопиомеланокортина [12]. Дополнительно к этому полученные данные позволяли установить, что полифазный характер стрессовой реакции, свойственный гипофизарно-адренкортикальной системе [4], выявляется также в изменениях продукции  $\beta$ -эндорфина. По крайней мере субнормальная фаза активности гипофизарно-адренкортикальной системы, наступающая через длительный период мышечной работы, сочетается с уменьшением продукции  $\beta$ -эндорфина. По-видимому, в основе обоих изменений лежит уменьшение синтеза проопиомеланокортина или истощение его запасов. Полифазный характер и параллелизм в изменениях

уровней  $\beta$ -эндорфина и кортикотропина в крови установлены после адреналэктомии [8]. При этом показано и вторичное усиление продукции обоих регуляторных пептидов, наступающее через 4 сут после операции. Это согласуется с повышенным содержанием иРНК-проопиомеланокортина в адепогипофизе у хронически адреналэктомированных крыс [17], указывающее на повышенный синтез проопиомеланокортина в третьей фазе.

Полученные данные об отсутствии активации как гипофизарно-адренкортикальной системы, так и продукции  $\beta$ -эндорфина у некоторых людей во время выполнения 2-часовой работы свидетельствуют, что у части людей эти процессы малочувствительны к активирующим воздействиям, возникающим во время мышечной работы. Такое разделение людей по реактивности гипофизарно-адренкортикальной системы показано нами ранее [19]. Данные, представленные в табл. 3, указывают, что малая реактивность аденогипофиза при физической работе сочетается с более низким исходным уровнем  $\beta$ -эндорфина ( $2,2 \pm 14$  нмоль·л<sup>-1</sup>) и кортикотропина ( $40 \pm 4,4$  пг·мл<sup>-1</sup>) по сравнению с другими обследуемыми (соответственно  $13,5 \pm 6,7$  нмоль·л<sup>-1</sup> и  $95 \pm 17$  пг·мл<sup>-1</sup>).

Как показывает табл. 3, увеличение концентрации соматотропина и уменьшение концентрации инсулина было более значительным у обследуемых, выявляющих полифазную динамику содержания  $\beta$ -эндорфина в крови. Эксперименты с введением налоксана, блокирующего действие опиоидных пептидов на уровне их рецепторов, выявили в одном исследовании зависимость реакции соматотропина при мышечной работе от действия эндорфинов [14]. Результаты других исследований не свидетельствовали о наличии такой зависимости [11, 13]. Поэтому преждевременно было бы связывать отмеченные особенности в изменениях  $\beta$ -эндорфина и соматотропина между собой, хотя и нет основания отрицать наличие такой связи. То же можно сказать и в отношении изменений инсулина, хотя показано влияние  $\beta$ -эндорфина на эндокринную функцию поджелудочной железы [9]. У лиц, занимающихся оздоровительной физкультурой, согласованность в изменениях  $\beta$ -эндорфина, соматотропина и

инсулина не обнаруживалась. Вне зависимости от изменений  $\beta$ -эндорфина у этой группы обследуемых отмечался наивысший уровень соматотропина на 60-й минуте работы ( $41,4 \pm 5,2$  пг·мл<sup>-1</sup>). В конце работы он был ниже этого ( $26,7 \pm 6,9$  пг·мл<sup>-1</sup>), но выше исходного ( $1,3 \pm 0,5$  пг·мл<sup>-1</sup>).

### Заключение

Продолжительная мышечная работа повышает уровень  $\beta$ -эндорфина в крови. За первоначальным повышением уровня  $\beta$ -эндорфина в крови следует его снижение, которое в основном у лиц с высокой аэробной работоспособностью (МПК выше 55 мл·мин·кг<sup>-1</sup>) сменяется новым увеличением концентрации нейропептида в течение 2-го часа работы. У некоторых лиц концентрация нейропептида может уменьшаться к концу работы до уровня ниже исходного. Различные варианты в изменениях уровня  $\beta$ -эндорфина находятся в хорошей согласованности с динамикой активности гипофизарно-адренокортикальной системы. Увеличение концентрации соматотропина и уменьшение концентрации инсулина было у нетренированных студентов более значительным при наличии первоначального повышения содержания  $\beta$ -эндорфина в крови по сравнению со случаями малой изменчивости уровня нейропептида. У лиц, занимающихся оздоровительной физкультурой, такой зависимости не обнаруживалось.

### ЛИТЕРАТУРА

1. *Вирю А. А.* Функции коры надпочечников при мышечной деятельности. — М., 1977.
2. *Вирю А. А.* // Успехи совр. биол. — 1979. — Т. 87. — С. 271—286.
3. *Вирю А. А., Кырге П. К.* Гормоны и спортивная работоспособность. — М., 1983.
4. *Вульятга Э. Х.* // Эстонская респ. науч.-метод. конф. по проблемам физкультуры: 23-я. — Таллин, 1985. — С. 108—109.
5. *Пярнат Я. П.* Возрастно-половые стандарты (10—50 лет) аэробной способности человека: Автореф. дис... д-ра мед. наук. — М., 1983.
6. *Camber S. R., Cartwaite T. L., Pontzer C. H.* et al. // Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.). — 1981. — Vol. 168. — P. 1—4.
7. *Carr D. B., Bullen B. A., Skrinar G. S.* et al. // New Engl. J. Med. — 1981. — Vol. 305. — P. 560—563.

8. *De Souza E. B., Van Loon G. R.* // Amer. J. Physiol. — 1983. — Vol. 245. — P. E60—E66.
9. *Feldman M., Kiser R. S., Unger R. H., Li C. H.* // New Engl. G. Med. — 1983. — Vol. 208. — P. 349—353.
10. *Fraidi F., Morelli C., Paolucci D.* et al. // Experientia (Basel). — 1980. — Vol. 36. — P. 987—989.
11. *Harber V. J., Sutton J. R.* // Sports Med. — 1984. — Vol. 1. — P. 154—171.
12. *Mains R. E., Eipper B. A., Ling N.* // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1977. — Vol. 74. — P. 3014—3018.
13. *Mayer G., Wessel J., Kobberling J.* // Clin. Endocr. — 1980. — Vol. 13. — P. 413—416.
14. *Morelli C., Fabbri A., Gnessi L.* et al. // Ibid. — 1983. — Vol. 18. — P. 135—138.
15. *Quillemain R. T., Vargo T., Rossier J.* et al. // Science. — 1977. — Vol. 197. — P. 1367—1369.
16. *Rossier J., Bloom E., Guillemin R.* // Selye's Guide to Stress Research / H. Selye. — New York, 1980. — Vol. 1. — P. 187—205.
17. *Schachter B. S., Johnson L. K., Baxter J. D., Roberts J. L.* // Endocrinology. — 1982. — Vol. 119. — P. 1442—1444.
18. *Viru A.* Hormones in Muscular Activity: Vol. 1. — Boca Raton, 1985.
19. *Viru A., Smirnova T., Tomson K., Matsin T.* // Biochemistry of Exercise IV / Ed. J. Poortmans, G. Niset. — Baltimore, 1981. — P. 100—106.
20. *Wardlow S. L., Frantz A. G.* // J. clin. Endocr. — 1979. — Vol. 48. — P. 176.

Поступила 01.10.86

### INTERRELATIONSHIP BETWEEN $\beta$ -ENDORPHIN AND VARIOUS HORMONES IN BLOOD DURING EXERCISES

*A. Viru, Z. Tendzegolskis, K. Karelson, K. Alev, T. Smirnova*

Department of Sport Physiology, Laboratory of Hormonal Regulation of Muscle Activity, State University, Tartu

Dynamics of  $\beta$ -endorphin, corticotropin, cortisol, somatotropin, insulin and triiodothyronine content were studied using bicycle ergometer in blood of 22 persons during 2 hrs exercises. After an initial increase the  $\beta$ -endorphin content was subsequently decreased. At the same time, the decrease in the neuropeptide content was accompanied by repeated elevation within the second hr of the exercise, mainly in persons exhibiting high working capacity, while in other persons the hormone concentration decreased below the initial level at the end of the exercise. These alterations in the content of  $\beta$ -endorphin correlated distinctly with dynamics of pituitary-adrenocortical hormones variation. In untrained persons the initial increase in  $\beta$ -endorphin content was especially distinctly related to the elevation in somatotropin and to a decrease in insulin content in blood. Concentration of triiodothyronine in blood was altered independently of the alterations of other hormones.

Г. Я. Трemasова

## МИТОХОНДРИАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ В ПЕЧЕНИ КРОЛИКОВ ПРИ ОСТРОЙ КРОВОПОТЕРЕ

НИИ гематологии и переливания крови Минздрава Узбекской ССР, Ташкент

В последние годы в патогенезе массивной кровопотери и других экстремальных состояний все большее внимание уделяется энергетическому кризису в организме, причем именно нарушением биоэнергетики многие авторы [9, 10, 13] объясняют наступление необратимости процесса.

Показано, что при кровопотере изменяется энергетическая роль метаболизма углеводов, белков и липидов [4, 18—20, 22, 24]. Имеется небольшое число публикаций по состоянию дыхания и окислительного фосфорилирования в тканях при кровопотере [5, 6, 11, 17]. Данные литературы носят противоречивый характер, что обусловлено недостаточным стандартизированными моделями без учета характера течения процесса, использованием разных объектов (крысы, кролики, собаки) и методов исследования. Кроме того, в большинстве работ не исследуются механизмы нарушений митохондриального окисления, происходящих при кровопотере.

Настоящая работа посвящена изучению механизмов, приводящих к нарушению митохондриального окисления в клетках печени животных при кровопотере в зависимости от характера течения патологического процесса.

### Методика

Опыты проводили на кроликах-самцах породы шиншилла массой 2,7±0,4 кг. До начала кровопускания измеряли частоту дыхания, ректальную температуру, регистрировали величину артериального давления. Кислотно-основное состояние крови исследовали на аппарате ЛЗИВ-2. Под местной анестезией 0,5 % раствором новокаина выделяли бедренную артерию; кровопускание из нее осуществляли пока артериальное давление не снижалось до уровня 40 мм рт. ст. Время, необходимое для этого, составляло около 60 мин. Объем кровопотери был равен 2,4±0,61 % массы тела. На этой стадии животных деканитировали. Митохондрии из печени выделяли дифференциальным центрифугированием, взяв за основу метод [23]. Среда выделения содержала 0,25 М сахарозу, 10 мМ трис-буфер, 1 мМ ЭДТА pH 7,4. Концентрацию белка определяли по методу [21]. Скорость дыхания и

показатели окислительного фосфорилирования устанавливали полярографически [8]. Среда инкубации содержала 0,25 М сахарозы, 10 мМ трис-буфер, 20 мМ KCl, 20 мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 мМ ЭДТА pH 7,4. Субстратами окисления служили сукцинат натрия (10 мМ) и глутамат натрия (20 мМ). Добавка АДФ составляла 200 мкМ, 2,4-ДНФ — 30 мкМ. Белок в пробе составлял 5 мг.

Активность полиферментных систем митохондрий — НАД·Н-оксидазы, сукцинатоксидазы и цитохром *c*-оксидазы — измеряли на однократно замороженных и оттаявших митохондриях [12]. Полученные данные обрабатывали статистически [15].

### Результаты и обсуждение

Острая массивная кровопотеря у кроликов приводит к закономерным изменениям в функционировании систем кровообращения, дыхания и метаболизма. Анализ имеющегося материала позволил выделить по характеру течения кровопотери 2 основные группы животных. У большинства кроликов имело место так называемое благоприятное течение кровопотери (1-я группа), когда pH артериальной крови снижался не более чем на 0,1, а температура тела — на 1,1±0,12 °С. При реже встречающемся неблагоприятном течении процесса (2-я группа) снижение pH крови и температуры тела было более выраженным: pH на 0,29±0,03, температура тела на 2 °С и более.

Результаты экспериментов показали, что характерной реакцией митохондрий печени в ответ на кровопотерю было снижение скоростей переноса электронов по редокс-цепи и образования АТФ. Нарушения электронотранспортной и энергетической функций митохондрий четко коррелировали со степенью гипоксии и метаболического ацидоза. Так, при благоприятном течении кровопотери скорость окисления сукцината снижалась незначительно по сравнению с нормой (рис. 1). Время фосфорилирования, а также показатели АДФ/О, ДК<sub>ч</sub> (дыхательный контроль по Чансу) практически не отличались от данных, полученных на контрольных животных.

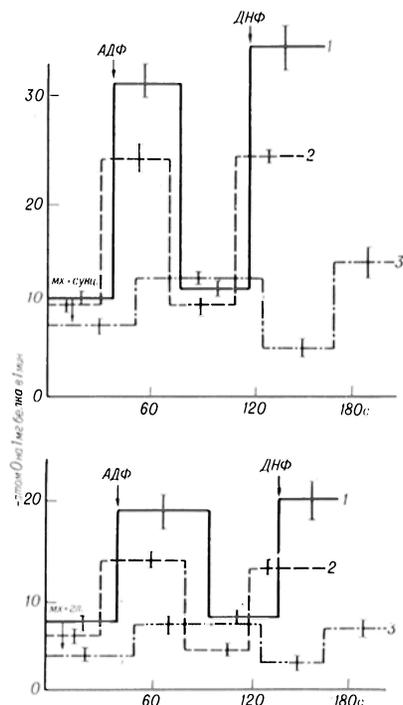


Рис. 1. Дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий печени кроликов в норме и при различном течении кровопотери. *a* — сукцинат натрия; *b* — глутамат. Здесь и на рис. 2: 1 — контрольные животные (норма); 2 и 3 — соответственно животные 1-й и 2-й групп.

У животных 2-й группы показатели  $V_2, V_3, V_4$  и  $V_{днф}$  были достоверно ниже не только по сравнению с контрольными (на 24, 66, 48 и 57 % соответственно), но и с животными 1-й группы (на 20, 45, 34 и 38 %). В результате более значительного снижения скорости  $V_3$  по сравнению со скоростью  $V_2$  происходит уменьшение дыхательного контроля по Ларди ( $ДК_л$ ; на 45 %), что свидетельствует о снижении способности дыхательной цепи к ускорению переноса электронов при добавлении экзогенного АДФ. Время фосфорилирования было увеличено на 91 % против нормы и на 77 % по сравнению с данными животных 1-й группы. При окислении глутамата наблюдалась аналогичная динамика изменений митохондриального окисления.

Принимая во внимание избыточное сопрягающее действие ЭДТА на митохондрии печени, мы провели опыты, в которых в среде инкубации этот комплексон отсутствовал. Установлено (рис. 2), что при кровопотере, сопровождающейся четко выраженным метаболическим ацидозом (2-я группа), в митохондриях печени в среде без

ЭДТА резко повышается скорость окисления экзогенного сукцината (на 137 %), после чего стимуляции дыхания добавленным АДФ не наступает.

При окислении глутамата вместо стимуляции происходило ингибирование дыхания добавленным АДФ, т. е. наблюдался «обратный дыхательный контроль».

Принимая во внимание градации метаболического состояния митохондрий [7], митохондрии печени кроликов при кровопотере можно отнести к слабо сопряженным. В таких препаратах нефосфорилирующее дыхание выражено максимально. Добавление АДФ не активирует, а тормозит дыхание. Фосфорилирующая способность митохондрий отсутствует или замедлена настолько, что добавленный АДФ не успевает фосфорилироваться за время опыта.  $ДК_л$  и АДФ/О не определяются.

Таким образом, отсутствие ЭДТА в среде инкубации позволило выявить более глубокие нарушения, происходящие в митохондриях печени животных при острой кровопотере. Степень этих нарушений зависит от характера течения патологического процесса.

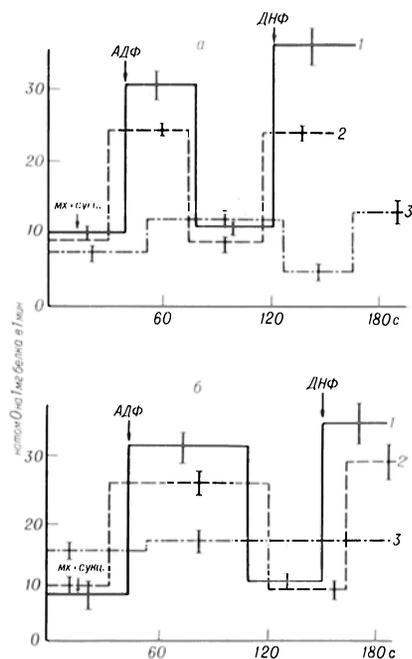


Рис. 2. Влияние ЭДТА на дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий печени кроликов в норме и при различном течении кровопотери.

Субстрат — сукцинат натрия. *a* — среда измерения с ЭДТА; *b* — то же без ЭДТА.

**Активность полиферментных систем (в наноатомах О на 1 мг белка в 1 мин) митохондрий печени при кровопотере ( $M \pm m$ )**

Полиферментная система	Субстрат и добавка	Норма ( $n=12$ )	Кровопотеря		
			общая ( $n=19$ )	характер течения	
				благоприятный ( $n=14$ )	неблагоприятный
НАД·Н-оксидаза	НАД·Н	10,7±1,07	6,0±0,5***	6,07±0,6***	5,8±0,95***
	НАД·Н+цитохром <i>c</i>	56,9±5,04	38,4±3,0**	41,8±3,49*	28,8±1,85***
Сукцинатоксидаза	ΔΔ	46,2	32,4	35,7	23,0
	Сукцинат	24,8±3,19	14,7±0,9**	15,9±0,9*	11,4±1,7**
	Сукцинат+цитохром <i>c</i>	37,4±4,2	24,5±1,9**	27,0±1,88*	17,6±3,7**
Цитохром <i>c</i> -оксидаза	ΔΔ	12,6	9,8	1,1	6,2
	Аскорбат+цитохром <i>c</i>	75,5±7,68	47,2±3,7**	51,8±3,72*	34,0±4,76***

Примечание. ΔΔ — разность между активностью в присутствии цитохрома *c* и без его добавления; одна звездочка —  $p < 0,05$ , две —  $p < 0,01$ , три —  $p < 0,001$ .

Выявленное при кровопотере нарушение транспорта электронов по дыхательной цепи может быть связано с подавлением активности ферментных систем в различных ее звеньях. В связи с этим представлялось важным исследовать состояние оксидазных систем митохондрий, непосредственно участвующих в переносе электронов. Проведенные исследования позволили установить (см. таблицу), что при благоприятном течении кровопотери (1-я группа) нарушения активности оксидазных систем выражены в меньшей степени, чем при тяжелом течении процесса (2-я группа). Так, исходные активности НАД·Н-, сукцинат- и цитохром *c*-оксидаз были достоверно снижены на 44, 36 и 32 % соответственно. При тяжелом течении кровопотери активности сукцинатоксидазы и цитохром *c*-оксидазы были снижены не только по сравнению с нормой (на 54 и 55 % соответственно;  $p < 0,001$ ), но и по сравнению с данными животных 1-й группы (на 28 и 34 %;  $p < 0,05$ ).

При определении активности каждой из оксидазных систем (кроме НАД·Н-оксидазы) представляется возможность преимущественного определения активности некоторых из участков редокс-цепи. Так, в случае сукцинатоксидазы измеряется активность звена от убихинона до  $O_2$ , а цитохром *c*-оксидазы — от цитохрома *c* до  $O_2$ . Относительно равномерное снижение активности всех исследуемых оксидаз при благоприятном течении кровопотери и более выраженное

нарушение активности сукцинат- и цитохром *c*-оксидаз при тяжелом течении процесса позволяют предположить, что торможение переноса электронов происходит на цитохромном участке дыхательной цепи. Вероятными причинами этого могут быть следующие: солибилизация цитохрома *c* из внутренней мембраны митохондрий, нарушение его «челночной» функции и, наконец, снижение окислительно-восстановительной функции цитохромоксидазы. В связи с этим добавление цитохрома *c* к митохондриям печени при измерении активностей НАД·Н и сукцинатоксидаз позволило бы установить роль этого компонента редокс-цепи в происходящих при кровопотере нарушениях, а опыты с применением системы аскорбат+тетраметил-*p*-фениледиамин — функциональное состояние цитохромоксидазы.

Установлено, что в присутствии цитохрома *c* происходит резкое увеличение активности НАД·Н-оксидазы в митохондриях печени животных всех групп (см. таблицу). Информативным оказалось вычисление разницы между оксидазной активностью в присутствии и в отсутствие цитохрома *c* в среде инкубации. Эта разница, обозначенная в таблице ΔΔ, свидетельствует об активации процесса переноса электронов экзогенным цитохромом *c*.

При измерении активности НАД·Н-оксидазы в этих условиях у животных 1-й группы показатель ΔΔ был снижен на 23 % по сравнению с нормой. У кроликов с выраженным ацидозом активация цитохромом *c* НАД·Н-оксида-

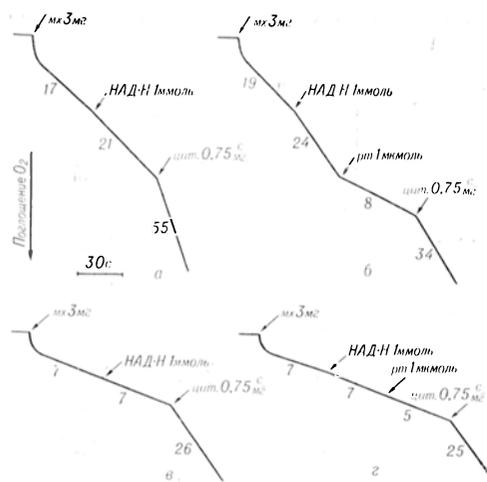


Рис. 3. Активность НАД·Н-оксидазы (а — норма, в — кровопотеря) и ротенон-нечувствительной НАД·Н-оксидазы (б — норма, г — кровопотеря) митохондрий печени кроликов в присутствии цитохрома с.

Здесь и на рис. 4 цифрами обозначены скорости дыхания (в наномолях  $O_2$  на 1 мг белка митохондрий в 1 мин). мх — митохондрии, рт — ротенон, цит. с — цитохром с.

зы была снижена на 50 % по сравнению с нормой и на 36 % по отношению к показателю животных 1-й группы.

Стимуляция активности сукцинат оксидазы добавленным цитохромом с при кровопотере была также снижена, а величина  $\Delta A$  оказалась значительно ниже, чем в случае НАД·Н-оксидазы. У животных 1-й группы показатель  $\Delta A$  был на 28 % ниже, чем у контрольных, а у животных 2-й группы — на 51 % ниже, чем в норме, и на 44 % ниже, чем у особей 1-й группы.

Высокая степень активации экзогенным цитохромом с НАД·Н-, а не сукцинатоксидазы дает возможность предположить, что добавленный цитохром с может активировать окисление НАД·Н через альтернативный путь, в котором принимает участие цитохром с. Это согласуется с данными работы [3], где показано, что окисление НАД·Н может происходить через систему ФП<sub>5</sub> — цитохром с — свободный цитохром с, локализованную во внешней мембране, и цитохром с-оксидазу внутренней мембраны митохондрий. В связи с этим представлялось важным установить участие внешнего пути окисления НАД·Н в поддержании энергетического гомеостаза при кровопотере. На рис. 3 приведены результаты одного из опытов, характеризующих долю окисления

НАД·Н ротенон-нечувствительной НАД·Н-оксидазой в общем потреблении  $O_2$ . Как видно из рисунка, при активации процесса окисления НАД·Н экзогенным цитохромом с общая активность окисления НАД·Н митохондриями печени животных с кровопотерей составляла 47 % уровня нормы (кривые а и в). После ингибирования дыхательной цепи ротенонем активность ротенон-нечувствительной НАД·Н-оксидазы митохондрий печени здоровых животных составляла 62 % общей исходной активности (кривые а и б), а при кровопотере она была равна исходной активности НАД·Н-оксидазы до добавления ротенона (кривые в и г). Эти данные позволяют предположить, что при кровопотере в связи с торможением основной цепи переноса электронов окисление НАД·Н в митохондриях печени животных может переключаться на альтернативный путь. Наблюдаемая на размороженных митохондриях высокая активация цитохромом с НАД·Н-оксидазы, а также наличие такого важного факта, как окисление НАД·Н преимущественно через ротенон-нечувствительную НАД·Н-оксидазу могут свидетельствовать о том, что при кровопотере снижение электронотранспортной функции митохондрий печени связано с нарушением окислительно-восстановительной функции эндогенного цитохрома с, а не цитохромоксидазы. По-видимому, снижение активности цитохром с-оксидазы, выявленное на размороженных митохондриях, не является определяющим фактором в нарушении переноса электронов по главной цепи. Доказательством этому служат данные специально проведенных экспериментов с ис-

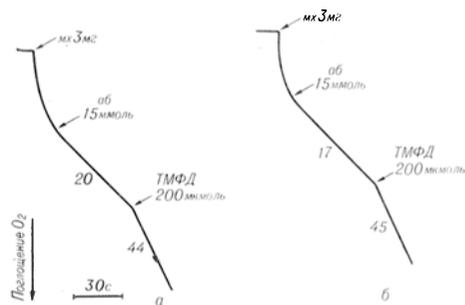


Рис. 4. Окисление аскорбата и ТМФД митохондриями печени кроликов в норме (а) и при кровопотере (б).

аб — аскорбат, мх — митохондрии.

пользованием в качестве доноров электронов системы аскорбат+тетраметил-п-фенилендиамин (рис. 4). Кривые, отражающие потребление  $O_2$  митохондриями печени кроликов с кровопотерей и контрольных животных, указывают на то, что активность терминального звена дыхательной цепи митохондрий печени подопытных кроликов не является лимитирующим фактором для переноса электронов.

Исходя из полученных результатов, следует признать, что острая массивная кровопотеря сопровождается значительными нарушениями функций митохондриального аппарата печени, что приводит к уменьшению выработки АТФ в клетках этого органа. Для митохондрий печени при кровопотере характерно снижение потребления  $O_2$  при увеличении времени фосфорилирования, что указывает на замедление выработки АТФ редокс-цепью. Несмотря на отсутствие снижения показателя АДФ/О и сохранение синтеза АТФ в расчете на единицу восстановленного кислорода, из-за резкого снижения скоростей дыхания развивается дефицит общего фонда макроэргических соединений.

Одновременно установлено уменьшение активности полиферментных систем митохондрий печени при кровопотере. Наиболее вероятной причиной этих нарушений является подавление транспортной функции цитохрома *c* во внутренней мембране митохондрий. Известно [2], что цитохром *c* может связываться с фосфолипидами митохондрий. При кровопотере, вероятно, в мембранах митохондрий печени возникают повреждения, обусловленные разрушением комплексов цитохром *c* — фосфолипиды фосфолипазами, активность которых возрастает при нарушении целостности мембран [1]. Установлено, что активация фосфолипазы в первую очередь сказывается на участке дыхательной цепи в области цитохрома *c* [14]. При разрушении комплексов цитохром *c* — фосфолипиды могут наблюдаться нарушения «челночной» функции цитохрома *c* и частичная солиubilизация его из внутренней митохондриальной мембраны в межмембранное пространство, где он может служить компонентом внешнего пути окисления НАД·Н [16].

Важным представляется факт различной степени поражения митохондриальных функций в зависимости от характера течения процесса. Разделение подопытных животных на группы позволило выявить достоверно более выраженное нарушение митохондриального окисления, а также активности полиферментных систем при кровопотере, сопровождающейся выраженным метаболическим ацидозом и гипоксией. Наличие тесной коррелятивной связи между течением процесса и глубиной повреждения митохондриального окисления свидетельствуют о том, что нарушения функций митохондрий играют определенную роль в патогенезе кровопотери.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Агуреев А. П., Мохова Е. П. // Реакция живых систем и состояние энергетического обмена. — Пуццино, 1979. — С. 27—51.
2. Грин Д., Гольдберг Р. Молекулярные аспекты жизни: Пер. с англ. — М., 1968.
3. Евтодченко Ю. В., Скулачев В. П., Чистяков В. В. // Митохондрии: Структура и функция. — М., 1966. — С. 113—115.
4. Зорькин А. А. // Шок и коллапс. — Кишинев, 1970. — С. 76—82.
5. Зорькина Т. А. Метаболическая реакция печени на острую кровопотерю: Автореф. дис... канд. мед. наук. — Л., 1980.
6. Казуева Т. В., Кваша Л. В., Селезнев С. А. // Бюл. экспер. биол. — 1984. — № 6. — С. 666—667.
7. Кондрашова М. П. // Митохондрии: Структура и функции в норме и патологии. — М., 1971. — С. 25—35.
8. Кондрашова М. П., Николаев Л. В., Чистяков В. В. // Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. — М., 1973. — С. 50—59.
9. Кочетыгов Н. И. Кровезаменители при кровопотере и шоке. — М., 1984.
10. Левин Г. С., Каменецкая Ц. Л. Метаболизм липидов при кровопотере и шоке. — Ташкент, 1982.
11. Левин Г. С., Костова С. В. // Пат. физиол. — 1981. — № 4. — С. 37—41.
12. Левин Г. С., Трemasова Г. Я. // Механизмы патологических процессов. — Ташкент, 1978. — Вып. 3. — С. 5—11.
13. Левин Г. С., Халматова Н. М., Парлагашвили Ю. Ю., Мальцев В. М. // Пробл. гематол. — 1974. — № 7. — С. 40—45.
14. Лузиков В. Н. Стабилизация энзиматических систем внутренней митохондриальной мембраны и родственные проблемы: Автореф. дис... д-ра. — М., 1973.
15. Монцевичюте-Эрингене Е. В. // Пат. физиол. — 1964. — № 4. — С. 71—78.
16. Скулачев В. П. Аккумуляция энергии в клетке. — М., 1969.
17. Слепнева Л. Е., Кривцова И. М., Алексеева Н. И. // Пробл. гематол. — 1981. — № 9. — С. 48—51.
18. Парлагашвили Ю. Ю. // Механизмы повреждения, резистентности, адаптации и

компенсации. — Ташкент, 1976. — Т. 2. — С. 415.

19. Петров И. Р. Травматический шок. — Л., 1962.
20. Elwin D. H., Parikh H. C., Stahr L. G. et al. // Amer. J. Physiol. — 1976. — Vol. 230, N 2. — P. 377—386.
21. Gornall A. G., Bardawill C. G., David M. M. // J. biol. Chem. — 1949. — Vol. 177, N 3. — P. 751—766.
22. Kovach A. G. B., Rossel S., Sandor P. et al. // Acta physiol. Acad. Sci. hung. — 1974(1976). — Vol. 45, N 1—2. — P. 79—87.
23. Schneider W. C. // J. biol. Chem. — 1948. — Vol. 176, N 1. — P. 259.
24. Stremple G., Schutzer S. F., Thomas H. et al. // Surgery. — 1976. — Vol. 80, N 1. — P. 4—12.

Поступила 09.05.86

## MITOCHONDRIAL OXIDATION IN LIVER TISSUE OF RABBITS WITH ACUTE HEMORRHAGE

G. Ya. Tremasova

Central Research Laboratory, Institute of Hematology and Blood Transfusion, Ministry of Public Health of the Uzbek SSR, Tashkent

Acute hemorrhage was accompanied by impairments in electron transport and energy functions of rabbit liver mitochondria as well as by a decrease in activity of multienzyme systems responsible for electron transfer via redox chain. The impairments observed correlated distinctly with the rate of hypoxia and of metabolic acidosis. In the hemorrhage NADH oxidation occurred mainly via rotenon-insensitive NADH oxidase while the cytochrome oxidase activity was maintained at a relatively high level.

УДК 616.36-002.2+616.36-004+616.36-003.826]-07:616.36-008.932.95-074

В. М. Мохов, Ю. А. Блюдзин

## ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ЛИПИДОВ ПЕЧЕНИ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ГЕПАТИТАХ, ЦИРРОЗАХ ПЕЧЕНИ И ЖИРОВОМ ГЕПАТОЗЕ

Кафедра внутренних болезней лечебного факультета Ленинградского санитарно-гигиенического медицинского института

При хронических диффузных заболеваниях печени в липидах плазмы крови больных наблюдается значительное уменьшение содержания ряда жирных кислот (особенно линолевой) и полиненасыщенных жирных кислот [1, 2, 7, 13, 20]. Изучение состава жирных кислот непосредственно в ткани печени больных сопряжено с рядом трудностей, поскольку для исследования используются небольшие по объему биоптаты, а это усложняет биохимический анализ и может стать источником ошибок. Данные о составе липидов и их жирных кислот в печени больных при ее хронических диффузных заболеваниях приводятся лишь в отдельных работах и имеют противоречивый характер. В настоящей работе представлены результаты исследования жирнокислотного состава суммарных липидов в биоптатах печени больных хроническим гепатитом, портальным и биллиарным циррозом печени, жировой дистрофией печени.

### Методика

Биоптаты печени больных, полученные методом пункционной биопсии (масса около 5 мг), помещали в 0,5 мл смеси хлороформ —

метанол (2:1). Из гомогената печеночной ткани извлекали общую фракцию липидов по методу Фолча [16]. Липиды подвергали метанолизу в смеси метанол-хлороформ — концентрированная  $H_2SO_4$  (100:100:1) в стеклянных ампулах, заполненных  $N_2$ , при  $100^\circ C$  в течение 2 ч [17]. Выделенные по общепринятой схеме [9] метиловые эфиры жирных кислот упаривали досуха в токе  $N_2$ , растворяли в 2—3 мкл гексана и анализировали на хроматографе «Цвет-101» с ионизационно-пламенным детектором при чувствительности, близкой к максимальной ( $20 \cdot 10^{-12}$ ), на колонке с полиэтиленгликольсукцинатом, нанесенным на силианизированный целит-545 в количестве 8%. Температура колонки  $196—198^\circ C$ , газ-носитель  $N_2$ . Пики метиловых эфиров жирных кислот на хроматограммах идентифицировали по стандартам миристиновой, пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, линолевой и бегеновой кислот. Остальные обнаруженные кислоты идентифицировали по приведенным в литературе величинам относительного времени удерживания. Подробное описание методических процедур, применяемых в работе, приведено ранее [5].

### Результаты и обсуждение

Исследовано 66 образцов ткани печени: 29 больных хроническим гепатитом, 15 портальным и 6 биллиарным циррозом, 8 лиц, страдающих жировым гепатозом, и 8 человек, у которых при диагностической биопсии печени не обнаружено гистологических при-

Содержание основных жирных кислот в суммарных липидах биоптатов печени при различных заболеваниях (в % от суммы всех обнаруженных кислот)

Жирные кислоты	Контроль (8)	Хронический активный гепатит (10)	Персистирующий гепатит (19)	Портальный цирроз (15)	Билиарный цирроз (6)	Жировой гепатоз (8)
Миристиновая (14:0)	1,0±0,2	3,5±1,0 $p<0,01$	3,9±1,0 $p<0,01$	3,2±0,7 $p<0,01$	2,5±0,7 $p<0,01$	3,8±1,1 $p<0,01$
Пальмитиновая (16:0)	24,3±0,8	21,8±0,8 $p<0,05$	23,1±0,6 $p>0,1$	25,0±1,0 $p>0,1$	24,0±3,4 $p>0,1$	27,0±3,9 $p>0,1$
Пальмитолеиновая (16:1)	3,8±0,7	6,3±1,3 $p<0,01$	5,8±0,8 $p<0,05$	7,6±0,6 $p<0,01$	1,7±0,7 $p<0,01$	5,8±1,0 $p<0,01$
Стеариновая (18:0)	14,3±0,7	11,0±1,0 $p<0,01$	12,2±1,8 $p<0,05$	11,6±0,7 $p<0,01$	17,8±2,8 $p<0,01$	9,7±1,2 $p<0,01$
Олеиновая (18:1)	24,0±0,6	30,9±2,0 $p<0,01$	33,2±2,5 $p<0,01$	36,0±1,2 $p<0,01$	25,0±4,3 $p>0,1$	32,7±3,6 $p<0,01$
Линолевая (18:2)	17,2±1,3	9,3±0,4 $p<0,01$	8,5±0,9 $p<0,01$	7,3±0,4 $p<0,01$	15,5±2,4 $p>0,1$	12,0±3,5 $p<0,01$
Арахидоновая (20:4)	6,6±0,4	5,7±0,9 $p>0,1$	5,0±1,0 $p<0,05$	5,4±1,9 $p>0,1$	4,6±1,9 $p<0,05$	4,0±0,9 $p<0,01$
Докозагексаеновая (22:6)	4,1±0,5	2,5±1,6 $p<0,05$	3,1±1,8 $p>0,1$	1,1±0,9 $p<0,01$	1,7±0,8 $p<0,01$	2,6±1,6 $p<0,05$
Другие	5,0	9,0	7,2	3,4	7,2	2,5
Индекс ненасыщенности *	123	105	108	86	82	105

\* Произведение от числа двойных связей в ненасыщенной кислоте на ее процентное содержание в исследуемых липидах [14].

знаков ее заболевания. Содержание основных жирных кислот в исследованных образцах печеночной ткани представлено в таблице. Кроме жирных кислот, указанных в таблице, найдены в небольших количествах миристиленовая, пентадеценивая, гептадеценивая, линоленовая, эйкозеновая, докозатетраеновая и некоторые другие кислоты, в том числе неидентифицированные. Как видно из таблицы, суммарное содержание этих кислот варьировало значительно — от 9 % при активном гепатите до 2,5 % при жировом гепатозе. Однако из-за небольшой величины пиков этих кислот на хроматограммах при их измерении обычными методами, без применения специальной оптической измерительной техники, получается большая ошибка. Поэтому анализ количественных различий в содержании каждой из названных кислот может быть сделан лишь при применении адекватных методов [4]. В данном же случае нужно лишь обратить внимание на резкое снижение содержания перечисленных кислот при портальном циррозе печени и жировом гепатозе, что свидетельствует об упрощении жирнокислотного состава в липидах печени при данных заболеваниях.

Доминирующими кислотами в ли-

пидах печени во всех исследованных случаях являлись пальмитиновая, стеариновая, олеиновая и линолевая, которые обычно преобладают и во всех других тканях человека. Суммарное содержание этих кислот составляло около 80 %, варьируя от 77 до 82 %. В то же время именно в этой группе кислот отмечались наиболее значительные и статистически достоверные изменения. Так, процентное содержание ненасыщенной олеиновой кислоты во всех группах, кроме больных билиарным циррозом печени, значительно и статистически достоверно ( $p<0,01$ ) повышалось и колебалось от 30 до 36 %, в то время как в контрольной группе ее содержание составляло 24 %. Содержание диеновой линолевой кислоты, напротив, снижалось. Наиболее заметным это снижение было при портальном циррозе (более чем в 2 раза по сравнению с контролем), а также у больных хроническим гепатитом ( $p<0,01$ ). У больных жировым гепатозом содержание линолевой кислоты снижалось на 30 % ( $p<0,01$ ), при билиарном циррозе снижение было незначительным и статистически недостоверным.

В распределении доминирующих насыщенных кислот количественные изменения были менее выраженными.

Содержание пальмитиновой кислоты практически не изменялось ( $p > 0,1$ ), стеариновой — снижалось, и в большинстве случаев это снижение было статистически достоверным ( $p < 0,01$ ; недостаточным оно было лишь при билиарном циррозе печени).

Из других кислот, приведенных в таблице и содержащихся в сравнительно небольшом количестве, определенный интерес представляют полиненасыщенные арахидоновая и докозагексаеновая. Функциональная значимость этих соединений общеизвестна, она является следствием их высокой ненасыщенности и преимущественной локализации в липидах различных специализированных мембранных структур. Кроме того, арахидоновая кислота является предшественником ряда биологически активных веществ, таких как простагландины и простагланлины. В данной работе обнаружено отчетливое снижение процентного содержания полиненасыщенных кислот, особенно докозагексаеновой: при циррозах печени — более чем в 2 раза ( $p < 0,01$ ), при активном гепатите — на 40 % ( $p < 0,05$ ). При персистирующем гепатите и жировом гепатозе снижение было менее значительным и в первом случае статистически недостоверным ( $p > 0,1$ ). Наряду с этим при всех заболеваниях наблюдалось статистически достоверное возрастание содержания короткоцепочечной миристиновой кислоты (как правило, более чем в 3 раза по сравнению с нормой), а также мононенасыщенной пальмитолеиновой кислоты ( $p < 0,01$ ).

Причиной указанных выше изменений могут быть нарушения ряда биохимических процессов. Во-первых, снижение активности десатураз и ферментных систем, ответственных за удлинение углеродной цепи жирных кислот, вследствие чего уменьшается синтез длинноцепочечных полиненасыщенных кислот. Во-вторых, интенсификация распада полиненасыщенных кислот, в том числе и их перекисного окисления. Ферментные системы, ответственные за процессы липолиза и перекисного окисления липидов и жирных кислот, преимущественно локализованы в печени [3, 6] и, возможно, их активность изменяется в результате патологического процесса в печени. Показано также, что содержание про-

дуктов перекисного окисления липидов в печени при хронических ее заболеваниях возрастает [12].

Обнаруженное в данной работе и в исследованиях других авторов [15] значительное возрастание содержания короткоцепочечной миристиновой кислоты может свидетельствовать об интенсификации процессов  $\beta$ -окисления жирных кислот. Повышение активности липоксигеназ подтверждает возрастание количества простагландинов, отмеченное при заболеваниях печени [8].

Анализ полученных данных показывает, что в липидах печеночной ткани при исследованных заболеваниях происходят однотипные, хотя и количественно различные, изменения жирнокислотного состава, которые приводят к заметному снижению ненасыщенности жирных кислот. Так, индекс ненасыщенности липидов снижался во всех группах, особенно заметно (до 86 и 82) при портальном и билиарном циррозах, тогда как в контроле он составлял 123. Индекс ненасыщенности представляет собой величину, по возможности полно учитывающую количество двойных связей в жирнокислотных цепях липидов. Известно, что двойные связи жирных кислот и длина их углеводородных цепей влияют на функциональные свойства биологических мембран [11]. В организме человека и животных, по-видимому, имеются регуляторные механизмы, которые способны поддерживать определенную степень ненасыщенности тканевых липидов. Так, исключение из диеты экспериментальных животных незаменимых кислот (линолевой, линоленовой), не способных синтезироваться в организме из более простых эндогенных предшественников, приводило к появлению в липидах различных органов этих животных кислот с 2 и 3 двойными связями ( $C_{20:2}$ ,  $C_{20:3}$ ), не типичных для них в обычных условиях. Эти кислоты, по-видимому, должны были компенсировать недостаток незаменимых полиненасыщенных кислот и способствовать сохранению на определенном уровне степени ненасыщенности тканевых липидов [6, 18].

По нашим данным, снижение процентного содержания полиненасыщенных кислот в липидах печени при хроническом гепатите и циррозах печени

сопровождалось довольно значительным возрастанием количества моноеновых оленновой и пальмитоленновой кислот, которое, возможно, также имеет компенсаторное значение. Полученные результаты согласуются с данными других авторов о характере изменений жирнокислотного состава липидов печени при названных заболеваниях. В то же время масштаб изменений жирнокислотного состава при жировой дистрофии печени в работах некоторых авторов заметно превосходил таковые, обнаруженные нами. Так, например, японские исследователи [19] установили, что процентное содержание стеариновой кислоты снижалось более чем в 8 раз, количество линолевой кислоты уменьшалось на 80 %, полиеновые кислоты отсутствовали вовсе. Наряду с этим содержание оленновой кислоты возрастало почти в 2 раза, а пальмитоленновой — более чем в 3 раза. Менее значительные изменения обнаружены другими авторами [15], в соответствии с которыми содержание стеариновой кислоты снижалось с 14 до 6 %, оленновой кислоты возрастало на 60 %, распределение остальных кислот при жировом гепатозе менялось в тех же пределах, что и в нашей работе.

Такие различия результатов, полученных различными авторами, возможно, объясняются тем, что образцы ткани в одних случаях получали методом прижизненной биопсии, в других — при аутопсии. Наконец, на результатах исследования может сказываться и различная степень выраженности жирового перерождения печени. Тем не менее, несмотря на выявленные различия, следует отметить одинаковую направленность изменений во всех исследованиях.

Таким образом, имеющиеся данные позволяют сделать вывод о значительных нарушениях жирнокислотного профиля липидов печени при различных заболеваниях. У больных хроническим активным и хроническим персистирующим гепатитом, при портальных и билиарных циррозах печени, жировом гепатозе в липидах печени статистически достоверно снижается содержание линолевой, арахидоновой, докозагексаеновой кислот и повышается содержание оленновой, пальмитоленновой и миристиновой кислот. Изменения жирнокислотного состава в

липидях печени при исследованных заболеваниях приводят к снижению степени ненасыщенности липидов, наиболее значительно выраженному при циррозах печени.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеев В. П., Блюдзин Ю. А., Звягина Ф. Э., Тарасова Г. Г. // Вопр. охр. мат. — 1972. — № 10. — С. 28—31.
2. Алимova Е. К., Аствацатурьян А. Т., Жаров Л. В. // Липиды в организме животных и человека. — М., 1974. — С. 10—20.
3. Арчаков А. И. Оксигеназы биологических мембран. — М., 1983. — С. 53.
4. Березкин В. Г., Татарский В. С. // Газохроматографические методы анализа примесей. — М., 1970. — С. 163.
5. Блюдзин Ю. А., Мохов В. М. // Лаб. дело. — 1983. — № 7. — С. 30—33.
6. Брокерхов Х., Дженсен Р. Липолитические ферменты: Пер. с англ. — М., 1978.
7. Левина П. Д., Зуева В. В., Аствацатурьян А. Т. // Лаб. дело. — 1981. — № 11. — С. 649—652.
8. Логинова А. С., Высоцкая Р. А. // Всесоюзный симпозиум по биохимии липидов, 4-й: Тезисы докладов. — Киев, 1983. — С. 218.
9. Мак — Нейр Г., Бонелли Э. Введение в газовую хроматографию: Пер. с англ. — М., 1970.
10. Покровский А. А., Левачев М. М., Ганпаров М. М. // Липиды в организме животных и человека. — М., 1974. — С. 86—101.
11. Робинсон Дж. Б. // Биологические мембраны: Пер. с англ. — М., 1978. — С. 38—61.
12. Шилина Н. К. // Структура, биосинтез, превращение липидов в организме животного и человека. — М., 1975. — С. 113.
13. Alling C., Aspernstrom G., Dencer S. L. // Acta med. scand. — 1979. — Suppl. 631. — P. 5—38.
14. Galli C., White H. B., Paoletti R. // J. Neurochem. — 1970. — Vol. 17. — P. 347—375.
15. Gerchbein L. L., Baburao K., Pedrosa A. // Acta hepatogastroent. — 1977. — Vol. 24. — P. 250—255.
16. Folsh J., Lees M., Stanley C. H. // J. Biol. Chem. — 1957. — Vol. 226. — P. 497—509.
17. Peisker K. // J. Amer. Oil. Soc. — 1964. — Vol. 41. — P. 87—91.
18. Spresher H. W. // Fed. Proc. — 1972. — Vol. 31, P. 1451—1457.
19. Tahahashi I., Tanaka K. J. // J. Biochem. (Tokyo). — 1961. — Vol. 49. — P. 713—720.
20. Weizel L. A. // Fettstoffwechselerkr. Diagnost. — 1977. — Bd 10. — S. 15—17.

Поступила 25.05.86

#### FATTY ACID COMPOSITION OF LIVER TISSUE LIPIDS IN CHRONIC HEPATITIS, CIRRHOSIS AND FATTY HEPATOSIS

V. M. Mokhov, Yu. A. Blyudzin

Sanitary-Hygienic Medical School, Leningrad

Fatty acid spectrum of liver tissue lipids was studied by means of gas-liquid chromatography.

graphy in 58 bioptic samples from patients with chronic hepatitis, liver cirrhosis and fatty hepatosis. A statistically significant decrease in content of linoleic, arachidonic and docosahexaenic acids as well as an increase in oleic,

palmitoleic and myristic acids were found. Under conditions of the diseases studied fatty acid spectrum of liver tissue lipids altered. A decrease in degree of lipid desaturation was especially distinct in liver tissue cirrhosis.

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

*Д. И. Бельченко, Н. Я. Ханина, М. Н. Калинин*

## **О ВЛИЯНИИ ГИПЕРЛИПОПРОТЕИДЕМИИ, ИНДУЦИРОВАННОЙ ВВЕДЕНИЕМ АТЕРОГЕННОЙ ФРАКЦИИ ЛИПОПРОТЕИДОВ, НА НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА У КРОЛИКОВ**

Кафедра патологической физиологии Калининского медицинского института

Ранее было показано, что внутривенное введение атерогенной фракции липопротеидов (ЛП) кроликам вызывает у них развитие стабильной гиперлипипротемии (ГЛП), сохраняющейся в течение 35—40 дней после прекращения липидной нагрузки [1].

Наращение липидемии сопровождалось снижением суммарной эстеразной и липолитической активности крови [12], что предположительно позволило считать в числе причин самоподдержания ГЛП нарушение катаболизма и замедление выведения ЛП из кровеносного русла. Однако метод, использованный нами для определения липолитической активности, не позволил решить вопрос о функциональном состоянии ферментных систем, участвующих в непосредственном расщеплении и трансформации сывроточных ЛП. Речь идет прежде всего о липопротеиновой липазе (ЛПЛ) и печеночной триглицеридлипазе (ПТГЛ), осуществляющих гидролиз триглицеридов хиломикронов (ХМ), ЛП очень низкой плотности (ЛПНП) и их ремнантов [6, 20] и способствующих образованию ЛПНП и ЛП высокой плотности (ЛПВП).

Согласно данным исследований [9], основная роль в гидролизе триглицеридов ЛП у кроликов принадлежит ЛПЛ, и практически вся липолитическая активность постгепариновой плазмы обусловлена активностью этого фермента.

Поскольку от скорости липолиза зависят соотношение отдельных фракций и липидный состав плазменных ЛП, представляло интерес определить количественное содержание липидов, входящих в их состав, и соотношение

отдельных подклассов ЛПВП, ответственных за акцепцию холестерина и его транспорт из тканей в печень, у кроликов с экспериментальной ГЛП.

### **Методика**

Исследования проведены на кроликах шинилла массой 2—3 кг. Экспериментальную ГЛП вызывали описанным ранее методом [1]. ЛПВП и суммарную фракцию ЛПОНП и ЛПНП выделяли [3, 14] из 2 мл крови до начала эксперимента и из 5 мл (учитывая уменьшение концентрации ЛПВП) — по его окончании. ЛПВП фракционировали с помощью диск-электрофореза [10] после предварительного осаждения атерогенных ЛП [4]. Чистоту полученной общей фракции ЛПВП проверяли электрофоретически в полиакриламидном геле [15]. Относительное содержание подклассов ЛПВП определяли методом прямой денситометрии столбиков гелей на денситометре ЭФА-1. Площадь пиков, соответствующих отдельным фракциям ЛПВП, вырезали, взвешивали на аналитических весах и выражали в процентах к общей массе. Для разделения липидов использовали проточную тонкослойную хроматографию [8] в системе *n*-гексан — диэтиловый эфир — уксусная кислота (75:25:1,25) на силикагеле марки Л 40/100 (ЧССР). Содержание количества липидных компонентов определяли спектрофотометрически на СФ-16 [19]. Для определения активности ЛПЛ в качестве субстрата использовали интралипид, активированный путем предварительной инкубации со свежей сывроточной крови крысы в течение 30 мин при 37 °С [9]. Исследуемые пробы крови собирали в пробирки с цитратом натрия до и через 10 мин после внутривенного введения гепарина в дозе 100 ЕД на 1 кг массы. О величине липолитической активности судили по приросту свободных жирных кислот (СЖК), концентрацию которых измеряли титрационным методом [16]. Активность ЛПЛ рассчитывали по разнице между общей липолитической активностью и активностью плазмы после добавления NaCl, ингибирующего ЛПЛ [9].

Результаты обработаны общепринятым статистическим методом прямых и не прямых разностей с применением критерия Стьюдента.

Как показали наши исследования, через 1—2 сут после первоначального введения суммарной фракции ЛПОНП и ЛПНП у всех экспериментальных животных отмечалось увеличение обшей постгепариновой липолитической активности крови более чем на 100 % по сравнению с исходной величиной ( $p \leq 0,01$ ). Учитывая значительные индивидуальные колебания в исходных величинах активности липолитических ферментов, мы сочли возможным представить в табл. 1 следующие показатели по каждому животному. Как видно из таблицы, липолитическая активность постгепариновой плазмы варьировала в пределах 3,6—12,2 мкмоль СЖК на 1 мл плазмы у разных животных. После первичного введения ЛП перед колебаний соответствовал 7,1—21,6 мкмоль. При этом активность ЛПЛ увеличивалась в среднем в 2 раза по сравнению с контролем. Длительное поступление в кровоток экзогенных ЛП приводило к усилению постгепариновой липолитической активности крови. Так, к концу эксперимента, примерно через 2 мес от начала введения ЛП, на фоне установленной у 1 из 6 опытных кроликов липолитическая активность постгепариновой плазмы оставалась увеличенной, у 2 приближалась к исходной величине, у остальных снизилась в среднем на 35 %. Одновременно с этим в суммарной фракции атерогенных ЛП резко увеличивалась содержание триглицеридов и холестерина соответственно на 342 и 230 % и в меньшей степени — эфиров холестерина и фосфолипидов — на 89 и 105 %.

Абсолютное количество СЖК не изме-

Липолитическая активность постгепариновой плазмы у кроликов после однократного и длительного введения суммарной фракции ЛПОНП и ЛПНП (в мкмоль СЖК на 1 мл в 1 ч)

Исходная	После первичного введения ЛП	После длительного введения ЛП
общая постгепариновая активность	общая постгепариновая активность	общая постгепариновая активность
активность ЛПЛ	активность ЛПЛ	активность ЛПЛ
12,2	11,4	14,4
8,0	7,8	18,8
11,0	10,4	21,6
3,6	3,0	7,1
6,2	5,4	13,0
8,0	7,0	12,8
		12,0
		5,0
		8,0
		13,2
		12,0
		3,0
		4,0
		4,0
		4,2

нялось, хотя их относительное содержание достоверно снижалось (табл. 2).

Принимая во внимание данные литературы о преобладании в ЛПОНП триглицеридов и относительно меньшем количестве фосфолипидов и эфиров холестерина по сравнению с ЛПНП [6, 22], можно предположить, что обнаруженное ранее увеличение концентрации суммарной фракции ЛПОНП и ЛПНП у экспериментальных кроликов [1] происходит в основном за счет ЛПОНП. Очевидно, именно из-за перегрузки холестерином эти ЛП теряют субстратную специфичность по отношению в ЛПЛ и не могут в достаточной степени подвергнуться гидролизу [2, 9, 17]. Об этом свидетельствует и поддержание ГЛП у кроликов с неизменной и несколько повышенной липопротеинлипазной активностью в нашем эксперименте.

Недостаточность первичного гидролиза ЛП, содержащих большое коли-

Таблица 2  
Липидный спектр липопротеидов крови кроликов с ГЛП через 1,5—2 мес от начала эксперимента (в мкг на 1 мл плазмы)

Липидные фракции	ЛПОНП+ЛПНП		ЛПНП		p
	до введения ЛП (n=13)	после введения ЛП (n=12)	до введения ЛП (n=13)	после введения ЛП (n=12)	
Эфиры холестерина	345±36,0	653±108	110±13,4	50±7	<0,001
Холестерин	65±8	215±33,0	20,1±1,7	13,0±2,3	<0,05
Свободные жирные кислоты	40,0±6,5	56±13	16,8±3,4	25,5±4,8	
Триглицериды	252±41	1116±229	40,4±3,1	41,4±2,0	
Фосфолипиды	402±51	826±89	185±11,2	127±19,6	<0,05

Примечание. n — число животных.

Относительное содержание отдельных подклассов ЛПВП в крови у кроликов с экспериментальной ГЛП

Время исследования	ЛПВП <sub>2</sub>			ЛПВП <sub>3</sub>
	«медленная» фракция	«быстрая» фракция	суммарная фракция	
До введения ЛП	37,9±1,3	32,7±2,3	70,6±2,2	30,0±1,1
После введения ЛП	27,6±2,1	53,6±2,3	81,2±1,9	18,7±1,3
<i>p</i>	<0,01	<0,001	<0,01	<0,001

чество триглицеридов, является фактором, во многом определяющим концентрацию ЛПВП в плазме крови [11, 21, 22]. Исходя из этого, можно объяснить обнаруженные нами изменения относительного содержания отдельных подфракций ЛПВП плазмы крови опытных кроликов.

Как известно, ЛПВП при электрофорезе в полиакриламидном геле разделяются на 3 подкласса [23]. При этом быстро движущаяся фракция, локализуемая в мелкопористом геле, соответствует ЛПВП<sub>3</sub>, а 2 другие — с низкой электрофоретической подвижностью — представлены ЛПВП<sub>2</sub>. Сравнительный анализ результатов исследования отдельных подфракций антиатерогенных ЛП позволил выявить уменьшение относительного содержания ЛПВП<sub>3</sub> с одновременным увеличением доли ЛПВП<sub>2</sub> в общем количестве ЛПВП у кроликов с экспериментальной ГЛП (табл. 3). Следовательно, обнаруженное ранее почти двукратное уменьшение концентрации ЛПВП у них [1] происходит преимущественно за счет ЛПВП<sub>3</sub>. Считают, что именно эта фракция ЛПВП акцентирует холестерин из клеточных мембран, пренятевуя тем самым его накоплению в тканях [5].

При изучении липидного спектра общей фракции ЛПВП получены данные, свидетельствующие о снижении в них содержания фосфолипидов, свободного холестерина и в большей степени — его эфиров (см. табл. 2). Обнаруженное, кроме этого, увеличение абсолютного количества СЖК и отсутствие изменений в содержании триглицеридов в ЛПВП на фоне гипопальфолипотемии свидетельствуют об относительной перегрузке этих частиц гидрофобными липидными компонентами, что в свою очередь не может не отразиться на их антиатерогенных свойствах. Накопление СЖК в

ЛПВП может наблюдаться в тех случаях, когда нарастание жирных кислот в крови превосходит транспортную емкость сывороточных альбуминов [18].

Резюмируя полученные данные, можно считать, что ГЛП, вызванная внутривенным введением атерогенных ЛП, приводит к вторичным изменениям обмена, приводящим к замедлению катаболизма ЛП и длительному поддержанию высокого уровня липидов в крови. Жировая нагрузка вызывает первоначальное увеличение выхода и активацию ЛПЛ. Усиление гидролиза триглицеридов приводит к освобождению СЖК, которые в больших концентрациях становятся ингибиторами ЛПЛ [13]. Одновременно в печени нарастает содержание холестерина [12], что приводит к снижению захвата и катаболизма ЛПНП. Замедление распада ЛП сопровождается перегрузкой ЛПОНП триглицеридами и холестерином, потерей ими субстратной специфичности по отношению к ЛПЛ. Торможение гидролиза ЛПОНП, а также нарушение синтеза ЛП в печени из-за перегрузки гепатоцитов холестерином является одной из причин уменьшения образования ЛПВП, в основном ЛПВП<sub>3</sub>, осуществляющих захват холестерина из тканевых мембран. Не исключена возможность, что поддержанию ГЛП способствует и усиление синтеза ЛПОНП в печени, о чем свидетельствует обнаруженное уменьшение количества триглицеридов в гепатоцитах экспериментальных животных [12].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Калинин М. И., Бельченко Д. И. // Вопр. мед. химии. — 1978. — № 2. — С. 147—150.
2. Кириенко Т. А., Чаяло П. П. // Укр. биохим. журн. — 1985. — № 1. — С. 25—30.
3. Климов А. П., Ловягина Т. П., Баньковская Э. Б. // Лаб. дело. — 1966. — № 5. — С. 276—280.
4. Климов А. Е., Никульчева Н. П. // Дислипидотемии и ишемическая болезнь

- сердца / Под ред. Е. И. Чазова, А. Н. Климова. — М., 1980. — С. 71—72.
5. Климов А. П., Петрова-Маслакова Л. Г., Мамонтова И. Ф., Парфенова Н. С. и др. // *Вопр. мед. химии.* — 1982. — № 2. — С. 122—125.
  6. Климов А. П., Никульчева П. Г. Липопротеиды, дислипидотенденции и атеросклероз. — Л., 1984.
  7. Перова Н. В., Герасимова Е. П., Чернышова Н. П. и др. // *Вопр. мед. химии.* — 1979. — № 2. — С. 185—192.
  8. Покровский Е. А., Каргаполов А. В. // *Лаб. дело.* — 1972. — № 6. — С. 337—341.
  9. Солитернова И. Б., Никульчева П. Г. // *Вопр. мед. химии.* — 1979. — № 2. — С. 204—209.
  10. Тихонов В. П., Крутько А. П., Крюкова Т. Н. // *Лаб. дело.* — 1981. — № 4. — С. 214—216.
  11. Творогова М. Г., Перова Н. В. // *Кардиология.* — 1986. — № 5. — С. 119—125.
  12. Ханина Н. Я., Бельченко Д. И., Калинин М. И. // *Вопр. мед. химии.* — 1985. — № 2. — С. 37—40.
  13. Bengtsson G., Olivecrona T. // *Europ. J. Biochem.* — 1980. — Vol. 106, N 2. — P. 557—562.
  14. Burstain M., Morfin R. // *Life Sci.* — 1969. — Vol. 8, N 8. — P. 345—348.
  15. Dabels J., Dabels E. // *Z. ges. inn. Med.* — 1972. — Bd 27, N 1. — S. 35—37.
  16. Dole V. // *J. clin. Invest.* — 1956. — Vol. 35, N 2. — P. 150—154.
  17. Holdworth G., Stocks J., Dodson P., Galton D. // *Ibid.* — 1982. — Vol. 69, N 4. — P. 932—939.
  18. Lipson M. // *J. Lipid Res.* — 1971. — Vol. 12, N 3. — P. 294—305.
  19. Marsh T., Weinstein D. // *Ibid.* — 1966. — Vol. 7. — P. 574—576.
  20. Musliner T., Herbert P., Kindston M. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1979. — Vol. 575, N 2. — P. 277—288.
  21. Norum R. // *Biochem. Soc. Trans.* — 1—81. — Vol. 9, N 2. — P. 40.
  22. Picard J., Veisaire D., Ayrault-Jarrier M. // *Ann. biol. clin.* — 1973. — Vol. 31, N 2. — P. 77—86.
  23. Ubbink J., Seifontein W., Villiers L. // *Clin. chim. Acta.* — 1982. — Vol. 125, N 2. — P. 165—175.

Поступила 10.09.86

EFFECT OF HYPERLIPOPROTEINEMIA, INDUCED BY ATHEROGENOUS FRACTION OF LIPOPROTEINS, ON SOME PATTERNS OF LIPID METABOLISM IN RABBITS

D. I. Bel'chenko, N. Ya. Khanina, M. N. Kalinkin

Chair of Pathophysiology, Medical School, Kazan

Hyperlipoproteinemia, which was developed after intravenous administration of lipoprotein atherogenous fraction, caused the secondary metabolic alterations. These alterations were manifested as a decrease in catabolism of blood serum lipoproteins, accumulation of hydrophobic lipid components in the lipoproteins as well as in a decrease in relative content of high density lipoproteins responsible for elimination of cholesterol from tissues.

УДК 612.398.2/7-06:612.391

А. А. Кричевская, А. И. Лукаш, Н. В. Пушкина, И. В. Шепотиновская,  
А. Ю. Жданов

**ВЛИЯНИЕ ГОЛОДАНИЯ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ПРОТЕОЛИЗА  
И АМИДИРОВАННОСТЬ БЕЛКОВ ТКАНЕЙ КРЫС РАЗНОГО  
ВОЗРАСТА**

Кафедра биохимии и биотехнологии и Научно-исследовательский биологический институт Ростовского университета им. М. А. Сулолова

Старение организма сопровождается «затуханием» белкового обмена [8]. На фоне общего снижения самообновления белковых структур в клетках старых тканей обнаружено накопление модифицированных белков, утративших свою функциональную активность [4]. Ряд авторов относит этот факт к возрастному ослаблению активности протеолитических систем клетки [19, 20]. Однако, если снижение синтетических процессов с возрастом имеет множество экспериментальных подтверждений [8, 2], то вопрос об ослаблении катаболизма белков при старении остается дискуссионным.

К числу связанных с возрастом модификаций белков относится посттрансляционное дезамидирование [7]. Потеря белком части амидных групп вызывает изменение его физико-химических свойств и увеличение его атакуемости пептид-гидролазами тканей [11]. Однако при старении отмечено накопление дезамидированных белков [11, 20].

Полное голодание организма приводит к значительному активированию катаболических процессов, в том числе к усилению протеолиза [10]. Согласно вышесказанному, наиболее чувствительными к протеолизу должны быть дезамидированные белки.

Таким образом, под влиянием голодания в организме могут создаваться условия для предпочтительной деструкции в старых клетках дезамидированных белковых молекул.

Целью настоящей работы явилось исследование уровня протеолиза эндогенными ферментами и амидированности белков разных тканей молодых и старых животных, поставленных в условия истощающего голодания.

### Методика

Опыты проводили на белых крысах-самцах в возрасте 4—5 мес (молодые, масса 150—180 г) и 2—2,5-летних (старые, масса 360—420 г). Животных подвергали полному голоданию в течение 7 сут при неограниченном потреблении воды.

Животных декапитировали, извлекали мозг (без мозжечка), печень, тестикулы, участок скелетной мышцы бедра задней конечности. Ткани промывали холодной дистиллированной водой и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе Поттера с тефлоновым пестиком в течение 90 с. Гомогенаты готовили на 0,02 М цитратном буфере, рН 4,8: конечное разведение 1:10 (масса:объем). Ткань скелетной мышцы измельчали в микроизмельчителе при 5000 об/мин, гомогенат готовили на дистиллированной воде и использовали для выделения белков. Все операции проводили на холоде.

Для исследования активности протеолитических процессов в мозге, печени и тестикулах пробы, содержащие 0,4 мл гомогената в 2,6 мл цитратного буфера, инкубировали в водяной бане с шутелем при 37°C в течение 1 ч. Реакцию останавливали ТХУ в конечной концентрации 6%. Об активности протеолиза судили по приросту фоллинположительных кислоторастворимых продуктов гидролиза белков в надосадочной жидкости, определяемых по методу [15]. Содержание

белка в гомогенатах находили по методу [15] с предварительным растворением образцов в 0,1 н. растворе NaOH. Активность выражали в микрограммах тирозина на 1 мг белка в 1 ч.

Для исследования амидированности белков ткани гомогенизировали на холоде с дистиллированной водой (1:10). Гомогенат оставляли для экстракции растворимых белков на 18 ч при 4°C, центрифугировали при 8000 об/мин в течение 20 мин. Из надосадочной жидкости и осадка обработкой 10% ТХУ выделяли соответственно водорастворимые и водонерастворимые белки. Осадки отмывали органическими растворителями, как описано ранее [11], для освобождения от азотсодержащих примесей небелковой природы. Белки высушивали в термостате при 37°C и использовали для определения амидных групп [3]. Оптическую плотность измеряли на Spexol 210 при длине волны 630 нм. Результаты обрабатывали статистически [6].

### Результаты и обсуждение

Как показали результаты исследования, уровень протеолитической деструкции в изучаемых тканях различен (табл. 1). По интенсивности протеолиза эндогенными ферментами в области рН 4,8 ткани располагаются в следующем порядке: печень > тестикулы > мозг, что согласуется с литературными данными [13].

У старых животных установлено снижение активности протеолитических систем в мозге (на 15,6%) и печени (на 16,5%). В тестикулах молодых и старых крыс этот показатель достоверно не различается.

Имеющиеся в литературе сведения относительно возрастных изменений протеолитической активности гомоген-

Таблица 1

Интенсивность протеолиза (в мкг тирозина на 1 мг белка в 1 ч) и уровень фоллинположительных продуктов (в мкг тирозина на 1 мг белка) в мозге, печени и тестикулах крыс разного возраста в норме и при голодании

Ткань	Исследуемый показатель	Молодые крысы		Старые крысы	
		контроль	голодание	контроль	голодание
Печень	Протеолиз	8,04±0,29 (8)	9,71±0,51**	6,71±0,22*	8,32±0,67**
	Фоллин-положительные продукты	2,86±0,26 (8)	2,89±0,34 (5)	2,57±0,18 (7)	2,86±0,31 (6)
Тестикулы	Протеолиз	6,15±0,34 (9)	7,53±0,55**	5,82±0,35 (9)	6,79±0,23**
	Фоллин-положительные продукты	3,22±0,33 (6)	3,28±0,31 (5)	3,36±0,35 (9)	2,96±0,25 (7)
Мозг	Протеолиз	4,23±0,13 (9)	4,12±0,23 (7)	3,57±0,10* (9)	3,63±0,20 (8)
	Фоллин-положительные продукты	1,21±0,14 (7)	1,90±0,18** (5)	1,67±0,21 (9)	1,62±0,28 (7)

Примечание. В скобках — число опытов. Одна звездочка —  $P < 0,05$  (молодые и старые животные), две —  $P < 0,001$  —  $< 0,01$  (норма и голодание).

Содержание амидных групп в белках тканей крыс разного возраста в норме и при голодании (мкмоль амидного азота на 1 г белка)

Ткань	Исследованные белки	Молодые крысы		Старые крысы	
		контроль	голод	контроль	голод
Печень	Растворимые	653±33,8	675±13,4	567±15,9*	616±15,0**
	Нерастворимые	635±23,8	630±18,2	538±14,2*	623±21,8**
Тестикулы	Растворимые	615±31,0	617±22,4	613±24,7	615±30,8
	Нерастворимые	630±21,9	628±29,9	624±20,2	599±16,8
Мозг	Растворимые	747±26,6	711±17,7	660±14,5*	642±11,9
	Нерастворимые	596±30,0	566±32,1	497±20,6*	489±41,0
Скелетная мышца	Растворимые	508±9,4	508±11,2	482±12,2*	531±9,7**
	Нерастворимые	510±24,8	497±	454±11,5*	492±15,6**

\*  $p < 0,001$  —  $< 0,05$  (молодые и старые животные).\*\*  $p < 0,001$  —  $< 0,05$  (норма и голодание).

натов разных тканей не однозначны. Для ряда тканей установлено снижение скорости распада белков при старении [16], с чем некоторые авторы связывают накопление аномальных белков в старых клетках [20].

Ранее было установлено, что к старости общее содержание амидных групп белков тканей и субклеточных фракций снижается на 15—20 % [1, 11]. Проведенные нами исследования также позволили выявить возрастное накопление в клетках ткани мозга, печени и скелетных мышц белков с пониженным (на 11—17 %) содержанием амидов (табл. 2). В тестикулах, характеризующихся постоянным уровнем протеолиза, достоверного снижения амидированности белков при старении не обнаружено. Можно предположить, что одной из причин накопления дезамидированных белков в тканях при старении является установленное нами возрастное снижение активности протеолитических процессов. Наряду с общим снижением протеолитической деградациии при старении особое значение может иметь уменьшение способности старых клеток к деградации аберрантных белков [17]. В частности, было установлено, что с возрастом в некоторых тканях снижается селективная протеолитическая активность ферментов, устраняющих дезамидированные белки [5]. В связи с этим следует подчеркнуть, что более выраженное снижение амидированности установлено для нерастворимых белков, характеризующихся большей «метаболической инертностью».

Сохранение уровня протеолиза и отсутствие накопления дезамидированных белков в тестикулах старых животных, по-видимому, детерминируется особыми биологическими функциями этой ткани, генерирующей половые клетки. Имеются сведения о самой высокой селективной активности расщепления дезамидированных белков в ткани семенников [5].

Исследованиями последних лет показано, что дезамидирование белков может быть первым шагом к их деградации [7, 20], поскольку белки с пониженным содержанием амидов легче атакуются пептид-гидролазами тканей [11].

К числу функциональных состояний организма, при котором значительно активируются катаболические процессы и интенсивной деградации начинают подвергаться белковые компоненты клетки, относится голодание [12]. Сопоставляя эти данные, можно предположить, что активация катаболических процессов в тканях старых животных в результате полного голодания вызовет ускоренное выведение из организма белков с пониженным содержанием амидов.

Для подтверждения этого положения мы исследовали активность протеолитических процессов и степень амидированности белков крыс, подвергнутых полному голоданию в течение 7 сут. За один и тот же период голодания у молодых животных наблюдалась большая потеря в массе (30 %), чем у старых (25 %).

Как следует из табл. 1, голодание вызывает увеличение протеолитиче-

ской деструкции белков эндогенными ферментами в печени и тестикулах молодых крыс на 21—22 %. У старых животных несколько более выраженная интенсификация протеолиза обнаружена в печеночной ткани (24 %). Изменения в тестикулах составили 16,7 %. Полученные данные согласуются с имеющимися в литературе сведениями об увеличении активности многих лизосомальных ферментов, участвующих в деградации белков тканей голодающих животных [9, 18].

В мозге, характеризующимся высоко развитыми компенсаторно-приспособительными механизмами, поддерживается прежняя интенсивность протеолитических процессов (см. табл. 1). Автономность нервной ткани в реакции организма на голод сохраняется и у старых животных.

Интересно отметить, что фоновое содержание фолинположительных продуктов в печени и тестикулах при голодании не изменяется, тогда как в мозге возрастает на 69 %, что может быть связано с перетранспортировкой веществ от менее жизненно важных органов к мозговой ткани. У старых животных таких изменений не обнаружено (см. табл. 1).

Исследование амидированности белков тканей крыс при голодании позволило установить взаимосвязь между изменением этого показателя и активностью протеолитических процессов в тканях.

У молодых животных, в клетках которых не накапливаются дезамидированные формы белковых молекул, изменение амидированности растворимых и нерастворимых белков под влиянием голодания не обнаружено (см. табл. 2). Аналогичные результаты получены и при исследовании тестикул старых животных, характеризующихся отсутствием накопления дезамидированных белков при старении.

В печени старых голодающих животных на фоне активирования протеолитических процессов, амидированность белков возрастала на 8—16 %, достигая в нерастворимых белках уровня, определенного для молодых животных.

В ряде работ приведены данные о значительном активировании при голодании протеолитических ферментов в скелетных мышцах и связанным с

этим увеличением деградации мышечных белков [4, 18].

Нами установлено, что под влиянием 7-дневного голодания содержание амидных групп в белках скелетных мышц старых животных достоверно возрастает. В отличие от возрастных изменений амидированности белков выявленное увеличение содержания амидов при голодании наиболее выражено у растворимых белков, более доступных протеолитической атаке (см. табл. 2).

В белках ткани мозга старых животных изменение амидированности под воздействием истощающего голодания не обнаружено, что согласуется с отсутствием активации протеолитических систем в этой ткани.

На основании полученных данных можно заключить, что под влиянием длительного голодания в некоторых тканях организма интенсификация протеолиза может способствовать ускоренной деградации дезамидированных белковых молекул и выводу их из сферы биохимических процессов. Для ткани мозга, сохраняющей автономность в реакции на голод, нормализация амидированности белков у старых животных при голодании не осуществляется.

Таким образом, активирование протеолитических систем под воздействием голодания может явиться механизмом селективного вывода измененных, функционально неактивных молекул из клеток некоторых тканей старого организма.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Априкян Г. В., Мкртчян Г. А., Паронян Ж. А. // *Нейрохимия*. — 1982. — Т. 1, № 3. — С. 243—248.
2. Буланкин И. П., Парина Е. В., Головкин Н. И. // *Проблемы возрастной физиологии и биохимии*. — Харьков, 1962. — С. 21—26.
3. Гершеневич З. С., Кричевская А. А. // *Биохимия*. — 1960. — Т. 25, № 2. — С. 310—317.
4. Демченко А. П., Орловская П. П. // *Успехи совр. биол.* — 1981. — Т. 92, № 2 (5). — С. 180—197.
5. Кизильштейн А. Л. *Расщепление дезамидированных белков протенназами тканей: Дис. ... канд. биол. наук*. — Ереван, 1984.
6. Кокунин В. В. // *Укр. биохим. журн.* — 1975. — Т. 47, № 6. — С. 776—790.
7. Кричевская А. А., Лукаш Л. И., Пушкина Н. В. // *Изв. Сев-Кавказ. науч. центра высш. школы: Естеств. науки*. — 1980. — № 3. — С. 90—94.

8. Парина Е. В. Возраст и обмен белков. — Харьков, 1967.
9. Покровский А. А., Тугельян В. В., Кравченко Л. В. // Биохимия. — 1975. — Т. 40, № 3. — С. 545—552.
10. Покровский А. А., Тугельян В. В. // Там же. — 1968. — Т. 33. — № 4. — С. 809—816.
11. Пушклина П. В. // Укр. биохим. журн. — 1979. — Т. 51, № 6. — С. 680—683.
12. Многоотомное руководство по патологической физиологии / Под ред. Н. Н. Сиротинкина. — М., 1966. — Т. 2. — С. 233—241.
13. Шугалей В. С., Ананян А. А., Ломакина Л. В., Арутюнян Л. С. // Укр. биохим. журн. — 1981. — Т. 53, № 2. — С. 110—114.
14. Arakawa N., Takashima M., Kurata T., Tujimaki M. // Argicult. biol. Chem. — 1985. — Vol. 43, N 7. — P. 1517—1522.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. I., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
16. McKay M. J., Daniels R. S., Hipkiss A. R. // Biochem. Soc. Trans. — 1980. — Vol. 8, N 1. — P. 81—82.
17. McKay M. J., Daniels R. S., Hipkiss A. R. // Biochem. J. — 1980. — Vol. 188, N 1. P. 279—283.
18. Odobasic L., Sohar I., Scedrow O., Guba F. // Wiss. Beitr. M. Luther-Univ. Halle — Wittenberg. — 1981. — S. 66—68.
19. Reznick A. Z., Lavie L., Gershon D. // International Congress of Gerontology, 12th. Proceedings. — Basel, 1982. — Vol. 2. — P. 143.
20. Yuan P. M., Talent J. M., Gracy R. W. // Mech. Ageing Develop. — 1981. — Vol. 17, N 2. — P. 151—162.

Поступила 17.09.86

## EFFECT OF STARVATION ON THE RATE OF AUTOLYSIS AND THE AMIDE CONTENT IN TISSUE PROTEINS OF AGED AND OLD RATES

A. A. Krichevskaya, A. I. Lukash, N. V. Pushkina, I. V. Shepotinovskaya, A. Yu. Zhdanov

State University, Rostov-on-Don

Rates of autolysis and degree of amidation of tissue proteins were studied in rats under conditions of ageing and after starvation during 7 days. Proteins with decreased content of amide groups accumulated in brain, liver tissues and skeletal muscles. This phenomenon occurred apparently due to decrease in the rate of protein autolysis observed in ageing. In testes, where the rate of protein autolysis was similar both in young and old animals, the protein amidation was not altered on the course of ageing. Under conditions of severe starvation activation of proteolysis was observed in cells. At the same time, the amide content was restored in liver and muscle proteins of old rats up to the level, estimated in tissues of young animals. These data suggest stimulation of selective degradation of the deamidated proteins. The activation of autolysis and normalization of the protein amide groups content were not observed in brain of old animals under conditions of starvation.

УДК 616.33-002.4-02:613.863]-092:616.33-008.939.15-39-085.355:577.152.1

Ф. А. Зверихановский, М. А. Симонян, С. Г. Вайнштейн, Г. П. Гривенко

## ПРОТЕКТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ НА ПОРАЖЕНИЕ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА КРЫС ПРИ ЭМОЦИОНАЛЬНО-БОЛЕВОМ СТРЕССЕ

Кафедра терапии и кафедра бионеорганической и биофизической химии Тернопольского медицинского института, лаборатория физхимии белков Института биохимии АН Армянской ССР, Ереван

Известно, что эмоционально-болевым стресс (ЭБС) приводит к инициированию свободно-радикального перекисного окисления липидов (ПОЛ) [11]. Выраженная активация гипофизарно-адреналовой и адренергической систем [29], избыточное накопление продуктов ПОЛ при длительном стрессорном воздействии вызывают ишемическое повреждение слизистой оболочки желудка (СОЖ) с последующим кровоизлиянием в нее, развитием очагового некроза железистого эпителия и изъязвления его под влиянием обратной диффузии  $H^+$ -ионов [12, 14]. Поиск протекторов повреждения клеточных мембран при ЭБС привел

к использованию с этой целью многих фармакологических препаратов, в том числе антиоксидантов [1, 13].

В последние годы для воздействия на многие патологические процессы [5, 15] стали применять супероксиддисмутазу (СОД). СОД способна не только дисмутировать супероксидные анион-радикалы ( $O_2^-$ ) [30], но и генерировать их, особенно при увеличении содержания перекиси водорода [33] или липоперекисей [19, 20]. Это особенно важно, так как образующиеся в процессе ПОЛ перекиси (гидроперекиси фосфолипидов, алифатические гидроперекиси жирных кислот и циклические эндоперекиси — предше-

ственники простагландинов) обладают существенно различным действием [8]. Уменьшенная содержание  $O_2^-$ , СОД ингибирует процессы ПОЛ, инициированные этими радикалами [17, 34]. Тем самым СОД выступает в роли регулятора уровней  $O_2^-$  и эндоперекисей, проявляя ярко выраженные антиоксидантные и противовоспалительные свойства [31]. С другой стороны, при многих патологических состояниях, в частности при экспериментальном гастрите [32], в результате повышения допустимого уровня  $O_2^-$ , (перекисей) содержание и активность СОД изменяются (в основном понижаются).

На основании приведенных данных нам представлялось целесообразным изучить некоторые биохимические показатели ПОЛ стрессорно поврежденной СОЖ до и после введения Cu/Zn-СОД и выяснить защитную функцию этого фермента.

### Методика

Исследование выполнено на 49 белых крысах-самцах массой тела 180—200 г. Животные были распределены на 4 группы: 1-я — контрольная группа интактных животных (15 крыс); 2-я — интактные животные, получавшие внутрижелудочно через зонд Cu/Zn-СОД (0,5 мг/кг массы тела животного) каждые 30 мин в течение 6 ч (10 крыс).

У крыс 3-й и 4-й групп (10 и 14 животных соответственно) вызывали ЭБС по методике Дезидерато [25] в течение 6 ч. Для усиления эффекта в методику эксперимента вводили элементы социального стресса, для чего площадь платформы в центре камеры подбирали таким образом, чтобы из 5 находившихся в камере животных на платформе одновременно могли помещаться только 4. Указанные обстоятельства приводили к конфликтам среди животных при избегании боли уходом на платформу. 3-я группа подвергалась воздействию ЭБС без фармакологической защиты, 4-я — с одновременным внутрижелудочным введением СОД в дозе 0,5 мг/кг каждые полчаса на протяжении всего эксперимента.

Лиофилизированная Cu/Zn-СОД, выделенная и очищенная из крови быка до электрофоретически гомогенного состояния, имела удельную активность 3500—4000 ед/мг белка. За единицу активности СОД принимали то количество фермента (в мг), которое способно ингибировать на 50 % восстановление нитросинего тетразолия супероксидным анионом. Раствор фермента перед лиофилизацией диализировали против воды. Перед употреблением препарат растворяли в 0,002 М калий-фосфатном буфере pH 7,4. Использованный фермент не инaktivировался при температуре до 75—80 °C и при pH от 4 до 11,8.

По окончании эксперимента у крыс под внутривенным барбитуровым наркозом

Биохимические показатели в тканях желудка крыс при ЭБС ( $\bar{x} \pm m$ )

Группа животных	Показатели ПОЛ				Показатели АОС				Глутатион-пероксидаза, нмоль/г/х (г/х/х/мин)	Глутатион-редуктаза, нмоль/г/х (г/х/х/мин)	Г-6-ФД, нАДФХ/хН/(г/х/мин)	АТФ, мкмоль/г
	МДА, ммоль/г	липеновые коъюгаты, ммоль/г	основания Шиффа, мкмоль/л	ГССГ, нмоль/г	ГSH, нмоль/г	аскорбиновая кислота, мкмоль/г	токоферол, нмоль/г	Глутатион-пероксидаза, нмоль/г/х (г/х/х/мин)				
1-я — контроль (15)	0,04 ± 0,003	0,267 ± 0,14	0,17 ± 0,007	3,66 ± 0,46	19,52 ± 1,62	0,15 ± 0,008	3,96 ± 0,11	2,55 ± 0,46	0,08 ± 0,01	0,21 ± 0,019	0,29 ± 0,021	
2-я — СОД (10) $P_1$	0,03 ± 0,002 < 0,02	0,281 ± 0,005 > 0,05	0,13 ± 0,01	1,09 ± 0,11 < 0,001	4,02 ± 0,03 < 0,001	0,16 ± 0,009 > 0,05	3,86 ± 0,17 > 0,05	2,53 ± 0,20 > 0,05	0,09 ± 0,01 > 0,05	0,21 ± 0,020 > 0,05	0,22 ± 0,010 < 0,01	
3-я — ЭБС (10) $P_1$ $P_2$	0,09 ± 0,005 < 0,001 < 0,001	0,368 ± 0,009 < 0,001 < 0,001	2,26 ± 0,19 < 0,001 < 0,001	3,56 ± 0,27 < 0,05 < 0,001	10,16 ± 0,99 < 0,001 < 0,001	0,11 ± 0,011 < 0,02 < 0,01	2,17 ± 0,09 < 0,001 < 0,001	2,73 ± 0,19 > 0,05 > 0,05	0,11 ± 0,01 > 0,05 > 0,05	0,13 ± 0,013 < 0,01 < 0,01	0,19 ± 0,039 > 0,05 > 0,05	
4-я — ЭБС + СОД (14) $P_1$ $P_2$ $P_3$	0,01 ± 0,002 < 0,05 < 0,001 < 0,001	0,297 ± 0,007 > 0,05 > 0,001	1,03 ± 0,06 < 0,001 < 0,001 < 0,001	1,98 ± 0,15 < 0,01 < 0,001 < 0,001	4,23 ± 0,28 < 0,001 < 0,05 < 0,001	0,11 ± 0,007 < 0,002 < 0,001 < 0,05	2,19 ± 0,12 > 0,001 > 0,001 > 0,05	4,53 ± 0,31 < 0,002 < 0,001 < 0,001	0,13 ± 0,01 > 0,01 > 0,001 > 0,05	0,10 ± 0,009 < 0,001 < 0,001 < 0,05	0,19 ± 0,015 > 0,002 > 0,05 > 0,05	

Примечание. В скобках — число животных в группе,  $P_1, P_2, P_3$  — достоверность различия соответственно с 1, 2 и 3-й группами.

(100 мг/кг) забирали для исследования желудка, который вскрывали по большой кривизне и под лупой  $\times 10$  определяли состояние СОЖ, подсчитывая геморрагии, эрозии и язвы. Степень повреждения СОЖ оценивали двумя способами, определяя язвенный индекс [2], а также количество геморрагий, эрозий и язв на одно животное в группе и процент пораженных животных в группе [4]. В тканях мукозной части стенки желудка определяли показатели ПОЛ: малоновый диальдегид (МДА) [23], диеновую конъюгацию жирных кислот [22], аскорбат- и НАДФ·Н-зависимое перекисное окисление [21, 23], основания Шиффа [27], а также состояние антиоксидантной системы (АОС): восстановленного (GSH) и окисленного (GSSG) глутатиона [26], аскорбиновой кислоты [24], глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы [9], токоферола [28]. Кроме того, в тканях желудка определяли содержание глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФД) [6] и АТФ [18]. Полученные данные обработаны вариационным методом с использованием критериев Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

У крыс 1-й и 2-й групп поражения СОЖ отсутствовали. У крыс 3-й группы поражения СОЖ были представлены эрозиями, кровоизлияниями, язвами с геморрагическими краями; язвенный индекс составляла 8,5. У крыс 4-й группы по сравнению с 3-й достоверно снизилось количество всех учитываемых показателей язвенно-геморрагических поражений СОЖ; язвенный индекс уменьшился до 2,36.

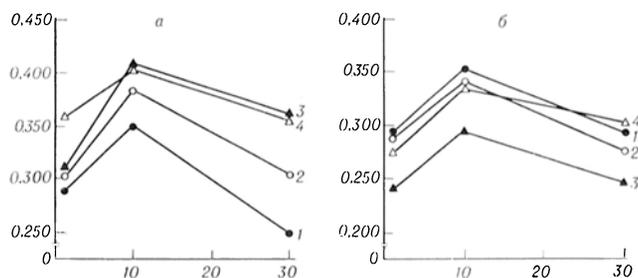
Введение СОД intactным крысам (см. таблицу, 2-я группа) ингибировало систему ПОЛ, о чем свидетельствовало достоверное снижение содержания МДА. Показатели аскорбат- и НАДФ·Н-зависимого ПОЛ (см. рисунок) значимо не отличались от контрольной группы. При этом в АОС существенных изменений не произошло, за исключением снижения концентрации GSH, что, вероятно, объясняется влиянием привнесенного извне избытка антиоксиданта.

ЭБС (3-я группа) резко инициирует ПОЛ, что проявляется значительным

повышением содержания МДА, диеновых конъюгатов и накоплением оснований Шиффа в тканях желудка. Наблюдаются активация неферментативного, аскорбат-зависимого ПОЛ и, наоборот, снижение показателей НАДФ·Н-зависимого ПОЛ. Эти изменения возникают на фоне истощения АОС: снижается содержание компонентов антирадикальной цепи: GSH  $\rightarrow$  аскорбат  $\rightarrow$  токоферол. Одновременно наблюдается характерное для фазы адаптации стресса переключение энергетического обмена с углеводного на липидный [16], снижаются содержание АТФ, активность Г-6-ФД. Последнее особенно важно, так как известно, что основным источником водорода для антирадикальной цепи и пероксидаз в железистом эпителии СОЖ является пентозофосфатный цикл [10]. Нарушение реакций гликолиза и пентозофосфатного шунта в клетках кровяно-ямочного эпителия, снижение активности ферментов дыхательной цепи в железистом эпителии повышают роль утилизации жирных кислот как источника энергии. В то же время активация фосфолипаз, гидролиз фосфолипидов создают избыток субстрата перекисного окисления. Инициация ПОЛ, истощение АОС, дефицит АТФ, наличие в премукозальном слое желудка жирных кислот — переносчиков протонов — нарушают трансэпителиальный градиент СОЖ, потенцируют обратную диффузию ионов водорода, что и приводит в конечном итоге к возникновению острых стрессорных язв и эрозий желудка [7]. Нарушение целостности поверхностного эпителия СОЖ, увеличение межклеточного пространства, образование перекисных кластеров и фрагментация мембран создают условия, при которых СОД, введенная в желудок, по градиенту концентрации может проникнуть через липидные плазматические мембраны и в межклеточное

Активность аскорбат-(а)- и НАДФ·Н(б)-зависимого ПОЛ в тканях желудка крыс при ЭБС.

По оси ординат — концентрация диеновых конъюгатов (в ммоль/г): 1, 2, 3, 4 — группы животных.



пространство покровно-эпителиально-го пласта, тем более что ЭБС существенно снижает интенсивность кислотообразования [11] с появлением допустимого для действия СОД рН в полости желудка. С учетом этих данных СОД вводили внутривентрикулярно через каждые 30 мин эксперимента, так как в течение этого времени фермент проявляет активность в слабнокислых средах. К тому же при расщеплении СОД из-за уменьшения молекулярной массы фермента увеличивается ее проницаемость в ткани СОЖ.

Введение животным СОД на фоне ЭБС нивелирует некоторые показатели ПОЛ. Интенсивность неиндуцируемого ПОЛ у животных 4-й группы была существенно ниже, чем у крыс 3-й группы. Отмечена нормализация НАДФ-Н-зависимого ПОЛ. Наряду с этим оставалась высокой окисляемость липидов в аскорбат-зависимой системе. Введенная СОД не предупредила снижения активности как цепи антирадикальных ингибиторов, так и пероксидаз, элиминирующих перекиси. Оставалась низкой активность Г-6-ФД. Сопоставление результатов морфологического и биохимического исследования тканей позволяет предположить, что защитный эффект СОД на поражения СОЖ при ЭБС реализуется путем регуляции уровня свободно-радикальных процессов и предупреждения нарушений структурно-функциональной целостности липопротеидных комплексов слизистой оболочки желудка.

В то же время в кислых средах часть супероксидных анионов находится в протонированной форме ( $\text{HO}_2^-$ ) и не может дисмутироваться СОД. В таких средах СОД инактивируется не только протонами, но и перекисью водорода, содержание которой может повышаться в тканях желудка в результате понижения супероксидными анионами активности каталазы и глутатионпероксидазы. Можно предположить, что СОД предупреждает эффекты, вызванные супероксидными анионами, и не предупреждает процессы, вызванные гидроксильными радикалами. Недостаточное протективное действие экзогенной СОД на СОЖ связано также с локальными особенностями и механизмами антиоксидантной защиты СОЖ [3]. Тем не менее полученные нами данные могут являть-

ся основанием для клинической апробации СОД как протектора поврежденных СОЖ при стрессорных ситуациях.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Вайнштейн С. Г., Зверихановский Ф. А. // Фармакол. и токсикол. — 1984. — № 6. — С. 87—90.
2. Виноградов В. А., Полонский В. М., Смагин В. Г. // Биол. экспер. биол. — 1982. — № 5. — С. 40—42.
3. Воскресенский О. П. // Общие проблемы биологии. — М., 1986. — Т. 5. — С. 163—201.
4. Гройсман С. Д., Капеева Т. Г. // Физиол. журн. — 1982. — Т. 28, № 3. — С. 334—339.
5. Гусев В. А., Герасимова А. М. // Гипербарическая медицина. — М., 1983. — Т. 2. — С. 128—133.
6. Захарьин Ю. Л. // Лаб. дело. — 1967. — № 6. — С. 327—330.
7. Ивашкин В. Т. Метаболическая организация функций желудка. — Л., 1981.
8. Комаров П. Г., Биленко М. В., Шведова А. А. и др. // Вопр. мед. химии. — 1985. — № 2. — С. 40—45.
9. Кругликова Г. О., Штутман Ц. М. // Укр. биохим. журн. — 1976. — № 2. — С. 223—228.
10. Лабори Л. Регуляция обменных процессов: Пер. с франц. — М., 1970.
11. Меерсон Ф. З. Адаптация, стресс и профилактика. — М., 1981.
12. Меерсон Ф. З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. — М., 1984.
13. Меерсон Ф. З., Павлова В. И., Коробейникова Э. П. // Вопр. мед. химии. — 1980. — № 6. — С. 827—832.
14. Меерсон Ф. З., Устинова Е. Е. // Биол. экспер. биол. — 1982. — / 4. — С. 24—26.
15. Мильчаков В. И., Демуров Е. А., Колосков Ю. Б. и др. // Фармакологическая коррекция кислородзависимых патологических состояний. — М., 1984. — С. 188—189.
16. Панин Л. Е. Биохимические механизмы стресса. — Новосибирск, 1983.
17. Погосян Г. Г., Налбандян Р. М. // Биохимия. — 1983. — Т. 48, № 7. — С. 1129—1134.
18. Прохорова М. И. // Методы биохимических исследований: (Липидный и энергетический обмен). — Л., 1982. — С. 256—258.
19. Симонян М. А. // Биохимия. — 1984. — Т. 49, № 11. — С. 1792—1798.
20. Симонян М. А., Табачникова С. И., Громов Л. А. // Нейрохимия. — 1984. — Т. 3, № 2. — С. 124—129.
21. Спиричев В. В., Блажевич П. В. // Вопр. мед. химии. — 1968. — № 4. — С. 371—375.
22. Стальная И. Д. // Современные методы в биохимии. — М., 1977. — С. 63—64.
23. Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г. // Там же. — С. 66—68.
24. Федуров В. В., Епигейн М. М. // Укр. биохим. журн. — 1974. — № 3. — С. 403—405.
25. Desiderato O., Mackinnon J., Hisson N. // Comp. Physiol. Psychol. — 1974. — Vol. 87, N 4. — P. 208—214.
26. Ellman G. Z. // Arch. Biochem. — 1959. — Vol. 82. — P. 70—77.

27. Fletcher B. L., Dillard C. J., Tappel A. L. // *Analyt. Biochem.* — 1973. — Vol. 52, N 1. — P. 1—9.
28. Kny L., Gerecke K. // *Photometric und Refraktometrie Tokopherole.* — Berlin, 1967. — P. 128.
29. Kristl D. A., Freimark S. J. // *Amer. J. Path.* — 1973. — Vol. 73, N 2. — P. 411—420.
30. McCord J., Fridovich I. // *J. Biol. Chem.* — 1969. — Vol. 244, N 2. — P. 6049—6063.
31. McCord J. M., Wong K., Stokes S. H. et al. // *Acta physiol. scand.* — 1980. — Vol. 492. — P. 25—30.
32. Mózsic G., Yávor T., Zsoldos T. et al. // *Acta physiol. hung.* — 1984. — Vol. 64, N 3—4. — P. 309—314.
33. Symonyan M. A., Nalbandyan R. M. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1979. — Vol. 583. — P. 279—286.
34. Tien M., Svingen B. A., Aust S. D. // *Fed. Proc.* — 1981. — Vol. 40, N 2. — P. 179—182.

Поступила 25.04.86

УДК 612.015.1:577.112.853]-088.1

Н. А. Чернова, Л. К. Шатаева, И. Абрашев, П. Велчева, Г. В. Самсонов

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЛИКОМАКРОПЕПТИДА $\kappa$ -КАЗЕИНА В КАЧЕСТВЕ СУБСТРАТА НЕЙРАМИИДАЗЫ

Институт высокомолекулярных соединений АН СССР, Ленинград

Нейраминидаза (КФ 3.2.1.18) — фермент, отщепляющий концевые сиаловые кислоты от молекул гликопротеинов, гликолипидов, олигосахаридов, используется в медицинской практике для диагностики. Известно, что нейраминидазы патогенных микроорганизмов играют определенную роль в патогенезе инфекционных заболеваний [3]. Нейраминидазы отщепляют сиалосодержащие фрагменты поверхностных антигенов эритроцитов и лимфоцитов, что позволяет использовать их в иммунохимических исследованиях.

Сиалосодержащие субстраты нейраминидазы (различные гликопротеины) содержатся в таких биологических средах, как яичный белок, сыворотка крови, молочная сыворотка. Ранее гликомакропептид (ГМП) из молочной сыворотки был использован как субстрат для нейраминидазы *Egusi*r. *rhusioph.* [1, 6]. В данной работе изучены молекулярные характеристики ГМП и определены условия его применения в качестве субстрата для нейраминидаз холерных и нехолерных (НАГ) вибрионов.

### Методика

В работе использованы препараты нейраминидазы нехолерных вибрионов производ-

## PROTECTIVE EFFECT OF SUPEROXIDE DISMUTASE ON IMPAIRMENT OF RAT GASTRIC MUCOSE IN EMOTIONAL-PAIN- FUL STRESS

F. A. Zoershkhanovsky, M. A. Simonyan,  
S. G. Vainstein, G. P. Grivenko

Medical School, Ternopol, Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Armenian SSR, Yerevan

Patterns of ulcer-hemorrhagic impairments were distinctly decreased in gastric mucose of rats with emotional-painful stress after Cu, Zn-superoxide dismutase administration at a dose of 0.5 mg/kg every 30 min of the experiment. The protective effect of the enzyme was realized via regulation of free radical reactions as well as by means of maintaining of structure-functional activity of lipoprotein complexes in gastric mucose.

ства Горьковского НИИ эпидемиологии и микробиологии и нейраминидазы холерных вибрионов фирмы «Calbiochem» (США). В качестве субстратов исследованы ГМП из молочной сыворотки, полученный из Института микробиологии Болгарской АН [1], и овомуцин производства Горьковского НИИ эпидемиологии и микробиологии.

Молекулярную массу ГМП определяли с помощью гель-хроматографии на сефадексе G-50; колонка размером 60×1,6 см; сорбент уравновешен 0,1 М фосфатным буферным раствором pH 6,2, с добавлением 0,2 М хлорида натрия. Для калибровки колонки использован  $\alpha$ -химотрипсиноген («Serva», ФРГ), лизоцим и сывороточный альбумин («Reanal», ВНР), фенилаланин (научно-производственное объединение «Биохимреактив»), вазопрессин («Calbiochem»).

Концентрацию белка находили по методу [8] с калибровкой по  $\alpha$ -химотрипсиногену.

Активность нейраминидазы определяли тнобарбитуровым методом [7], без стадии экстракции хромофора органическим растворителем в случае ГМП и с экстракцией кислотным бутанолом в случае овомуцина [5]. Для калибровки использовали N-ацетилнейрамининовую кислоту фирмы «Serva».

### Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлена гель-хроматограмма ГМП на сефадексе G-50. Объем элюции основного пика составлял 48 мл. Калибровочный график зависимости объема задержки от молекулярной массы стандартных веществ

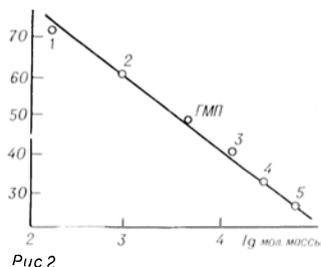
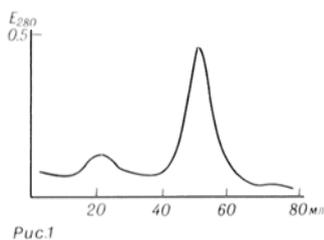


Рис. 1. Гель-хроматограмма ГМП на сефадексе G-50.

Рис. 2. Зависимость объема задержки колонки с сефадексом G-50 ( $V_c$ , в мл) от молекулярной массы стандартных веществ.

1 — фенилаланин; 2 — вазопрессин; 3 — лизоцим; 4 — хитотринсиноген; 5 — бычий сывороточный альбумин.

представлен на рис. 2. Соответственно молекулярную массу ГМП можно оценить как  $5000 \pm 500$ , что несколько ниже значения, приведенного в работе [1].

Аминокислотный состав, определенный нами при стандартном методе гидролиза (см. таблицу), также несколько отличается от данных литературы, что, вероятно, связано с колебаниями состава исходной молочной сыворотки. Очевидно, что по этой же причине определение высокомолекулярных белков в препаратах ГМП различных партий по методу [8] дает величину 0,5—1 %.

Содержание сиаловых кислот в ГМП колеблется в пределах 8—15 % в зависимости от способа очистки. Мы использовали препарат ГМП, содержащий 13 % сиаловых кислот.

Для определения активности нейраминидазы в пробу брали 0,5 мл 0,4 % раствора ГМП в 0,05 М ацетатном буферном растворе при pH 5,5 (или 1,2 % раствор овомуцина в том же буферном растворе), добавляли раствор

фермента в объеме 0,1 мл и инкубировали смесь при  $37^\circ\text{C}$  в течение 15 мин. Содержание свободных сиаловых кислот определяли тиобарбитуровым методом [7], по концентрации окрашенного продукта реакции, которую измеряли при длине волны 549 им.

На рис. 3 представлен спектр поглощения окрашенного раствора продуктов ферментативного расщепления ГМП и контрольного раствора ГМП, к которому вместо фермента было добавлено 0,1 мл буферного раствора. В дальнейших экспериментах активность нейраминидазы определяли по оптической плотности при длине волны 549 им с использованием в контроле раствора субстрата, в который фермент не добавляли.

Зависимость эффективной измеряемой активности нейраминидазы холерных вибрионов от различных начальных концентраций ГМП приведена на рис. 4. Так как область насыщения фермента субстратом соответствует 2—2,5 мг/мл ГМП, в дальнейших экспериментах использовали значение концентрации ГМП 2 мг/мл. В случае овомуцина получение такой зависимости затруднено вследствие ограниченной растворимости его в водных растворах. Кроме того, содержание сиаловых кислот в овомуцине составляет 5,8 %, что в 2—2,5 раза меньше, чем в ГМП.

Проведенное исследование скорости ферментативной реакции в зависимости от времени инкубации системы фермент — субстрат показало, что накопление продукта реакции при концентрации ГМП 2 мг/мл завершается за 10 мин и дальнейшего увеличения концентрации практически не происходит (рис. 5). Аналогичные результаты получены для низкомолекулярного синтетического субстрата N-ацетилнейраминииллактозы [2]. В дальнейшем все измерения активности нейрамини-

Аминокислотный состав ГМП

Аминокислота	Число аминокислотных остатков, приходящихся на одну молекулу		
		[11]	[14]
Аспарагиновая	4	6	4
Треонин	6	7	9
Серин	6	5	7
Глутаминовая	7	9	9
Пролин	4	7	7
Глицин	2	1	1
Аланин	4	7	5
Валин	3	4	5
Метионин	—	1	—
Изолейцин	5	5	5
Лейцин	2	1	1
Лизин	1	4	3
Всего . . .	44	55	58
Минимальная мол. масса	5255	6080	6795

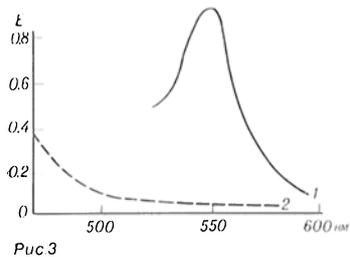


Рис. 3

Рис. 3. Спектр поглощения окрашенного раствора продуктов ферментативного расщепления ГМП (1); контроль (2).

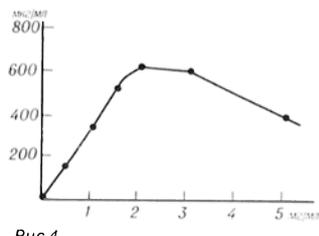


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость измеряемой активности нейраминидазы от концентрации ГМП в растворе.

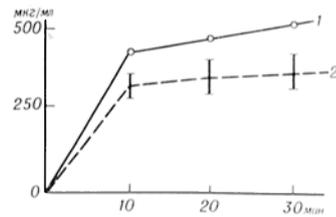


Рис. 5

Рис. 5. Зависимость измеряемой активности нейраминидазы от времени инкубации системы фермент — субстрат при использовании в качестве субстрата ГМП (1) и овомуцина (2).

дазы по отношению к ГМП проводили при инкубации в течение 10 мин. При использовании овомуцина концентрация свободных сиаловых кислот была рассчитана с учетом данных оптической плотности, полученных при экстракции кислотным бутанолом. В этом случае погрешность величины концентрации сиаловых кислот существенно больше (см. рис. 5, кривая 2), чем при использовании ГМП.

При хранении раствора ГМП в 0,05 М ацетатном буферном растворе при pH 5,5 в течение 1 мес (при 4°C) увеличение фона свободных сиаловых кислот соответствует отщеплению 0,2—0,4 мкмоль/мг ГМП. В случае овомуцина контроль за содержанием свободных сиаловых кислот показал, что величина фона в 3 раза больше, чем для ГМП. При увеличении срока хранения раствора ГМП до 2 мес возрастания фона свободных сиаловых кислот не происходит.

Таким образом, при определении нейраминидазной активности (например, при сравнении препаратов нейраминидаз, различающихся субстратной специфичностью) преимущество использования ГМП перед высокомолекулярным овомуцином заключается в повышенном содержании сиаловых кислот при хорошей растворимости; кроме того, при использовании овомуцина необходима стадия экстракции окрашенного соединения органическим растворителем. В случае ГМП после образования окрашенного продукта раствор остается прозрачным и изме-

рение его оптической плотности может быть проведено без стадии экстракции.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Велчева П., Абрашев И., Куртева П. и др. // Докл. Болг. АН. — 1981. — № 9. — С. 12—20.
2. Вергиев Ю. В., Белянская Г. К., Езепчук Ю. В. // Биохимия. — 1977. — Т. 42. — С. 1736—1741.
3. Соловьев В. Д., Кобринский Г. Д., Гальцева Г. В. и др. // Журн. микробиол. — 1975. — № 5. — С. 94—99.
4. Черников М. П. Протеолиз и биологическая ценность белков. — М., 1975. — С. 185—186.
5. Шатаева Л. К., Чернова И. А., Самсонов Г. В. и др. // Вопр. мед. химии. — 1978. — № 4. — С. 569—572.
6. Abrashev I., Kourteva Y., Nikolov P. et al. // C. R. Acad. Bulg. Sci. — 1981. — Vol. 34. — P. 575—577.
7. Aminoff D. // Biochem. J. — 1961. — Vol. 81. — P. 384—392.
8. Bradford M. M. // Analyt. Biochem. — 1976. — Vol. 72. — P. 248—254.

Поступила 20.01.86

#### GLYCOMACROPEPTIDE FROM K-CASEIN AS A SUBSTRATE OF NEURAMINIDASE

I. A. Chernova, L. K. Shataeva, I. Abrashev, P. Velcheva, G. V. Samsonov

Institute of High Molecular Substances, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Glycomacropeptide from milk was studied; its molecular mass and amino acid composition were evaluated. When the glycomacropeptide was used as a substrate of neuraminidase, it exhibited many advantages as compared with ovomucin (high molecular substrate of the enzyme) due to increased content of sialic acids in the glycomacropeptide composition and to high solubility.

*А. Р. Монастырская, В. М. Фролова, А. П. Востряков, В. С. Гуткин,  
В. А. Горбатов, В. И. Дейгин, Е. П. Ярова, В. В. Роговин*

## ВЛИЯНИЕ IN VITRO [Д-АЛА-4]-ДЕРМОРФИНА НА ЛЮМИНОЛЗАВИСИМУЮ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ МЫШЕЙ ПРИ ФАГОЦИТОЗЕ

Институт химической физики АН СССР, ВНИИ экспериментальной ветеринарии, Москва

В пероксидазосоме нейтрофилов, эозинофилов, моноцитов и макрофагов локализована мощная антимикробная система, состоящая из пероксидазы, перекиси водорода и окисляемого кофактора (хлорид, бромид, йодид, тиоцианат) [2—4, 10]. Ранее мы показали [1, 5], что гиполипидемическое средство клофибрат, введенное перорально, не только повышает цитохимически выявляемую активность пероксидазы в нейтрофилах мышей, но и позволяет целенаправленно увеличить объем пероксидазосом в 2 раза. Было обнаружено [12], что клофибрат увеличивает выживаемость крыс при экспериментальном пневмококковом сепсисе. Эти данные подтвердили выдвинутое нами ранее [1] положение о новом подходе к лечению инфекционных заболеваний с помощью направленного усиления гранулогенеза в лейкоцитах. Таким образом, была показана принципиальная возможность управления генезом пероксидазосом в нейтрофилах. Однако применение препаратов, воздействующих на гранулогенез, может оказаться не всегда эффективным, так как образование увеличенных пероксидазосом происходит на стадии промиелоцита и поэтому необходимо время на дозревание нейтрофила, стимулированного препаратом, от этой стадии до зрелой клетки (около недели). С другой стороны, поскольку гранулогенез в зрелой клетке закончен, эти препараты на зрелую клетку воздействовать не будут. В связи с этим необходим поиск другой группы биологически активных соединений, которые могли бы усиливать функцию пероксидазосом и всего зрелого нейтрофила непосредственно после введения препарата.

Мы исследовали биологически активные пептиды, так как ранее было показано [11], что тетрапептид тафцин активирует фагоцитоз и усиливает окислительный метаболизм фагоцитов.

В данной работе мы изучали влия-

ние на спокойные и фагоцитирующие клетки цельной крови мышей биологически активного пептида [Д-ала-4]-дерморфина с помощью метода люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ), поскольку этот метод позволяет адекватно оценить степень активности миелопероксидазной антимикробной системы нейтрофилов и других фагоцитов [8, 15]. Возможность применения в качестве объема исследования цельной крови показана ранее [9].

### Методика

Объектом исследования служила цельная кровь трех групп (по 35 особей) белых мыш-самцов массой 18—20 г. Кровь получали после декаптации мышей, собирали в общий гепаринизированный сосуд и использовали в опыте непосредственно после получения. Для измерения ХЛ кровь разбавляли физиологическим раствором в соотношении 1:9.

Изучали изменение ХЛ под влиянием [Д-ала-4]-дерморфина в концентрациях, уменьшающихся на порядок в интервале от  $1,015 \cdot 10^{-3}$  до  $1,015 \cdot 10^{-12}$  М в покое и при фагоцитозе.

Пептид растворяли в физиологическом растворе в концентрации  $1,015 \cdot 10^{-3}$  М в силиконовой посуде с притертой пробкой и хранили при температуре  $-12^\circ\text{C}$ . Маточный раствор размораживали и методом последовательных разведений получали растворы исследуемых концентраций непосредственно перед опытом. Разведения и последующие измерения проводили в полистироновых кюветках, что исключало возможность прилипания пептида к стенкам сосудов.

Максимальные значения ХЛ цельной крови определяли в спокойном состоянии лейкоцитов и после индукции фагоцитоза добавлением полистиронового латекса диаметром 0,82 мкм ( $4 \cdot 10^7$  на кювету). Измерения проводили на люминометре 1251 («LKB — Wallac», Швеция). Для усиления ХЛ использовали люминол — 5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазидион («Serva», ФРГ), предварительно разведенный в физиологическом растворе с добавкой триэтаноламина в концентрации 8 мкл/мл и хранящийся при температуре  $-12^\circ\text{C}$ . Концентрация люминола в кювете составляла  $10^{-6}$  М.

Регистрировали интегрированный сигнал ХЛ за 10 с в обеих сериях опытов: спонтанная ХЛ ( $X_{L_{сп}}$ ) и индуцированная фагоцитозом ХЛ ( $X_{L_{фаг}}$ ) при добавлении в кюветы раствором пептида в концентрациях от  $1,015 \cdot 10^{-3}$  до  $1,015 \cdot 10^{-12}$  М. Измерения про-

водили в трипликатах образцов. Результаты измерений ХЛ анализировали по максимальным значениям интегрированного сигнала в сериях экспериментов по каждой концентрации пептида и в контрольных кюветках, куда добавляли эквивалентное количество физиологического раствора без пептида. После измерения по формуле  $\Delta XЛ = XЛ_{\text{ксп}} - XЛ_{\text{контр}}$  вычисляли изменения ХЛ ( $\Delta XЛ$ ) во всех изученных концентрациях пептида в покое и при фагоцитозе. Кроме того, вычисляли изменение интенсивности ХЛ в фагоцитирующих клетках ( $\Delta XЛ_{\text{пнд}}$ ) по сравнению со спокойными ( $\Delta XЛ_{\text{сп}}$ ) по каждой отдельной концентрации ( $\Delta XЛ_{\text{пнд}} - \Delta XЛ_{\text{сп}}$ ), что позволило судить о характере и выраженности действия каждой отдельной концентрации [Д-ала-4]-дерморфина на ХЛ цельной крови мышей.

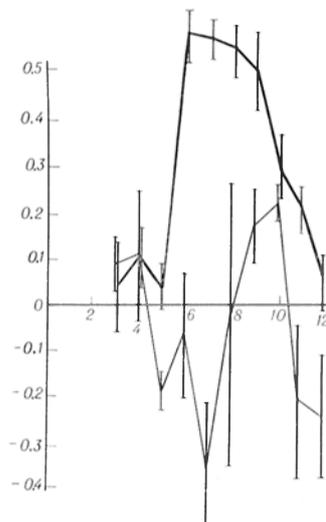
### Результаты и обсуждение

Результаты измерения максимальных значений ХЛ цельной крови представлены в таблице. Изменения максимальных значений ХЛ ( $\Delta XЛ$ ) в нефагоцитирующих и фагоцитирующих клетках (см. рисунок) демонстрируют стимулирующее влияние [Д-ала-4]-дерморфина на ХЛ фагоцитирующих клеток. При этом  $\Delta XЛ$  возрастает при всех изученных концентрациях пептида по сравнению с нефагоцитирующими клетками.

Наиболее выражено проявляется воздействие пептида *in vitro* на интенсивность ХЛ фагоцитирующих клеток при концентрации пептида в интервале  $1,015 \cdot 10^{-6} - 1,015 \cdot 10^{-8}$  М с максимумом  $1,015 \cdot 10^{-7}$  М. Одновременно со снижением его концентрации наблюдается тенденция к уменьшению интенсивности ХЛ. Однако интенсивность ХЛ значительно снижается также и при более высоких концентра-

Показатели ХЛ цельной крови мышей при различной концентрации [Д-ала-4]-дерморфина

Концентрация пептида, М	ХЛ <sub>сп. макс.</sub>	ХЛ <sub>пнд. макс.</sub>	$\Delta XЛ_{\text{пнд}} - \Delta XЛ_{\text{сп}}$
	мВ		
$1,015 \cdot 10^{-3}$	$0,782 \pm 0,07$	$0,766 \pm 0,006$	$-0,0313 \pm 0,063$
$1,015 \cdot 10^{-4}$	$0,839 \pm 0,08$	$0,836 \pm 0,04$	$-0,003 \pm 0,04$
$1,015 \cdot 10^{-5}$	$0,536 \pm 0,02$	$0,764 \pm 0,04$	$+0,227 \pm 0,02$
$1,015 \cdot 10^{-6}$	$0,658 \pm 0,05$	$1,311 \pm 0,04$	$0,661 \pm 0,045$
$1,015 \cdot 10^{-7}$	$0,380 \pm 0,02$	$1,303 \pm 0,02$	$0,926 \pm 0,01$
$1,015 \cdot 10^{-8}$	$0,690 \pm 0,12$	$1,278 \pm 0,02$	$0,591 \pm 0,155$
$1,015 \cdot 10^{-9}$	$0,808 \pm 0,001$	$1,226 \pm 0,06$	$0,368 \pm 0,026$
$1,015 \cdot 10^{-10}$	$0,863 \pm 0,06$	$1,030 \pm 0,04$	$0,157 \pm 0,045$
$1,015 \cdot 10^{-11}$	$0,524 \pm 0,01$	$0,943 \pm 0,06$	$0,422 \pm 0,03$
$1,015 \cdot 10^{-12}$	$0,488 \pm 0,05$	$0,798 \pm 0,1$	$0,267 \pm 0,04$



Динамика изменения ХЛ ( $\Delta XЛ$ ) цельной крови в покое и при фагоцитозе в зависимости от концентрации [Д-ала-4]-дерморфина.

По оси ординат — изменение ХЛ ( $\Delta XЛ$ ), мВ; по оси абсцисс — концентрация [Д-ала-4]-дерморфина, мМ ( $1,015 \cdot 10^{-3} - 10^{-12}$ ). Верхний график — ХЛ, индуцированная латексом, нижний — спонтанная ХЛ. Каждая точка является средним трех измерений  $\pm$  стандартное отклонение.

циях  $1,015 \cdot 10^{-3}$ ,  $1,015 \cdot 10^{-4}$  М (см. таблицу).

Имеются две точки зрения на возможность стимуляции пептидами активности фагоцитов и «дыхательной вспышки» полиморфо-ядерных лейкоцитов (ПМЯЛ). По мнению ряда исследователей [8, 14], тетрапептид тафцин, высвобождающийся из лейкокинина, стимулирует фагоцитирующие гранулоциты и макрофаги, активирует гексозомонофосфатный шунт. Кроме того, тафцин усиливает пиноцитоз, клеточную подвижность, продолжительность жизни клеток, стимулирует бактерицидную и противоопухолевую активность макрофагов, активирует обработку антигена, специфически связываясь с поверхностью мембраны гранулоцита и макрофага. Другие исследователи [7] не подтвердили стимулирующие эффекты тафцина. Ими не обнаружено различий в поглощении стафилококков нейтрофилами при разных вариантах эксперимента: с различной концентрацией частиц или сыворотки, преинкубацией зимозана или преинкубацией клеток с тафцином. Одним из возможных объяснений расхождения в результатах, по их мнению, является различие в методах изучения фагоцитирующей активности ПМЯЛ.

Одни авторы [11] использовали методы световой микроскопии, другие [7] — прижизненный метод измерения ХЛ при фагоцитозе, определяя поглощение радиомеченных бактерий.

Мы также использовали прижизненный метод измерения ХЛ, и полученные при использовании [D-ала-4]-дерморфина результаты свидетельствуют об усилении люминолзависимой ХЛ при фагоцитозе. Это усиление интерпретируют [8, 15] как результат активации пероксидазо-оксидазной системы лейкоцитов. Возрастание ХЛ цельной крови наблюдали во всех кюветках с пептидом только при индукции фагоцитоза. Люминолзависимую ХЛ фагоцитирующих нейтрофилов связывают с образованием в пероксидазной системе хлорноватистой кислоты, которая реагирует с люминолом [6, 8]. Результатом этой реакции является эмиссия света. Однако пероксидазная система может усиливаться как от активации фермента пероксидазы, так и от усиленного образования перекиси водорода в результате «дыхательной вспышки» и достаточного присутствия в системе хлорида [13]. Мы также предполагаем, что усиление люминолзависимой ХЛ при фагоцитозе связано с усиленным образованием перекиси водорода в процессе «дыхательной вспышки», что в свою очередь приводит к усиленному образованию хлорноватистой кислоты.

Полученные данные свидетельствуют о том, что *in vitro* дерморфин может усиливать оксидазо-пероксидазную систему фагоцитов цельной крови во время фагоцитоза. Требуются дальнейшие исследования возможности усиления оксидазо-пероксидазной активности нейтрофилов и моноцитов в экспериментах *in vivo*.

Авторы приносят глубокую благодарность акад. АМН СССР И. П. Ашмарину за идею проведения настоящей работы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Голиков Ю. В., Фролова В. М., Роговин В. В. и др. // Хим.-фарм. журн. — 1975. — № 3. — С. 13—14.

2. Роговин В. В., Муравьев Р. А., Геранина И. Г. и др. // Изв. АН СССР, сер. биол. — 1972. — № 1. — С. 135—141.
3. Роговин В. В., Муравьев Р. А., Пирюзян Л. А. // БМЭ: 3-е изд. — М., 1985. — Т. 25. — С. 528—532.
4. Роговин В. В., Пирюзян Л. А., Муравьев Р. А. Пероксидазосомы. — М., 1977. — С. 64—72.
5. Роговин В. В., Фролова В. М. // Цитология. — 1982. — № 9. — С. 1045—1049.
6. Cohen M. S., Shirley P. S., De Chatelet L. R. // Clin. Chem. — 1983. — Vol. 29. — P. 513—515.
7. Cooper M. R., De Chatelet L. R., Shirley P. S., Cooper M. R. // Inflammation. — 1982. — Vol. 6. — P. 103—112.
8. De Chatelet L. R., Long G. D., Shirley P. S. et al. // J. Immunol. — 1982. — Vol. 129. — P. 1589—1593.
9. Des Camps-Zatscha B., Nguyen A. T., Golub R. M., Feuillet-Fleux M. N. // Ann. Immunol. — 1982. — Vol. 133-c. — P. 349—364.
10. Klebanoff S. J., Clark R. A. The Neutrophil: Function and Clinical Disorders. — Amsterdam, 1978. — P. 409—466.
11. Najjar V. A. // The Reticuloendothelial System. — New York, 1980. — Vol. 2. — P. 45—71.
12. Powanda M. C., Canonico P. G. // Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.). — 1976. — Vol. 152. — P. 437—440.
13. Selvaraj R. J., Zgliczynsky I. M., Paul B. B., Sharra A. J. // J. Reticuloendoth. Soc. — 1980. — Vol. 27. — P. 31—38.
14. Spierer Z., Zakuth V., Golander A. et al. // J. clin. Invest. — 1975. — Vol. 55. — P. 198—206.
15. Stevens P., Hong D. // Microchem. J. — 1984. — Vol. 30. — P. 135—146.

Поступила 17.01.86

#### IN VITRO INFLUENCE OF THE PEPTIDE D-ALA<sup>4</sup>-DERMORPHINE ON THE LUMINOLODEPENDENT CHEMILUMINESCENCE OF MICE WHOLE BLOOD

A. R. Monastyrskaya, W. M. Frolova, A. P. Vostryakov, V. S. Gulkin, V. A. Gorbатов, V. I. Deigin, E. P. Yarova, V. V. Rogovin

Institute of Chemical Physics, Academy of Sciences of the USSR, Institute of Experimental Veterinary, Moscow

*In vitro* effect of biologically active D-Ala<sup>4</sup>-dermorphine on the phagocytizing and resting cells of mice whole blood was studied using luminol-dependent chemiluminescence. D-Ala<sup>4</sup>-dermorphine influenced only on chemiluminescence of the phagocytizing cells; maximal effect was observed at  $1.015 \cdot 10^{-7}$  M of the peptide.

*Н. Н. Прозоровская, С. В. Гляняная, А. А. Дельвиц, С. С. Рудаков,  
Ю. П. Воронцов*

## ЭКСКРЕЦИЯ ОКСИПРОЛИНА С МОЧОЙ ПРИ ВОРОНКООБРАЗНОЙ ДЕФОРМАЦИИ ГРУДНОЙ КЛЕТКИ

НИИ медицинской энзимологии АМН СССР, кафедра детской хирургии II ММИ им.  
Н. И. Пирогова

Воронкообразная деформация грудной клетки (ВДГК) представляет собой врожденный дефект развития, проявляющийся в разном по глубине и конфигурации западении грудины и передних отделов ребер. Помимо внешнего дефекта, при ВДГК наблюдаются глубокие функциональные нарушения, которые обуславливают необходимость хирургического лечения. Сложность лечения ВДГК и неудовлетворенность его результатами в значительной мере связаны с отсутствием четких представлений об этиологии и патогенезе этого дефекта развития.

В настоящее время большинство авторов придерживаются мнения, что ВДГК являются проявлением хондродисплазии с преимущественным поражением реберных хрящей [1, 2, 4, 10]. Имеются также отдельные сообщения о том, что в значительном числе случаев ВДГК носит наследственный характер, передаваясь по аутосомно-доминантному типу [3, 10], или является компонентом одного из врожденно-наследственных синдромов [1, 2, 5], чаще всего Марфана и Элерса — Данлоса. Все это указывает на полиэтиологический характер ВДГК и на необходимость исследования возможности существования патогенетического звена, общего для изолированной и синдромальной форм ВДГК, что, по нашему мнению, позволит разработать методы целенаправленного вмешательства в этиопатогенез хондродисплазий.

Известно, что синдромы Марфана и Элерса — Данлоса относятся к группе «синдромов дисплазий» [11]. В обзоре [8] даны многочисленные ссылки на работы, свидетельствующие, что примерно у половины пациентов с синдромом Марфана наблюдается повышенная экскреция оксипролина с мочой, что может служить подтверждением диагноза, однако отсутствие ее, как указывает автор, не исключает наличия этого синдрома. В литерату-

ре имеются данные, указывающие на отклонения в метаболизме коллагена и при синдроме Элерса — Данлоса, особенно IV типа [9]. Общность характера поражения соединительной ткани при этих синдромах, а также частота ВДГК заставили нас обратить внимание на характер экскреции продуктов метаболизма коллагена у детей с изолированной формой ВДГК и ВДГК на фоне указанных выше синдромов.

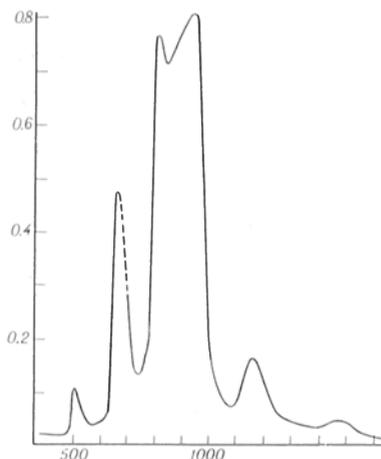
### Методика

Исследована моча 16 детей с ВДГК II—III степени до выполнения торакопластики: у 10 детей (11—14 лет) была изолированная форма, у 6 (4—14 лет) — синдромальная (у 3 синдром Марфана, у 3 синдром Элерса — Данлоса), а также 9 детей (8—14 лет) через 6—8 мес после выполнения торакопластики (изолированная форма) и 3 детей (4—14 лет) с синдромом Элерса — Данлоса IV типа без ВДГК.

Определяли следующие показатели экскреции оксипролина: содержание свободного и связанного оксипролина (в составе пептидов с молекулярной массой более и менее 700 Д), что давало в сумме содержание общего оксипролина, в миллиграммах на 100 мл мочи. Содержание свободного и связанного оксипролина выражали в процентах от его общего содержания. Вычисляли также соотношение оксипролина и креатинина в миллимолях на 1 моль, отношение свободного оксипролина к связанному в пептидах с мол. массой более 700 Д и отношение пептидосвязанного оксипролина  $>700$  Д /  $<700$  Д).

Для анализа использовали утреннюю порцию мочи, которую в объеме 50 мл фракционировали на колонке (5×70 см) с сефадексом G-10 при автоматической регистрации оптической плотности на выходе из колонки при длине волны 280 нм. Возможность использования утренней порции мочи для определения указанных выше показателей экскреции оксипролина была нами продемонстрирована ранее у здоровых детей и взрослых [4]. Кроме того, при параллельном анализе утренней порции и суточной мочи не было выявлено статистически значимой разницы между полученными результатами. Эти исследования были проведены у 10 пациентов с ВДГК.

Оксипролин в составе пептидов с молекулярной массой более 700 Д определяли после кислотного гидролиза в материале пер-



Характерный профиль функционирования мочи (50 мл) у детей 3–14 лет на колонке (5 × 70 см) с сефадексом G-10.

Элюат — 0,01 М раствор аммиака. Пунктиром отмечена зона выхода свободного оксипролина. По оси абсцисс — количество элюата (в мл), по оси ординат — единицы оптической плотности при 280 нм.

вого пика, свободный оксипролин — в материале второго пика без предварительного гидролиза. Выход свободного оксипролина именно с этим пиком был подтвержден опытами с добавлением 1 мг оксипролина на 50 мл мочи. Оксипролин в составе пептидов с мол. массой менее 700 Д вычисляли вычитанием количества свободного оксипролина из

количества оксипролина, определенного в материале второго пика после кислотного гидролиза. Содержание оксипролина в материале первого и второго пиков суммарно составляло общее содержание оксипролина (см. рисунок).

Оксипролин определяли по методу [6], креатинин — по методу [3].

В качестве нормы использовали показатели экскреции оксипролина, полученные при исследовании мочи 24 здоровых детей в возрасте от 3 до 14 лет [4]. Статистически значимых различий в показателях экскреции оксипролина между возрастными группами 3–8 лет (12 детей) и 9–14 лет (12 детей) не обнаружено.

## Результаты и обсуждение

Результаты определения показателей экскреции оксипролина в утренней порции мочи после ее фракционирования на сефадексе G-10 представлены в таблице.

Сравнительный анализ показателей экскреции оксипролина в пределах группы с синдромальной формой ВДГК выявил статистически значимые различия только в относительном содержании свободного оксипролина, которое было выше при синдроме Элерса — Данлоса ( $p < 0,001$ ) и оксипролина в составе пептидов с мол. массой более 700 Д, которое было ни-

Показатели экскреции оксипролина у детей ( $M \pm m$ )

Диагноз	Возраст обследованных, годы	Число детей	Общий оксипролин, мг/100 мл	Соотношение оксипролина и креатинина, ммоль на 1 моль	Свободный оксипролин, % от общего оксипролина	Связанный оксипролин, пептиды с мол. массой 700 Д, % от общего оксипролина	Соотношение свободного и связанного оксипролина ( $\wedge$ 700 Д)	Отношение пептидо-связанный оксипролин ( $>700$ ) / $<700$ Д
Изолированная форма ВДГК	11–14	10	2,6 ± 0,2	16,2 ± 1,5	1,6 ± 0,2	25,3 ± 2,4	0,06 ± 0,009	0,36 ± 0,05
Синдромальная форма ВДГК: на фоне синдрома Марфана	4–14	32	2,4 ± 0,4	11,1 ± 2,7	1,0 ± 0,07	30,2 ± 2,9	0,03 ± 0,005	0,44 ± 0,07
на фоне синдрома Элерса — Данлоса		3	3,0 ± 0,4	14,4 ± 3,6	6,3 ± 0,4	20,6 ± 1,8	0,31 ± 0,04	0,28 ± 0,04
Синдром Элерса — Данлоса IV типа	4–14	3	5,4 ± 0,7	25,7 ± 0,5	7,2 ± 1,0	20,5 ± 3,4	0,37 ± 0,1	0,29 ± 0,06
Изолированная форма ВДГК через 6–8 мес после торакопластики	8–14	9	4,9 ± 0,4	33,4 ± 3,4	2,6 ± 0,1	26,6 ± 1,4	1,00 ± 0,007	0,38 ± 0,03
Здоровые дети	3–14	24	4,9 ± 0,8	32,2 ± 1,8	2,6 ± 0,4	32,0 ± 2,4	0,08 ± 0,006	0,49 ± 0,05

же при этом синдроме ( $p < 0,05$ ); величина отношения свободного оксипролина к пептидосвязанному ( $>700$  Д) при синдроме Марфана была в 10 раз меньше, чем при синдроме Элерса — Данлоса.

Между изолированной и синдромальной формой ВДГК значимые различия были обнаружены опять же в содержании свободного оксипролина, которое было ниже при синдроме Марфана ( $p < 0,05$ ) и выше при синдроме Элерса — Данлоса ( $p < 0,001$ ), чем в случае изолированной формы, и в величине отношения свободного оксипролина к пептидосвязанному ( $>700$  Д) с той же статистической значимостью разницы.

По сравнению со здоровыми детьми того же возраста содержание общего оксипролина и в пересчете на креатинин как при изолированной, так и при синдромальной форме ВДГК было значимо ниже ( $p < 0,01$  и  $< 0,05$  соответственно;  $p < 0,001$ ); относительное содержание свободного оксипролина при изолированной форме ВДГК и ВДГК на фоне синдрома Марфана — ниже ( $p < 0,05$  и  $< 0,01$  соответственно), а на фоне синдрома Элерса — Данлоса — выше ( $p < 0,001$ ). Относительное содержание связанного оксипролина в пептидах с мол. массой  $>700$  Д и отношение пептидосвязанного оксипролина  $>700$  Д/ $<700$  Д при изолированной ВДГК и ВДГК на фоне синдрома Марфана оставались в пределах нормы, однако при ВДГК на фоне синдрома Элерса — Данлоса эти показатели были значимо ниже нормы ( $p < 0,001$  и  $p < 0,05$  соответственно). Отношение свободного оксипролина к пептидосвязанному ( $>700$  Д) при изолированной форме ВДГК было в пределах нормы, при ВДГК на фоне синдрома Марфана — ниже нормы ( $p < 0,001$ ), а на фоне синдрома Элерса — Данлоса — выше нормы ( $p < 0,001$ ).

Таким образом, для ВДГК независимо от ее формы характерно сниженное содержание общего оксипролина по сравнению с показателями у здоровых детей того же возраста, что, вероятно, свидетельствует о сниженном синтезе коллагена. По данным литературы [8], при синдроме Марфана (без указания на наличие ВДГК) экскреция оксипролина либо повышена, либо находится в пределах нормы.

При синдроме Элерса — Данлоса без ВДГК мы также не обнаружили сниженной экскреции оксипролина. Все это указывает, что сниженная экскреция оксипролина с мочой при синдромах Марфана и Элерса — Данлоса связана с наличием ВДГК. Характер изменений показателей свободного и пептидосвязанного оксипролина при синдромальных формах ВДГК свидетельствует о специфическом нарушении процесса деградации коллагена у этих больных, что может быть обусловлено или изменением активности коллагенолитических протеаз, или же структурными особенностями коллагеновых фибрилл [9]. Нарушения в соотношении свободного и пептидосвязанного оксипролина ассоциируются с наличием рассматриваемых синдромов и, по-видимому, не связаны с присутствием или отсутствием ВДГК. Эти наблюдения дают основание предполагать существование различных механизмов нарушения метаболизма коллагена, один из которых приводит к развитию ВДГК.

В пользу этого предположения свидетельствуют показатели экскреции оксипролина, определенные у пациентов с синдромом Элерса — Данлоса IV типа без ВДГК, и сопоставление их с показателями у пациентов с ВДГК на фоне этого синдрома. За исключением значимых различий в содержании общего оксипролина и величине соотношения оксипролина и креатинина ( $p < 0,05$ ) показатели экскреции оксипролина у детей при синдроме Элерса — Данлоса с ВДГК и без нее были сходными: более высокое по сравнению с нормой содержание свободного оксипролина ( $p < 0,001$ ), более низкое содержание пептидосвязанного ( $>700$  Д) оксипролина ( $p < 0,001$  и  $< 0,05$ ) и соответственно в 4—5 раз выше нормы отношение свободного и пептидосвязанного ( $>700$  Д) оксипролина ( $p < 0,001$  и  $< 0,01$ ) и ниже нормы величина отношения пептидосвязанного ( $>700$  Д/ $<700$  Д) оксипролина ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, повышенное относительное содержание свободного оксипролина и сниженное содержание пептидосвязанного ( $>700$  Д) характерно, по-видимому, именно для этого синдрома, несмотря на гетерогенность его проявлений и множественность ти-

пов, и не связано с ВДГК как таковой.

Показатели экскреции оксипролина с мочой у больных с изолированной формой ВДГК через 6—8 мес после выполнения торакопластики не имели статистически значимых отличий от показателей у здоровых детей того же возраста, что указывает на нормализацию метаболизма коллагена (см. таблицу). По-видимому, регенераты, которые образуются из оставленной надхрящницы, качественно отличаются от удаленных хрящей. Эти качественные отличия проявляются в нормализации коллагенообразования, что, предположительно, может быть обусловлено либо «переключением» генетического аппарата хондроцитов на нормальную работу, либо конкурентной заменой диспластичных хрящевых клеток на нормальные.

Сделанные наблюдения могут быть полезны для оценки лечения пациентов с воронкообразной деформацией грудной клетки, а также при установлении диагноза синдрома Элерса — Данлоса в качестве вспомогательной информации.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Дольницкий О. В., Дирдовская Л. И. Врожденные деформации грудной клетки у детей. — Киев, 1978.
2. Кондрашин П. И. // Ортопед. травматол. — 1984. — № 4. — С. 62—67.
3. Методические указания по применению унифицированных клинических лабораторных методов исследований / Под ред. В. В. Меньшикова. — М., 1973. — С. 70—71.
4. Проzorovskaya Н. Н., Глиняная С. В., Дельвиг А. А. // Вопр. мед. химии. — 1986. — Т. 6. — С. 84—86.
5. Рудаков С. С., Солониченко В. Г., Делонне Н. Л. // Всесоюзный съезд медицин-

ских генетиков, 1-й: Материалы. — Киев, 1984. — С. 289.

6. Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича. — М., 1977. — С. 262—264.
7. Урманас В. К., Кондрашин П. И. Воронкообразная деформация грудной клетки. — Каунас, 1983.
8. Kivirikko K. I. // Int. Rev. Connect. Tissue Res. — 1970. — Vol. 5. — P. 133—134.
9. Kivirikko K. I., Savolainen E. R. // Focus Res. med. Biol. — 1981. — Vol. 59. — P. 1—6.
10. Ravitch M. M. Congenital Deformities of the Chest Wall and Their Operative Correction. — Philadelphia, 1977.
11. Spranger J., Benirschke K., Hall J. G., Lenz W. // J. Pediat. — 1982. — Vol. 100. — P. 160—165.

Поступила 20.01.86

#### EXCRETION OF HYDROXYPROLINE WITH URINE IN FUNNEL CHEST DEFORMATION

N. N. Prozorovskaya, S. V. Glinyayaya, A. A. Del'vig, S. S. Rudakov, Yu. P. Vorontsov

Institute of Medical Enzymology, Academy of Medical Sciences of the USSR, N. I. Pirogov II Medical School, Moscow

Excretion of hydroxyproline with urine was studied in 16 children with localized form of funnel chest deformation simultaneously with Marfan and Elers-Danlos syndromes, in 9 children with the localized form of deformation within 6-8 months after thorax surgical plastic operation as well as in 3 children with Elers-Danlos syndrome but without funnel chest deformation. Funnel chest deformation of the II-III degree, independently of its form, was accompanied by a decrease of total hydroxyproline in urine as compared with healthy children of the similar age. The hydroxyproline excretion was normalized after thoracoplastic operation in the children with localized form of the chest deformation. In Elers-Danlos syndrome, independently on presence or absence of the chest deformation, relative content of free hydroxyproline was increased in urine, while the peptide-bound amino acid was decreased (peptides with molecular mass above 700 daltons); this phenomenon appears to be a characteristic property of the syndrome.

УДК 612.115.35-088.1+616.151.55-074

О. А. Маркова, В. В. Калашников, В. Б. Хватов

#### ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИТРОМБИНА-III ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Московский НИИ скорой помощи им. Н. В. Склифосовского

Антитромбин-III (АТ-III), или кофактор гепарина, является важным регулятором свертывающей системы крови, ингибирующим сериновые протеиназы: тромбин, калликреин, плазмин и активированные факторы VII, IX, X, XI, XII [8, 18]. Косвенно он

способен инактивировать V, VIII и XIII факторы свертывания крови. Имеются отдельные сообщения о наследственном дефиците АТ-III [13, 15]. Отмечено значительное снижение его активности при циррозе печени [15], ДВС [2, 6, 19] и других тромбо-

тических состояниях [22]. Это определяет важность исследования активности АТ-III у этих больных.

Активность АТ-III в настоящее время определяют различными методами: коагулологическими, амидолитическими, иммунологическими. В клинической практике встречаются трудности при использовании только коагулологического метода, так как лечение больных гепарином может привести к ложным результатам определения этого белка. В этой связи перспективным является внедрение высокочувствительных количественных иммунохимических методов определения АТ-III в плазме крови, моче и других биологических жидкостях больных. Для их внедрения необходимо получение моноспецифической антисыворотки к этому белку.

Настоящая работа посвящена способу выделения и очистки препарата АТ-III человека, необходимого для получения моноспецифических антисывороток. В основе его лежит метод, приведенный в работе [16], предусматривающий применение биоспецифической хроматографии на гепарин-сефарозе.

### Методика

Материалом для выделения АТ-III служила плазма крови доноров и внезапно умерших людей [5].

Активность АТ-III определяли по методу Абильтгаарда [9], содержание антигена — по методу Оухтерлонн [7] в модификации Н. И. Храмковой и Г. И. Абелева [7] с использованием антисыворотки к АТ-III производства «Calbiochem-Behring corp.» (США). Количество белка в пробах устанавливали методом Лоури и соавт. [14].

Электрофорез в 7% ПААГ проводили с использованием реактивов и методических разработок фирмы «Reanal» (ВНР) [12]. Положение АТ-III на электрофореграмме определяли с помощью слитного иммуноэлектрофореза [1].

Изоэлектрическую точку препарата АТ-III находили методом изохромофокусирования [21]. Относительную молекулярную массу определяли методом гель-фильтрации через сефадекс G-200 [4].

Гепарин-сефарозу готовили иммобилизацией гепарина фирмы «Sigma» (США) на сефарозе 4В, активированной CNBr, согласно рекомендациям фирмы «Pharmacia Fine Chemicals» (Швеция).

**Выделение и очистка АТ-III.** Донорскую плазму центрифугировали 20 мин при 3000 об/мин и дефибрилировали, прибавляя 0,1 объема 5% CaCl<sub>2</sub> и раствор тромбина до конечной концентрации 0,25 ед/мл. После инкубации смеси в течение 20 мин при 37°C фибриновый сгусток удаляли фильтрованием через 2 слоя марли.

Полученную сыворотку обрабатывали

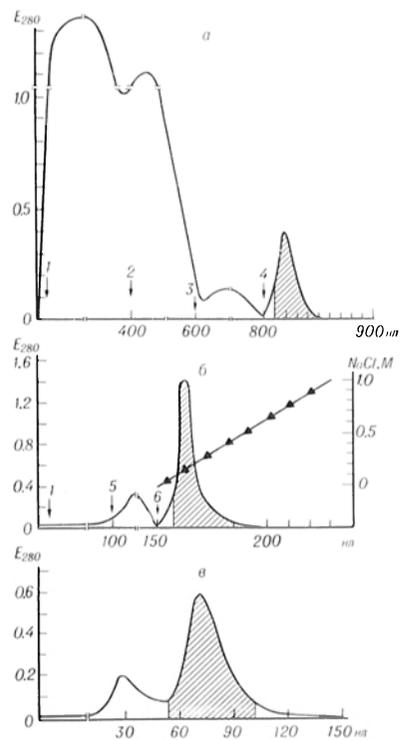


Рис. 1. Получение АТ-III из плазмы крови человека.

*а* — аффинная хроматография на гепарин-сефарозе 4В. Размер колонки — 3×10 см; высота геля — 5 см; 0,05 М трис-НСl буфер рН 7,4; скорость элюции — 20 мл/ч; объем фракции — 10 мл; *б* — хроматография на целлюлозе ДЕ-32. Размер колонки — 1×5 см; высота геля — 4 см; 0,05 М трис-НСl буфер рН 7,4; скорость элюции — 20 мл/ч; объем фракции — 6 мл; *в* — гель-фильтрация через сефадекс G-200. Размер колонки — 2×80 см; высота геля — 64 см; 0,05 М трис-НСl буфер рН 7,4; скорость элюции — 12 мл/ч; объем фракции — 3 мл. 1 — нанесение образца; элюция стартовым буфером, содержащим 0,15 М NaCl (2), 0,40 М NaCl (3) и 2,0 М NaCl (4), 5 — элюция стартовым буфером без NaCl; 6 — градиентная элюция с изменением концентрации NaCl от 0 до 1,0 М. Заштрихованы объединенные фракции, содержащие АТ-III.

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> при 50% насыщении, добавляя 31,2 г сухой соли на 100 мл. Осадок, образовавшийся в течение ночи при 4°C, отделяли центрифугированием 30 мин при 3000 об/мин. Надосадок (153 мг белка) диализовали в течение ночи против проточной воды и наносили на колонку (3×10 см) с высотой геля гепарин-сефарозы 4В 5 см, забуференного 0,05 М трис-НСl буфером рН 7,4, содержащим 0,15 М NaCl (рис. 1, *а*). Колонку промывали сначала стартовым буфером, а затем буфером, содержащим 0,4 М NaCl. АТ-III десорбировали исходным буфером, содержащим 2,0 М NaCl.

Объединенную фракцию АТ-III после диализа против воды в течение ночи наносили на колонку (1×5 см) с высотой геля целлюлозы ДЕ-32 4 см, уравновешенного 0,05 М трис-НСl буфером рН 7,4. После нанесения образца (15 мг белка) колонку промывали исходным буфером. АТ-III элюировали линейным градиентом NaCl от 0 до 1,0 М, приготовленным на стартовом буфере. АТ-III, адсорбированный на аннионите, элюировался при содержании соли 0,1—0,4 М (рис. 1, *б*).

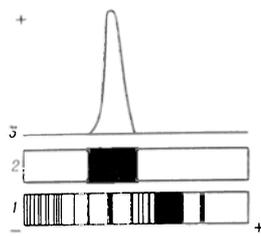


Рис. 2. Диск-электрофорез препарата АТ-III в 7% ПААГ с последующим иммунопроявлением (см. схему).

1 — плазма донорской крови; 2 — препарат АТ-III; 3 — иммунохимический профиль препарата АТ-III, выявленный моноспецифической антисывороткой к этому белку.

Фракции с АТ-III объединяли и лиофилизировали.

Лиофилизат растворяли в 1 мл 0,05 М трис-НСI буфера рН 7,4 и наносили на колонку (2×80 см) с высотой геля G-200 64 см, уравновешенного тем же буфером. АТ-III элюировался во 2-м белковом пике, как показано на рис. 1, в. Эти фракции объединяли, лиофилизировали и хранили при 4°C.

**Получение и стандартизация антисыворотки к АТ-III.** В работе использовали кроликов породы шиншилла массой 2,5—4 кг. Материалом для иммунизации служил очищенный препарат АТ-III, содержащий 1,0—2,0 мг белка. Применялась следующая схема иммунизации: 2 мг белка в 1 мл воды в смеси с равным объемом полного адьюванта Фрейнда вводили подкожно интраконтингально в оба глаза и подкожно в 5 мест. Впоследствии проводили 3 инъекции этого же количества белка с интервалом в 9 дней, чередуя места введения (подкожно, внутримышечно, подкожно).

Взятие крови начинали на 7-й день после последней инъекции из краевой вены уха кролика и продолжали в течение 20 дней. Полученную антисыворотку консервировали азидом натрия (0,2%) и хранили 2—3 года при 4°C.

Анализ антисывороток включал определение преципитирующих антител к препарату АТ-III с помощью иммунодиффузионного анализа по методу Оухтерлони [7] и иммуноэлектрофореза по методу Грабаря [3]. Преципитирующие антисыворотки использовали для выведения стандартной тест-системы к изучаемому белку по методу Н. И. Храмоной

и Г. И. Абелева [7], которая стандартизировалась коммерческой антисывороткой к АТ-III фирмы «Calbiochem-Belting corp.» (США).

## Результаты и обсуждение

АТ-III выделяли из плазмы донорской и трупной крови с содержанием ингибитора около 200 мкг/мл, что составляет 0,25—0,30% от общей концентрации белка в плазме.

Результаты фракционирования, полученные при проведении одного из трех идентичных опытов, представлены в таблице. Выход АТ-III по белку составил 0,015% от общего белка плазмы и 6% от общего содержания ингибитора.

Аналогично выделяли АТ-III из плазмы трупной крови, которая может служить полноценным дополнительным сырьем для получения этого ингибитора.

В предлагаемом методе получения АТ-III по сравнению с ранее известными [8, 11, 16] сокращено число этапов очистки, а потеря белка сведена к минимуму.

Очищенный препарат АТ-III представлял собой порошок белого цвета, хорошо растворимый в воде, буферных и солевых растворах.

Диск-электрофоретический анализ препарата в 7,0% ПААГ показал его гомогенность и электрофоретическую подвижность  $\alpha_2$ -глобулинов (рис. 2).

Относительная молекулярная масса очищенного препарата АТ-III, определенная методом гель-фильтрации через сефадекс G-200, составляет 6500 Д,

### Выделение и очистка АТ-III из плазмы донорской и трупной крови

Этап очистки	Донорская кровь				Трупная кровь			
	объем, мл	общий белок, мг	АТ-III, мг	степень очистки, %	объем, мл	общий белок, мг	АТ-III, мг	степень очистки, %
Плазма крови	1 200	84 000	230	0,3	1 200	78 000	230	0,3
Осаждение (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 340	25 460	164	0,6	1 420	25 560	173	0,7
Аффинная хроматография на гепаринсефарозе 4В	150	30	25	83	144	28	24	86
Хроматография на целлюлозе ДЕ-32	42	17	16	94	44	18	17	94
Гель-фильтрация через сефадекс G-200	44	13	13	100	44	13	13	100

Примечание. Представлены результаты типичной серии опытов.

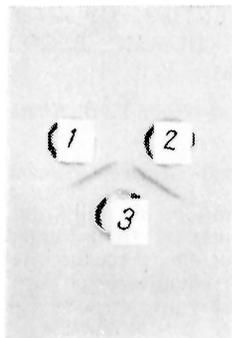


Рис. 3. Сравнительный иммунохимический анализ антисывороток к АТ-III. 1 — антисыворотка к АТ-III; 2 — коммерческая антисыворотка к АТ-III фирмы «Calbiochem — Behring corp.» (США); 3 — стандартный препарат АТ-III.

что соответствует ранее полученным данным [16, 20]. Изоэлектрическая точка АТ-III, найденная методом изохромофокусирования, в среднем равна  $pH\ 4,9 \pm 0,1$ , что также согласуется с данными литературы [10].

Выделенный препарат АТ-III относится к числу хорошо иммуногенных белков, что проявляется высоким качеством антисывороток при использо-

вании его для иммунизации кроликов. Идентичность полученной нами и коммерческой антисывороток представлена на рис. 3. Титр антител в них  $1/16—1/32$ , что сопоставимо с зарубежными аналогами.

Иммуноэлектрофоретический анализ показал, что антисыворотка к АТ-III моноспецифична (рис. 4). Это подтверждает единственная дуга преципитации, выявленная как в очищенном препарате АТ-III, так и в плазме донорской или трупной крови. Полученные антисыворотки не уступали коммерческим по содержанию специфических антител и аффинности.

Таким образом, разработанный способ очистки АТ-III человека позволяет получить препарат белка высокой степени чистоты, который с успехом может применяться для получения моноспецифических антисывороток и создания серодиагностикомов.

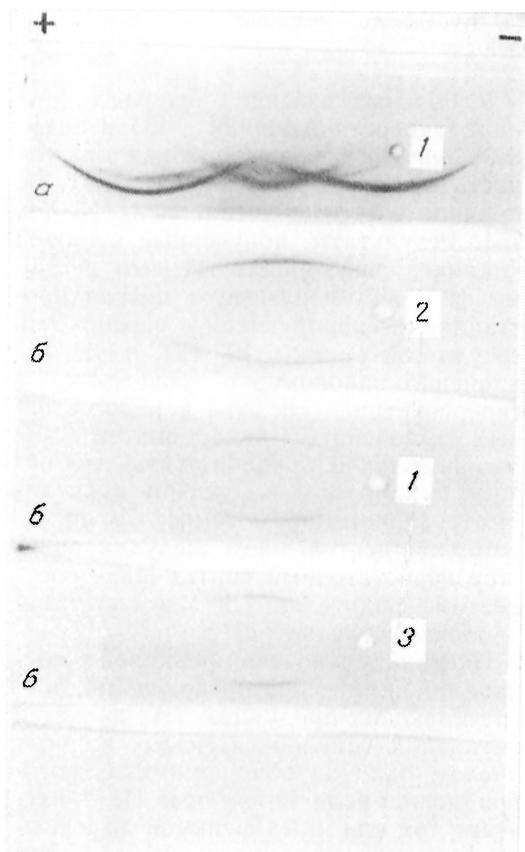


Рис. 4. Иммуноэлектрофоретический анализ антисыворотки к АТ-III.

а — антисыворотка к белкам плазмы крови человека; б — антисыворотка к АТ-III; 1 — плазма донорской крови; 2 — препарат АТ-III; 3 — плазма каданверной крови.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Аксельсен П., Крелль И., Вееке Б. Руководство по количественному иммуноэлектрофорезу: Пер. с англ. — М., 1977.
2. Андреев Г. В., Полянцев Л. Р., Подорожская Л. В. // Тер. арх. — 1980. — № 2. — С. 141—284.
3. Грабар П. // Биохимия. — 1957. — № 1. — С. 49—54.
4. Детерман Г. Гель-хроматография: Пер. с нем. — М., 1970.
5. Нафомов Г. А. Биологическая характеристика крови внезапно умерших и ее использование в хирургической практике: Дис... д-ра мед. наук. — М., 1971.
6. Федуллова Г. А. Диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови при различных формах острого лейкоза: Дис... канд. мед. наук. — М., 1979.
7. Храмова И. И., Абелев Г. И. // Бюл. экпер. биол. — 1961. — № 12. — С. 107.
8. Abildgaard V. // Scand. J. clin. Lab. Invest. — 1967. — Vol. 19. — P. 190—201.
9. Abildgaard V., Graven I., Godal H. C. // Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttg.). — 1970. — Bd 24. — S. 224.
10. Andersson L.-O. // The Physiological Inhibitors of Blood Coagulation and Fibrinolysis. — Amsterdam, 1979. — P. 39.
11. D'Souza K., Ananthakrishnan R. // Austr. J. exp. Biol. — 1979. — Vol. 57. — P. 245—250.
12. Davis B. J. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1964. — Vol. 121. — P. 404.
13. Filip D. G., Echstein Y. D., Veltkamp Y. Y. // Amer. J. Hemat. — 1976. — Vol. 1. — P. 343—349.
14. Lowry O. H., Rosebraugh N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.

15. *Marciniak E., Farley C. H., Desimone P. A.* // Blood. — 1974. — Vol. 43. — P. 219—231.
16. *Miller-Anderson M., Borg H., Anderson L. O.* // Thrombos. Res. — 1974. — Vol. 5. — P. 439.
17. *Ouchlerlongy O.* // Progr. Allergy. — 1958. — Vol. 5. — P. 1.
18. *Rosenberg R. D.* // New Engl. J. Med. — 1975. — Vol. 292. — P. 146—151.
19. *Seegers W. H.* // Amer. J. clin. Path. — 1978. — Vol. 69. — P. 367—374.
20. *Shijman M. A., Pizzo S. V.* // J. biol. Chem. — 1982. — Vol. 257. — P. 32—43.
21. *Slyterman L. A. E., Elgersma O.* // J. Chromatogr. — 1978. — Vol. 150. — P. 17, 31.
22. *Thaler E., Balzar E., Kopsa H. et al.* // Haemostasis. — 1978. — Vol. 7. — P. 257—272.

Поступила 20.01.86

## ISOLATION AND PROPERTIES OF ANTI-THROMBIN III FROM HUMAN BLOOD PLASMA

*O. A. Markova, V. V. Kalashnikov, V. B. Khvatov*

Institute of Urgent Medical Service, Moscow

Highly purified preparation of antithrombin III (AT III) was obtained from human blood plasma. Efficiency of the procedure developed was corroborated by studies of physico-chemical properties of the preparation. The AT III preparation was used for production of monospecific antiserum. The antisera prepared were analogous to the commercially available antisera in content of specific antibodies, affinity properties and might be used for development of sera for serodiagnostics.

УДК 616.342-002.44-06:616.342-005.1]-07:616.155.25-02:[615.276.3+615.212.3

*А. А. Фишер, Е. Н. Калюжная, С. К. Саха*

## ОСОБЕННОСТИ СИНТЕЗА ПРОСТАНОИДОВ У БОЛЬНЫХ ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНЬЮ ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ С ГЕМОРРАГИЧЕСКИМИ ОСЛОЖНЕНИЯМИ В АНАМНЕЗЕ

Кафедра терапии педиатрического факультета Кубанского медицинского института, Краснодар

При изучении молекулярных основ генеза язвенной болезни и ее осложнений все большее внимание привлекают простагландины (ПГ). ПГ тесно связаны по крайней мере с двумя группами механизмов, имеющими непосредственное отношение к развитию геморрагических осложнений (ГО) язвенной болезни — гемостатических и местных гастроуденальных. ПГ активно участвуют в агрегационной функции тромбоцитов (тромбоксаны), антиагрегантной активности сосудов (простаглицлины), изменении фибринолитической системы крови и др. [17, 24, 26, 34]. Основные гастроуденальные функции, опосредуемые и модулируемые различными ПГ, включают стимуляцию продукции бикарбонатов и слизи, подавление секреции кислоты и, возможно, пепсина, регуляцию моторики, трофики и кровоснабжения гастроуденальной зоны [1, 4, 6, 23, 28]. Хотя значение ПГ в ulcerogenesis и развитии ГО еще остается неясным, факт их важной физиологической роли в регуляции гастроуденальных функций и гемостаза уже не вызывает сомнений, и началось практическое использование ПГ и их синтетических аналогов с лечебной целью при язвенной болезни [19, 22, 32].

У больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки с ГО в анамнезе снижена агрегационная активность кровяных пластинок (КП), но причина этого не установлена [3, 10, 15]. Результаты, полученные в нашей клинике, свидетельствуют, что данному феномену сопутствует низкая простаглицлиногенерирующая способность сосудистой стенки [9, 12], и эти отклонения закономерно сочетаются с гиперсекрецией кислоты и недостаточным выделением бикарбонатов [13]. Это позволило предположить, что общим механизмом нарушения сосудисто-тромбоцитарного гемостаза и секреторной деятельности желудка является недостаточный синтез ПГ в сосудистой эндотелии, КП и слизистой оболочке желудка [13].

Поскольку ключевой реакцией в каскаде биохимических превращений, обеспечивающих продукцию ПГ, является активация циклооксигеназы жирных кислот, один из общепринятых способов оценки роли эндогенных ПГ — изучение тех или иных функций до и после блокады указанного фермента. Наиболее известные ингибиторы циклооксигеназы — нестероидные противовоспалительные средства (НПС): аспирин, вызывающий ее обратимое ацетили-

рование, индометацин и др. Если эндогенные ПГ действительно влияют на изучаемую функцию, то торможение циклооксигеназы должно вызывать эффекты, противоположные действию ПГ.

Исходя из этих предпосылок, в настоящей работе предпринят сопоставительный анализ влияния индометацина и аспирина на агрегационную функцию КП и антиагрегантную активность сосудов, а также индометацина — на базальную и стимулированную гистамином секрецию кислоты, бикарбонатов и пепсина у больных неосложненной и осложненной кровотечением (в анамнезе) язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки. В таком аспекте эти вопросы еще не исследовались, а немногочисленные данные литературы о влиянии индометацина на желудочную секрецию весьма разноречивы [18, 21, 41].

#### Методика

Обследовано 67 человек (63 мужчины, 4 женщины): 10 здоровых в возрасте от 18 до 43 лет (в среднем  $37,3 \pm 2,7$  года), 27 больных неосложненной язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки в возрасте от 16 до 58 лет (в среднем  $36,0 \pm 2,3$  года) и 30 больных дуоденальной язвой, осложненной кровотечением в анамнезе, в возрасте от 15 до 54 лет (в среднем  $35,9 \pm 2,0$  года). Среднее число кровотечений у одного больного 1,3.

Гемостатические исследования включали определение агрегационной функции КП и антиагрегантной активности сосудистой стенки. Кровь брали утром натощак в условиях, близких к основному обмену; женщины обследовали в межменструальном периоде. Богатую тромбоцитами плазму ( $2 \cdot 10^5$  КП в 1 мкл) получали из крови, стабилизированной цитратом. Агрегационную активность КП изучали фотометрическим методом [16] с графической записью процесса [35] на потенциометре И-399. Индуктором агрегации служил свежеприготовленный раствор АДФ фирмы «Reanal» (ВНР) в конечной концентрации 20 мкг/мл. При расшифровке агрегатограммы КП учитывали обычные параметры и вычисляли интегральный показатель агрегации —  $A_{\text{АДФ}}$ , который увеличивается пропорционально снижению упомянутой функции [10]. Антиагрегантную активность сосудистой стенки определяли методом венозной окклюзии [2]. Оценивали степень торможения агрегации КП при добавлении к ним бедной тромбоцитами плазмы, полученной после 5-минутного венозного застоя, вызванного наложением манжеты сфигмоманометра на плечо с давлением, равным среднему между систолическим и диастолическим. Кроме того, рассчитывали индекс антиагрегантной активности сосудистой стенки (И) по формуле:

$$И = \frac{A_{\text{АДФ}} \text{ после венозаоста} - A_{\text{АДФ}} \text{ исходный}}{A_{\text{АДФ}} \text{ исходный}} \cdot 100\%$$

Гемостатические исследования проводили до и через 3 ч после однократного приема внутрь индометацина в дозе 50 мг, а также до и через 22 ч после приема аспирина в дозе 500 мг. Эти НПС в таких дозах и в указанные временные интервалы вызывают резкое торможение синтеза ПГ [31, 36].

Секреторную деятельность желудка изучали утром натощак через 12—14 ч голодания и не ранее, чем через 24 ч после отмены всех лекарственных средств по методике, описанной ранее [8, 11]. После удаления остатка голодного желудка проводили пробу на полноту аспирации желудочного сока и правильность расположения зонда [11], в течение 60 мин исследовали базальную секрецию. Затем в желудок через зонд вводили 50 мг индометацина в 100 мл дистиллированной воды и прекращали исследование на 60 мин, после чего оценивали влияние препарата на желудочную секрецию — нестимулированную (в течение 1 ч) и стимулированную гистамином дигидрохлоридом сначала в субмаксимальной дозе (0,009 мг/кг; 1 ч), затем в максимальной (0,024 мг/кг; 1 ч). Для устранения побочного действия максимальной дозы гистамина за 30 мин до его введения внутримышечно инъецировали 2 мл 1% раствора супрастина. В контрольном исследовании определяли секреторную деятельность желудка в базальном периоде и в ответ на введение тех же доз гистамина.

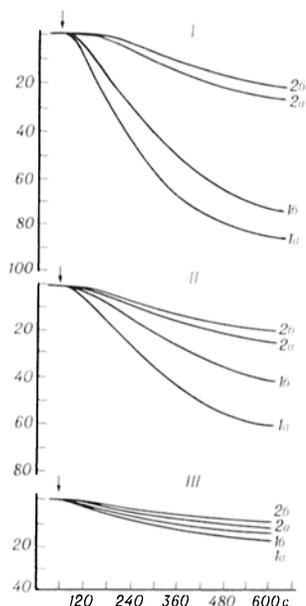
Желудочный сок собирали постоянной ручной аспирацией 15-минутными порциями. В каждой порции измеряли объем, кислотность (индикатор нейтральный красный), осмолярность (на приборе Е. О. Бекманна), активность пепсина с использованием эталона свиного кристаллического пепсина [7]. Рассчитывали парциальные объемы бикарбонатного и кислого компонентов в желудочном соке, выработку и концентрацию бикарбонатов в нем [20]. Вычисляли абсолютную (истинную) выработку кислоты ( $VK_a$ ) и определяли соотношение между продукцией бикарбонатов и кислоты ( $VB/VK_a$ ).

Цифровые результаты обработаны стандартными методами вариационной статистики, включившими *t*-критерий Стьюдента для парных измерений,  $\chi^2$ -критерий и корреляционный анализ. Кроме того, определяли прогностическую информативность — чувствительность, специфичность, эффективность, предсказательную ценность положительного и отрицательного результатов [25].

#### Результаты и обсуждение

Полученные данные демонстрируют, что блокада циклооксигеназы отчетливо изменяет агрегационную активность КП, антиагрегантную способность сосудистой стенки и работу секреторного аппарата желудка, при этом степень и знак реакции существенно зависят от формы заболевания.

Сначала рассмотрим эффекты индометацина. У здоровых лиц, как и следовало ожидать, через 3 ч после приема индометацина наблюдается выраженное угнетение агрегационной ак-



Влияние индометацина на АДФ-индуцированную агрегационную активность КП у здоровых (I) и больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки — неосложненной (II) и с кровотечением в анамнезе (III).

1 — исходная величина агрегатограммы; 2 — после введения индометацина; а — в базальном состоянии; б — после веностаза. Стрелкой указан момент введения АДФ.

тивности КП и антиагрегантной функции сосудистой стенки (табл. 1; см. рисунок): латентный период агрегации КП удлиняется почти в 3 раза (здесь и далее указаны только статистически достоверные изменения;  $p < 0,05$ ), угол наклона агрегатограммы и степень агрегации уменьшаются в 2 раза, АДФ возрастает в 2,4 раза, полностью ингибируется антиагрегантная способность сосудистой стенки. У обследованных больных неосложненной дуоденальной язвой исходные параметры достоверно не отличались от таких же в контрольной группе. Индометацин вызывал у них сходные с таковыми у здоровых реакции, т. е. депрессию агрегационной активности КП (время агрегации увеличилось на 27 %, угол наклона агрегатограммы уменьшился на 31 %, АДФ возрос почти в 2 раза), и полное подавление антиагрегантной функции сосудистого эндотелия.

Группа лиц с ГО в анамнезе резко отличается от здоровых и больных неосложненной дуоденальной язвой по исходным гемостатическим параметрам, особенно по реакции на индометацин. У этой группы агрегационная способность КП, судя по АДФ, в сред-

нем в 1,5 раза ниже, чем в двух других, и веностаз не вызывает антиагрегантного эффекта. Индометацин у больных с ГО достоверно не влияет ни на параметры агрегатограммы КП, ни на антиагрегантную активность сосудистой стенки. Небезынтересно отметить, что до приема индометацина (в исходном состоянии) венозная окклюзия ни у кого из здоровых не вызывала увеличения проагрегантной активности плазмы крови. Такой феномен (И принимает отрицательные значения) имел место у 1 больного неосложненной дуоденальной язвой и у 1/4 больных с ГО в анамнезе. После приема индометацина проагрегантная активность плазмы выявлена у 2/3 здоровых, 1/2 больных неосложненной дуоденальной язвой и 2/5 с ГО в анамнезе. Этот факт не представляется парадоксальным, если учесть, что сосудистая стенка содержит вещества не только с антиагрегантным, но и с проагрегантным действием [5]. В условиях блокады циклооксигеназы угнетается синтез простаглицина (ПГ<sub>2</sub>), наиболее мощного из известных антиагрегантов, и, естественно, проявляются проагрегантные свойства сосудов.

Обследованные группы больных неосложненной (1-я группа) и осложненной кровотечением дуоденальной язвой (2-я группа) по исходным параметрам базальной и стимулированной гистамином желудочной секреции существенно не различались, но реакция на индометацин у них оказалась неодинаковой (табл. 2). В базальном периоде индометацин вызвал прирост продукции кислоты в 1-й группе на 109 %, во 2-й — только на 71 %, снижение выработки бикарбонатов — на 29 и 17 % соответственно, увеличение соотношения ВБ/ВК<sub>н</sub> — на 56 и 34 %. В субмаксимальном гистаминовом секрете отмечалась такая же тенденция: под влиянием индометацина произошло снижение продукции бикарбонатов в 1-й группе на 35 %, во 2-й — на 19 %, усиление секреции пепсина — на 47 и 35 % соответственно, увеличение кислотовыделения на 23 % — только в 1-й. При воздействии индометацина на фоне максимальной гистаминовой стимуляции в обеих группах не изменилась продукция кислоты и в одинаковой степени снизилась секреция бикарбоната (на 38 и 36 %), но у лиц с ГО меньше снизился коэффициент ВБ/ВК<sub>н</sub>

Таблица 1

Влияние индометацина и аспирина на показатели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов и антиагрегантной активности сосудистой стенки у здоровых и больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки, неосложненной и осложненной кровотечением в анамнезе ( $X \pm m$ )

Параметры	Индометацин						Аспирин			
	здоровые		больные язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки							
			неосложненной		с кровотечением в анамнезе		неосложненной		с кровотечением в анамнезе	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Латентный период, с	$17,4 \pm 1,9$	$49,8 \pm 12,3^{**}$	$26,6 \pm 4,2$	$26,6 \pm 3,4$	$31,2 \pm 4,9^*$	$33,1 \pm 4,9$	$40,2 \pm 4,6$	$57,5 \pm 9,1$	$64,5 \pm 11,1$	$68,5 \pm 8,6$
	$25,9 \pm 2,6$	$22,8 \pm 2,6$	$38,3 \pm 3,8$	$28,5 \pm 2,1$	$33,0 \pm 3,7$	$34,2 \pm 8,0$	$63,8 \pm 9,7$	$61,6 \pm 11,4$	$78,0 \pm 14,2$	$68,0 \pm 8,0$
Время агрегации, с	$411,6 \pm 40,9$	$534,4 \pm 51,3$	$394,1 \pm 35,7$	$502,1 \pm 34,8^{**}$	$465,0 \pm 37,0$	$475,2 \pm 50,6$	$521,5 \pm 59,5$	$577,0 \pm 25,7$	$639,3 \pm 27,1$	$637,2 \pm 13,9$
	$526,8 \pm 42,1$	$441,6 \pm 46,8$	$463,1 \pm 31,9$	$451,9 \pm 26,8$	$483,6 \pm 48,7$	$443,9 \pm 38,2$	$598,0 \pm 54,5$	$657,3 \pm 31,5$	$656,2 \pm 52,4$	$646,8 \pm 17,9$
Угол агрегации, град.	$47,9 \pm 4,5$	$24,8 \pm 7,5^{**}$	$50,4 \pm 4,0$	$34,3 \pm 4,0^{**}$	$38,3 \pm 5,9$	$34,3 \pm 4,0$	$40,8 \pm 6,1$	$19,3 \pm 4,7^{**}$	$10,3 \pm 2,2$	$11,6 \pm 3,1$
	$34,0 \pm 5,4^*$	$31,4 \pm 7,4$	$37,6 \pm 4,7^*$	$39,8 \pm 3,8$	$35,9 \pm 5,0$	$39,8 \pm 3,8$	$23,9 \pm 6,0^*$	$13,5 \pm 3,4$	$15,1 \pm 2,9$	$12,4 \pm 3,4$
Степень агрегации, мм	$73,4 \pm 5,1$	$39,6 \pm 8,3^{**}$	$79,4 \pm 4,6$	$51,3 \pm 5,2^{**}$	$63,3 \pm 8,2$	$60,6 \pm 7,6$	$74,3 \pm 8,4$	$32,1 \pm 5,2^{**}$	$18,8 \pm 4,1$	$20,9 \pm 6,1$
	$58,2 \pm 7,7^*$	$42,0 \pm 7,8$	$59,4 \pm 4,9^*$	$63,6 \pm 5,2$	$58,3 \pm 7,3$	$55,7 \pm 9,0$	$42,2 \pm 8,7^*$	$26,4 \pm 7,5$	$26,9 \pm 8,3$	$25,2 \pm 6,8$
А <sub>АДФ</sub> усл. ед.	$1,6 \pm 0,3$	$3,9 \pm 0,7^{**}$	$1,7 \pm 0,2$	$2,9 \pm 0,3^{**}$	$2,5 \pm 0,4$	$2,6 \pm 0,4$	$2,7 \pm 0,5$	$4,3 \pm 0,5^{**}$	$5,4 \pm 0,4$	$5,2 \pm 0,3$
	$2,7 \pm 0,3^*$	$2,6 \pm 0,4$	$2,8 \pm 0,3^*$	$2,3 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,4$	$2,7 \pm 0,6$	$4,7 \pm 0,8^*$	$4,9 \pm 0,5$	$5,4 \pm 0,8$	$5,2 \pm 0,1$
Индекс антиагрегантной активности сосудов, %	$100,6 \pm 30,8$	$-17,6 \pm 13,9^{**}$	$122,5 \pm 33,8$	$-3,4 \pm 14,7^{**}$	$-32,8 \pm 24,6^{**}$	$34,8 \pm 33,3$	$117,0 \pm 32,2$	$26,3 \pm 18,0^{**}$	$2,7 \pm 10,7$	$1,4 \pm 4,6$

Примечание. 1 — до, 2 — после воздействия. В числителе — исходная плазма крови, богатая тромбоцитами ( $2 \cdot 10^5$  в 1 мкл), в знаменателе — исходная плазма, к которой добавлена бедная тромбоцитами плазма крови, полученная после 5-минутного венозного застоя. Знаком \* — отмечены параметры, существенно отличающиеся от одноименных у здоровых лиц ( $p < 0,05$ ); точкой — достоверные отличия больных с кровотечением (в анамнезе) от больных неосложненной дуоденальной язвой; одна звездочка — достоверные сдвиги ( $p < 0,05$ ) после веностаза, две — после блокады циклооксигеназы.

Влияние индометацина на базальную и стимулированную гистамином желудочную секрецию у больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки ( $\bar{X} \pm m$ )

Секреторный параметр	Базальная секреция		Секреция, стимулированная гистамином			
			0,009 мг/кг		0,024 мг/кг	
	1	2	1	2	1	2
Объем, мл	110,9±7,1	112,1±12,8	163,3±12,1	193,8±13,8	232,3±14,5	261,5±16,1
	133,2±10,1	121,4±13,8	170,8±10,1	184,8±14,7	220,6±13,8	241,8±15,0
Кислотность, ммоль/л	41,5±4,5	31,9±3,7	62,0±3,1	96,3±4,5	81,5±4,4	110,5±4,1
	78,2±6,3*	50,9±2,8*	93,7±2,8*	102,8±1,1	116,4±2,9*	116,7±3,7
Концентрация бикарбонатов, ммоль/л	47,9±4,3	59,2±4,9	35,4±5,3	48,5±5,1	30,2±4,9	46,2±4,8
	39,7±3,3	51,2±4,9	32,3±6,1	45,6±4,7	27,9±3,7	34,4±3,8
Осмолярность, мосм/кг	244,1±4,3	228,3±5,4	253,2±6,0	272,0±5,3	264,2±5,2	281,0±5,2
	265,8±5,1*	245,9±6,2*	273,9±5,6*	276,5±6,5	290,3±6,8*	288,2±6,1
Активность пепсина, мг/л	0,29±0,04	0,26±0,03	0,41±0,02	0,33±0,02	0,47±0,04	0,33±0,02
	0,40±0,05*	0,34±0,04*	0,52±0,03	0,45±0,03	0,56±0,03	0,46±0,03
Выработка: кислоты, ммоль/ч:						
истинная	7,66±1,01	7,75±1,15	18,24±1,69	22,78±1,91	27,40±2,07	34,75±2,25
	12,74±1,25*	9,87±1,17*	20,83±1,83	22,57±1,89	28,63±2,13	32,02±2,19
конечная	5,31±0,89	3,88±1,03	15,34±1,52	19,89±1,25	25,09±2,11	31,86±2,11
	11,12±1,21*	6,65±1,14*	18,94±1,65*	20,23±1,13	27,19±2,04	30,18±2,51
бикарбонатов, ммоль/ч	3,02±0,28	3,87±0,31	2,90±0,35	2,89±0,30	2,31±0,28	2,87±0,33
	2,13±0,23*	3,22±0,25*	1,90±0,15*	2,34±0,29*	1,44±0,12*	1,84±0,20*
пепсина, мг/ч	38,9±8,9	26,1±7,6	63,0±7,2	63,0±10,0	131,5±9,5	83,2±9,1
	55,1±10,3*	35,3±9,1*	92,9±7,9*	85,2±9,6	133,2±17,7	115,0±12,5*
Соотношение ВВ/ВК <sub>н</sub>	0,39±0,03	0,50±0,04	0,16±0,02	0,13±0,01	0,08±0,01	0,08±0,01
	0,17±0,02*	0,33±0,03*	0,09±0,01*	0,10±0,01*	0,05±0,01*	0,06±0,01*

Примечание. В числителе — исходные данные, в знаменателе — после воздействия индометацином; 1 — больные с несложившейся формой заболевания; 2 — с кровотечением в анамнезе. Звездочкой обозначены статистически достоверные изменения по отношению к исходным данным ( $p < 0,05$ ).

(на 25 и 38 %) и значительно возросло выделение пепсина ( $\pm 38$  %). Индометацин *in vitro* и *in vivo* предотвращает и устраняет вызываемое арахидоновой кислотой (предшественник ПГ) угнетение функции париетальных клеток [28, 39]. Если учесть, что торможение ПГ секреции кислоты обусловлено подавлением гистаминзависимой активации аденилатциклазы и снижением образования цАМФ в париетальных клетках [33, 40], то станет ясно, почему индометацин влияет на базальную и субмаксимальную секрецию, но существенно не влияет на выработку кислоты, вызванную максимальной дозой гистамина.

Такие явные различия больных 2 групп по реакции КП, сосудистого эндотелия и секреторного аппарата желудка на блокаду ключевого фермента биосинтеза ПГ — циклооксигеназы не могут быть случайными. Они указывают на важную роль эндогенных ПГ в развитии ГО язвенной болезни. Серьезным аргументом в пользу такого заключения могут служить результаты, полученные с другим ингибитором этого фермента — аспирином. Как видно из табл. 1, у больных несложившейся дуоденальной язвой

аспирина подобно индометацину, резко подавляет агрегационную активность КП и антиагрегантную функцию сосудистой стенки: угол наклона агрегограммы уменьшается на 52 %, степень агрегации — на 56 %, АлДФ возрастает на 59 %, индекс антиагрегантной активности сосудистого эндотелия снижается на 91 %. В то же время у больных с ГО в анамнезе значительно сниженные в исходном состоянии агрегационная способность КП и антиагрегантная активность сосудистой стенки после приема аспирина достоверно не изменяются.

Итак, можно видеть, что у больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки с ГО в анамнезе в отличие от здоровых и больных несложившейся дуоденальной язвой подавление циклооксигеназы не вызывает достоверного уменьшения исходно низкой агрегационной активности КП и депрессии антиагрегантной функции сосудистого эндотелия, в 1/2—2 раза слабее угнетает выделение бикарбонатов и в меньшей степени стимулирует секрецию кислоты и пепсина с желудочным соком.

Гемостатические и секреторные эффекты НПС существенно зависят от

Прогностическая информативность и коэффициенты относительного риска развития ГО у больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки по данным ряда гемостатических и секреторных показателей

Анализируемый тест	Чувствительность	Специфичность	Эффективность	Предсказательная ценность		Коэффициент относительного риска
				положительного результата	отрицательного результата	
в %						
<b>В исходном состоянии</b>						
1. Сниженная агрегационная активность КП (АДДФ >3 усл. ед.)	69	50	57	51	67	1,4
2. Сниженная антиагрегантная активность сосудистой стенки (И < 0,20 %)	71	54	62	55	71	1,6
3. Низкий коэффициент ВБ/ВК <sub>II</sub> (< 0,20)	71	80	77	60	86	3,5
4. Сочетание 1 и 2 (АДДФ >3, И < 20 %)	56	67	62	58	65	1,8
<b>Эффект НПС</b>						
5. Слабое подавление агрегационной активности КП (повышение АДДФ менее 20 %)	85	62	72	62	85	2,3
6. Низкая степень снижения антиагрегантной активности сосудов (И < 20 %)	80	70	74	66	82	2,8
7. Слабое подавление секреции бикарбонатов (< 20 %)	71	73	73	56	85	2,6
8. Сочетание 5 и 6	70	85	78	77	79	5,0
<b>Сочетание исходных данных и эффекта НПС</b>						
9. Сочетание 1 и 5	65	85	76	76	76	4,6
10. Сочетание 2 и 6	75	81	78	75	81	4,2
11. Сочетание 3 и 7	71	93	86	83	88	10,0

исходного состояния рассматриваемых функций. Действие НПС отчетливо проявляется у лиц с неизменной и высокой агрегационной активностью КП, а у больных, у которых эта функция в исходном состоянии снижена (АДДФ больше 3 усл. ед.), эффект НПС выражен слабо: степень угнетения данной функции не достигает 20 % ( $\chi^2 = 6,92$ ;  $p < 0,01$ ). При низкой антиагрегантной активности сосудистой стенки (индекс меньше 20 %) закономерно наблюдается лишь незначительное угнетение указанного параметра в ответ на НПС ( $\chi^2 = 13,2$ ;  $p < 0,01$ ). Индометацин подавляет базальную продукцию бикарбонатов слабо (не более чем на 20 %), если ее исходный уровень не превышает 2,5 ммоль/ч ( $\chi^2 = 8,81$ ;  $p < 0,01$ ). При этом между изменением антиагрегантной активности сосудистой стенки ( $\Delta \% И$ ) и торможением выработки бикарбонатов желуд-

ке ( $\Delta \% ВБ$ ) в ответ на индометацин имеется тесная положительная корреляционная связь ( $r = 0,82$ ;  $p < 0,01$ ).

Совокупность представленных данных позволяет заключить, что описанные различия между больными несложной и осложненной кровотечением дуоденальной язвой могут быть обусловлены снижением у вторых циклооксигеназного пути биосинтеза ПГ. В пользу этого можно привести данные литературы: у больных язвенной болезнью пониженная агрегационная активность КП сочетается с увеличением содержания арахидоновой кислоты в плазме крови, причем более выраженные изменения характерны для больных с ГО в анамнезе [14]; у больных дуоденальной язвой обнаружен дефект способности дуоденальной слизистой оболочки к синтезу ПГИ<sub>2</sub> и ПГЕ<sub>2 $\alpha$</sub>  [27]; НПС резко угнетают синтез ПГ в гастродуоденальной слизи-

стой оболочке, что сопровождается выраженными эрозивно-геморрагическими повреждениями [29, 37]; ПГ, в частности ПГЕ<sub>2</sub>, предотвращают эрозивно-язвенные повреждения, в том числе вызываемые НПС [19, 37, 38].

Клиническое значение своевременного выявления лиц с высоким риском развития язвенного кровотечения очевидно. Чтобы установить, может ли чувствительность к НПС служить прогностическим критерием для дискриминации таких больных, мы оценили информативность изменений интегрального показателя агрегации КП (АлДФ), индекса антиагрегантной активности сосудов (И), уровня базальной продукции бикарбонатов и соотношения ВБ/ВК<sub>n</sub> в исходном состоянии и после воздействия НПС (индометацином и аспирином) в отдельности и в различных сочетаниях. Для оценки прогностической информативности исходных параметров проанализированы данные, полученные при обследовании 135 больных неосложненной дуоденальной язвой и ПЮ с ГО в анамнезе. Из табл. 3 видно, что большую ценность имеют 5 из 11 изученных критериев; по степени увеличения коэффициента относительного риска развития ГО и прогностической информативности они могут быть расположены в следующей последовательности: сочетание исходно низкого коэффициента ВБ/ВК<sub>n</sub> в базальном желудочном секрете (ниже 2,0) и слабое (менее чем на 20 %) угнетение выработки бикарбонатов индометацином (критерий 11 в табл. 3); низкая чувствительность КП и сосудов к НПС (критерий 8); сниженная агрегационная активность КП в сочетании с их низкой чувствительностью к НПС (критерий 9); исходно низкая антиагрегантная активность сосудов и ее слабая реакция на НПС (критерий 10); низкий коэффициент ВБ/ВК<sub>n</sub> (критерий 3). Первый из описанных тестов (критерий 11) обладает весьма высокой специфичностью (93 %) и 10-кратным увеличением выявляемости больных, но, как и четыре других перечисленных критерия, обнаруживает только около 2/3 больных с потенциальным риском ГО. Выше чувствительность (85 %) показателя «низкая реакция КП на НПС» (критерий 5). По-видимому, скрининг больных с высоким риском развития ГО среди лиц

с неосложненной дуоденальной язвой будет наиболее эффективным при комбинации 5 и 11 критериев.

Таким образом, материалы работы свидетельствуют, что для больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки, осложненной кровотечением, характерно существенное нарушение (снижение) циклооксигеназного пути биосинтеза ПГ, и обусловленные этим изменения в системах гемостаза и желудочной секреции могут служить прогностическими маркерами для выявления больных с риском развития геморагии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ареутинская С. В., Таиров М. М., Бесимбаев Р. И., Салганик Р. И. // Вопр. мед. химии. — 1983. — № 5. — С. 5—10.
2. Балуда В. П., Лукьянова Т. И., Балуда М. В. // Лаб. дело. — 1983. — № 6. — С. 17—19.
3. Белоусов А. С., Шарова Ю. А., Юмашкина А. Г. и др. // Клин. мед. — 1976. — № 3. — С. 102—105.
4. Бушцева Г. И., Манукина Т. А., Диковская К. И. // Физиол. журн. СССР. — 1983. — Т. 69, № 3. — С. 1104—1108.
5. Габриэлян Э. С., Акопов С. Э., Балаян Б. Г. // Бюл. экспер. биол. — 1984. — № 10. — С. 403—405.
6. Кочина Е. П. // Нейрогуморальная регуляция пищеварения / Под ред. В. Х. Василенко, Е. Н. Кочной. — М., 1983. — С. 5—53.
7. Пятницкий П. П. // Клин. мед. — 1965. — № 4. — С. 74—79.
8. Фишер А. А. // Лаб. дело. — 1966. — № 6. — С. 360—366.
9. Фишер А. А. // Геморрагические осложнения язвенной болезни (вопросы патогенеза, клиники, профилактики, лечения и прогноза). — Краснодар, 1984. — С. 51—53.
10. Фишер А. А., Кононова В. П. // Клин. мед. — 1983. — № 7. — С. 61—66.
11. Фишер А. А., Фокичева Н. Х. // Тер. арх. — 1969. — № 9. — С. 96—101.
12. Фишер А. А., Кононова В. П., Саха С. К. // Поражение сосудистой стенки и гемостаз. — Минск, 1983. — С. 166—169.
13. Фишер А. А., Саха С. К., Калужная Е. И. // Клин. мед. — 1985. — № 8. — С. 72—78.
14. Юмашкина А. Г., Белоусов А. С., Львович Н. А. и др. // Там же. — 1981. — № 3. — С. 51—54.
15. Юмашкина А. Г., Лейтин В. Я., Миссельвейц Ф. В. // Тер. арх. — 1982. — № 2. — С. 32—44.
16. Born G. V. R. // Nature. — 1962. — Vol. 194. — P. 927—929.
17. Burch G. W., Mayerus Ph. W. // Seminars Hemat. — 1979. — Vol. 16, N 3. — P. 25—30.
18. Befrits R., Samuelsson K., Johansson C. // Scand. J. Gastroent. — 1984. — Vol. 19, N 7. — P. 899—904.
19. Cohen M. M., McCready D. R., Clark L.

- Sevelins H. // Gastroenterology. — 1985. — Vol. 88, N 1. — P. 382—386.
20. Feldman M. // J. clin. Invest. — 1983. — Vol. 72, N 7. — P. 295—303.
21. Feldman M., Colturi T. J. // Gastroenterology. — 1984. — Vol. 87, N 9. — P. 1339—1343.
22. Fung W. P. // Aust. N. Z. J. Med. — 1980. — Vol. 10, N 6. — P. 678—681.
23. Garner A., Flemstrom G., Allen A. et al. // Scand. J. Gastroent. — 1984. — Suppl. 101. — P. 79—86.
24. Gryglewski R. G., Bunting S., Moncada S. // Prostaglandins. — 1976. — Vol. 12. — P. 685—714.
25. Griner P. F., Mayewski P. J., Mushlin A. I., Greenland P. // Ann. intern. Med. — 1981. — Vol. 94, N 4. — P. 2. — P. 555—600.
26. Hamberg M., Svensson G., Wakabayashi T., Samuelsson B. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1975. — Vol. 72. — P. 2994—2998.
27. Hiller K., Smith C. L., Jewell R. et al. // Gut. — 1985. — Vol. 26, N 3. — P. 237—240.
28. Ivey K. G. // Amer. J. Med. — 1983. — Vol. 75, N 5-A. — P. 53—56.
29. Konturek S. J., Oblulowicz W., Sito E. et al. // Gut. — 1981. — Vol. 22, N 4. — P. 283—289.
30. Konturek S. J., Mikos E., Pawlik W., Walus K. // J. Physiol. (Lond.). — 1979. — Vol. 286. — P. 15—28.
31. Levine R. A., Schwartzel E. N. // Gut. — 1984. — Vol. 25, N 7. — P. 718—722.
32. Levine R. A., Sirinek K. R., Gaskill III H. V. // Arch. Surg. — 1985. — Vol. 120, N 5. — P. 600—604.
33. Levine R. A., Kohan K. R., Schwartzel E. N., Ramsay C. E. // Amer. J. Physiol. 1982. — Vol. 242. — P. G21—G26.
34. Moncada S., Gryglewski R., Bcehning S., Vane G. R. // Nature. — 1976. — Vol. 263. — P. 663—665.
35. O'Brien G. R. // Ibid. — 1966. — Vol. 207. — P. 306—307.
36. Raue A., Oelz O., Frolich J. C. et al. // Clin. Pharmacol. Ther. — 1978. — Vol. 23. — P. 658—668.
37. Rees W. D. W., Gibbons L. C., Turnberg L. A. // Gut. — 1984. — Vol. 24. — P. 784—789.
38. Rees W. D. W. // International Congress of Rheumatology: 16-th. Abstracts. — Sydney, 1985. — F. 8. — P. 86—86.
39. Skoglung M. L., Nils A. C., Gerber J. G. // J. Pharmacol. exp. Ther. — 1982. — Vol. 220. — P. 371—394.
40. Soll A. H., Whittle B. J. R. // Prostaglandins. — 1981. — Vol. 21. — P. 353—365.
41. Whittle B. J. R. // Brit. J. Pharmacol. — 1977. — Vol. 60. — P. 455—460.

Поступила 20.01.86

#### SPECIFIC PROPERTIES OF PROSTANOID SYNTHESIS IN PATIENTS WITH DUODENAL ULCER COMPLICATED BY PREVIOUS HEMORRHAGE

A. A. Fisher, E. N. Kalyuzhnaya, S. K. Sakha  
Cuban Medical School, Krasnodar

After inhibition of the cyclooxygenase pathway of arachidonic acid metabolism by means of indometacin or aspirin the initially low aggregation activity of thrombocytes was not distinctly decreased, the antiaggregatory function of the blood vessels endothelium was not suppressed, secretion of bicarbonates was 1.5-2-fold less distinctly inhibited as well as secretion of acid and pepsin with gastric juice was less distinctly stimulated in patients with duodenal ulcer accompanied by hemorrhage as compared with healthy persons or the patients with non-complicated form of duodenal ulcer. At the same time, inhibition of bicarbonate secretion correlated with the antiaggregative activity of the blood vessel wall. The data obtained suggest that cyclooxygenase pathway of prostaglandin synthesis was distinctly impaired in the patients with hemorrhagic complications. Alterations in hemostatic and secretory parameters, caused by indometacin or aspirin, should be considered in prognostic evaluation of the patients with duodenal ulcer, which had an increased risk of hemorrhagic complications.

УДК 616.153:577.112.856]-008.61-085.874-036.8-07: [616.155.1]-616.155.25]-008.932.95

И. И. Корф, В. А. Мещерякова, М. А. Самсонов, Н. В. Чепурненко,  
В. А. Кошечкин, М. М. Левачев

#### ИЗМЕНЕНИЕ СОСТАВА ЖИРНЫХ КИСЛОТ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ И ТРОМБОЦИТОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ ДИЕТОТЕРАПИИ У БОЛЬНЫХ ГИПЕРЛИПОПРОТЕИДЕМИЕЙ II ТИПА

Институт питания АМН СССР, Институт профилактической кардиологии ВКНЦ, Москва

Гиперлипопротеидемия (ГЛП) того или иного типа характеризуется увеличением концентрации в плазме крови одной, реже — двух фракций липопротеидов (ЛП), причем изменяется не только пропорция отдельных фракций ЛП в кровотоке, но и, как правило,

химический состав этих фракций. Изменения транспортных форм липидов, каковыми являются ЛП, неизбежно приводят к изменению соотношения жирных кислот, транспортируемых в составе ЛП, в том числе эссенциальных жирных кислот, поступающих с

Т а б л и ц а 1  
Состав жирных кислот плазмы крови и эритроцитов больных ГЛП типа II

Жирные кислоты	Больные ГЛП типа IIa		Больные ГЛП типа IIb		Практически здоровые лица
	до диеты-терапии	после диеты-терапии	до диеты-терапии	после диеты-терапии	
Плазма крови					
14:0	1,12	1,15	0,89	0,76	0,94
14:1	0,84	0,72	0,63	0,67	0,62
16:0	18,24	16,91	18,86	18,17	18,88
16:1	2,96	2,64	3,55	3,80	4,27
18:0	5,56	5,57	5,28	5,04	7,95
18:1	17,13	15,57	21,11	18,54	25,42
18:2	35,00	41,00	29,35	34,29	20,54
18:3	1,00	0,77	0,68	0,58	0,85
20:3	1,53	1,43	1,54	1,07	1,88
20:4	7,54	6,71	8,36	6,72	9,56
20:5	1,49	0,86	1,76	1,41	1,28
24:0	0,91	0,58	0,56	1,38	1,22
22:4 + 24:1*	2,08	1,90	1,68	2,02	2,47
22:5	1,26	0,82	1,15	1,88	0,95
22:6	3,30	3,18	4,60	3,68	3,17
20:4	0,22	0,16	0,28	0,20	0,47
П:НЖК	2,03	2,30	1,90	2,01	1,37
НЖК	0,84	0,89	0,82	0,72	1,07
КЭМ					
Эритроциты					
14:0	1,47	1,07	2,04	1,44	2,08
14:1	2,29	2,01	2,96	2,09	2,18
16:0	18,28	18,60	15,83	17,78	20,34
16:1	2,20	1,89	4,02	2,86	3,65
17:0	2,70	2,71	3,21	2,56	2,40
18:0	11,85	12,77	12,72	11,66	11,95
18:1	13,21	13,64	14,18	14,94	13,80
18:2	11,19	12,23	8,49	9,89	11,77
18:3	1,10	1,08	1,67	0,86	0,84
20:3	1,90	1,87	1,64	1,14	1,26
20:4	15,34	14,27	15,00	14,92	14,14
20:5	1,47	1,33	1,48	1,06	1,20
24:0	3,83	3,76	3,52	4,48	3,24
22:4 + 24:1*	4,25	4,93	5,32	5,57	3,68
22:5	2,68	2,70	2,49	2,31	3,00
22:6	6,22	5,14	5,44	6,43	4,47
20:4	1,37	1,17	1,77	1,51	1,20
18:2					
ПНЖК	1,12	1,08	1,07	1,06	0,98
НЖК	1,01	1,00	1,03	1,02	1,14
КЭМ					

\* Сумма, в которой на долю жирной кислоты 22:4 приходится около 2/3 общего их содержания.

ншей и являющихся необходимым материалом для синтеза липидов мембран. Влияние этих изменений на эффективность формирования липидных структур клеточных мембран не представляется достаточно ясным. Возможным результатом изменивших-

ся условий транспорта жирных кислот могут быть изменения качественного и количественного состава жирных кислот мембранных липидов, что должно быть сопряжено со значительной морфологической и функциональной перестройкой мембран, в частности мембран клеток крови — тромбоцитов и эритроцитов, которым принадлежит определенная роль в генезе гемодинамических расстройств, участвующих в механизмах атерогенеза.

#### Методика

Наблюдения проведены над 14 больными семейной гиперхолестеринемией (IIa и IIb фенотипы ГЛП по классификации Фредриксона и соавт. [13]): 10 мужчинами в возрасте от 38 до 60 лет и 4 женщинами в возрасте от 44 до 56 лет. В условиях клиники больные в течение 4 нед получали диету, контролируруемую по калорийности (2800 ккал), количеству холестерина (<350 мг/сут) и количеству жира (88 г/сут) при соотношении насыщенные жирные кислоты (НЖК)/полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), равном 1. Общее количество углеводов в диете составляло 380 г/сут, в том числе сахарозы 30 г/сут. Количество пищевых волокон было увеличено до 40 г/сут за счет дополнительного введения в диету пектина цитрусовых (9 г/сут). Содержание витаминов А, Е, группы В в рационе соответствовало физиологическим потребностям организма, количество аскорбиновой кислоты составляло 150 мг/сут. Кровь для исследования жирнокислотного состава плазмы, мембран эритроцитов и тромбоцитов брали из локтевой вены больных дважды, до и после проведения диетотерапии. Мембраны эритроцитов выделяли по методу [6], тромбоциты — по методу [7]. Липиды экстрагировали по Фолчу [12]. Метилловые эфиры жирных кислот получали по методу Штоффеля [19]. Газо-хроматографический анализ метилловых эфиров жирных кислот проводили на хроматографе «Цвет-106» с пламенно-ионизационным детектором в стеклянной набивной колонке, используя фазу Silar 10 С на хромосорбе W. Разделение осуществляли в изотермическом режиме при температуре колонки 188 °С, испарителя и детектора — 200 °С, скорость потока газа-носителя составляла 40 мл/мин. Для контроля за разделением жирных кислот применяли стандартные смеси фирмы "Sigma". При обсуждении полученных результатов жирнокислотного анализа использовали полученные ранее данные обследования практически здоровых лиц [4, 5].

#### Результаты и обсуждение

Как видно из данных, приведенных в табл. 1, в плазме больных ГЛП типа IIa отмечается высокое содержание линолевой кислоты (С 18:2, ω 6) как при первичном обследовании, так и (особенно) после курса диетотерапии. При резком увеличении доли линоле-

вой кислоты в сумме полиеновых жирных кислот плазмы содержание других ПНЖК семейства  $\omega 6$ , являющихся метаболитами линолевой кислоты (главным образом арахидоновой С 20:4), не только не было увеличенным, но даже было снижено по сравнению с величинами, определенными для практически здоровых лиц. Накопление линолевой кислоты в плазме больных ГЛП типа II следует, по-видимому, рассматривать не только как следствие значительного поступления ее с пищей (что особенно заметно на фоне диетотерапии), но и как результат нарушенного ее метаболизма. Показатель  $C_{20:4}/C_{18:2}$ , характеризующий интенсивность метаболических превращений жирных кислот линолевой серии, для группы больных с ГЛП типа IIa составил всего 0,22 и 0,16 до и после курса диетотерапии против 0,46 для здоровых лиц. Коэффициент эффективности метаболизации (КЭМ) эссенциальных жирных кислот в липидные структуры мембран [3] у больных ГЛП типа IIa был также заметно снижен по сравнению с нормальным уровнем и существенно не изменился после диетотерапии. Из других жирных кислот при ГЛП IIa в большей степени снижено содержание олеиновой кислоты. Соотношение ПНЖК/НЖК в плазме этих больных было увеличено по сравнению с таковым здоровых лиц главным образом за счет высокого содержания линолевой кислоты. В литературе имеются отдельные данные о том, что холестерин пищи может влиять на метаболизм эссенциальных жирных кислот или увеличивать потребность в них [9, 15]. В работах [16, 10] содержатся данные о том, что под влиянием холестерина пищи уровень арахидоновой кислоты в плазме уменьшается, тогда как уровень линолевой кислоты не изменяется или увеличивается. Механизм этого влияния не выяснен. Изменения подобной направленности характеризуют и жирнокислотный спектр плазмы больных, обследованных нами. Нарушения липидного обмена при ГЛП типа II отличаются резким увеличением содержания холестерина в плазме крови, главным образом за счет увеличения его уровня в ЛП низкой плотности. В группе наших больных ГЛП типа IIa концентрация холестерина плазмы составляла в среднем

$370 \pm 32,5$  мг/дл. Не исключено, что именно холестерин в высоких концентрациях может быть фактором, снижающим эффективность превращения жирных кислот линолевого ряда. С другой стороны, высокое содержание линолевой кислоты в плазме больных гиперхолестеринемией можно, по-видимому, рассматривать и как необходимое условие для выведения избытка холестерина в форме его эфиров из циркуляции в печень и последующего окисления. Уместно отметить, что доминирующим эфиром холестерина в плазме крови человека является холестерил-линолеат [1].

Общие закономерности изменений жирнокислотного состава плазмы, отмеченные для больных ГЛП типа IIa, сохраняются и у больных ГЛП типа IIb, хотя в этом случае изменения носят менее выраженный характер. Следует отметить лишь некоторое увеличение (по сравнению с ГЛП типа IIa) уровня моноеновых кислот с 16 и особенно с 18 углеродными атомами, что, возможно, отражает увеличение концентрации триглицеридов в крови, характерное для этих больных, поскольку основной жирной кислотой триглицеридов является олеиновая, составляющая около 35 % [2].

Несмотря на выраженное увеличение доли линолевой кислоты в спектре жирных кислот плазмы больных ГЛП, в эритроцитарных мембранах этих больных (см. табл. 1) процентное содержание линолевой кислоты не увеличено, а при ГЛП типа IIb несколько снижено, что не приводит, однако, к снижению синтеза арахидоновой кислоты. Обращает на себя внимание относительное увеличение содержания средних ПНЖК мембран эритроцитов кислот линоленовой серии. Указанные изменения жирнокислотного спектра выразились в некотором снижении величин КЭМ эритроцитов в группе лиц с ГЛП типа II по сравнению с таковыми здоровых, сохранившихся и после диетотерапии. Следует отметить, что месячный курс диетотерапии не оказал заметного влияния на содержание индивидуальных жирных кислот в мембранах эритроцитов, соотношение ПНЖК/НЖК практически не изменилось.

В жирнокислотном составе липидов тромбоцитов (табл. 2) обследованной группы больных ГЛП типа II наибольшее

Т а б л и ц а 2  
Состав жирных кислот тромбоцитов больных гиперлиппротеидемией типа IIa

Жирные кислоты	Больные		Практически здоровые лица
	до диетотерапии	после диетотерапии	
14:0	1,92	1,69	1,86
14:1	1,42	1,44	1,57
16:0	16,31	16,58	17,80
16:1	4,07	3,01	3,60
17:0	1,30	1,55	2,35
18:0	8,71	10,88	13,92
18:1	18,92	17,28	19,24
18:2	19,79	21,32	11,92
18:3	1,98	1,01	2,07
20:3	1,26	1,20	1,78
20:4	12,47	14,46	12,67
20:5	1,11	0,74	1,05
24:0	1,18	1,16	1,39
22:4+24:1*	5,67	4,18	4,36
22:5	1,33	1,11	1,49
22:6	2,56	2,39	2,93
ПНЖК	1,50	1,44	0,99
НЖК			
КЭМ	1,24	1,76	1,25

более существенным отличием было резкое увеличение уровня линолевой кислоты по сравнению с таковым практически здоровых лиц. Одновременно было несколько снижено содержание насыщенных длинноцепочечных жирных кислот. Повышенный уровень линолевой кислоты в тромбоцитах может свидетельствовать как об интенсивном включении ее в тромбоциты в процессе обмена фосфолипидами между тромбоцитами и ЛПП плазмы [8], так и о синтезе *de novo*. Способность тромбоцитов синтезировать жирные кислоты показана рядом исследователей [11, 14]. Процентное содержание арахидоновой кислоты в липидах тромбоцитов больных не отличалось от нормы. Под влиянием диетотерапии содержание арахидоновой кислоты несколько увеличилось, что наряду с изменениями в других ПНЖК с 20 и 22 углеродными атомами привело к достоверному увеличению значений КЭМ, превысивших уровень, характерный для здоровых лиц. Эти результаты согласуются с данными, полученными ранее при исследовании здоровых лиц [5], о том, что КЭМ тромбоцитов является показателем, более быстро реагирующим на изменения жирнокислотного состава диеты, чем КЭМ эритроцитов. Довольно короткий период диетического воздействия, очевидно, не позволил нам установить из-

менение в жирнокислотном составе мембран эритроцитов, характеризующее благоприятное действие лечебной диеты.

На основании полученных результатов можно заключить, что у обследованных больных семейной гиперхолестеринемией в жирнокислотном спектре мембран эритроцитов дефицита ПНЖК не установлено, а жирнокислотный состав мембран тромбоцитов характеризуется повышенным включением ПНЖК (главным образом линолевой кислоты). В свете имеющихся в литературе данных [17] об увеличенном соотношении холестерин/фосфолипиды в мембранах тромбоцитов больных ГЛП типа IIa (что сочетается с увеличением микровязкости мембран и чувствительности тромбоцитов к агрегации) можно предположить, что найденное повышенное включение линолевой кислоты в мембранные липиды тромбоцитов может представлять собой адаптационный механизм, направленный на коррекцию структурно-функциональных изменений, возникающих в тромбоцитах в условиях данной патологии (гиперхолестеринемия). В связи с этим интересно сопоставить наши данные по жирнокислотному составу мембран эритроцитов (равные доли линолевой кислоты у больных ГЛП типа IIa и практически здоровых лиц) и сообщение авторов [18], не наблюдавших возрастания отношения холестерин/фосфолипиды в эритроцитах больных с ГЛП типа IIa (в отличие от тромбоцитов).

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что у больных семейной гиперхолестеринемией (IIa и IIb фенотипы ГЛП) возможна алиментарная коррекция жирнокислотного спектра плазмы крови и в достаточно короткие сроки структурных липидов тромбоцитов. Полученные факты еще раз подчеркивают важную роль патогенетически сбалансированной (применительно к ГЛП типа II) диеты в профилактике сердечно-сосудистых заболеваний у этой категории больных.

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Алимova Е. К., Аствацатурьян А. Т., Жаров Л. В. Липиды и жирные кислоты в норме и при ряде патологических состояний. — М., 1975. — С. 129.
2. Денисенко А. Д., Климов А. Н. // Бюл. экпер. биол. — 1975. — № 6. — С. 44—47.

3. Покровский А. А., Левачев М. М., Ганнаров М. М. // Вопр. питания. — 1973. — № 4. — С. 3—11.
4. Покровский А. А., Левачев М. М., Пятницкая Г. К. и др. // Клин. мед. — 1974. — № 10. — С. 28—32.
5. Покровский А. А., Левачев М. М., Львович Н. А. и др. // Вопр. питания. — 1977. — № 3. — С. 12—17.
6. Aloni B., Shinitzky M., Livne A. // Biochim. biophys. Acta. — 1974. — Vol. 348. — P. 438—441.
7. Ando J., Steiner M. // Ibid. — 1973. — Vol. 311. — P. 26—37.
8. Beroziat G., Chamber J., Trugnan G. et al. // J. Lipid Res. — 1978. — Vol. 19. — P. 495—500.
9. Bochenek W., Rodgers J. B. // Biochim. biophys. Acta. — 1978. — Vol. 528. — P. 1—16.
10. Crocker P. J., Fitch M., Ostwald R. // J. Nutr. — 1979. — Vol. 109. — P. 927—938.
11. Deykin D., Desser R. K. // J. clin. Invest. — 1968. — Vol. 47. — P. 1590—1602.
12. Falch J., Lees M., Sloan-Stanley G. H. // J. biol. Chem. — 1957. — Vol. 226. — P. 497—506.
13. Fredrickson D., Goldstein I. L., Brown N. // The Metabolic Basis of Inherited Disease / Ed. J. Wyngaarden, D. Fredrickson. — New York, 1978. — P. 604.
14. Hennes A. R., Awai K., Hamerstand K. et al. // Nature. — 1969. — Vol. 210. — P. 839—841.
15. Holman R. T., Peijer J. J. // J. Nutr. — 1960. — Vol. 70. — P. 411—417.
16. Morin R. J., Bernick S., Mean J. F. et al. // J. Lipid Res. — 1962. — Vol. 3. — P. 432—438.
17. Shaltil S. J., Cooper R. A. // Biochemistry (Wash.). — 1976. — Vol. 15. — P. 4832—4837.
18. Shaltil S. J., Bennet J. S., Colman R. W. et al. // J. Lab. clin. Med. — 1977. — Vol. 89. — P. 341—353.
19. Stoffel W., Chu F., Achrens E. H. // Analyt. Chem. — 1959. — Vol. 31. — P. 307—311.

Поступила 20.01.86

#### EFFECT OF DIETOTHERAPY ON THE FATTY ACID SPECTRUM IN ERYTHROCYTE AND THROMBOCYTE MEMBRANES IN PATIENTS WITH HYPERLIPOPROTEINEMIA OF THE II TYPE

I. I. Korj, V. A. Mescheryakova, M. A. Samsonov, N. V. Chepurnenko, V. A. Koshechkin, M. M. Levachev

Institute of Nutrition, Institute of Prophylactic Cardiology, All-Union Cardiological Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Fatty acid spectrum of blood plasma, erythrocyte, and thrombocyte membranes as well as its alterations after dietotherapy, containing polyunsaturated/saturated fatty acids at the ratio of 1 and less than 350 mg of cholesterol per a day, was studied in patients with hereditary hypercholesterolemia using gas chromatography. Content of linoleic acid was increased and that of oleic and arachidonic acids—decreased in lipids of the patients blood plasma as compared with healthy persons; an increase of linoleic acid was also detected in thrombocyte lipids. Alterations in fatty acid spectrum of erythrocyte membranes were less pronounced. After the course of dietotherapy within 1 month a further increase in content of linoleic acid was observed in blood plasma. Under these conditions efficiency of essential fatty acids incorporation into lipid structures of thrombocyte membranes was higher and of erythrocytes—lower in the patients as compared with healthy persons. Possible alimentary correction of fatty acid spectrum in blood lipids is discussed.

УДК 616.33-002.44-092.9-085.252.44:547.854.71-033.8:616.33-008.939.15-39

Н. Г. Кузнецов, С. К. Суслова, М. М. Расулов, В. М. Гукасов,  
Э. Я. Каплан

### ВЛИЯНИЕ МЕТИЛУРАЦИЛА НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ И ГОМОГЕНАТАХ ТКАНЕЙ ЯЗВЕННОГО ДЕФЕКТА СТЕНКИ ЖЕЛУДКА КРЫС

Иркутский институт органической химии СО АН СССР

Молекулярные механизмы повреждения биологических мембран при патологических процессах остаются недостаточно выясненными. Особый интерес представляют исследования свойств бимолекулярного липидного слоя, который является матрицей для ферментов и ряда других функционирующих в мембране белков и в то же время выполняет функции барьера для веществ, проникающих в клетку.

Одним из важных звеньев метаболизма липидов в биомембранах является их перекисное окисление (ПОЛ). Принимая во внимание тот факт, что развитие язвенного процесса сопряжено с деструкцией тканей и, в частности, с нарушением структуры клеточных мембран, есть основание полагать, что язвенная болезнь может сопровождаться изменением ПОЛ. В случае подтверждения данной гипотезы

**Изменения площади (в мм<sup>2</sup>) ацетатной язвы желудка у крыс под влиянием метилурацила**

Исследуемая группа	День наблюдения		
	3-й	7-й	10-й
Животные с не-леченой язвой	31,8±3,1	28,6±2,2	7,4±0,8
Животные с язвой, леченной метилурацилом <i>p</i>	25,8±3,2 >0,1	9,2±1,1 <0,01	1,2±0,2 <0,01

тезы определение интенсивности ПОЛ может быть использовано как тест при диагностике заболевания, а также стать одним из критериев эффективности терапевтического воздействия.

Известно, что метилурацил стимулирует репаративную функцию клеток при лечении язвенной болезни [4, 6]. Однако процессы, определяющие эффект препарата, выяснены далеко не полностью. В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение влияния метилурацила на ПОЛ при экспериментальной язве желудка.

#### Методика

Эксперименты проведены на белых беспородных крысах массой 140—160 г, у которых воспроизводили хроническую язву желудка [12]. Животным под эфирным раши-наркозом вскрывали срединным разрезом брюшную полость. Края раны отодвигали, гемостаз производили методом раздавливания. В рану вводили желудок, на переднюю поверхность которого прикладывали кончик стеклянного тупфера, смоченного в 70 % уксусной кислоте. Аппликация длилась 1 мин. Площадь контакта составляла 0,3 см<sup>2</sup>. Химический ожог наружной стенки приводил к образованию язвы на прилегающей части слизистой оболочки желудка уже через 18—24 ч. Операция заканчивалась сопоставлением и послойным сшиванием краев раны. Метилурацил вводили перорально в дозе 500 мг/кг в течение 10 дней, начиная с 1-го дня эксперимента. Группы оперированных (по 7 леченых и нелеченых) животных декантитировали на 3, 7 и 10-е сутки, вскрывали желудок, вырезали участок с язвой и ткань помещали в жидкий азот для дальнейших исследований. У других групп животных (7 леченых и 7 нелеченых) брали из хвостовой вены 0,02 мл крови до операции и через 2, 6, 24 ч, а также на 3, 7 и 10-е сутки после операции. Кровь смешивали с 1 мл физиологического раствора, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 мин, плазму отсасывали и использовали для дальнейших исследований. Эталонам служили параметры хемилюминесценции крови и ткани желудка 10 интактных крыс.

Интенсивность ПОЛ определяли методом хемилюминесценции на установке, описанной ранее [3]. Для иницирования ПОЛ в плаз-

ме крови добавляли 10 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, а при работе с гомогенатами ткани желудка — 1 мл 10<sup>-2</sup> М FeSO<sub>4</sub>. Гомогенат из ткани желудка (100 мг) готовили путем перетирания в фарфоровой чашке с кварцевым песком в среде инкубации (2 мл) и вносили в измерительную ячейку (конечный объем суспензии в ячейке 10 мл). Среда инкубации состояла из 105 мМ KCl и 20 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4. Конечная концентрация инициаторов ПОЛ в реакционной среде составляла: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> — 1 % (0,3 М), а Fe<sup>2+</sup> — 10<sup>-3</sup> М. Для оценки антиокислительного действия метилурацила изучали его влияние на кинетику всех стадий Fe<sup>2+</sup>-индуцируемой хемилюминесценции в системе, содержащей суспензию многослойных липосом, приготовленных из яичного желтка. О динамике процесса ПОЛ судили по тангенсу угла наклона прои-сываемой кривой. Интенсивность хемилюминесценции рассчитывали в условиях одинаковой массы гомогената (10 мг ткани в 1 мл суспензии) в измерительной ячейке; при этом мерой являлось отношение интенсивности индуцированной Fe<sup>2+</sup>, либо H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> люминесценции к спонтанному уровню свечения, т. е. амплитуда быстрой вспышки, выражаемая в относительных единицах.

Статистическую обработку данных проводили методом Стьюдента.

#### Результаты и обсуждение

Введение метилурацила приводит к заметному ускорению заживления экспериментальной язвы. Так, на 10-й день у животных, получавших препарат, отмечалось практическое исчезновение язвенного дефекта, а у крыс, не получавших метилурацила, можно было наблюдать изъязвления на слизистой оболочке желудка (см. таблицу).

Рассмотрим динамику морфологических изменений в проведенных опытах. Логично допустить, что в первые 72 ч на фоне воспаления в ткани желудка катаболические процессы преобладали над анаболическими: слизистая оболочка прогрессивно распадалась, образуя определенного размера дефекты; затем этот процесс на некоторое время стабилизировался, после чего начинали превалировать репаративные процессы, т. е. язвенный дефект уменьшался. Введение препарата существенно ускоряло этот процесс, который в терминах концепции Г. Селье может быть охарактеризован как развитие генерализованного адаптационного синдрома (ГАС), затем — переход ГАС в местный адаптационный синдром (МАС) [10], после чего наступало выздоровление.

В следующих опытах изучали влияние метилурацила на динамику ПОЛ как непосредственно в очаге язвенного поражения ткани желудка, так и в

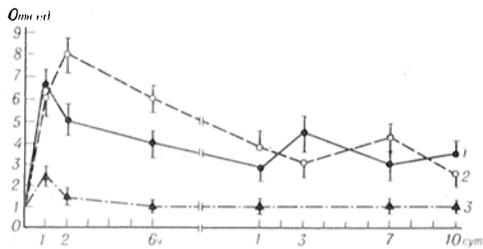


Рис. 1. Влияние метилурацила на интенсивность  $H_2O_2$ -индуцированной хемилюминесценции плазмы крови крыс.

Здесь и на рис. 2: 1 — животные с нелеченой язвой желудка; 2 — животные с язвой, леченной метилурацилом; 3 — интактные животные. По оси абсцисс — время наблюдений, по оси ординат — интенсивность хемилюминесценции (в опт. ед.). В каждой точке с обозначенным доверительным интервалом  $n=7$ ;  $p<0,05$ .

плазме крови животных с экспериментальной язвой. Установлено, что в плазме крови крыс с язвой, не получавших препарата, происходит, в соответствии с данными хемилюминесценции, активация ПОЛ, особенно в первые 2 ч после операции. В последующем уровень сверхслабого свечения снижался. Динамика этого процесса представлена на рис. 1. В группе животных, получавших метилурацил, происходило снижение интенсивности хемилюминесценции в первые часы после операции. На рис. 1 представлена динамика этого процесса. Исследование интенсивности ПОЛ в гомогенатах ткани желудка из очага язвенного поражения показало, что на ранних стадиях развития язвенного процесса, т. е. в первые 72 ч после операции, у крыс, не принимавших метилурацила, интенсивность хемилюминесценции сначала увеличивалась, а затем снижалась, не достигнув к 10-му дню после операции нормальных величин. В то же время у крыс, получавших препарат, параметры хемилюминесценции практически не отличались от таковых интактных крыс (рис. 2).

Таким образом, синхронно с деградацией слизистой оболочки желудка у животных, не принимавших метилурацил, происходило усиление сверхслабого свечения крови и ткани желудка; впоследствии (на стадии МАС) вместе с уменьшением степени поражения ткани желудка уменьшались параметры хемилюминесценции. Введение препарата сопровождалось прямо противоположной динамикой свечения объектов в разные фазы стресса. Очевидно, между отмеченными явлениями существует взаимосвязь, характер ко-

торой может быть интерпретирован следующим образом.

Показано, что интенсивность хемилюминесценции возрастает при действии различных стрессоров [2, 7]. В состоянии стресса, как указывает Г. Селье, происходит усиленный выброс в кровь различных гормонов — кортикостероидов и катехоламинов, основной функцией которых является мобилизация биоэнергетики. Последняя происходит за счет выброса в кровь из жировой ткани неэстерифицированных жирных кислот в большей мере, чем гликогена. Соответственно и биоэнергетика, в частности окислительно-восстановительные реакции, переходят в основном на липидный субстрат [5]. При контакте липидов с кислородом активируется свободнорадикальное окисление, что сопровождается усилением хемилюминесценции. Иными словами, в состоянии стресса происходит переход биоэнергетики на другой, более высокий уровень, поскольку calorическая ценность липидов и сахаров не одинакова. Применение препарата позволяет сохранить фоновый энергетический уровень биоокисления. Это положение справедливо как для крови, так и для ткани желудка, реакции в котором при стрессе хоть и отличаются от реакций в крови, но тем не менее имеют важное сходство: стрессоры повышают уровень сверхслабого свечения в исследованных объектах и, следовательно, их уровень биоэнергетики, а метилурацил оказывает антиокислительное действие. В этой связи представлялось важным изучить влияние метилурацила на параметры ПОЛ в опытах *in vitro*.

В специальной серии опытов на многослойных липосомах был установлен факт ингибирования метилурацилом

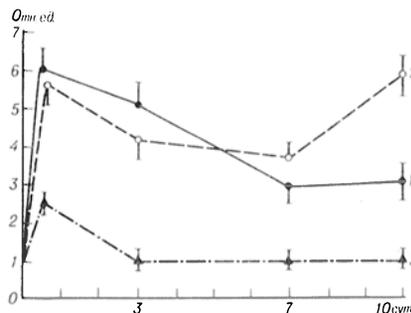


Рис. 2. Влияние метилурацила на интенсивность  $F_2^+$ -индуцированной хемилюминесценции в гомогенатах ткани желудка крыс.

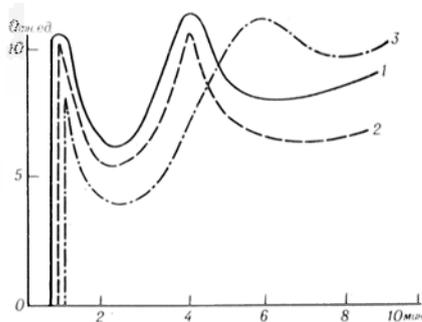


Рис. 3. Влияние метилурацила на развитие  $Fe^{2+}$ -индуцированной хемилюминесценции в суспензии липосом.

1 — контроль (без препарата); 2 — 0,2 мг метилурацила в 1 мл; 3 — 1 мг метилурацила в 1 мл.

ПОЛ, что выражалось в уменьшении параметров развития  $Fe^{2+}$ -индуцированного сверхслабого свечения; эффекты препарата в дозах 0,2—1,0 мг на 1 мл суспензии представлены на рис. 3. Ингибирующее действие метилурацила проявляется в основном в фазе медленной вспышки. Исходя из положения [3], что на стадии медленной вспышки происходит разветвление цепных реакций с участием липидных радикалов типа  $RO_2^{\cdot}$ , можно допустить, что в основе антиокислительного действия метилурацила лежит его способность ингибировать этот процесс разветвления цепных реакций ПОЛ.

Оценивая изложенные данные в целом, считаем важным выявить их патофизиологический смысл.

Известно [1, 8, 9, 11], что перекисное окисление ненасыщенных цепей фосфолипидов мембран является одним из основных звеньев механизма нарушения барьерной и матричной функции мембран. Процессы ПОЛ ведут к образованию свободных радикалов, которые могут активно воздействовать на различные биологические субстраты и изменять их структуру. Липидные радикалы легко соединяются с тиоловыми и амидазольными группами ферментов, образуя внутри- и межмолекулярные сшивки. Радикалы могут легко разрушать различные вещества, обладающие антиоксидантной активностью, а также нарушать селективную проницаемость мембран и разобщать дыхание митохондрий. В результате катаболические процессы начинают превалировать над анаболическими. Это значит, что резкая активация ПОЛ в ранние сроки образования язвы лежит в основе дальнейшего

развития деструктивных процессов в ткани желудка в более поздние сроки развития язвы. При этом особо следует заметить, что некоторые продукты деструкции сами по себе могут являться ингибиторами репаративных процессов. Таким образом может создаваться «порочный круг». Метилурацил предупреждает образование этого круга, активируя процессы репарации в очаге язвы. Поэтому динамика развития деструктивных процессов, сопровождающаяся активацией ПОЛ как в плазме крови, так и в гомогенатах ткани желудка у различных групп животных, в проведенных опытах получает удовлетворительное объяснение. Следовательно, обнаруженный нами факт ингибирования ПОЛ под влиянием метилурацила может свидетельствовать о том, что в основе защитного эффекта препарата при экспериментальной ацетатной язве желудка лежит, вероятнее всего, его антиокислительное действие. Применение метацила особенно эффективно в самые ранние сроки образования язвы. При этом отнюдь не уменьшается значение других факторов, стимулирующих репарацию слизистой оболочки как в условиях самозаживления, так и при употреблении лекарств.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов В. Ф. Липиды и новая проницаемость мембран. — М., 1982.
2. Барабой В. А., Орел В. Э., Срибназ А. Ф., Тацый Ю. А. // Радиобиология. — 1978. — Т. 18. — № 2. — С. 305—309.
3. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М., 1972.
4. Ермаков Е. В., Орлов А. В., Барский Р. Л. // Клин. мед. — 1981. — № 8. — С. 67—71.
5. Журавлева А. И. // Биохемилюминесценция. — М., 1983. — С. 3—30.
6. Капитаненко А. М. // Сов. мед. — 1968. — № 6. — С. 140—141.
7. Кожевников Ю. П. // Вопр. мед. химии. — 1985. — № 5. — С. 2—7.
8. Крылов В. И., Олехнович В. М., Сорочкин В. П., Жогин С. В. // Там же. — 1984. — № 1. — С. 52—55.
9. Прилипко Л. Л., Лидеман Р. Р. // Вестн. АМН СССР. — 1982. — № 1. — С. 33—36.
10. Селье Г. Стресс без дистресса: Пер. с англ. — М., 1982.
11. Ribarov S., Benov L., Benchev I. // *Experientia* (Basel). — 1982. — Vol. 38. — P. 1354—1355.
12. Takagi K., Okabe S., Saziki R. // *Jap. J. Pharmacol.* — 1969. — Vol. 19. — P. 418—426.

Поступила 29.10.86

Dynamics of experimental acetate gastric ulcer healing and lipid peroxidation were studied in rat blood and gastric tissues after treatment with methyluracyl. The drug was

shown to stimulate reparation and to inhibit lipid peroxidation. The antiulcerogenous effects of methyluracyl appear to involve the antioxidative mechanisms.

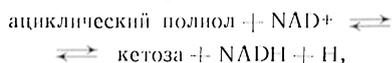
УДК 612.351.11:577.152.11:612.352.1

В. Е. Судовцов, Т. Ю. Жармухамедова

### ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СОРБИТОЛДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ ЦИТОПЛАЗМЫ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ БЫКА

Биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

Сорбитолдегидрогеназа — СДГ (1-идитол; NAD — 5 — оксидоредуктаза, КФ 1.1.1.14), катализирующая обратимое окисление сорбита до фруктозы в NAD-зависимой реакции



является узловым ферментом сорбитольного пути обмена глюкозы [9, 11, 21]. Фермент локализован в клетках семенных пузырьков [20], цитоплазме клеток печени [11, 12, 17], мозга [13, 14] и хрусталика глаза [10, 19], а также в других тканях млекопитающих. Изменение активности этого фермента рассматривают как диагностический признак при заболеваниях печени [1, 8, 16], периферических нервов [21], отеке мозга [7] и другой патологии.

Каталитические и физико-химические свойства СДГ из различных источников изучены недостаточно. Настоящая работа посвящена исследованию некоторых физико-химических характеристик этого фермента из цитоплазмы клеток печени быка.

#### Методика

Исследование проведено на частично очищенном ферментном препарате из цитоплазмы клеток печени быка. Сразу после забоя животного на Серпуховском мясокомбинате печень извлекали и доставляли в лабораторию на холод. Все дальнейшие операции по выделению фермента проводили при 4°C. Навеску печени (100 г) измельчали, добавляли 150 мл холодной 0,25 М сахарозы в 10 мМ цитратно-фосфатном буфере pH 8,0, содержащей 5 мМ дитиотрейтола, и гомогенизировали в гомологе-

низаторе типа Поттера—Элвейхема. Гомогенат фильтровали через 4 слоя марли и центрифугировали при 7000×g в течение 20 мин. Надосадочную жидкость вновь центрифугировали при 100 000×g в течение 90 мин. Осадок отбрасывали, а надосадочную жидкость нагревали в течение 5 мин при постоянном перемешивании при 45°C и быстро охлаждали до 4°C. После центрифугирования при 25 000×g в течение 20 мин надосадочную жидкость подкисляли до pH 5,8 при постоянном перемешивании, подщелачивали водным раствором аммиака до pH 8,0 и подвергали дифференциальному высаливанию сухим (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Белки осадка, собранные в диапазоне насыщения 0,2—0,5 и растворенные в минимальном объеме 10 мМ цитратно-фосфатного буфера pH 8,0, содержащего 5 мМ дитиотрейтола, после диализа фракционировали холодным этанолом. Ферментативная активность отмечалась в осадке, собранном между 15 и 35 % насыщения этанолом. Осадок немедленно растворяли в буфере и диализовали. Гель-хроматографию препарата проводили при 5—7°C на колонке с сефадексом G-100 в том же буфере с добавлением 0,5 л NaCl. Фракции по 5 мл отбирали автоматически. Фракции, содержащие активный фермент, объединяли и определяли в них концентрацию белка и удельную активность. Полученный таким образом ферментный препарат был очищен в 496 раз с выходом по общей активности в 22 %.

Ферментативную активность определяли по начальным скоростям реакции, регистрируя изменение оптической плотности при 340 нм на спектрофотометре "Specord M-40" (фирма "Carl Zeiss", ГДР). Состав инкубационной среды: 2 мл 50 мМ соответствующего буфера, содержащего 100 мМ NaCl, 0,1 мл 20 мМ NAD, 0,04 мл (1,3—2 мг белка) ферментного препарата. Реакцию начинали добавлением в опытную кювету (длина оптического пути 10 мм) 0,1 мл раствора сорбита. При изучении субстратной специфичности вместо сорбита добавляли такой же объем изучаемого полиола в концентрации 5—100 мМ.

Диск-электрофорез в полиакриламидном геле проводили по общепринятой методике при pH 9,5 и концентрации геля 7,5 % [2]. Для

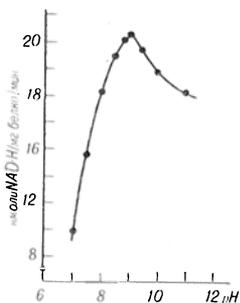


Рис. 1. Зависимость активности СДГ от pH среды.

В диапазоне pH 6,0—8,0 использован цитратно-фосфатный буфер; в диапазоне 7,5—11,5 — трис-HCl; в диапазоне 9,5—12,0 — глицин — NaOH.

выявления активности геля после разделения и промывки в буфере при pH 8,0 инкубировали в среде, содержащей 50 мкл трис-HCl pH 8,0, 50 мкг NAD, 1 мг феназинметасульфата, 15 мг тетразолия нитросинего и 2 мкл 0,5 М субстрата. Относительную электрофоретическую подвижность определяли как отношение расстояния, пройденного белком, к аналогичному расстоянию, пройденному красителем в этом геле.

Белок определяли по методу Лоури. Для построения калибровочного графика использовали бычий сывороточный альбумин, удельную активность выражали в наномолях восстановленного NADH на 1 мг белка за 1 мин.

Буферные растворы готовили из солей, оснований или кислот отечественного производства квалификации «ХЧ» или «ЧДА», которые были дважды перекристаллизованы или перегнаны. Воду трижды переговарили в стеклянной посуде.

В работе использованы следующие реактивы: NAD<sup>+</sup> и NADP<sup>+</sup> (фирма "Reanal", Венгрия; или фирма "Serva", ФРГ), БСА ("Serva"), сорбит, маннит, ксилит, дульцит, рибит и эритрит («фирма "Serva"», глицерин отечественного производства квалификации «4ДА», который был дважды перегнан, дитиотреитол (фирма "Sigma", США), феназинметасульфат (фирма "Koch—Light" или "BDH", Англия), тетразолий нитросиний (фирма "BDH" или "Serva"). Реактивы для гель-электрофореза фирмы "Reanal" были дважды перекристаллизованы.

Все полученные результаты обработаны вариационно-статистическим методом [3]. Каждая экспериментальная точка на графиках представляет собой среднюю арифметическую величину, вычисленную на основании эксперимента.

## Результаты и обсуждение

Как и большинство ранее выделенных препаратов, СДГ из цитоплазмы клеток печени быка была довольно лабильна. Но активность СДГ не изменялась при хранении цельной печени в замороженном состоянии в течение 4 мес. Аналогичные данные были получены для этого фермента из цитоплазмы клеток печени крысы [11]. В наших экспериментах СДГ быстро теряла активность в отсутствие дитиотреитола (на 50 % при хранении при —20 °С и на 100 % при 4 °С в течение

1 нед). Известно, что дитиотреитол в значительной степени тормозит превращения SH-групп, существенных для функционирования фермента. Добавление субстрата или кофермента не способствовало сохранению активности.

Добавление к выделенному препарату 0,1 М NaCl способствовало хорошей сохранности активности СДГ печени быка. Вероятно, в этих условиях ингибируется протеолиз или полная сила снижает процесс агрегации белка.

Интересные данные получены для СДГ из цитоплазмы клеток мозга крысы [14]. Выделенный фермент терял активность в течение недельного срока хранения, но сохранял ее в присутствии 0,2 % альбумина. В наших экспериментах добавление такого же количества БСА не способствовало сохранению активности.

Хранение СДГ в замороженном состоянии (при —20 °С) стабилизировало фермент. Процесс трехкратного замораживания — оттаивания не приводил к заметному снижению активности. Добавление глицерина до конечной концентрации 30 % не вызывало заметных изменений в активности, но позволяло хранить фермент в незамороженном состоянии.

Итак, наиболее подходящими условиями сохранения частично очищенного препарата СДГ из цитоплазмы клеток печени быка является его хранение при —12 °С после добавления до конечной концентрации 10<sup>-4</sup> М дитиотреитола, 0,1 М NaCl и 35 % глицерина. В этих условиях фермент хранился без потери активности в течение 8 мес.

Влияние pH на активность СДГ из цитоплазмы клеток печени быка изучали в диапазоне pH 6,0—12,0 при использовании следующих буферных смесей: диапазон pH 6,0—8,0 — цитратно-фосфатная; диапазон pH 7,5—11,5 — трис-HCl; диапазон 9,5—12,0 — глицин — NaOH. Профиль зависимости этой активности от pH имеет острый пик при pH 9,0 (рис. 1). Это согласуется с данными литературы для СДГ из цитоплазмы клеток печени [4, 6, 11, 17] и мозга [13, 14].

Активность СДГ из цитоплазмы клеток печени быка проявлялась только в присутствии NAD, который нельзя заменить на NADP, что согласуется с данными литературы для этого фер-

Т а б л и ц а 1  
Активность СДГ из цитоплазмы клеток печени быка

Субстрат	Концентрация, мМ	Активность СДГ, нмоль НАДН в 1 мин на 1 мг белка
Сорбит (C <sub>6</sub> )	5	17,68—0,31
Ксилит (C <sub>6</sub> )	5	16,11—0,41
Рибит (C <sub>6</sub> )	5	4,34—0,16
Маннит (C <sub>6</sub> )	5—100	0
Эритрит (C <sub>4</sub> )	5—100	0
Дульцит (C <sub>6</sub> )	5—100	0
Глицерин (C <sub>3</sub> )	5—100	0
Глюкоза (C <sub>6</sub> )	5—100	0

мента из цитоплазмы клеток печени и мозга млекопитающих [11—14, 17], а также хрусталика глаза [10, 19].

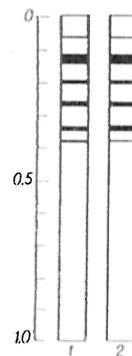
Скорость дегидрирования различных полиолов в присутствии частично очищенного препарата СДГ из цитоплазмы клеток печени быка представлена в табл. 1. Высокая активность этого фермента отмечена при использовании в качестве субстрата сорбита или ксилита. Скорость дегидрирования рибита была в 4 раза ниже скорости этой реакции в пробах с сорбитом. Маннит, дульцит, эритрит, глицерин и глюкоза не подвергались дегидрированию в пробах с этим препаратом фермента как при различных величинах pH, так и в широком диапазоне их концентраций (5—100 мМ). Полученные результаты согласуются с данными литературы для фермента из цитоплазмы клеток печени крысы и овцы, но отличаются от данных литературы для СДГ из других источников (табл. 2). Так, фермент из цитоплазмы клеток печени лошади на 30 % медленнее ка-

Т а б л и ц а 2  
Сравнительная активность СДГ из цитоплазмы клеток печени различных животных

Субстрат	Активность СДГ из цитоплазмы клеток печени, %			
	быка (собственные данные)	лошади [4]	крысы [11]	овцы [17]
1-Идитол	—	100	97	—
Сорбит	100	68	100	110
Ксилит	91	50	99	100
Рибит	25	28	50	88
Маннит	0	0	25	3
Эритрит	0	0	0	—
Глицерин	0	0	—	—

Рис. 2. Зимограммы СДГ из цитоплазмы клеток печени быка.

1 — субстрат — сорбит, 2 — субстрат — ксилит. По вертикали — относительная электрофоретическая подвижность.



тализовал дегидрирование сорбита по отношению к идиту. Если принять во внимание активность СДГ по отношению к сорбиту и идиту, то ферменты из печени крысы и лошади совершенно различны. Если же дегидрирование сорбита принять 100 %, то скорость дегидрирования идита, ксилита и рибита под действием СДГ из цитоплазмы клеток печени лошади будет составлять 147, 73 и 41 % соответственно. В этом случае различия между этими ферментами незначительны.

Интересные данные обнаружены при дегидрировании маннита. Мы уже отмечали, что этот полиол практически не дегидрируется под действием СДГ из цитоплазмы клеток печени быка. Аналогичные данные получены и для фермента из цитоплазмы клеток печени лошади [4]. Вместе с тем СДГ из цитоплазмы клеток печени крысы активно катализирует дегидрирование этого полиола [11].

Анализ собственных и литературных данных свидетельствует о том, что среди ациклических полиолов, обнаруживаемых в клетках млекопитающих, с относительно большими скоростями дегидрируются сорбит, ксилит и рибит, а у некоторых и маннит. Это свидетельствует в пользу того, что в определенных условиях (высокая концентрация полиола, щелочная среда клетки, соотношение между NAD и NADH и т. д.) данные субстраты могут окисляться с большой скоростью в клетках млекопитающих и таким образом включаться в метаболизм. Различная степень дегидрирования этих полиолов в присутствии ферментных препаратов СДГ из различных источников может быть обусловлена двумя причинами. Либо исследуемые препараты СДГ загрязнены индивидуальными маннит-ксилит- и рибитдегидрогеназами, либо для каждого фермента характерны

свои скорости дегидрирования этих полиолов. Для проверки этих предположений решено исследовать молекулярные формы СДГ из цитоплазмы клеток печени быка методом электрофореза в полиакриламидном геле с использованием гистохимического метода для выявления активности СДГ.

Как видно из рис. 2, на зимограммах при дегидрировании сорбита, ксилита и рибита (не показано) обнаружено 6 идентичных зон активности вне зависимости от используемого субстрата. Эти зоны отличались друг от друга величинами относительной электрофоретической подвижности, интенсивностью окраски и шириной. При использовании в качестве субстрата сорбита, ксилита или рибита выявили следующие величины: 0,387, 0,338, 0,226, 0,193, 0,129 и 0,064. Следовательно, в исследуемом нами частично очищенном препарате СДГ из цитоплазмы клеток печени быка содержатся множественные молекулярные формы одного фермента, способного катализировать дегидрирование сорбита, ксилита или рибита. Это свидетельствует в пользу второго предположения, что каждый ферментный препарат СДГ из различных источников с разной скоростью катализирует дегидрирование этих полиолов. Следует также подчеркнуть, что СДГ из цитоплазмы клеток печени быка, как и из других источников, катализирует дегидрирование любых 5-, 6- или 7-углеродных полиолов, у которых 2-й и 4-й углеродные атомы имеют общую 1-конфигурацию относительно 1-го углеродного атома.

Выражаем искреннюю благодарность проф. З. С. Кагану за ряд критических замечаний и плодотворную дискуссию.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Квелишвили Д. В. // Врач. дело. — 1983. — № 3. — С. 19—21.
2. Маурер Г. Диск-электрофорез: Пер. с нем. — М., 1971.
3. Урбах В. Ю. Биометрические методы. — М., 1964.
4. Bailey J. S., Renz Ch., McGuinness E. T. //

- Comp. Biochem. Physiol. — 1981. — Vol. 69-B. — P. 909—914.
5. Blackley R. L. // Biochem. J. — 1951. — Vol. 49. — P. 257—271.
  6. Burnell J. N., Holmes R. S. // Int. J. Biochem. — 1983. — Vol. 15. — P. 507—511.
  7. Clements R. S., Prockop L. D., Winegrad A. L. // Lancet. — 1968. — Vol. 2. — P. 384—386.
  8. Gerlach U. // Klin. Wschr. — 1957. — Bd. 35. — S. 1144—1152.
  9. Hers H. G. // Biochim. biophys. Acta. — 1956. — Vol. 22. — P. 202—203.
  10. Jedziniak J. A., Yales E. M. // Exp. Eye Res. — 1973. — Vol. 16. — P. 95—104.
  11. Jeffery J., Jornwall H. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1983. — Vol. 80. — P. 901—909.
  12. McCorkindale J., Edson N. // Biochem. J. — 1954. — Vol. 57. — P. 518—532.
  13. O'Brien M. M., Schoffield Ph. J., Edwards M. R. // Ibid. — 1983. — Vol. 211. — P. 81—90.
  14. Regh J. E., Torack R. M. // J. Neurochem. — 1977. — Vol. 28. — P. 655—660.
  15. Leissing N. L., McGuinness E. T. // Biochim. biophys. Acta. — 1978. — Vol. 524. — P. 254—261.
  16. Shon H., Wunst H. // Klin. Wschr. — 1960. — Bd. 38. — P. 497—507.
  17. Smith M. G. // Biochem. J. — 1962. — Vol. 83. — P. 135—144.
  18. Touster O., Montesi G. // Meth. Enzymol. — 1965. — Vol. 5. — P. 317—322.
  19. Van Heiningen R. // Exp. Eye Res. — 1962. — Vol. 1. — P. 396—409.
  20. Williams-Ashman H. G., Banks J., Wolfson S. K. // Arch. Biochem. — 1957. — Vol. 72. — P. 495—494.
  21. Winegrad A. L., Clements F. S., Jr., Morrison A. D. // Handbook of Physiology. — Washington, 1972. — Sect. 7. — Vol. 1. — P. 457—471.

Поступила 20.01.86

#### PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF SORBITOL DEHYDROGENASE FROM CYTOPLASM OF BOVINE LIVER CELLS.

V. E. Sudovtsov, T. Yu. Zharmukhamedova

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

Partially purified preparation of sorbitol dehydrogenase, isolated from hepatocytes of bovine liver tissue, was active at a wide range of pH exhibiting the maximal activity at pH 9.0 in presence of NAD but not of NADP. The high rate of sorbitol and xylitol dehydration was observed, whereas the enzyme dehydrated ribitol at the 4-fold lower rate. Disc electrophoresis of the preparation in polyacrylamide gel, where sorbitol, xylitol and ribitol were used as substrates for colorimetric detection of the enzyme activity, exhibited six enzymatic zones with Rf 0.387, 0.266, 0.338, 0.193, 0.129 and 0.064. Optimal conditions were developed for storage of the active enzyme.

Л. С. Колесниченко, Н. С. Манторова, Л. А. Шапиро,  
И. А. Ольховский, А. В. Барон, В. И. Кулинский

## ВЛИЯНИЕ ЭМОЦИОНАЛЬНОГО СТРЕССА НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ МЕТАБОЛИЗМА ГЛУТАТИОНА

Красноярский медицинский институт

Недавно мы обнаружили, что катехоламины (КА) *in vivo* и цАМФ *in vitro* активируют глутатионпероксидазу (ГПО) и глутатион-S-трансферазу (ГТ) печени, а также тормозят  $\gamma$ -глутамилтрансферазу (ГГТ) почек, но не влияют на глутатионредуктазу (ГР) печени [3]. Важно было проверить, реализуется ли этот механизм регуляции ферментов метаболизма глутатиона (ФМГ) в естественных условиях. Поэтому было интересно изучить влияние стресса, вызывающего выраженную мобилизацию эндогенных КА [11]. Данные о влиянии стресса на ГПО неоднозначны: описаны как активация [9, 12], так и отсутствие изменений [8]. Сообщалось о стимуляции при стрессе и ГР [9, 12]. Влияние стресса на ГТ и ГГТ не исследовали. Учитывая, что ФМГ выполняют в организме многочисленные функции [5, 6, 13, 15, 16], мы поставили задачу изучить влияние стресса на все основные ФМГ.

### Методика

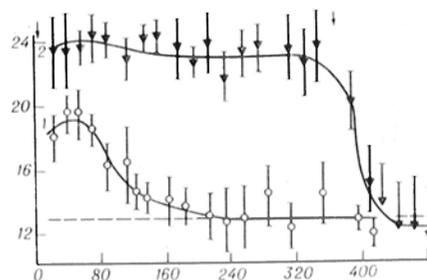
Работа проведена на 138 крысах-самцах Вистар массой 150—200 г и 27 мышках-самцах  $F_1$  (СВА $\times$ С<sub>57</sub>В1) массой 18—23 г. В качестве показателя физиологической реакции на стресс использовали увеличение потребления  $O_2$  ( $VO_2$ ), поскольку экзо- и эндогенные КА увеличивают  $VO_2$ . Этот тест прост и позволяет проводить динамические наблюдения, не подвергая животных дополнительному травмированию. Для выбора конкретной модели эмоционального (иммобилизационного) стресса мы сравнили 3 его известных варианта: 1) фиксирование крысы на спине за все 4 лапы и зубы; 2) фиксирование лап липким пластырем и завертывание в полотенце; 3) завертывание крысы в гибкую металлическую сетку. Во всех случаях увеличение  $VO_2$  достигало максимума в интервале 20—30 мин и сохранялось на повышенном уровне в течение всего периода стресса — 6 ч. После прекращения иммобилизации  $VO_2$  быстро (за 20—25 мин) возвращалось к контрольному уровню и сохранялось на этом уровне до конца наблюдения (см. рисунок). Увеличение  $VO_2$  было максимальным при 1-м варианте стресса, при других оно было ниже в среднем в 1,5—2 раза. Поэтому был выбран 1-й вариант — иммобилизация на спине с жесткой фиксацией лап и головы. Так как при этом варианте стресса

гиперкатехоламинемия [1] и увеличение  $VO_2$  достигают максимума за 20 мин, мы оставались на данном сроке иммобилизации.

Ткани гомогенизировали в 5 объемах 0,25 М сахарозы — 1 мМ ЭДТА — 50 мМ трис-НСI-буфера (рН 7,5) и гомогенаты центрифугировали 30 мин при 18 000 g. Надосадочную жидкость использовали как источник ферментов. В опытах *in vitro* ее инкубировали с цАМФ ( $10^{-6}$  М) в присутствии АТФ ( $10^{-4}$  М) и М ( $10^{-2}$  М) при 30 °С в течение 10—15 мин. Активность ГПО определяли по методу [17], ГТ — методом [14], ГГТ — с наборами "Lachema" (ИССР); субстрат —  $\gamma$ -L-глутамил-p-нитроанилид.

### Результаты и обсуждение

Стресс вызывает активацию ГПО во всех 3 исследованных органах: значительную в сердце и печени, умеренную в почках (см. таблицу). Активность ГТ резко (в 2 раза) возрастает в сердце, увеличивается в печени, но не изменяется в почках. В отличие от этих ферментов активность ГГТ снижается: резко — в печени, умеренно — в почках. Выраженность сдвигов ФМГ в органах соответствует последовательности сердце  $\geq$  печень  $>$  почки. Отметим, что в печени больше, чем в почках, выражены как активация ГПО и ГТ, так и ингибирование ГГТ. Возможно, тканевые различия связаны с мощностью симпатической иннервации органов — во всяком случае, в сердце она максимальна. При стрессе па-



Влияние иммобилизационного стресса на потребление кислорода организмом ( $VO_2$ ).

По оси абсцисс — время после начала эксперимента, мин; по оси ординат —  $VO_2$ , мл/кг/мин. Стрелки — начало и завершение стрессорного воздействия. 1 — контроль; 2 — иммобилизация на спине; пунктирная линия соответствует уровню базального  $VO_2$ .

Влияние эмоционального стресса и цАМФ на активность ФМГ

Орган	Условия опыта	ГР	ГПО	ГТ	ГГТ
Печень	Контроль	39,3±3,8 (15)	169,0±15,0 (9)	215,0±14,7 (12)	3,9±0,6 (13)
	цАМФ	40,5±6,5 (11)	226,0±24,7* (8)	257,0±14,7* <sup>4</sup> (12)	4,27±0,65 (13)
	Стресс	47,2±5,4 (15)	276,0±36,6* (12)	272,0±16,8* (15)	1,6±0,5*** (14)
Почки	Контроль	91,5±6,1 (17)	90,3±12,5 (10)	72,8±4,4 (11)	3,0±0,23 (16)
	цАМФ	92,7±6,7 (11)	118,0±18,8* (8)	61,0±2,5* (11)	2,75±0,22*** (16)
	Стресс	93,2±6,2 (16)	122,0±12,5** (10)	69,0±4,2 (14)	2,3±0,17*** (16)
Сердце	Контроль	13,9±1,6 (12)	81,7±2,8 (6)	15,9±1,3 (7)	—
	цАМФ	14,5±2,2 (7)	98,9±7,3*** (5)	22,0±2,4* (7)	—
	Стресс	14,9±2,6 (10)	139,0±17,5*** (6)	31,0±4,6* (7)	—

Примечание. Активность ферментов выражена в наномолях в 1 мин на 1 мг белка, активность ГТ в почках — в микромолях в 1 мин на 1 мг; в скобках — число опытов. Значимость различий с контролем рассчитана методом связанных выборок для цАМФ и несвязанных выборок для стресса: \* —  $P < 0,01$ ; \*\* —  $P < 0,1$ ; \*\*\* —  $P < 0,05$ ; <sup>4</sup> —  $P < 0,001$ .

блюдали тенденцию к активации дисульфидредуктазной активности с 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензоатом) в качестве субстрата ( $95 \pm 43\%$ ;  $P < 0,1$ ). Активность ГР в исследованных органах не изменялась.

В этом же эксперименте у контрольных животных изучали влияние физиологической концентрации цАМФ на активность ФМГ in vitro (см. таблицу). цАМФ активировал ГПО всех органов, стимулировал ГТ сердца и печени, но не почек, тормозил ГГТ почек, но не печени. Активность ГР при этом не изменялась. Очевидно, что за единственным исключением — отсутствием ингибирования ГГТ печени — эффекты цАМФ и стресса односторонне. Правда, влияние стресса выражено больше, чем цАМФ. Но относительная выраженность эффектов тесно коррелировала:  $r_s = +0,83$  ( $P = 0,01$ ). Введение физиологических доз (11 мкмоль/кг) экзогенных КА (норадреналина и изадрина) также вызвало активацию ГПО ( $25 \pm 6$  и  $28 \pm 7\%$ ) и ГТ ( $21 \pm 8\%$ ) печени и ингибирование ГГТ почек ( $-21 \pm 10$  и  $-23 \pm 10\%$ ). Активность ГР не изменялась ( $3,3 \pm 6,2\%$ ;  $P > 0,5$ ). Очевидно, что стресс, КА и цАМФ вызывают качественно аналогичные и количественно близкие воздействия на ГПО, ГТ и ГГТ. Это позволяет полагать, что стресс действует на ФМГ через эндогенные КА и цАМФ.

Активация ГПО и ГТ при стрессе имеет, вероятно, функциональный характер, поскольку при повреждении ткани вследствие, например, ишемии происходит снижение активности ГПО [2, 4, 8] и ГТ [4]. Активация ГПО под влиянием стресса освещена и в работах [9, 12]. В работе [8] авторы отмечали снижение активности ГПО при стрессе, но их экспериментальный материал свидетельствует об отсутствии значимых сдвигов. Последнее вряд ли связано с иным видом стресса — эмоционально-болевым [8], так как и эмоциональный стресс (наши данные), и иммобилизация + охлаждение [12], и ожог [9] вызывали активацию ГПО. Вряд ли определяют различие большая продолжительность стресса — 6 ч [8]: во-первых, в работе [12] она была сопоставимой — 3 ч; во-вторых, при длительном стрессе реакции на него часто сохраняются устойчиво. Это относится, например, к гиперкатехоламинемии [1] и к увеличению  $VO_2$  (см. рисунок). Скорее причиной отсутствия активации ГПО в работе [8] было проведение исследований через 1—2 ч после стресса, как принято в этой лаборатории [7]. Хорошо известно, что в отличие от органических поражений функциональные сдвиги, вызванные КА и стрессом, быстро нормализуются. В частности, это подтверждается тестом  $VO_2$  (см. рисунок).

Мы не наблюдали активации ГР при стрессе. Причины такого расхождения с данными [9, 12] не ясны. Отметим, что в наших опытах ГР не активировалась ни КА, ни цАМФ.

Обнаруженные нами реакции ФМГ на стресс могут иметь важное биологическое значение. Доказано, что стресс активирует перекисное окисление липидов (ПОЛ) [7—10]. Защитная роль антиоксидантных систем подчеркивалась неоднократно [4, 5, 7]; их даже называли «естественной системой профилактики стрессорных повреждений» [7]. Однако акцент делался на то, что при стрессе имеется недостаточность этих систем [7]. В настоящей работе показано, что КА и стресс наряду с ПОЛ включают защитные механизмы против него — активацию антиоксидантных ФМГ (ГПО и ГТ). При этом в сердце максимальна не только стимуляция ПОЛ [7], но и активация ГТ и ГПО. Стимуляция этого защитного механизма представляется важной ввиду того, что мощность ферментных антиоксидантных систем намного больше, чем неферментных [5, 13]. Подчеркнем, что антиоксидантная активность ГТ шире, чем ГПО. Если ГПО восстанавливает  $H_2O_2$  и гидропероксиды липидов, то ГТ наряду с последними обезвреживает многие другие метаболиты (в том числе главные продукты перекисной полиненасыщенных жирных кислот — 4-гидроксиалканоли), причем для их обезвреживания важна не глутатионпероксидазная активность ГТ (неселеновая ГПО), а конъюгация этих метаболитов с глутатионом. Кроме того, ГТ ингибирует инициацию перекисной и защищает от нее мембраны [15]. Активация ГТ может способствовать также обезвреживанию многих ксенобiotиков путем конъюгации с глутатионом [15]. Параллельная активация обезвреживания окисленных метаболитов и ксенобiotиков при стрессе может иметь важное значение в условиях увеличения внешнего загрязнения среды и частых стрессов.

Ингибирование ГТТ, участвующей в транспорте некоторых аминокислот [6, 16], может замедлить их всасывание в кишечнике и использование для синтеза белков, а также реабсорбцию в почках. Это согласуется с такими известными фактами, как торможе-

ние функций желудочно-кишечного тракта, синтеза белка и увеличение экскреции остаточного азота под влиянием КА и стресса.

Активация ГТ может способствовать усиленному синтезу лейкотриена С, а ингибирование ГТТ — торможению его перехода в лейкотриен D [16].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Белова Т. И., Кветнанский Р., Индра А. и др. // Бюл. экпер. биол. — 1981. — № 3. — С. 265—269.
2. Гуткин Д. В., Петрович Ю. А. // Там же. — 1982. — № 1. — С. 33—35.
3. Колесниченко Л. С., Манторова Н. С. // Физиология и биохимия медиаторных процессов. — М., 1985. — Ч. 1. — С. 158.
4. Коновалова Г. Г., Литвицкий Н. Ф., Шершагов К. С. и др. // Бюл. экпер. биол. — 1984. — № 9. — С. 271—272.
5. Ланкин В. З. // Биохимия липидов и их роль в обмене веществ. — М., 1981. — С. 75—95.
6. Лосинов В. А., Чернов П. П., Березов Т. Т. // Вопр. мед. химии. — 1982. — № 5. — С. 2—10.
7. Меерсон Ф. З. Адаптация, стресс и профилактика. — М., 1981. — С. 176—178; 225.
8. Меерсон Ф. З., Каган В. Е., Архипенко Ю. В. и др. // Кардиология. — 1981. — № 12. — С. 55—60.
9. Мхитарян В. Г., Агаджанов М. И., Геворкян Д. М. и др. // Вестн. АМН СССР. — 1982. — № 9. — С. 5—19.
10. Прилипко Л. Л., Орлов О. П., Иванова С. М. и др. // Докл. АН СССР. — 1982. — Т. 265, № 4. — С. 1010—1013.
11. Axelrod J., Reisine T. D. // Science. — 1984. — Vol. 224, N4648. — P. 452—459.
12. Capel L. D., Dorrell H. M., Smolwood A. E. // J. Toxicol. Environm. Hlth. — 1983. — Vol. 11, N 3. — P. 425—436.
13. Flohe L. // Free Radicals in Biology. — New York, 1982. — Vol. 5. — P. 223—254.
14. Habig N. H., Pabst M. J., Jacoby W. B. // J. biol. Chem. — 1974. — Vol. 249, N 22. — P. 7130—7139.
15. Mannerwik B. // Advance. Enzymol. — 1985. — Vol. 57. — P. 357—417.
16. Meister A., Anderson M. E. // Ann. Rev. Biochem. — 1983. — Vol. 52. — P. 711—760.
17. Stults F. H., Foerstrom J. W., Chin D. T. Y. et al. // Arch. Biochem. — 1977. — Vol. 183, N 2. — P. 490—497.

Поступила 07.01.85

#### THE INFLUENCE OF EMOTIONAL STRESS ON THE GLUTATHIONE METABOLIZING ENZYME

L. S. Kolesnichenko, N. S. Mantorova, L. A. Shapiro, I. A. Olkhovskiy, A. V. Baron, V. I. Kulinsky

Medical School, Krasnoyarsk

Emotional stress during 20 min induced the stimulation of the glutathione peroxidase activity in heart, liver and kidney tissues and the activation of glutathione-S-transferase in heart

and liver tissues.  $\gamma$ -Glutamyl transferase activity was inhibited in liver and kidney tissues. The alterations were gradually decreased in heart  $\geq$  liver  $>$  kidney. Both catecholamines (*in vivo*) and cAMP (*in vitro*) produced the

same effects. Close correlation between the stress and cAMP actions on the glutathione metabolizing enzymes was found. No changes of glutathione reductase activity was observed in all the tissues studied.

УДК 616.151.55:616.153.962.41-02:615.362.411.015.348.

Л. А. Ляпина, Я. М. Аммосова

## КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ ГЕПАРИНА С ИНГИБИТОРОМ НЕФЕРМЕНТАТИВНОГО ФИБРИНОЛИЗА, ВЫДЕЛЕННЫМ ИЗ ТКАНИ СЕЛЕЗЕНКИ

Московский университет им. М. В. Ломоносова

Ранее было изучено свойство гепарина вступать во взаимодействие с различными белками, аминами [6], аминокислотами [14] и образовывать с ними комплексы [4, 11].

Комплексные соединения гепарина с тромбогенными белками крови оказывают неферментативное фибринолитическое действие на нестабилизированный фактором XIII фибрин, антикоагулянтное и антиагрегационное действие [3]. Эти данные свидетельствуют, что физиологическое значение комплексных соединений гепарина заключается не только в устранении в кровеносном русле уже образовавшихся нестабилизированных сгустков фибрина, но и в блокаде процесса их образования и стабилизации [4, 6, 7]. В то же время установлено, что кровоточивость у рожениц при акушерской патологии в большинстве случаев коррелирует с избытком появившемся комплексных соединений гепарина в крови. Получены данные, указывающие, что у части больных в плазме крови, взятой из материнского русла, содержится ингибитор, блокирующий фибринолитическую активность комплексов гепарина, но не разрушающий их [2].

Нами [6, 8, 9] был обнаружен и выделен ингибитор неферментативного фибринолиза (ИНФ) из ткани селезенки здоровых животных — крыс. Однако этот ингибитор теряет свои свойства, если он выделен из ткани селезенки животных в условиях стресса [8] или в присутствии в крови определенного повышенного уровня гепарина [9].

В настоящем исследовании была показана возможность образования комплексного соединения гепарина с ингибитором, выделенным из ткани селезенки здоровых крыс, изучены некото-

рые физиологические и физико-химические свойства ИНФ и его комплекса с гепарином.

### Методика

ИНФ был выделен из ткани селезенки здоровых крыс [9]. Для получения комплекса ингибитора с гепарином использовали гепарин фирмы «СПОФА», комплекс получали по методу [10] при соотношении гепарин:ингибитор, равном 1:1. Полученные продукты проанализированы физико-химическими методами.

Антикоагулянтную активность препаратов определяли общепринятым методом, литическую активность — на нестабилизированных пластинках фибрина методом [5]. Для доказательства комплексобразования между гепарином и ингибитором использовали метод пересекающегося электрофореза [15]. Исследовали физико-химические свойства препаратов, включая спектральные характеристики в ультрафиолетовой и инфракрасной областях спектра. Спектрофотометрирование 0,5 % комплекса и его составных частей в эквивалентных количествах проводили на регистрирующем спектрофотометре "Unicam SP-8000" в кюветках 3 мл в диапазоне длин волн 220—350 нм (препараты готовили в фосфатном буфере рН 7,4). На приборе ИКС-29 (СССР) по принятой в лаборатории методике нижепером Н. П. Основой были сняты инфракрасные спектры твердых препаратов гепарина, белка-ингибитора и продукта их взаимодействия и сопоставлены структурные особенности комплекса и его составных частей. Инфракрасные спектры препаратов интерпретированы на основании данных литературы [1, 12].

Для анализа гомогенности препарата ингибитора из ткани селезенки применяли метод электрофореза в геле полиакриламида с додецилсульфатом натрия [13].

### Результаты и обсуждение

Полученный нами препарат ИНФ обнаруживал при электрофорезе в геле полиакриламида в присутствии додецилсульфата натрия только одну полосу, что указывало на относительную гомогенность полученного препарата. Следует отметить, что экстракт из тка-

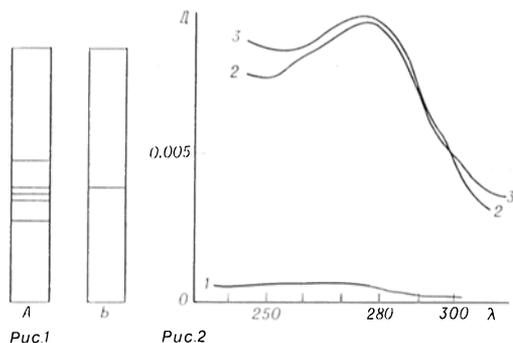


Рис. 1. Электрофореграмма экстракта селезенки (А) и белкового ингибитора, выделенного из ткани селезенки (В).

Рис. 2. Спектры поглощения в УФ-области. 1 — гепарин, 2 — ИНФ, 3 — комплексе гепарин — ИНФ.

ни селезенки, из которого выделяли в последующем фракцию ингибитора, при электрофоретическом разделении содержал 5 фракций, окрашивающихся 0,125 % раствором кумаси (рис. 1). По данным электрофореза в геле полиакриламида, молекулярная масса ИНФ из ткани селезенки находилась в пределах 13 000—15 000 дальтон (см. рис. 1).

Образование комплексов гепарин — ИНФ подтверждено методом пересеченияющегося электрофореза. Гепарин в месте контакта с ингибитором обнаруживал изгиб полосы при окрашивании 0,33 % раствором Азура II в метаноле. Сравнение УФ-спектров полученного комплекса гепарин — ИНФ со спектрами гепарина и ИНФ в эквивалентных по отношению к комплексу дозах (рис. 2) также свидетельствует о наличии комплексобразования, поскольку спектр поглощения гепарина и ИНФ отличались от спектра поглощения комплекса. УФ-спектр поглощения комплекса имеет максимум поглощения в области 276 нм, спектр поглощения ИНФ несколько смещается в область 278 нм. Наличие максимумов поглощения в указанной области обусловлено поглощением боковых групп остатков 3 аминокислот — фенилаланина, тирозина и триптофана.

Комплексы гепарин — ИНФ получали при взаимодействии эквимольных количеств гепарина и ИНФ. В препаратах комплексов, полученных при весовых соотношениях гепарин — ИНФ, равных 1:1 или 3:1, установлена антикоагулянтная активность, соответ-

Таблица 1  
Физиологические свойства ИНФ из ткани селезенки и его комплекса с гепарином ( $M \pm m$ )

Исследуемое вещество	Антикоагулянтная активность, с	Неферментативная фибринолитическая активность, мм <sup>2</sup>
0,85 % раствор NaCl	100 ± 1,0 (10)	0 ± 0 (12)
Гепарин, мкг/мл	155 ± 4,8 (8)	0 ± 0 (8)
250	< 0,001	> 0,5
ρ	Более 5 мин нет сгустка (7)	0 ± 0 (7)
750	< 0,001	> 0,5
ρ	< 0,001	> 0,5
ИНФ (250 мкг/мл)	97 ± 5,1 (10)	0 ± 0 (7)
ρ	> 0,5	> 0,5
Комплексы гепарин — ИНФ при соотношениях:		
1:6 (73 мкг гепарина + 438 мкг гепарина)	100 ± 3,9 (7)	0 ± 0 (7)
ρ	> 0,5	> 0,5
1:3 (125 мкг гепарина + 375 мкг ИНФ)	100 ± 1,5 (8)	0 ± 0 (8)
ρ	> 0,5	> 0,5
1:1 (250 мкг гепарина + 250 мкг ИНФ)	156 ± 7,7 (8)	3,5 ± 2,5 (8)
ρ	< 0,001	< 0,05
3:1 (750 мкг гепарина + 250 мкг ИНФ)	Более 5 мин нет сгустка (8)	9,3 ± 2,7 (8)
ρ	< 0,001	< 0,01
12:1 (460 мкг гепарина + 40 мкг ИНФ)	Более 5 мин нет сгустка (6)	0 ± 0 (7)
ρ	< 0,001	> 0,5

Примечание. Здесь и в табл. 2: статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб контроля с 0,85 % NaCl; в скобках — число исследований.

ствующая антикоагулянтной активности эквивалентных по отношению к комплексу доз гепарина; неферментативная фибринолитическая активность либо отсутствовала, либо была настолько мала (зоны лизиса до 10 мм<sup>2</sup>), что ею можно было пренебречь. Следовательно, полученный комплекс в

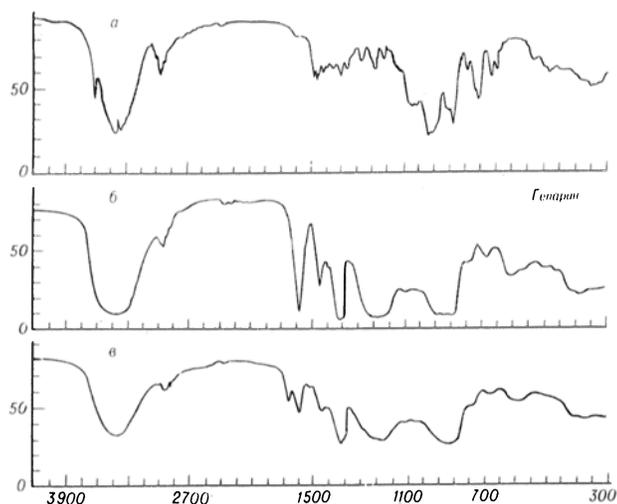


Рис. 3. Спектры поглощения в ИК-области; ИНФ (а), гепарина (б) и комплекса гепарин — ИНФ (в).

отличие от уже известных комплексных соединений гепарина с белками крови [6] был неактивен в фибринолитическом отношении (табл. 1). Комплекс гепарин — ИНФ не оказывал ингибиторного действия на ферментативный фибринолиз плазмы и не способствовал уменьшению времени рекальцификации плазмы в отличие от эквивалентных доз ИНФ (табл. 2).

Для исследования структурных особенностей белка — ИНФ, выделенного из ткани селезенки крыс, а также взаимодействия гепарина и данного

белка, была сделана попытка применения ИК-спектроскопии. На рис. 3 представлена фракция ИНФ — белка с молекулярной массой 13 000—15 000 дальтон, высушивание которой проходило в сравнительно мягких условиях в течение 5 ч при температуре 0—4 °С. ИК-спектр поглощения этого ИНФ характеризуется большим набором полос поглощения, которые можно достоверно интерпретировать и которые свойственны белковой молекуле [1, 12]. ИК-спектр гепарина (см. рис. 3, б) показывает, что данный препарат высокомолекулярен и полидисперсен (гепарин — мукополисахарид с молекулярной массой 4 000—37 000 дальтон), поэтому интерпретация его спектра условна. Можно идентифицировать наличие максимумов поглощения, соответствующих валентным колебаниям следующих групп:  $\text{SO}_2\text{N}$  ( $1150 \text{ см}^{-1}$ ),  $\text{SO}_3$  ( $1150, 1050, 800, 600 \text{ см}^{-1}$ ),  $\text{COO}^-$  (сильная полоса в области  $1620 \text{ см}^{-1}$ ), пептидной  $\text{NH}^+$  с водородной связью (в области  $3200 \text{ см}^{-1}$ ) и других группировок, присутствующих в структуре молекулы гепарина. ИК-спектры комплекса гепарина с белком из ткани селезенки характеризовались в основном наличием полос поглощения, которые тождественны ИК-максимумам поглощения на ИК-спектре гепарина, в то же время проявляется хорошо выраженная полоса поглощения  $\text{COOH}$ -группы ( $1720 \text{ см}^{-1}$ ).

Экспериментально было установлено при определении реакции среды в растворах белка — ИНФ и комплекса гепарин — ИНФ, что при взаимодействии гепарина с ИНФ рН снижается

Таблица 2

Влияние ИНФ из селезенки и его комплекса с гепарином на время рекальцификации и ферментативный фибринолиз плазмы в условиях *in vitro* ( $M \pm m$ )

Условия опыта	Время рекальцификации плазмы, с	Зоны лизиса на нестабилизированном фибрине в присутствии плазмы и в-аминокaproновой кислоты, мм <sup>2</sup>
Контроль с 0,85 % NaCl	$85 \pm 2,5$ (12)	$49 \pm 5$ (8)
ИНФ (500 мкг/мл) <i>p</i>	$47 \pm 3,1$ (15) $< 0,001$	$0 \pm 0$ (10) $< 0,001$
Контроль с гепарином (500 мкг/мл) <i>p</i>	Более 3 мин нет сгустка (6) $< 0,001$	$49 \pm 3,8$ (6) $> 0,5$
Комплекс гепарин — ИНФ (500 мкг гепарина + 500 мкг ИНФ) <i>p</i>	Более 3 мин нет сгустка (8) $< 0,001$	$49 \pm 4,0$ (8) $> 0,5$

в кислую сторону: рН ИНФ составлял 6,6—6,7, при взаимодействии его с гепарином рН среды снизился до 6,0—6,1. Следовательно, комплексообразование гепарина с ИНФ сопровождается появлением дополнительных кислых группировок в препаратах комплексов.

Итак, показано, что в присутствии гепарина свойства ИНФ резко изменяются. Весьма вероятно, что образуется новое соединение в результате взаимодействия гепарина и ингибитора из ткани селезенки, свидетельством чего являются данные, полученные при использовании метода пересекающегося электрофореза, прямой ультрафиолетовой и инфракрасной спектроскопии. Анализ ультрафиолетовых спектров поглощения белка из ткани селезенки и его комплекса с гепарином показал, что наличие максимумов поглощения в области 276—278 нм обусловлено поглощением боковых групп остатков фенилаланина, тирозина и триптофана. По данным ИК-спектроскопии, спектр поглощения вновь образованного комплекса соответствует в основном спектру поглощения одной из составных частей комплекса — гепарина. Это согласуется с результатами исследований, полученными при изучении и сравнении физиологических свойств комплекса и его составных частей (см. табл. 1 и 2). Комплекс гепарин — ИНФ обладает антикоагулянтной активностью и не проявляет неферментативных фибринолитических свойств, как и гепарин. Следовательно, по данным о физиологических и физико-химических свойствах этого комплекса, полученных с использованием различных методов, можно сделать выводы о том, что, по-видимому, механизм блокады неферментативного фибринолиза ингибитором из ткани селезенки обусловлен его взаимодействием с гепарином, к которому он имеет большое сродство. С большой достоверностью можно полагать, что образуется комплексное соединение, в котором исчезают свойства ИНФ и в полной мере проявляется антикоагулянтная активность. Следовательно, в данных условиях экспери-

мента гепарин является блокатором белкового ИНФ из ткани селезенки.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Беллами Л. Инфракрасные спектры сложных молекул: Пер. с англ. — М., 1963.
2. Блошанский Ю. М., Подольская О. В., Ляпина Л. А. и др. // Система свертывания крови и фибринолиз. — Саратов, 1975. — Т. 2. — С. 577—578.
3. Кудряшов Б. А. Биологические проблемы регуляции жидкого состояния крови и ее свертывания — М., 1975.
4. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А. // Вестн. Моск. ун-та: Сер. биол. — 1973. — № 4. — С. 3—25.
5. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А. // Лаб. дело. — 1971. — № 6. — С. 326—329.
6. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А. // Биохимия животных и человека. — Киев, 1982. — Вып. 6. — С. 64—73.
7. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А., Молчанова Л. В., Рустамова Б. А. // Вопр. мед. химии. — 1970. — № 2. — С. 161—164.
8. Ляпина Л. А. // Система свертывания крови и фибринолиз. — Саратов, 1975. — Т. 1. — С. 109—110.
9. Ляпина Л. А., Азиева Л. Д. // Физiol. журн. СССР. — 1985. — Т. 71, № 7. — С. 916—920.
10. Ляпина Л. А., Азиева Л. Д. // Биохимия. — 1985. — Т. 50, № 1. — С. 69—73.
11. Ульянов А. М., Аммосова Я. М., Кудряшов Б. А. // Вопр. мед. химии. — 1974. — № 6. — С. 611—614.
12. Чиргадзе Ю. П. Инфракрасные спектры и структура полипептидов и белков. — М., 1965.
13. Farbank S. G., Steck T. L., Wallach F. U. // Biochemistry (Wash.). — 1971. — Vol. 13. — P. 2606—2616.
14. Koh T. Y., Barucha K. R. // Pat. Office 3.577.534, 1971 USA.
15. Nakamura S., Takeo K., Tanaka K., Ueta S. // Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. — 1960. — Bd 318. — S. 115—121.

Поступила 07.01.86

#### COMPLEXES OF HEPARIN AND THE INHIBITOR OF NON-ENZYMATIC FIBRINOLYSIS

L. A. Lyapina, Ya. M. Ammosova

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

Formation of complexes between heparin and protein inhibitor of non-enzymatic fibrinolysis, isolated from spleen tissue of healthy animals, was demonstrated by means of cross electrophoresis, UV- and IR-spectrophotometries. Suppression of the spleen inhibitor activity towards non-enzymatic fibrinolysis occurred via its complex-formation with heparin, where the inhibitor aminogroups reacted with sulfo- or carboxyl groups of heparin.

А. В. Долгов, М. И. Душкин

## АКТИВНОСТЬ ХОЛЕСТЕРОЛЭСТЕРАЗ В АОРТЕ И ПЕЧЕНИ КРЫСЫ ПРИ СТИМУЛЯЦИИ И БЛОКАДЕ β-АДРЕНорецепторов

Институт терапии СО АН СССР, Новосибирск

Изменения содержания свободного холестерина (СХС) и его эфиров (ЭХС) в сыворотке крови экспериментальных животных под влиянием катехоламинов свидетельствует о существенной роли β-адренорецепторов в регуляции холестеринового обмена [4, 13].

Хотя известно, что функция β-адренергических рецепторов реализуется с участием аденилатциклазной системы [14], конкретные механизмы изменения активности ферментов холестеринового метаболизма изучены недостаточно. В то же время твердо установлена прямая зависимость между содержанием ЭХС и уровнем циклического АМФ (цАМФ) в гладкомышечных клетках, полученных из атеросклеротических бляшек аорты человека [17]. В последнее время появились сообщения о повышении активности лизосомной и цитоплазматической холестеролэстераз — ХЭ (КФ 3.1.1.13) при стимуляции аденилатциклазной системы простагландинами [10] и инфедрином [8] в гладкомышечных клетках аорты.

Целью настоящей работы явилось изучение роли лизосомной кислой и цитоплазматической нейтральной ХЭ в изменении содержания ХС в ткани аорты и печени крысы при стимуляции β-адренергических рецепторов эфедрином и блокаде их пропранололом.

### Методика

В опытах использовали 60 крыс-самцов линии Вистар с массой тела 180—200 г, содержавшихся в обычных условиях вивария. Животные были разделены на 4 группы (по 15 крыс в каждой группе). Животным 1-й группы внутривенно вводили солянокислый эфедрин в дозе 1 мг на 100 г массы тела, животным 2-й группы — пропранолол гидрохлорид ("Germed", ГДР) в дозе 2,5 мг на 100 г массы тела, животным 3-й группы одновременно вводили эфедрин и пропранолол в дозе 1 мг и 2,5 мг соответственно на 100 г массы. Контрольным животным (4-я группа) одновременно и тем же способом вводили физиологический раствор.

Крыс декапитировали спустя 12 ч после введения препаратов. За 24 ч до забоя их

лишали пищи при свободном доступе к воде. Печень промывали от крови и гомогенизировали в 0,25 М сахарозе с ЭДТА pH 7,4 в механическом стеклянном гомогенизаторе с тefлоновым пестиком в течение 60 с. Аорту крыс выделяли на участке от сердца до бифуркации, тщательно освобождали от окружающей ткани и адвентиции, измельчали микротомом в криостате при  $-20^{\circ}\text{C}$  и толщине среза 10 мкм с последующей гомогенизацией в стеклянном гомогенизаторе в растворе 5 мМ трие-НСl, 1 мМ ЭДТА pH 7,4. Полученные 5% гомогенаты печени и аорты использовали для определения активности ферментов и содержания липидов.

Активность лизосомной (pH 4,2) и цитоплазматической (pH 7,5) ХЭ определяли описанным ранее радиоизотопным методом [5], используя в качестве субстрата холестерол (1- $^{14}\text{C}$ )-олеат ("Amersham", Англия) в составе липосом, содержащих лецитин ("Calbiochem", США) и холестерололеат в соотношении 66:1. Условия инкубации и подсчет радиоактивности подробно описаны в предыдущих работах [1, 2]. Активность ферментов выражали в наномолях гидролизованного холестерололеата в 1 мин на 1 мг белка. Белок определяли методом [14].

Фракционирование липидов, экстрагируемых из сыворотки крови и гомогенатов печени и аорты по методу [7], осуществляли методом тонкослойной хроматографии на силикагеле Н ("Ferak", ФРГ) в двух системах растворителей: гексан — диэтиловый эфир — уксусная кислота в объемном соотношении 60:40:1 и 90:10:1. В пятнах, соответствующих СХС и ЭХС, концентрацию стерина определяли по методу [18] после переэкстракции хлороформом.

Полученные данные обработаны методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

Анализ полученных результатов свидетельствует о наличии вполне закономерных изменений активности лизосомной и цитоплазматической ХЭ в ответ на стимуляцию β-адренергических рецепторов однократным введением эфедрина. Как видно из рис. 1, при воздействии эфедрина активность цитоплазматической ХЭ была выше в 1,3 раза ( $P < 0,01$ ) в аорте и в 2,6 раза ( $P < 0,001$ ) в печени крыс по сравнению с соответствующими значениями у контрольных животных.

Предварительное введение пропранолола полностью снимало этот акти-

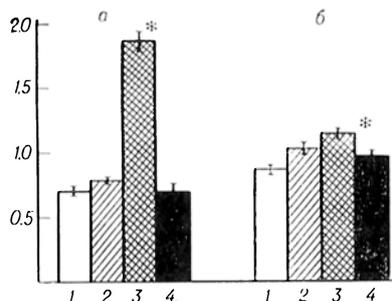


Рис. 1. Активность цитоплазматической ХЭ в печени (а) и аорте (б) крыс при стимуляции и блокаде  $\beta$ -адренорецепторов.

По оси абсцисс — группы животных; по оси ординат — активность фермента,  $\mu\text{моль/мин}$  на 1 мг белка. Звездочка — достоверные различия с контролем ( $P < 0.05$ ).

вирующий эффект эфедрина в печени и аорте крыс, что может указывать на существование прямой связи между повышением активности цитоплазматической ХЭ и стимуляцией  $\beta$ -адренорецепторов. Как было установлено ранее [11], нейтральная ХЭ присутствует в клетках в виде голофермента, переходящего в активированное состояние при увеличении внутриклеточной концентрации цАМФ. Вероятно, этот же механизм лежит в основе установленного нами активирующего влияния эфедрина на активность нейтральной ХЭ в печени и аорте крысы.

Активность лизосомной ХЭ при однократном введении эфедрина повышалась в 2,3 раза ( $P < 0,001$ ) в печени и в 1,6 раза ( $P < 0,001$ ) в аорте по сравнению с подобными показателями контрольных животных (рис. 2). Как видно из рис. 2, предварительное введение пропранолола полностью предотвращает активирующий эффект адреномиметика на активность кислой ХЭ. Это позволяет исключить прямое активирующее влияние эфедрина на лизосомную ХЭ.

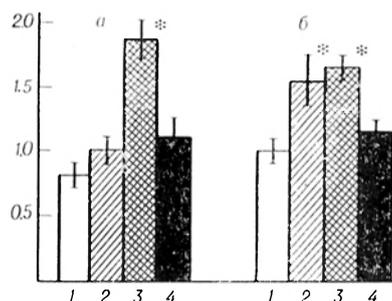


Рис. 2. Активность лизосомной ХЭ в печени (а) и аорте (б) крыс при стимуляции и блокаде  $\beta$ -адренорецепторов.

Обозначения те же, что на рис. 1.

В литературе имеются противоречивые данные о взаимосвязи внутриклеточной концентрации цАМФ с активацией лизосомного аппарата клеток. Так, было показано, что фосфорилирование кислой ХЭ цАМФ-зависимой протеинкиназой *in vitro* не вызывает изменения гидролитической активности ХЭ [11]. В то же время при введении простагландинов [10] и нифедина [8] в гладкомышечных клетках аорты кролика одновременно с увеличением содержания цАМФ отмечался значительный рост активности лизосомной ХЭ. Не исключено, что активирующее влияние аденيلاتциклазной системы, стимулированной катехоламинами, на лизосомный аппарат клеток реализуется только *in vivo*. Косвенным подтверждением этого предположения могут являться данные работы [3] об увеличении удельной активности лизосомных ферментов в печени крысы при воздействии адреналина.

Как показано в таблице, однократное введение эфедрина вызывало в наших условиях эксперимента снижение уровня СХС и ЭХС в сыворотке крови крысы. Введение пропранолола предот-

Содержание холестерина и его эфиров в печени и крови и общего холестерина в аорте крыс при воздействии эфедрина и пропранололом ( $M \pm m$ )

Группа животных	Липиды сыворотки крови, мг/дл			Липиды печени, на 1 мкг/мг белка			Содержание ОХС в аорте, на 1 мкг/мг белка
	СХС	ЭХС	ОХС	СХС	ЭХС	ОХС	
1-я	9,37 ± 0,4**	50,8 ± 3,34**	59,9 ± 4,1**	8,6 ± 0,5	5,4 ± 0,3***	13,6 ± 0,6**	8,64 ± 0,92**
2-я	17,5 ± 0,6	94,2 ± 3,82**	111,1 ± 4,5	6,4 ± 0,5*	3,0 ± 0,26	9,4 ± 0,4	10,32 ± 0,6
3-я	18,4 ± 0,9	58,9 ± 2,9*	76,9 ± 3,75	10,6 ± 0,3*	2,8 ± 0,4	12,9 ± 0,87	12,2 ± 0,87
4-я (контрольная)	18,1 ± 0,9	71,8 ± 5,2	90,7 ± 6,5	8,5 ± 0,4	2,9 ± 0,3	11,2 ± 0,4	12,65 ± 0,95

Примечание. Достоверность различий дана по отношению к контролю: одна звездочка —  $P < 0,05$ , две —  $P < 0,01$ , три —  $P < 0,001$ .

вращало этот эффект в отношении СХС, незначительно влияя на изменение уровня ЭХС. В то время стимуляция  $\beta$ -адренорецепторов приводила к перераспределению содержания общего ХС (ОХС) в аорте, сыворотке крови и печени. Если в аорте уровень ОХС при однократном воздействии эфедрином снижался, то в печени в этих условиях отмечался его достоверный рост, преимущественно за счет увеличения содержания ЭХС. Концентрация ОХС в аорте и ЭХС в печени не изменялась при воздействии эфедрином на фоне блокады  $\beta$ -адренергических рецепторов пропранололом. Интересно отметить, что при одновременном воздействии эфедрином и пропранололом наблюдалось достоверное увеличение уровня СХС в печени (см. таблицу).

Изменение содержания ОХС в сыворотке крови, печени и аорте при однократном введении эфедрина связано, по-видимому, с одной стороны, с активацией ХЭ в аорте и печени, с другой — с перераспределением концентрации ОХС между периферическими тканями и печенью. Так, наблюдаемое нами снижение концентрации ОХС в ткани аорты и повышение содержания ЭХС в ткани печени при стимуляции  $\beta$ -адренорецепторов, вероятно, свидетельствуют об усилении оттока ХС из аорты в печень на фоне увеличения активности ХЭ в ткани аорты.

В настоящее время известно, что нарушение активности ХЭ [1, 2] может приводить к накоплению ЭХС в клетках при различных повреждающих воздействиях [9, 12]. Некоторые авторы отмечают изменение активности лизосомной и цитоплазматической ХЭ при развитии спонтанного [6] и экспериментального [16] атеросклероза в аорте. Очевидно, одним из возможных путей коррекции нарушений метаболизма ЭХС в сосудистой стенке является повышение активности ХЭ [8]. В то же время направленный поиск препаратов, нормализующих активность ключевых ферментов холестеринового метаболизма, должен быть основан на знании механизмов регуляции их активности на уровне организма. Дозированная стимуляция  $\beta$ -адренергических рецепторов катехоламинами может оказаться, по-видимому, одним из средств целенаправлен-

ной регуляции активности лизосомной и цитоплазматической ХЭ.

Таким образом, полученные нами результаты, а также данные других исследователей свидетельствуют об активном вовлечении  $\beta$ -адренергических рецепторов в метаболизм ЭХС в тканях. В результате проведенных нами исследований установлено, что стимуляция  $\beta$ -адренергических рецепторов при однократном введении эфедрина вызывает у крыс повышение активности лизосомной и цитоплазматической ХЭ в печени и аорте, уменьшение концентрации ОХС в ткани аорты и сыворотке крови и увеличение концентрации ЭХС в печени. Авторы выражают благодарность И. Ю. Морозовой за квалифицированную техническую помощь.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Душкин М. И., Долгов А. В., Пикетин Ю. П. // Бюл. экпер. биол. — 1985. — № 5. — С. 573—575.
2. Морозова И. Ю., Морозов А. В., Душкин И. М. и др. // Вопр. мед. химии. — 1985. — № 6. — С. 60—62.
3. Панин Л. Е., Климентьева Т. К., Маянская Н. П. // Пробл. эндокринолог. — 1982. — № 11. — С. 70—73.
4. Barret A. M. // J. Endocr. — 1966. — Vol. 36. — P. 301—316.
5. Brecher P., Chobanian J., Small D. M., Chobanian A. V. // J. Lipid. Res. — 1976. — Vol. 17. — P. 239—247.
6. Davis H. R., Glagov S., Zarins C. K. // Atherosclerosis. — 1985. — Vol. 55. — P. 205—215.
7. Folch J., Lees M., Sranley C. S. // J. biol. Chem. — 1957. — Vol. 226. — P. 497—509.
8. Etingin O. R., Hajjar D. P. // J. clin. Invest. — 1985. — Vol. 75. — P. 1554—1558.
9. Ecsedi G. G., Amanuma K., Imanaka T. et al. // Biochem. Int. — 1985. — Vol. 10. — P. 337—342.
10. Hajjar D. P., Wenksler B. B. // J. Lipid Res. — 1983. — Vol. 24. — P. 1176—1185.
11. Hajjar D. R. P., Minick C. R., Fowler S. // J. biol. Chem. — 1983. — Vol. 258. — P. 192.
12. Hajjar D. P., Falcone D. J., Fabricant C. G. // Ibid. — 1985. — Vol. 260. — P. 6124—6128.
13. Kunihara M., Oshima T. // J. Lipid Res. — 1983. — Vol. 24. — P. 639—644.
14. Kunitada S., Ui M. // Europ. J. Pharmacol. — 1978. — Vol. 49. — P. 169—176.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
16. Subbiach M. T. R. // Steroids. — 1979. — Vol. 33. — P. 305—315.
17. Tertov V. V., Orekhov A. N., Repin V. S., Smirnov V. N. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1982. — Vol. 109. — P. 1228—1233.
18. Zak B., Dichenman R., Whilte E. et al. // Amer. J. clin. Path. — 1954. — Vol. 24. — P. 1307.

Поступила 07.01.86

# ACTIVITY OF CHOLESTEROL ESTERASES IN AORTA AND LIVER TISSUE OF RATS AFTER STIMULATION OR INHIBITION OF $\beta$ -ADRENERGIC RECEPTORS

A. V. Dolgov, M. I. Dushkin

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

Activities of lysosomal and cytoplasmic cholesterol esterases and cholesterol content in rat blood serum, liver tissue and aorta were studied after administration of ephedrine and propranolol. The ephedrine-induced lipolytic

effect was fully inhibited by propranolol. The correlation between stimulation of  $\beta$ -adrenergic receptors and activation of lipolytic enzymes was found.

УДК 612.017.4-064:[612.397:547.952

Э. В. Дятловицкая, Е. В. Синицына Т. Е. Ключарева, В. А. Матвеева,  
Л. Д. Бергельсон

## ИНГИБИРОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРОВ ГЛИКОСФИНГОЛИНИДАМИ. ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ ОЛИГОСАХАРИДНЫХ ЦЕПЕЙ

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, ВОНЦ АМН СССР,  
Москва

В последние годы значительное внимание исследователей привлекает проблема противоопухолевого иммунитета. В частности, большой интерес представляет вопрос о механизмах, с помощью которых опухоль «ускользает» от надзора иммунной системы хозяина-опухоленосителя. Было высказано предположение, что возможный механизм основан на воздействии на иммунокомпетентные клетки фрагментов плазматической мембраны, «сбрасываемых» в среду опухолевыми клетками [12]. Было показано, что тимоциты [6] и опухолевые клетки [4, 10, 13] освобождают во внеклеточную среду значительную часть ганглиозидов. Некоторые из этих ганглиозидов обладали свойством ингибировать цитотоксическую активность (ЦТА) эффекторных клеток селезенки мышей [3] и естественных киллеров (НК-клеток) сирийских хомяков [2]. Особенно сильный ингибирующий эффект вызывали ганглиозиды, в молекулу которых входила олигосахаридная цепь Lac (по номенклатуре гликосфинголинидов, рекомендованной комиссией IUPAC—IUB [7]). Было также установлено, что НК-чувствительные и НК-резистентные клетки-мишени отличаются друг от друга по составу ганглиозидов [3]. В связи с этим представляло интерес выяснить, как влияет изменение строения олигосахаридной цепи гликосфинголинидов на их свой-

ство блокировать ЦТА естественных киллеров. С этой целью в настоящей работе проведено сравнительное исследование ингибирующего действия ряда ганглиозидов и их асиалонпроизводных, содержащих олигосахаридные цепи Lac, GgOsc<sub>3</sub> и GgOsc<sub>4</sub>, на ЦТА НК-клеток сирийских хомяков.

### Методика

Ганглиозиды выделяли из тимуса теленка, мозга крупного рогатого скота, печени крысы, сухого молока, клеток лимфомы EL-4 экстракцией смесью хлороформ—метанол (2:1 и 1:2) с последующей хроматографией липидного экстракта на ДЭАЭ-сефадексе А-25 и силикагеле по методу [1] с небольшими модификациями.

НК-клетки выделяли по ранее описанному методу [5] из периферической крови сирийских хомяков путем отделения от других клеток центрифугированием в смеси фикол—верографии, пропусканием обогащенной НК-клетками фракции через колонку с нейлоновой ватой и последующим центрифугированием в градиенте плотности Перколала. Мишенями служили клетки лимфомы человека MOLT-4.

ЦТА НК-клеток измеряли как указано ранее [5] — в присутствии или в отсутствие ганглиозидов. Соотношение эффекторных клеток и клеток-мишеней составляло 100:1 (число эффекторных клеток в лунке —  $1 \times 10^6$ ). Гликосфинголиниды добавляли в количестве 1,25; 2,5; 5 и 10 нмоль в лунку (в 10% водно-метанольном растворе) и смесь инкубировали в течение 18 ч. В качестве контроля в каждом опыте исследовали ЦТА НК-клеток в присутствии соответствующего количества 10% водного метанола и исходных НК-клеток. Результаты опытов оценивали по проценту ингибирования ЦТА:

Ингибирование ЦТА естественных киллеров сирийских хомяков экзогенными ганглиозидами и их асиналоизопродуктами, % (приведены средние значения из 4 экспериментов)

№ п/п	Гликофинголипиды	Концентрация гликолипида в среде, нмоль/мл			
		6,25	12,5	25,0	50,0
1	LacCer	13±1	23±6	31±2	39±2
2	NeuAcLacCer	31±1	60±2	77±1	86±9
3	NeuGcLacCer	17±8	48±7	66±6	78±5
4	(NeuAc) <sub>2</sub> LacCer	12±4	26±3	35±10	61±14
5	(NeuGc) <sub>2</sub> LacCer	13±3	19±1	38±7	46±5
6	GgOse <sub>3</sub> Cer	5±1	8±1	18±2	30±9
7	NeuGcGgOse <sub>3</sub> Cer	6±1	6±1	20±3	36±2
8	(NeuAc) <sub>2</sub> GgOse <sub>3</sub> Cer	13±2	24±4	30±2	63±2
9	GgOse <sub>4</sub> Cer	9±2	12±0	13±1	29±3
10	II <sup>3</sup> NeuAcGgOse <sub>4</sub> Cer	2±2	3±1	12±2	9±1
11	II <sup>3</sup> (NeuAc) <sub>2</sub> GgOse <sub>4</sub> Cer	17±2	21±4	24±4	38±1
12	II <sup>3</sup> , IV <sup>3</sup> (NeuAc) <sub>2</sub> GgOse <sub>4</sub> Cer	19±1	25±3	36±9	50±2
13	II <sup>3</sup> (NeuAc) <sub>2</sub> , IV <sup>3</sup> NeuAc-GgOse <sub>4</sub> Cer	21±1	30±1	39±3	74±4
14	IV <sup>3</sup> NeuAc-nLcOse <sub>4</sub> Cer	15±2	18±1	21±4	47±1

% ингибирования =  $1 - (\% \text{ ЦТА исходных НК-клеток} - \% \text{ ЦТА НК-клеток в присутствии ганглиозидов}) / \% \text{ ЦТА исходных НК-клеток} \times 100$ .

Результаты и обсуждение

Как видно из таблицы, взаимодействие гликофинголипидов с НК-клетками явно зависит от строения олигосахаридной цепи. При введении в инкубационную среду нейтральных гликофинголипидов LacCer, GgOse<sub>3</sub>Cer и GgOse<sub>4</sub>Cer (соединения 1, 6, 9) лишь в первом случае наблюдалось небольшое понижение НК-активности при низких концентрациях гликолипида. В случае же GgOse<sub>3</sub>Cer и GgOse<sub>4</sub>Cer ингибирование ЦТА отмечалось лишь при концентрациях гликолипидов выше 25 нмоль/мл.

Введение остатков сialовых кислот в молекулу LacCer вызывало резкое возрастание ингибирующего эффекта. При этом ганглиозид, содержащий остаток N-ацетилнейраминной кислоты, — NeuAcLacCer оказался более активным, чем соответствующий ганглиозид NeuGcLacCer, в молекулу которого входил остаток N-гликолилнейраминной кислоты. В то же время моносialоганглиозиды NeuGcGgOse<sub>3</sub>Cer и NeuAcGgOse<sub>4</sub>Cer по своему влиянию на НК-активность мало отличались от соответствующих нейтральных гликолипидов.

Дисialоганглиозиды (NeuAc)<sub>2</sub>LacCer и (NeuGc)<sub>2</sub>LacCer оказывали менее выраженное ингибирующее действие на ЦТА естественных киллеров, чем соответствующие моносialоганглиозиды. В то же время дисialоганглиозиды

(NeuAc)<sub>2</sub>GgOse<sub>3</sub>Cer, II<sup>3</sup> (NeuAc)<sub>2</sub>GgOse<sub>4</sub>Cer и II<sup>3</sup>, IV<sup>3</sup> (NeuAc)<sub>2</sub>×GgOse<sub>4</sub>Cer снижали НК-активность более эффективно, чем соответствующие моносialоганглиозиды. Трисialоганглиозид II<sup>3</sup> (NeuAc)<sub>2</sub>, IV<sup>3</sup> NeuAcGgOse<sub>4</sub>Cer оказывал еще более значительное ингибирующее действие, чем соответствующий дисialоганглиозид.

Полученные результаты показывают, что ингибирующее действие гликофинголипидов на ЦТА естественных киллеров специфически зависит от структуры олигосахаридных цепей. Во-первых, наиболее эффективными ингибиторами являются гликолипиды с короткой углеводной цепью: среди нейтральных гликофинголипидов наибольшую активность проявляет LacCer (соединение 1), среди ганглиозидов — его моносialопродукты 2 и 3 (см. таблицу). Во-вторых, степень ингибирования НК-активности зависит также от строения сialозильного остатка: остаток N-ацетилнейраминной кислоты стимулировал высокий ингибирующий эффект в большей степени, чем остаток N-гликолилнейраминной кислоты (ср. соединения 2 и 3). Наличие в ганглиозидах этой серии второго остатка сialовой кислоты (соединения 4 и 5) уменьшало их ингибирующую способность, причем и в этом случае степень супрессии зависит от строения сialозильного остатка. Моносialоганглиозиды, содержащие олигосахаридные цепи GgOse<sub>3</sub>, GgOse<sub>4</sub> или nLcOse<sub>4</sub> (соединения 7, 10 и 14), вызывали слабый ингибирующий эффект или он практически отсутствовал.

Однако введение второго сиалозильного остатка в соединения этих серий увеличивало супрессорную способность ганглиозидов (соединения 8, 11, 12). При этом следует отметить, что степень ингибирования зависела не только от количества сиалозильных остатков в молекуле, но и от места их связывания в олигосахаридной цепи (соединения 11 и 12).

Сопоставляя все полученные данные, можно сделать вывод, что среди исследованных гликофинголинидов наибольший ингибирующий эффект вызывают ганглиозиды с короткой углеводной цепью Lac и остатком сиаловой кислоты, находящимся в конце цепи. Удлинение олигосахаридной цепи на один (GgOse<sub>3</sub>) или два (GgOse<sub>4</sub>) углеводных остатка приводит к уменьшению ингибирующей способности соответствующих сиалопроизводных. При этом следует отметить, что сиалозильный остаток в NeuGcGgOse<sub>3</sub>Cer и NeuAcGgOse<sub>4</sub>Cer связан с неконцевым углеводным фрагментом. В случае удлинения цепи SiaLacCer за счет присоединения второго остатка сиаловой кислоты наблюдается также ослабление ингибирующей способности гликолипида. В то же время в серии соединений, содержащих более длинные углеводные цепи GgOse<sub>3</sub> или GgOse<sub>4</sub>, наличие в молекуле двух или трех остатков сиаловых кислот приводит к повышению способности гликолипида ингибировать ЦТА естественных киллеров. При этом больший эффект вызывают соединения, в которых сиалозильный остаток связан с концевой галактозой (ср. соединения 12, 13 и 11).

Поскольку наиболее активный гликофинголипид SiaLacCer является основным ганглиозидным компонентом нормальной крови, возникает вопрос, почему этот ганглиозид не блокирует активность естественных киллеров в нормальной крови человека и животных? Результаты, приведенные в таблице, показывают, что ингибирование НК-активности зависит от концентрации ганглиозидов в среде. Наиболее высока супрессорная активность ганглиозидов при концентрации выше 25 нмоль/мл. Из данных литературы известно, что содержание липидно-связанных сиаловых кислот в нормальной крови человека и животных меньше 20 нмоль/мл [9, 11, 14, 15], в то

время как в крови опухоленосителей оно возрастает в 2—2,5 раза [8, 9, 11, 14]. Поэтому полученные нами данные о значительном ингибировании ЦТА естественных киллеров при концентрациях выше 25 нмоль/мл свидетельствуют о том, что подобный эффект может наблюдаться при концентрациях ганглиозидов, реально существующих в крови опухоленосителей. Следует также отметить, что именно ганглиозиды NeuAcLacCer и (NeuAc)<sub>2</sub>LacCer, проявляющие наибольшую ингибирующую активность, синтезируются в довольно больших количествах многими опухолевыми клетками. Таким образом, полученные данные приводят к выводу, что повышение концентрации этих ганглиозидов в крови некоторых опухоленосителей может быть одной из причин блокирования противоопухолевого иммунитета при злокачественном росте.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Дятловицкая Э. В., Ахмед-Заде А. // Приклад. биохим. — 1983. — Т. 19, № 3. — С. 399—402.
2. Дятловицкая Э. В., Ключарева Т. Е., Матвеева В. А. и др. // Биохимия. — 1985. — Т. 50, № 9. — С. 1514—1516.
3. Дятловицкая Э. В., Синицына Е. В., Лемновская А. Ф., Бергельсон Л. Д. // Там же. — 1983. — Т. 49, № 3. — С. 432—436.
4. Дятловицкая Э. В., Фомина-Агеева Е. В., Бергельсон Л. Д. // Докл. АН СССР. — 1983. — Т. 271, № 6. — С. 1511—1513.
5. Ключарева Т. Е., Матвеева В. А. // Бюл. экспер. биол. — 1983. — № 9. — С. 86—89; № 10. — С. 86—88.
6. Dyallovitskaya E. V., Sinitsyna E. V., Jung K. et al. // Europ. J. Biochem. — 1983. — Vol. 131. — P. 601—605.
7. The Nomenclature of Lipids // J. Lipid Res. — 1978. — Vol. 19. — P. 114—128.
8. Katopodis N., Hirshaut Y., Geller N., Stock C. C. // Cancer Res. — 1982. — Vol. 42. — P. 5270—5275.
9. Kloppel T. M., Keenan T. W., Freeman M. J., Morre D. J. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1977. — Vol. 74. — P. 3011—3013.
10. Ladisch S., Gillard B., Wong C., Ulsh L. // Cancer Res. — 1983. — Vol. 43. — P. 3808—3813.
11. Portoukalian J., Zwingelstein G., Abdul-Malak N., Dore J.-F. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1978. — Vol. 85. — P. 916—920.
12. Raz A., Goldman R., Yuli I., Inbar M. // Cancer Immunol. Immunother. — 1978. — Vol. 4. — P. 53—59.
13. Shaposhnikova G. I., Prokazova N. V., Buznikov G. A. et al. // Europ. J. Biochem. — 1984. — Vol. 140. — P. 567—570.
14. Skipski V. P., Katopodis N., Prendergast J. S., Stock C. C. // Biochem. biophys.

- Res. Commun. — 1975. — Vol. 67. — P. 1122—1127.  
15. Yu R. K., Ledeen R. W. // J. Lipid Res. — 1972. — Vol. 13. — P. 680—686.

Поступила 08.01.86

#### INHIBITION OF THE CYTOTOXIC ACTIVITY OF NATURAL KILLER CELLS BY GLYCOSPHINGOLIPIDS. EFFECT OF CARBOHYDRATE CHAIN STRUCTURE

*E. V. Dyallovitskaya, E. V. Sinitsina, T. E. Kluchareva, V. A. Matveeva, L. D. Bergelson*

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, All-Union Cancer Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

The ability of various glycosphingolipids to inhibit the cytotoxic activity of natural killer (NK) cells was studied. The inhibitory effect was found to depend on the structure and

concentration of the glycosphingolipids. Gangliosides SiaLacCer inhibited the NK activity most effectively and their inhibitory effect depended on the structure of sialic acids: the N-acetyl form was more active than the N-glycoloyl form. Elongation of the carbohydrate chain decreased the inhibitory effect and monosialogangliosides NeuGcGgOse<sub>3</sub>Cer and NeuAcGgOse<sub>4</sub>Cer were practically inactive. The inhibitory ability of disialogangliosides depended on the structure of the carbohydrate chain as well as on the structure and attachment site of the sialic acids. Previously it was found that ganglioside (NeuAc)<sub>2</sub>LacCer, which is absent or very low in normal blood, is produced by a number of tumors and alongside with NeuAcLacCer is present in elevated amounts in the blood of tumor-bearing subjects. Elevated concentration of these gangliosides in the blood of tumor hosts may inhibit apparently the NK activity and thus contribute to the escape of tumor cells from host immune surveillance.

УДК 616.379-008.64-07:616.681-008.939.633.2-074

*А. М. Тырышкин, Б. Ю. Сальник*

### ОБМЕН АДЕНИННУКЛЕОТИДОВ В ТКАНИ СЕМЕННИКОВ КРЫС В УСЛОВИЯХ АЛЛОКСАНОВОГО ДИАБЕТА

Томский медицинский институт

Нарушение репродуктивной функции у людей и животных при диабете хорошо известно. В многочисленных исследованиях выявлены морфологические изменения в ткани семенников, снижение уровня гонадотропинов в плазме крови и тестостерона в крови и ткани тестикул [9—11]. Возникновение повреждений гаметобразовательной и эндокринной функций органа связано главным образом с нарушениями центральных звеньев гормональной регуляции на уровне синтеза и секреции гонадотропных гормонов гипофиза и соответствующих рилизинг-факторов в гипоталамусе. Эти основные функции тестикул в значительной мере зависят от состояния энергетического обмена органа, поскольку требуют большого количества энергии в виде АТФ. Ранее нами было показано, что при аллоксановом диабете в ткани семенников крыс происходят серьезные нарушения функционирования митохондрий — основных поставщиков энергии в аэробной клетке [5, 6].

В настоящей работе представлены результаты сравнительного изучения энергетического обмена в ткани семенников интактных и диабетических крыс по стационарным концентрациям

адениннуклеотидов и неорганического фосфата ( $\Phi_n$ ).

#### Методика

В экспериментах использовали беспородных белых крыс-самцов с массой тела 200—230 г. Диабет вызывали однократным подкожным введением аллоксана моногидрата ("Reanal", ВНР) из расчета 200 мг на 1 кг массы тела животного. Течение диабета контролировали по уровню глюкозы в крови, который определяли орто-толуидиновым методом. Средняя концентрация глюкозы в крови крыс с аллоксановым диабетом составила 16 ммоль/л (в контроле 5 ммоль/л). После декапитации семенники быстро извлекали и погружали в жидкий азот. Экстракцию адениннуклеотидов проводили 6% HClO<sub>4</sub> (соотношение ткани и кислоты 1:6). Концентрацию АТФ, АДФ, АМФ в кислотных экстрактах определяли энзиматически спектрофотометрическим методом с использованием наборов фирмы "Boehringer" (ФРГ). Содержание  $\Phi_n$  в кислотных экстрактах измеряли по методу [4]. Величину аденилатного энергетического заряда рассчитывали согласно [8]. Потенциал фосфорилирования адениннуклеотидов и отношение действующих масс аденилаткиназы вычисляли, как описано в работе [3]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия *t* Стьюдента.

#### Результаты и обсуждение

В таблице представлены результаты определения концентрации адениннуклеотидов,  $\Phi_n$  и параметры энер-

гетического обмена в ткани семенников интактных и диабетических крыс. В доступной литературе мы не обнаружили сведений о стационарном уровне АТФ, АДФ, АДФ, АМФ и  $\Phi_n$  в ткани семенников крыс в норме. В связи с этим мы сочли необходимым более подробно остановиться на результатах, касающихся содержания компонентов адениловой системы у интактных животных, в сравнении с имеющимися в этом плане данными литературы по ткани печени [3]. В ткани семенников интактных крыс весьма высок уровень АТФ, который составлял 84% от общего внутриклеточного фонда адениннуклеотидов. Содержание АДФ и АМФ относительно невелико и составляло лишь 9 и 7% соответственно от суммарного содержания адениннуклеотидов, тогда как в печени соотношение АТФ, АДФ и АМФ было равно 61, 31 и 8% соответственно. По абсолютным значениям концентрация АТФ в ткани семенников превышала таковую в ткани печени примерно в 3 раза, в то время как уровень АДФ оказался в 2 раза ниже, а содержание АМФ было сопоставимо с таковым в ткани печени. Содержание  $\Phi_n$  в ткани семенников, по нашим данным, было в 4 раза ниже уровня  $\Phi_n$  в печеночной ткани [3]. За счет повышенного уровня АТФ в ткани семенников оказались весьма высокими отношение АТФ/АДФ и потенциал фосфорилирования адениннуклеотидов. Большая величина отношения действующих масс аденилаткиназной реакции свидетельствует о том, что равновесие последней резко смещено в сторону образования АТФ. По-видимому, это специфическая особенность ткани тестикул, в которой, как известно, очень интенсивно идут биосинтетические процессы, такие, как синтез РНК, ДНК и тестостерона, нуждающиеся в постоянном притоке энергии в виде АТФ. О нормальном течении таких реакций косвенно свидетельствует высокая величина энергетического заряда аденилатной системы в наших экспериментах, поскольку известно, что регуляторные ферменты биосинтетических последовательностей, которые потребляют АТФ, обнаруживают очень высокую активность при энергетическом заряде выше 0,85 [8]. Таким образом, ткань семенников хара-

Показатели обмена адениннуклеотидов в ткани семенников крыс в норме и при аллоксановом диабете ( $M \pm m$ )

Группа	АТФ	АДФ	АМФ	$\Phi_n$	АН	АТФ/АДФ	ПФ	ЭЗ	$D_{\text{ак}}$
Контроль	$5,30 \pm 0,64$	$0,54 \pm 0,03$	$0,41 \pm 0,05$	$0,59 \pm 0,05$	$6,29 \pm 0,67$	$9,37 \pm 1,26$	$13,9 \pm 2,1$	$0,88 \pm 0,01$	$5,45 \pm 0,87$
Диабет	$2,44 \pm 0,29$	$0,82 \pm 0,11$	$0,31 \pm 0,02$	$1,12 \pm 0,09$	$3,60 \pm 0,38$	$3,14 \pm 0,41$	$3,0 \pm 0,6$	$0,79 \pm 0,01$	$1,42 \pm 0,28$
P	$< 0,01$	$< 0,05$	0,05*	$< 0,01$	$< 0,01$	$< 0,01$	$< 0,01$	$< 0,01$	$< 0,01$

Примечание. Число опытов в каждой группе равно 6. Содержание АТФ, АДФ, АМФ,  $\Phi_n$  и суммарное содержание адениннуклеотидов (АН) выражено в микромолях на 1 г ткани семенников. Потенциал фосфорилирования (ПФ) адениннуклеотидов равен АТФ: (АДФ+ $\Phi_n$ ), аденилатный энергетический заряд (ЭЗ) -- (АТФ--1/2 АДФ): (АТФ+АДФ+АМФ), отношение действующих масс аденилаткиназы ( $D_{\text{ак}}$ ) -- (АТФ.АМФ):АДФ. Звездочкой отмечена достоверность, рассчитанная с помощью непараметрического критерия Вилкоксона -- Манна -- Уитни.

ктеризуется высоким содержанием АТФ и отношением АТФ/АДФ, большим потенциалом фосфорилирования адениннуклеотидов, высоким энергетическим зарядом аденилатной системы; аденилаткиназная реакция резко сдвинута в сторону образования АТФ. Такие особенности обмена адениннуклеотидов, вероятно, отражают специфику работы органа.

Во II серии экспериментов мы исследовали влияние аллоксанового диабета на обмен адениннуклеотидов и параметры энергетического обмена в ткани семенников крыс. Из таблицы видно, что при аллоксановом диабете значительно изменялись стационарные концентрации АТФ, АДФ, АМФ и  $\Phi_n$ . Так, уровень АТФ при диабете снизился на 54 %, содержание АДФ, наоборот, увеличилось на 52 %, а АМФ снизилось на 24 %, концентрация  $\Phi_n$  резко возросла — почти в 2 раза. Суммарное содержание адениннуклеотидов оказалось на 43 % ниже контрольных значений, главным образом за счет значительного снижения уровня АТФ. Соотношение АТФ, АДФ и АМФ (в процентах от общего внутриклеточного фонда адениннуклеотидов) составило 68:23:9 против 84:9:7 в контроле. При аллоксановом диабете было отмечено снижение величины потенциала фосфорилирования адениннуклеотидов и отношения действующих масс аденилаткиназы в 4 раза, отношения АТФ/АДФ в 3 раза. Величина энергетического заряда аденилатной системы была снижена на 10 %.

Представленные данные свидетельствуют о том, что аллоксановый диабет приводит к существенному нарушению энергоснабжения семенников. Снижение содержания АТФ в ткани в конечном итоге может быть обусловлено двумя факторами: либо повышенным распадом в ходе биосинтетических реакций, либо сниженным уровнем биосинтеза самого аденозинтрифосфата. Судя по данным литературы, в ткани семенников при аллоксановом диабете имеет место угнетение биосинтетических процессов, что выражается в снижении концентрации тестостерона в плазме крови и самом органе [11], угнетение интенсивности стероидогенеза [12], нарушении сперматогенной функции семенников [10]. Наряду с этим ранее

нами было показано существенное нарушение функционирования митохондрий семенников, которые могли быть основной причиной снижения образования АТФ в ходе окислительного фосфорилирования [5, 6]. Учитывая эти факты, можно предположить важную роль последнего в механизме снижения уровня АТФ в ткани семенников диабетических крыс. Высказанное предположение косвенно подтверждается данными работы [8], в которой установлено, что активность регуляторных ферментов биосинтетических реакций, в которых идет потребление АТФ, резко падает при снижении величины аденилатного энергетического заряда с 0,85 до 0,75. Суммарное содержание адениннуклеотидов в клетке отражает функциональное равновесие систем синтеза и распада пуринов и пиримидинов, многочисленных синтетических и катаболических реакций, в том числе реакций обмена нуклеиновых кислот. При аллоксановом диабете в селезенке крыс отмечено снижение суммарного содержания адениннуклеотидов, АТФ и АДФ [7]. Такое «разрежение» пула аденилатов усугубляется деградацией пуриновых оснований, играющих важную роль в поддержании уровня макроэргов путем их синтеза [2]. Однако в наших экспериментах снижение суммарного содержания адениннуклеотидов не находит объяснения в избыточной активности АМФ-деаминазы, так как содержание  $\Phi_n$ , мощного ингибитора этого фермента, в ткани семенников при аллоксановом диабете возрастает по сравнению с контролем, а уровень АМФ, субстрата АМФ-деаминазы, уменьшается. В этом случае более вероятным объяснением данной ситуации кажется нарушение процесса образования АМФ и его превращения в АТФ, что наблюдается при недостаточности инсулина в организме животного [1].

Таким образом, данные литературы и результаты нашей работы свидетельствуют о том, что при аллоксановом диабете в ткани семенников крыс происходит серьезное нарушение обмена адениннуклеотидов, вероятно, за счет снижения синтеза АМФ и превращения его в АТФ в ходе реакций окислительного фосфорилирования. Такое понижение энергообеспечения может быть одной из основ-

ных причин известного повреждения сперматогенной и эндокринной функций семенников наряду с имеющимися в литературе сведениями о нарушении при диабете регуляции функционирования органа гонадотропными гормонами гипофиза.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Германюк Я. Л.* Роль инсулина в биосинтезе нуклеотидов, нуклеиновых кислот и белков. — Киев, 1973.
2. *Друккер Н. А., Погорелова Т. Н., Осташевская М. И., Длужевская Т. С.* // Пробл. эндокринологии. — 1983. — № 5. — С. 82—86.
3. *Каминский Ю. Г., Косенко Е. А., Кондрашова М. И.* // Биохимия. — 1982. — Т. 47, № 4. — С. 654—659.
4. *Кондрашова М. И., Лесогорова М. И., Шноль С. Э.* // Там же. — 1965. — Т. 30, № 3. — С. 567—571.
5. *Гырышкин А. М.* // Вопросы теоретической и клинической медицины. — Томск, 1984. — Вып. 10. — С. 131—133.
6. *Гырышкин А. М., Стуканов С. Л.* // Роль тимуса в регуляции функций организма. — Томск, 1985. — С. 58—62.
7. *Халявко П. М., Сидоренко Д. С.* // Укр. биохим. журн. — 1982. — Т. 54, № 2. — С. 213—216.
8. *Atkinson D. E.* // The Enzymes / Ed. P. D. Boyer. — New York, 1970. — Vol. 1. — P. 461—489.

9. *Howland B. E., Zebrowski E. J.* // Horm. Metab. Res. — 1976. — Vol. 8, N 5. — P. 465—469.
10. *Oksanen A.* // Horm. Res. — 1975. — Vol. 6, N 3. — P. 138—144.
11. *Paz G., Homonnai Z. T.* // Experientia (Basel), 1979. — Vol. 35, N 10. — P. 1412—1413.
12. *Perez Diaz J., Benitez A., Fernandez Galaz C.* // Horm. Metab. Res. — 1982. — Vol. 14, N 9. — P. 479—482.

Поступила 15.01.86

#### METABOLISM OF ADENINE NUCLEOTIDES IN TESTICULAR TISSUE OF RATS WITH ALLOXANE DIABETES

*A. M. Taryshkin, B. Yu. Sal'nik*

Medical School, Tomsk

Content of ATP and AMP, total intracellular pool of adenine nucleotides, the ratio of adenylate cyclase affecting ratio of ATP/ADP, energy charge of the adenylate system as well as potential of adenine nucleotides phosphorylation were decreased in testicular tissue of rats with alloxane diabetes. At the same time, content of ADP and inorganic phosphate was increased as compared with control values. The data obtained suggest that energy metabolism was distinctly impaired in rat testes under conditions of alloxane diabetes, which appears to occur as a result of decrease in AMP biosynthesis and in transformation of the nucleotide into ATP during oxidative phosphorylation. These alterations in the pool of adenylates appear to play an important role in impairments of spermatogenic and endocrine functions of testes in diabetes.

УДК 616.716.4-018.46-002.1-092.9-07:616.36-008.931:577.152.11-074

*К. Н. Наджимутдинов, М. И. Азимов, М. Э. Краковский,  
А. Х. Аширметов*

#### СОСТОЯНИЕ МИКРОСОМАЛЬНОЙ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ПЕЧЕНИ КРЫС С ОСТРЫМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ НИЖНЕЙ ЧЕЛЮСТИ

Ташкентский медицинский институт

Несмотря на довольно обширную литературу, посвященную изучению острых и хронических одонтогенных воспалительных процессов, вопросы органной патологии, в частности функциональное состояние печени, исследованы явно недостаточно. В то же время органы полости рта и печень тесно связаны между собой, поскольку участвуют в сложном физиологическом процессе пищеварения и являются производными одной эмбриональной основы [11]. Интоксикация организма, возникающая вследствие повреждения воспалительным процессом тканей челюстно-лицевой об-

ласти, также оказывает существенное влияние на функциональное состояние внутренних органов. Учитывая то обстоятельство, что печени принадлежит ведущая роль в осуществлении процессов детоксикации в организме, представляло интерес исследовать активность ее микросомальных ферментов при остром остеомиелите нижней челюсти в эксперименте.

#### Методика

В экспериментах использовали 66 белых крыс-самцов смешанной популяции с массой тела 180—240 г, содержащихся в виварии на обычном лабораторном рационе. Каждая

Таблица 1

Продолжительность гексеналового сна у крыс с остеомиелитом нижней челюсти

Срок развития остеомиелита	Продолжительность гексеналового сна, мин
Контроль	25,5±1,87
7 сут <i>p</i>	48,17±6,33 <0,01
10 сут <i>p</i>	84,67±14,20 <0,01
14 сут <i>p</i>	66,14±10,31 <0,01

опытная группа состояла из 8—9 животных. Острый остеомиелит нижней челюсти вызывали путем поднадкостничного введения в тело кости взвесей суточной бульонной культуры *Stafilococcus aureus* (штамм 209) в количестве 1 млрд. микробных тел в 0,2 мл физиологического раствора. Для косвенного суждения о состоянии микросомальной системы печени использовали гексеналовый тест, поскольку это дает возможность оценивать активность ферментов *in vivo* [7, 11]. Гексенал вводили внутривенно в дозе 100 мг/кг. Продолжительность сна оценивали по времени нахождения крысы в положении на боку. Для проведения биохимических исследований животных декапитировали в холодной комнате, выделяли микросомальную фракцию печени методом дифференциального центрифугирования (VAC-601). В полученной фракции определяли активность N-деметилазы амидопиррина [9], гидроксилазы анилина [1], НАДФ-Н цитохром-с-редуктазы [13], содержание цитохромов P<sub>450</sub> и b<sub>5</sub> [15], микросомального белка [12]. Исследования проводили через 7, 10 и 14 сут после введения культуры стафилококка. Результаты экспериментов обрабатывали методом вариационной статистики.

### Результаты и обсуждение

Как видно из табл. 1, при остром остеомиелите нижней челюсти во все сроки исследования продолжи-

тельность гексеналового сна существенно возрастает. Так, через 7 сут эксперимента время сна увеличивалось на 89%, а через 10 и 14 сут — на 222 и 159% соответственно по сравнению с контролем. В связи с тем что гексеналовый тест является косвенным показателем активности монооксигеназной ферментативной системы гепатоцитов, можно заключить, что при остеомиелите происходит значительное снижение процессов детоксикации в печени. Действительно, активность N-деметилазы амидопиррина, гидроксилазы анилина и НАДФ-цитохром-с-редуктазы в микросомальной фракции печени крыс с острым остеомиелитом нижней челюсти была существенно ниже, чем у контрольных животных, причем наиболее резкие изменения наблюдались на 10-е сутки исследования (табл. 2). Та же закономерность отмечалась в отношении содержания цитохромов P<sub>450</sub> и b<sub>5</sub>. Следует отметить, что через 14 сут после начала эксперимента происходит некоторое повышение активности микросомальных ферментов и содержания цитохромов P<sub>450</sub> и b<sub>5</sub> по сравнению с предыдущим сроком наблюдения, причем активность N-деметилазы амидопиррина практически не отличалась от таковой у контрольных животных. Известно, что реакции окислительного деметилирования и гидроксирования являются основными путями детоксикации ксенобиотиков, причем их интенсивность зависит главным образом от содержания цитохрома P<sub>450</sub> [5, 8].

Следует отметить, что в наших опытах наиболее значительно угнеталась

Таблица 2

Биохимические показатели микросом печени крыс в динамике острого остеомиелита нижней челюсти (M±m)

Срок развития остеомиелита	Цитохром, нмоль/мг белка		N-деметилаза амидопиррина, нмоль HCOH/(мг·мин)	Гидроксилаза анилина, нмоль амидофенола/(мг·мин)	НАДФ-цитохром-с-редуктаза, нмоль/(мг·мин)
	P <sub>450</sub> <sup>1</sup>	b <sub>5</sub>			
Контроль (n=9)	1,05±0,03	0,55±0,01	1,15±0,05	1,12±0,04	146,45±6,98
7 сут <i>p</i> (n=8)	0,55±0,09 <0,01	0,33±0,03 <0,01	0,91±0,02 <0,01	0,69±0,08 <0,01	100,4±6,84 <0,01
10 сут <i>p</i>	0,27±0,05 <0,001	0,21±0,02 <0,001	0,83±0,03 <0,001	0,59±0,06 <0,001	73,25±5,31 <0,001
14 сут <i>p</i> (n=8)	0,51±0,05 <0,001	0,35±0,04 <0,01	1,04±0,02 >0,05	0,63±0,06 <0,001	109,33±4,96 <0,01

активность гидроксилазы анилина (на 47%), тогда как активность N-деметилазы амидопирина снижалась лишь на 28% по сравнению с контролем. Поскольку гидроксилаза анилина метаболизирует субстраты II типа, а N-деметилаза амидопирина — субстраты I типа, можно заключить, что метаболизм последних при остром остеомиелите нарушается в меньшей степени. Однако в связи с тем что цитохром P<sub>450</sub> является основным компонентом монооксигеназной ферментной системы печени, обезвреживающей разнообразные эндо- и экзогенные токсичные вещества [6, 16], снижение его содержания, несмотря на нормальную активность отдельных микросомальных ферментов, свидетельствует о существенном угнетении процессов детоксикации в этом органе. Подтверждением этому является увеличение продолжительности гексеналового сна при остром остеомиелите нижней челюсти во все сроки наблюдения, которая намного превышала контрольный уровень.

Известно, что остеомиелит нередко сопровождается выраженной интоксикацией организма, возникающей вследствие поступления в кровь микробных токсинов и продуктов распада пораженных тканей. Это обусловлено тем, что инфекция, локализованная в воспалительном очаге, часто прорывает грануляционный ограничительный вал и попадает в общий кровоток [2]. Поскольку эндотоксины поглощаются и обезвреживаются в основном печенью [14, 18], вполне вероятно, что этот фактор является ответственным за угнетение процессов детоксикации, наблюдаемое при остром остеомиелите нижней челюсти. По данным ряда исследователей, внутривенное введение животным эндотоксина E. coli значительно подавляет у них активность микросомальных ферментов в гепатоцитах [20, 21]. Гибель значительного количества лейкоцитов под действием эндотоксинов бактерий может способствовать поступлению в кровь протеаз, способных, по-видимому [4], инактивировать цитохром P<sub>450</sub>. Изучая функциональное состояние печени у больных с остеомиелитом нижней челюсти, обнаружили нарушение функции печени [3]. Причиной нарушения функционального состояния печени, вероятно, является токсико-ин-

фекционное воздействие на этот орган при остеомиелите, влекущее за собой обеднение гепатоцитов гликогеном и развитие тканевой гипоксии. В то же время как под влиянием эндотоксинов, так и при гипоксии происходит активация фосфолипазы A<sub>2</sub>, что сопровождается нарушением гидрофобных свойств мембран гепатоцитов в результате расщепления их фосфолипидов и вызывает снижение активности микросомальных ферментов и содержания цитохрома P<sub>450</sub> [10, 19]. Видимо, все вышеперечисленные факторы в комплексе и приводят к значительному угнетению процессов микросомального окисления, наблюдаемому при остром остеомиелите нижней челюсти. Поскольку в печени происходит деградация не только эндо- и экзогенных токсичных веществ, но и лекарственных препаратов, по-видимому, при остром остеомиелите их метаболизм будет существенно замедлен. Это в свою очередь может вызывать различные токсические и побочные эффекты от их применения даже в обычных терапевтических дозах.

Таким образом, при остром остеомиелите нижней челюсти у крыс наблюдается увеличение продолжительности гексеналового сна, а также угнетение активности монооксигеназной ферментной системы печени, ответственной за осуществление процессов детоксикации в этом органе, что следует учитывать при проведении фармакотерапии больных с этой патологией.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Арчаков А. И., Карузина Н. И., Тверитинов В. Н. и др. // Биохимия. — Т. 40, № 1. — С. 32—39.
2. Бадмаин Э. Ч. Функциональное состояние печени при хроническом остеомиелите: Автореф. дис. канд. мед. наук. — Иркутск, 1982.
3. Георгиади Т. В. Биохимические изменения крови и функциональное состояние печени при острых воспалительных заболеваниях челюстно-лицевой области: Автореф. дис. канд. мед. наук. — Махачкала, 1974.
4. Головенко П. Я. Механизмы реакций метаболизма ксенобиотиков в биологических мембранах. — Киев, 1981.
5. Лакин К. М., Крылов Ю. Ф. Биотрансформация лекарственных веществ. — М., 1984.
6. Метелица Д. И. Активация кислорода ферментными системами. — М., 1982.
7. Михайлец Г. Л., Лисочкин Б. Г., Крылова И. Б. и др. // Фармакологическая ре-

- гуляция регенераторных процессов. — Йошкар-Ола, 1979. — С. 222—224.
8. Парк Д. В. Биохимия чужеродных соединений: Пер. с англ. — М., 1973.
  9. Попов П. // Экспер. мед. и морфол. — 1973. — Т. 12, № 3. — С. 130—135.
  10. Сейфулла Р. Д., Онищенко П. А., Артамонов С. Д. и др. // Фармакол. и токсикол. — 1979. — № 2. — С. 157—163.
  11. Токин Б. П. Общая эмбриология. — М., 1977. — С. 195—199.
  12. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.
  13. Masters B. S. S., Williams C. H., Kamin H. // Meth. Enzymol. — 1967. — Vol. 10. — P. 565.
  14. Nolan J., Leibowitz A. // Proc. Soc. exp. Biol. — 1980. — Vol. 165, N 3. — P. 453—456.
  15. Omura T., Sato R. // J. biol. Chem. — 1964. — Vol. 239, N 7. — P. 2370—2378.
  16. Remmer H. // Amer. J. Med. — 1970. — Vol. 49, N 5. — P. 617—627.
  17. Roffman M., Lal H. // J. Pharmacol. exp. Ther. — 1974. — Vol. 191, N 3. — P. 358—369.
  18. Ruiter D. I., Van der Meulen I., Hummel M. I. et al. // Lab. Invest. — 1981. — Vol. 45, N 1. — P. 38—45.
  19. Shakir K. M., Mohamed, O'Brian J. T., Garther S. L. // Metabolism. — 1985. — Vol. 34, N 2. — P. 176—182.
  20. Sonawane B. R., Gaffe S. I. // Pediat. Res. — 1980. — Vol. 14, N 8. — P. 939—942.
  21. Williams I. F., Lowitt S., Szenlivany A. // Immunopharmacology. — 1980. — Vol. 2, N 4. — P. 285—291.

Поступила 15.01.86

#### THE STATE OF MICROSOMAL OXIDATIVE SYSTEM IN LIVER TISSUE OF RATS WITH ACUTE OSTEOMYELITIS OF MANDIBULA

N. K. Nadzhimuldinova, M. I. Azimova, M. E. Krakovsky, A. Kh. Asirmetov

Medical School, Tashkent

Duration of hexenal sleep and activity of main microsomal enzymes in hepatocytes were studied in experimental osteomyelitis of rat mandibula. Within 7, 10 and 14 days after the osteomyelitis development content of cytochromes P-450 and b<sub>5</sub> as well as activities of amidopyrine N-demethylase, aniline hydroxylase and NADPH cytochrome c reductase were decreased in liver cell microsomal fraction. As liver tissue monooxygenase enzymatic system is inhibited in osteomyelitis the elevated pharmacological activity and toxicity of drugs, metabolized in liver tissue, should be considered under conditions of practical use of these drugs.

УДК 612.843.14:612.84.015.11:577.152.53

И. А. Богданова, А. М. Герасимов, О. С. Комаров

### АКТИВНОСТЬ ГЛУТАТИОН: ДЕГИДРОАСКОРБАТ ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ В ТКАНЯХ ГЛАЗА КРОЛИКА

Центральный НИИ травматологии и ортопедии им. Н. Н. Приорова Минздрава СССР, П ММИ им. П. И. Пирогова, Минздрава РСФСР

Фотохимическая генерация свободных радикалов, как предполагают, является важным механизмом фоторецепторного акта в сетчатке [5] и их избыточное образование или недостаточное обезвреживание составляют основу патологии глаза при старческой катаракте, недостаточности витамина Е, ретролентальной фиброплазии, эмоционально-болевым стрессе, офтальмогерпесе [4, 6, 10]. Защита светопроницаемых тканей глаза от образования избытка свободных радикалов обеспечивается наличием супероксиддисмутазы, глутатион: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> пероксидазы, глутатионредуктазы, каталазы, аскорбиновой кислоты, глутатиона и α-токоферола [6—8, 11, 16].

В настоящей работе впервые установлено, что в тканях глаза кролика присутствует глутатион: дегидроаскорбат оксидоредуктаза (КФ 1.8.5.1).

#### Методика

Использовали перфузированные охлажденным раствором 0,15 М NaCl ткани глаз кроликов породы шиншилла: склеру, роговицу, сосудистую оболочку, цилиарное тело, радужную оболочку, зрительный нерв, а также хрусталик, стекловидное тело и содержимое передней камеры глаза. Ткани гомогенизировали в пятикратном объеме 0,15 М NaCl, содержащем 0,05 М калий-фосфатный буфер pH 7,4, на холоду в гомогенизаторе типа Поттера (хрусталик, стекловидное тело) или типа «Политрон» (другие ткани) в течение 5 мин. К полученным гомогенатам добавляли 0,1 % тритон X-100 (конечная концентрация) и центрифугировали в течение 10 мин при 600 g. Активность глутатион: дегидроаскорбат оксидоредуктазы, глутатион: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> пероксидазы (КФ 1.11.1.9) и глутатионредуктазы (КФ 1.6.4.2) определяли как описано ранее [1], и расщепляли в микрокаталах окислившегося (глутатион: дегидроаскорбат оксидоредуктаза, глутатион: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> пероксидаза) или образовавшегося (глутатионредуктаза) восстановленного глутатиона на 1 кг белка. Содержание белка определяли по Лоури и соавт. [14] после обработки гомогенатов 0,1 н. NaOH и 0,5 % раствором дезоксихолата натрия.

## Результаты и обсуждение

Глутатион: дегидроаскорбат оксидоредуктаза выявлена во всех исследованных тканях глаза (см. таблицу). По уровню удельной активности ткани глаза кролика могут быть распределены в следующей последовательности: цилиарное тело > сосудистая оболочка > радужная оболочка > зрительный нерв > роговица > склера > стекловидное тело > водянистая влага > хрусталик. Удельная активность глутатион: дегидроаскорбат оксидоредуктазы в цилиарном теле почти в 8 раз превышает такую в хрусталике, однако при этом она в 6 раз ниже, чем в печени (см. таблицу). В расчете на сырую массу ткани компартменты глаза отличаются по обеспеченности глутатион: дегидроаскорбат оксидоредуктазой не столь выражено и наименьшая величина приходится на склеру (данные не приведены).

Такое соотношение может быть указанием на сравнительно меньшее значение взаимосвязи глутатиона и аскорбиновой кислоты в компартментах глаза, чем в других структурных образованиях организма, при нормальных условиях функционирова-

ния. С другой стороны, чувствительность тканей глаза к повреждению в результате фотохимической продукции свободных радикалов из-за низкого уровня глутатион: дегидроаскорбат оксидоредуктазы здесь будет более высокой. Свойство света повреждать хрусталик, например, связывают именно с усилением образования  $O_2^-$  и возможностью обезвреживания этого радикала при реакции с аскорбиновой кислотой [16]. Эта реакция протекает неферментативно и, дублируя функцию супероксиддисмутазы, может, как предполагают, восполнить  $1/3$  ее мощности [12], а во внеклеточном пространстве, где диффузия супероксиддисмутазы затруднена, вклад аскорбата в обезвреживание  $O_2^-$ , вероятно, еще более высокий. Таким образом, глутатион: дегидроаскорбат оксидоредуктаза обеспечивает дублирование супероксиддисмутазы и даже ее замещение в микропространствах межклеточного матрикса соединительной ткани. Особый интерес в связи с этим представляет присутствие глутатион: дегидроаскорбат оксидоредуктазы в стекловидном теле и водянистой влаге — бесклеточных образованиях глаза. Хотя нельзя исключить полностью воз-

**Активность глутатион: дегидроаскорбат оксидоредуктазы и характеристика ферментной редокс-системы глутатиона тканей глаза кролика**

Ткань	Активность глутатион: дегидроаскорбат оксидоредуктазы, мккат на 1 кг белка	Глутатионредуктаза/глутатион: дегидроаскорбат оксидоредуктаза	Глутатионредуктаза/глутатион: $H_2O_2$ пероксидаза	Глутатионредуктаза/глутатион: дегидроаскорбат оксидоредуктаза + глутатион: $H_2O_2$ пероксидаза
Цилиарное тело	110,0±20,0 (6)	5,29±1,46 (5)	10,94 (4)	4,14 (4)
Сосудистая оболочка	84,4±13,3 (7)	4,96±0,63 (7)	2,55±0,38 (6)	1,59±0,19 (6)
Радужная оболочка	80,0±6,7 (6)	4,04±0,89 (5)	1,72 (4)	1,25 (4)
Зрительный нерв	76,7±13,3 (6)	1,50±0,22 (6)	1,49±0,33 (6)	0,81±0,01 (6)
Роговица	70,0±9,0 (6)	5,23±0,56 (6)	8,72±2,13 (6)	4,81±0,71 (6)
Склера	66,7±15,7 (7)	4,15±0,51 (7)	6,49±1,18 (7)	2,68±0,44 (7)
Стекловидное тело	31,3 (3)	2,07 (3)	3,34 (3)	0,89 (3)
Водянистая влага	31,3±1,7 (6)	2,00 (4)	0,73 (3)	0,59 (3)
Хрусталик	14,0±0,7 (7)	1,22±0,32 (6)	1,16±0,45 (6)	0,68±0,17 (6)
Печень	667,0±104,0 (7)	2,00±0,26 (7)		

Примечание. В скобках — число проб.

возможности попадания фермента из других тканей глаза при получении этих жидких сред, довольно высокий уровень активности глутатион: дегидроаскорбат оксидоредуктазы в них (в сравнении с хрусталиком, например) свидетельствует в пользу наличия внеклеточной глутатион: дегидроаскорбат оксидоредуктазы в стекловидном теле и водянистой влаге прижизненно. Функциональная роль глутатион: дегидроаскорбат оксидоредуктазы в глазу должна быть рассмотрена в нескольких аспектах вследствие многообразия процессов и клеточных функций, регулирующих ее субстратами — глутатионом и аскорбиновой кислотой.

Поскольку аскорбиновая кислота восстанавливает радикал  $\alpha$ -токоферола [15], глутатион: дегидроаскорбат оксидоредуктаза является принципиально важным звеном вовлечения антиокислительной ферментной системы цитозоля [3] в регуляцию процессов перекисного окисления липидов биологических мембран.

Как видно из соотношения глутатионредуктаза/глутатион: дегидроаскорбат оксидоредуктаза (см. таблицу), мощность первого этапа этой ферментной редокс-цепи — восстановления глутатиона — выше, чем максимально возможного окисления трипептида дегидроаскорбиновой кислотой на втором этапе. Таким образом, регенерация аскорбиновой кислоты за счет окисления НАДФ · Н сопряженной ферментной цепью (глутатионредуктаза + глутатион: дегидроаскорбат оксидоредуктаза), вероятно, не лимитируется глутатионредуктазой во всех тканях глаза. Соотношение потенциально возможной мощности ферментативного окисления глутатиона дегидроаскорбиновой кислотой (глутатионредуктаза/глутатион: дегидроаскорбат оксидоредуктаза) и перекисью водорода (глутатионредуктаза/глутатион:  $H_2O_2$  пероксидаза) в разных участках глаза неодинаково. В роговице, например, возможность образования окисленного глутатиона перекисью водорода примерно в 2 раза меньше, чем дегидроаскорбиновой кислотой; в радужной и сосудистой оболочках это соотношение имеет противоположный характер.

При учете активности обоих путей окисления глутатиона в отдельных

тканях глаза выявляется недостаточность глутатионредуктазного участка, что видно из «глутатион-редуцирующего потенциала»: отношения активностей глутатионредуктазы к сумме активностей глутатион: дегидроаскорбат оксидоредуктазы и глутатион:  $H_2O_2$  пероксидазы. Хрусталик, стекловидное тело, водянистая влага и зрительный нерв, имеющие низкий «глутатион-редуцирующий потенциал», должны рассматриваться как участки глаза, сравнительно более уязвимые к условиям и воздействиям, стимулирующим образование  $O_2^-$  и  $H_2O_2$ . При этом недостаточность системы антиокислительной защиты может быть предпосылкой не только избыточного перекисного окисления липидов, но и окислительной деструкции коллагена и гиалуроновой кислоты межклеточного матрикса [3]. Помимо участия глутатион: дегидроаскорбат оксидоредуктазы в ферментной системе антиокислительной защиты, представление о функциональной роли этого фермента в глазу должно учитывать значение аскорбиновой кислоты для синтеза коллагена [13], гипотеза о действии дегидроаскорбиновой кислоты как ингибитора клеточного деления [9] и участие окисленного глутатиона в регуляции тиол-дисульфидного состояния белков [2].

В целом наличие глутатион: дегидроаскорбат оксидоредуктазы в тканях глаза, установленное в данной работе, объясняет механизм регенерации аскорбиновой кислоты и, соответственно, причину поддержания здесь высокого соотношения аскорбиновой и дегидроаскорбиновой кислот.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Герасимов А. М., Королева Л. А., Иванова Л. И., Панченко Л. Ф. // Вопр. мед. химии. — 1976. — № 4. — С. 447—451.
2. Герасимов А. М., Уваров В. Ю. // Докл. АН СССР. — 1978. — Т. 240, № 2. — С. 467—470.
3. Герасимов А. М. Антиокислительная ферментная система цитозоля животных: Автореф. дис... д-ра. мед. наук. — М., 1981.
4. Даглар Л. Д. Некоторые показатели клеточного метаболизма при поверхностных и глубоких формах офтальмогерпеса: Автореф. дис... канд. мед. наук. — М., 1982.
5. Новиков К. П., Шведова А. А., Каган В. Е. и др. // Биофизика. — 1974. — Т. 19, № 2. — С. 280—284.
6. Шведова А. А., Каган В. Е., Кулиев И. Я. и др. // Бюл. экспер. биол. — 1982. — № 4. — С. 24—26.

7. Юсифов Э. Ю., Сакина Н. Л., Донцов А. Е. // Биохимия. — 1980. — Т. 45, № 8. — С. 1470—1475.
8. Bhuayan K. C., Bhuayan D. K. // Biochim. biophys. Acta. — 1978. — Vol. 542, N 2. — P. 28—38.
9. Edgar J. A. // Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 24—26.
10. Feeney L., Berman E. R. // Invest. Ophthalmol. — 1976. — Vol. 15, N 10. — P. 789—792.
11. Hockwin O., Winkler F., Korte I. // Albrecht v. Graefes Arch. klin. exp. Ophthalmol. — 1974. — Bd. 192, N 3. — S. 215—225.
12. Leibovitz B. E., Siegel B. V. // J. Gerontol. — 1980. — Vol. 35, N 1. — P. 45—56.
13. Levene C. I., Shoshan S., Bates C. J. // Biochim. biophys. Acta. — 1972. — Vol. 257, N 2. — P. 384—388.
14. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
15. Niki E., Tsuchiya J., Tanimura R., Kamina Y. // Chem. Lett. — 1982. — N 6. — P. 789—792.
16. Varma S. D. // Int. J. Quantum. Chem. — 1981. — Vol. 20, N 2. — P. 479—484.

Поступила 18.08.86

## ACTIVITY OF GLUTATHIONE: DEHYDROASCORBATE OXIDOREDUCTASE IN RABBIT EYE TISSUES

I. A. Bogdanova, A. M. Gerasimov, O. S. Komarov, N. N. Priorov

Central Institute of Traumatology and Orthopedics, Ministry of Public Health of the USSR, N. I. Pirogov II Medical School, Moscow

Glutathione: dehydroascorbate oxidoreductase was detected in rabbit eye tissues, activity of which was decreased as compared with that of glutathione reductase. The ratio between glutathione reductase activity and the total activity of the enzymes catalyzing glutathione oxidation (glutathione: dehydroascorbate oxidoreductase and glutathione:  $H_2O_2$  peroxidase) was above one unit in cornea, ciliar body, sclera vascular tunic and iris of the eye; it was lower than one unit in vitreous body, lens, optic nerve and aqueous humor. Glutathione: dehydroascorbate oxidoreductase is one of the key component in the eye antioxidative system; it regulates the ratio of oxidized and reduced forms of ascorbic acid and glutathione.

УДК 615.31:547.857.7].015.4

В. И. Кулинский, И. А. Ольховский, А. П. Ковалевский

## ИССЛЕДОВАНИЕ БИОХИМИКО-ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ И ВЗАИМОСВЯЗИ АНТИКАЛОРИГЕННОГО, ГИПОТЕРМИЧЕСКОГО И АНТИГИПОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТОВ АДЕНОЗИНА

Кафедра биохимии Красноярского медицинского института

Способность аденозина и адениновых нуклеотидов защищать животных от острой гипоксии известна, однако данные о механизме этого феномена малочисленны и противоречивы [6, 9]. Ранее было высказано предположение, что в основе антигипоксического действия этой группы веществ лежит торможение окислительных процессов в клетках [9]. Снижение кислородзависимых реакций на уровне целостного организма проявляется уменьшением потребления кислорода ( $pO_2$ ) — антикалоригенный эффект и температуры тела — гипотермический эффект [9, 20]. Механизмы этих эффектов и их взаимосвязь ранее не исследовались.

За последние годы в биохимии и биохимической фармакологии аденозина достигнут значительный успех. Обнаружен транспорт аденозина в клетки [13, 14]. Установлено существование различных типов аденозиновых рецепторов в плазматических мембранах многих, если не всех кле-

ток: на внешней стороне —  $A_1$  и  $A_2$ , или по другой номенклатуре  $R_1$  и  $R_2$ ; на внутренней — Р-сайтов. Показано, что через  $A_1$ -рецепторы и Р-сайты осуществляется ингибирование, а через  $A_2$  — активация аденилатциклазы [10, 13—15, 17]. Аденозин дает множество биохимических и физиологических эффектов [13, 14, 19, 21] и рассматривается либо как межклеточный посредник действия гормонов [13], либо как «ответный метаболит» эффекторной клетки [19]. Кроме того, существуют  $P_2$ -рецепторы и адениннуклеотидов [17].

Задачей настоящей работы был биохимико-фармакологический анализ механизмов антикалоригенного, гипотермического и антигипоксического действия аденозина и выявление их взаимосвязи.

### Методика

Работа проведена на 420 мышах  $F_1$  (СВА С57BL) обоего пола массой 19—23 г. Все вещества вводили в объеме 10 мг/кг в оптимальных дозах: аденозин и изопропилнорадре-

## Результаты и обсуждение

Введение мышам аденозина вызывает выраженное снижение  $pO_2$  и уменьшение температуры тела и поверхности кожи (рис. 1). Развитие антикалоригенного и гипотермического эффектов сопровождается значительным антигипоксическим действием препарата: средняя продолжительность жизни животных увеличивается в 3—4 раза при гиперкапнической и в 4—5 раз при гипобарической гипоксии; резко повышается и количество мышей, выживших за 20 мин гипоксического воздействия: с 0—3% в контроле до 100% при введении аденозина на обеих моделях гипоксии ( $p < 0,001$ ). Все эффекты аденозина проявляются через 5—15 мин после введения и сохраняются в течение 60—70 мин.

Все исследованные эффекты аденозина дозозависимы в выбранном диапазоне доз (рис. 2), причем максимальная доза, использованная нами (1600 мкмоль/кг), нетоксична (она более чем в 13 раз меньше, чем  $LD_{50}$  аденозина [6]). В целом временные и дозовые кривые трех эффектов аденозина близки.

В термонейтральных условиях все три эффекта аденозина резко ослаблены (см. рис. 1). Вероятно, они проявляются полностью лишь при опре-

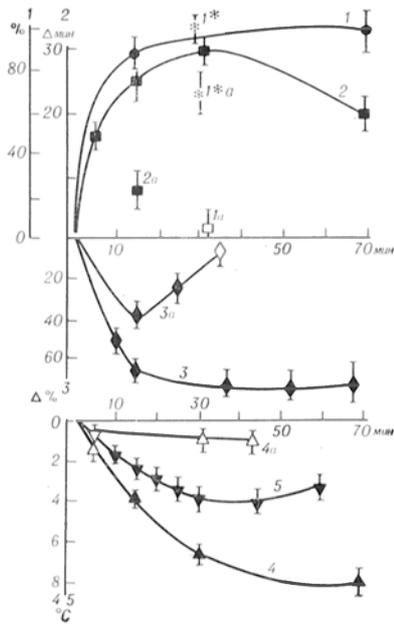


Рис. 1. Временная динамика эффектов аденозина.

По осям абсцисс — время (в мин) после инъекции аденозина; обозначение осей ординат и кривых: 1 — выживаемость при гипобарической гипоксии в течение 20 мин (в %); 2 — прирост средней продолжительности жизни при гиперкапнической гипоксии (в  $\Delta$  мин); 3 — снижение потребления кислорода (в  $\Delta$  %); 4 и 5 — уменьшение температуры «ядра» тела и поверхности кожи (в  $^{\circ}C$ ). *a* — эксперименты проводили при температуре воздуха 30—33  $^{\circ}C$ , в остальных случаях — при 20—22  $^{\circ}C$ . Звездочка — выживаемость при гипобарической гипоксии оценивалась за 10 мин, за этот период выживаемость контрольных животных в термонейтральных условиях составляла 0+10%. Доза аденозина во всех сериях — 800 мкмоль/кг. Темными символами обозначены статистически достоверные, а светлыми — недостоверные изменения.

налии (изадрин) — подкожно, а динпридамола (курантил), теофиллин и пропранолола (анаприлин) — внутривенно; используемые препараты вводили за 10—15 мин до аденозина. Большинство экспериментов проводили при температуре воздуха 20—22  $^{\circ}C$ , отдельную серию — при термонейтральной температуре 30—33  $^{\circ}C$  в микроклиматической камере МКК-3. Измерение  $pO_2$ , температуры «ядра» тела и поверхности кожи, а также моделирование гипоксической гипоксии в барокамере (гипобарическая гипоксия) и в гермокамере (гиперкапническая гипоксия) описаны ранее [1, 7]. цАМФ определяли методом радиоиммунного анализа, используя наборы фирмы «Amersham» (Англия). Для измерения дыхания гомогенат почек готовили в разведении 1:10, на среде: маннит — 0,225 М, сахараза — 0,075 М,  $MgCl_2$  — 1 мМ;  $KCl$  — 5 мМ;  $KH_2PO_4$  — 3 мМ, ЭДТА — 0,5 мМ, трис- $HCl$  — 0,5 мМ pH 7,4. Потребление кислорода исследовали через 5—6 мин после декапитации мышей на полярографе LP-7, используя среду дыхания такого же состава. Конечная концентрация белка в ячейке 4,5—6 мг/мл. Белок определяли биуретовым методом.

Результаты подвергали статистической обработке с использованием критериев  $F$ ,  $t$ ,  $\chi^2$  с поправкой Йейтса. Проводили дисперсионный и корреляционный анализ.

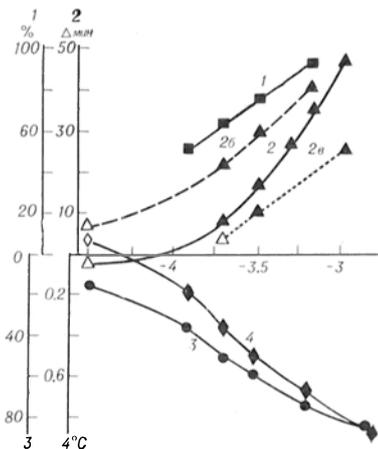


Рис. 2. Дозовая зависимость эффектов аденозина.

По оси абсцисс — доза аденозина,  $lg$  [моль/кг]; обозначения осей ординат и кривых те же, что и на рис. 1, за исключением гипотермического эффекта (3), который на данном графике выражен как  $T = \ln(T_n - T_b)$ , где  $T_n$  — температура «ядра» тела,  $T_b$  — температура воздуха в  $^{\circ}C$ ;  $b$  — эффект аденозина на фоне динпридамола (8 мкмоль/кг);  $a$  — то же на фоне теофиллина (50 мкмоль/кг).

Влияние дипиридамола на эффекты аденозина

Препарат и его доза (мкмоль/кг)	Изменение потребления кислорода, $\Delta$ %	Изменение температуры тела, $\Delta$ °C	Выживаемость в барокамере за 15 мин, %	Прирост средней продолжительности жизни мышей в гермокамере, $\Delta$ мин
Аденозин (40)	$-17,0 \pm 4,7^a$	$+0,2 \pm 0,2$	—	$-0,1 \pm 0,5$
Дипиридамол (8)	$-17,0 \pm 6,1^a$	$-1,2 \pm 0,4^a$	—	$+2,7 \pm 0,5^a$
Дипиридамол (8) +- аденозин (40)	$-28,6 \pm 5,8^b, в$	$-1,5 \pm 0,4^b$	—	$+10,6 \pm 1,2^b, в$
Аденозин (100)	—	$-0,8 \pm 0,3^a$	$23 \pm 12^a$	—
Дипиридамол (2)	—	$-0,2 \pm 0,3$	$0 \pm 8$	—
Дипиридамол (2) +- аденозин (100)	—	$-3,0 \pm 0,4^b, в$	$47 \pm 13^b, в$	—

Примечание. Выживаемость в барокамере животных контрольной группы за 15 мин составила 4—8 %. Здесь и в табл. 2 и 3 буквами *a*, *b* и *в* отмечены величины, статистически достоверно отличающиеся соответственно от контроля, эффекта аденозина, эффекта используемого фармакопрепарата. Количество опытов в сериях 8—12.

деленном тонусе терморегуляторных механизмов [7].

Между всеми тремя эффектами аденозина наблюдается тесная взаимосвязь ( $r=0,68$ — $0,84$ ;  $p<0,05$ ), что свидетельствует о схожести их рецепторных механизмов. Для дифференцировки конкретного типа включающихся рецепторов ( $A$  или  $P_2$ ) мы использовали общепринятые подходы биохимико-фармакологического анализа: исследование эффектов аденозина на фоне ингибитора его клеточного захвата — дипиридамола [13, 14, 18] и после введения блокатора  $A$ - (но не  $P_2$  — [10]) рецепторов — теофиллина [10, 11, 14].

Дипиридамол в дозе 8 мкмоль/кг (но не 2 мкмоль/кг) сам вызывал умеренные антикалоригенный, гипотермический и антигипоксический эффект (табл. 1). Антигипоксический эффект дипиридамола в гермокамере ранее объясняли взаимодействием этого вещества с бензодиазепиновыми рецепторами [8]. Однако антиги-

поксическое действие и другие изучаемые эффекты дипиридамола можно объяснить и вызываемым им накоплением эндогенного аденозина [12]. Возможно, известное антигипоксическое действие бензодиазепинов [8] в определенной степени связано с торможением ими клеточного захвата аденозина [21]. Эффект дипиридамола был аддитивен с действием малых доз аденозина (см. рис. 2, табл. 1), что свидетельствует об участии в реализации эффектов аденозина  $A$ -рецепторов внешней поверхности плазматических мембран клеток, так как эффекты стимуляции аденозином внутриклеточных  $P$ -сайтов дипиридамола, наоборот, снижает [18].

$A$ -рецепторный характер антикалоригенного, гипотермического и антигипоксического аденозина подтверждается также тем, что теофиллин, сам не влияя на изучаемые показатели, снимал или резко уменьшал выраженность этих эффектов (см. рис. 2, табл. 2). Это согласуется с результатами, по-

Т а б л и ц а 2

Влияние теофиллина (150 мкмоль/кг) на эффекты аденозина

Препарат	Изменение потребления кислорода, $\Delta$ %	Изменение температуры тела, $\Delta$ °C	Выживаемость в барокамере за 20 мин, %	Прирост средней продолжительности жизни в гермокамере, $\Delta$ мин
Аденозин	$-61,3 \pm 4,5^a$	$-6,6 \pm 0,5^b$	$75 \pm 11^a$	$-36,8 \pm 5,1^a$
Теофиллин	$+3,0 \pm 3,0$	$-0,3 \pm 0,4$	$7 \pm 7$	$-1,0 \pm 0,9$
Теофиллин +- аденозин	$-3,3 \pm 4,2^b$	$-1,7 \pm 0,4^b, в$	$7 \pm 7^a$	$+18,1 \pm 0,9^b, в$

Примечание. Доза аденозина при исследовании антигипоксического действия в гермокамере — 800 мкмоль/кг, в остальных случаях — 400 мкмоль/кг. Выживаемость за 20 мин в барокамере животных контрольной группы составила 0—3 %.

Влияние  $\beta$ -адреностимулятора изадрина и  $\beta$ -адреноблокатора пропранолола на выраженность эффектов аденозина

Препарат	Изменение потребления кислорода, $\Delta$ %	Изменение температуры тела, $\Delta$ °C	Выживаемость в барокамере за 20 мин, %	Прирост средней продолжительности жизни в гермокамере, $\Delta$ мин
1. Аденозин	$-73,4 \pm 4,3^a$	$-7,7 \pm 0,9^a$	$83 \pm 6^a$	$+30,7 \pm 3,2^a$
2. Изадрин	$+41,3 \pm 14,8^a$	$+0,2 \pm 0,3$	$0 \pm 6$	$-1,9 \pm 0,4^a$
3. Изадрин + аденозин	$-27,3 \pm 6,9^b, \text{в}$	$-1,5 \pm 0,6^b, \text{в}$	$0 \pm 9^b$	$-2,2 \pm 0,8^b, \text{в}$
4. Аденозин	$-21,9 \pm 6,9^a$	$-1,0 \pm 0,3^a$	$29 \pm 9^a$	—
5. Пропранолол	$-26,0 \pm 6,6^a$	$-1,4 \pm 0,4^a$	$46 \pm 14^a$	$+5,0 \pm 1,8^a$
6. Пропранолол + аденозин	$-51,2 \pm 5,5^b, \text{в}$	$-3,2 \pm 0,4^b, \text{в}$	$88 \pm 8^b, \text{в}$	$+97,0 \pm 5,7^b, \text{в}$

Примечание. Доза аденозина в сериях 1,3 и 6 (при изучении продолжительности жизни в гермокамере) — 800 мкмоль/кг, в сериях 4 и 6 (кроме опыта в гермокамере) — 100 мкмоль/кг. Доза изадрина — 3 мкмоль/кг, пропранолола — 35 мкмоль/кг. Выживаемость в барокамере за 20 мин в контрольной группе животных составила 0—3 %.

лученными при исследовании гипотермического эффекта аденозина укрысь, но с другим, менее селективным блокаторм  $A_1$ -рецептов — кофеином [20]. Следует подчеркнуть, что сродство теофиллина к аденозиновым рецептам на порядок выше, чем к фосфодиэстеразе цАМФ [14], и что использованная нами доза теофиллина *in vivo* не ингибирует фосфодиэстеразу цАМФ в тканях [11].

Учитывая, что  $A_1$ -рецепторы плазматических мембран связаны с аденилатциклазой [10, 14, 17] и что цАМФ стимулирует  $pO_2$  и процессы окисления в митохондриях [3], можно предположить, что в основе антикалоригенного, гипотермического и антигипоксического аденозина лежит ингибирование аденилатциклазы и снижение внутриклеточного пула цАМФ.

Действительно, стимулятор  $\beta$ -адренорецепторов изадрин, увеличивающий активность аденилатциклазы, значительно уменьшал выраженность эффектов аденозина и обладал противоположным действием: увеличивал  $pO_2$  и снижал устойчивость к гипоксии (табл. 3). Напротив, блокатор  $\beta$ -адренорецепторов пропранолол вызывал сходные с аденозином эффекты и усиливал его действие. Влияние блокатора, очевидно, связано с тем, что вызванная эндогенными катехоламинами активация  $\beta$ -адренорецепторов и аденилатциклазы снимается пропранололом и в результате проявляется второй, ранее скрытый эффект — торможение аденилатциклазы вследствие

стимуляции  $\alpha_2$ -адренорецепторов [4]. Противоположное действие агонистов  $\beta$ - и  $\alpha$ -адренорецепторов на терморегуляцию и устойчивость организма к острой гипоксии известно [2, 4, 5]. Антагонизм эффектов аденозина с действием изадрина и синергизм с влиянием пропранолола свидетельствуют в пользу того, что изучаемые эффекты реализуются в результате торможения активности аденилатциклазы.

Прямым подтверждением этой гипотезы является тот факт, что аденозин при введении мышам в дозе 800 мкмоль/кг через 30—45 мин снижает содержание цАМФ в скелетных мышцах со  $107 \pm 16$  до  $60 \pm 13$  и в почках с  $309 \pm 36$  до  $172 \pm 35$  пмоль на 1 г влажной ткани, т. е. на 40 % ( $p < 0,01$ ).

Таким образом, как показали результаты анализа, исследуемые эффекты аденозина реализуются через  $A_1$ -подтип рецепторов. Причиной такого явления могут быть следующие: 1) эти рецепторы локализованы внеклеточно (потенцирование диниридамом); 2) они относятся к  $A_1$ -типу (ингибирование теофиллином); 3) изучаемые эффекты сопряжены с торможением аденилатциклазы (ингибируются изадрином, потенцируются пропранололом, развиваются одновременно со снижением концентрации цАМФ в ряде тканей). Первые два факта делают маловероятным включение  $P$ -сайтов и  $P_2$ -рецепторов, а третья группа фактов исключает участие  $A_2$ -рецепторов.

Вполне естественным является вопрос о том, какой из трех изученных эффектов является первичным. Анализ полученных результатов и данных литературы свидетельствует о следующем: 1) антикалоригенный эффект достигает максимума быстрее, чем гипотермический (см. рис. 1); 2) в термонейтральных условиях гипотермический эффект уменьшается значительно сильнее, чем остальные эффекты аденозина (см. рис. 1); 3) малые дозы аденозина вызывают значимый антикалоригенный эффект без изменения температуры тела (см. рис. 2); 4) с первых минут после инъекции наблюдается снижение температуры кожи, что свидетельствует об уменьшении теплоотдачи через поверхность тела (см. рис. 1); 5) объем вентиляции легких снижается при стимуляции  $A_1$ -рецепторов [22], что также приводит к уменьшению теплопотерь; 6) аденозин может тормозить окислительные процессы. Ранее это было показано в опытах *in vitro* [9]. В наших экспериментах введение аденозина мышам в дозе 400 мкмоль/кг снижает потребление кислорода гомогенатами почек в среднем на  $14 \pm 5\%$  ( $p < 0,05$ ). Все это позволяет считать, что гипотермический эффект аденозина в основном обусловлен снижением теплопродукции, т. е. антикалоригенным эффектом. Вероятно, последний и коррелирующее с ним снижение потребности организма в кислороде играют важную роль в реализации антигипоксического действия аденозина.

Согласно гипотезе «ответного метаболизма» [19], аденозин, накапливающийся в тканях при гипоксии и других неблагоприятных условиях, способствует поддержанию жизнеспособности клеток путем торможения мобилизации катехоламинов и воздействия на микроциркуляцию. Вероятно, его защитное действие может опосредоваться также и ингибированием через  $A_1$ -рецепторы аденилатциклазы, следовательно, торможением окислительных процессов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ковалевский А. П., Ольховский И. А. // Регуляторные эффекты и обмен моноаминов и циклонуклеотидов. — Красноярск, 1979. — Вып. 2. — С. 51—56.

2. Контюх В. В. // Пат. физиол. — 1977. — Вып. 2. — С. 35—39.
3. Кулинский В. И., Воробьева Л. М., Труфанова Л. В. // Циклические нуклеотиды. — М., 1979. — С. 56—72.
- 4—5. Кулинский В. И., Ковалевский А. П. // Бюл. экспер. биол. — 1984. — № 10. — С. 510.
6. Лукиенко П. И. // Фармакол. токсикол. — 1973. — № 5. — С. 618—620.
7. Ольховский И. А., Ковалевский А. П., Климова А. Д. // Биологическое и медицинское значение моноаминов и циклонуклеотидов. — Красноярск, 1985. — С. 54—64.
8. Островская Р. У. // Бюл. экспер. биол. — 1984. — № 10. — С. 436—438.
9. Тихомирова М. В., Яшкин П. П. // Радиобиология. — 1983. — № 1. — С. 100—103.
10. Anand-Strivatalava M. B., Franks D. J. // Life Sci. — 1985. — Vol. 37, N 9. — P. 857—867.
11. Appleman M. M., Thompson W. J., Russell T. R. // Advanc. Cyclic Nucl. Res. — 1973. — Vol. 3. — P. 65—98.
12. Dresse A. // Europ. J. clin. Pharmacol. — 1982. — Vol. 23, N 3. — P. 229—234.
13. Fox J. H., Kelley W. N. // Amer. Rev. Biochem. — 1978. — Vol. 47. — P. 655—686.
14. Fredholm B. B. // Med. Biol. — 1982. — Vol. 60, N 6. — P. 289—293.
15. Garcia-Sainz J. A., Torner M. L. // Biochem. J. — 1985. — Vol. 232, N 6. — P. 439—443.
16. Jonzon B., Fredholm B. B. // Life Sci. — 1984. — Vol. 35, N 19. — P. 1971—1979.
17. Londos C., Cooper D. M. F., Wolf J. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1980. — Vol. 77, N 5. — P. 2551—2554.
18. Masayohy A., Katsuragi T., Furukawa T. // Europ. J. Pharmacol. — 1983. — Vol. 90, N 1. — P. 29—34.
19. Newby A. C. // Trends Biochem. Sci. — 1984. — Vol. 9, N 2. — P. 42—44.
20. Oken S. M. M., Morley L. J. E. // Fed. Proc. — 1983. — Vol. 42, N 5. — P. 1189.
21. Ushijima I., Katsuragi T., Furukawa T. // Psychopharmacology. — 1984. — Vol. 83, N 4. — P. 335—339.
22. Yamamoto Y., Lagercrantz H., Fredholm B. B., von Euler C. // Acta physiol. scand. — 1982. — Suppl. 508. — P. 34.

Поступила 01.04.86

#### BIOCHEMICO-PHARMACOLOGICAL MECHANISMS AND INTERRELATIONSHIP BETWEEN ANTICALORIGENIC, HYPOTHERMAL AND ANTIHYPOXIC EFFECTS OF ADENOSINE

V. I. Kulinsky, I. A. Olkhovsky, A. N. Kovalovsky

Medical School, Krasnoyarsk

Administration of adenosine into mice induced a decrease in oxygen consumption (anticalorigenic effect), body temperature (hypothermic effect) and protected against acute hypoxia (antihypoxic action); all these effects are closely correlated. Isopropyl noradrenaline and theophylline prevented but propranolol and dipiridamol increased these effects of adenosine. Being administered into mice adenosine

decreased both cAMP content (in skeletal muscles and kidney) and respiration in kidney homogenates. These adenosine effects appear to be realized via the following chain:  $A_1$ -re-

ceptors  $\rightarrow$  decrease in cellular cAMP content  $\rightarrow$  inhibition of tissue oxygen consumption  $\rightarrow$  development of anticarcinogenic reactions  $\rightarrow$  hypothermic effects  $\rightarrow$  antihypoxic actions.

УДК 615.38.015.2:615.246.2]:519.86

Ю. И. Казаков, Б. А. Шматков

## СТОХАСТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ГЕМОСОРБЦИИ

Областная клиническая больница, Калинин

Для оценки эффективности выведения метаболитов из организма при использовании экстракорпоральной детоксикации успешно применяется математическое моделирование [1—3]. Однако существующие многокамерные модели не позволяют описать процесс гемосорбции в динамике и определить оптимальные параметры проведения ее, ввиду того что коэффициент сорбции обычно рассматривается как неизменная величина. Между тем клинические и стендовые испытания показывают, что сорбент достаточно быстро насыщается, после чего явно прослеживается эффект «вымывания» элиминированных метаболитов. Кроме того, процесс экстракорпоральной детоксикации не является детерминированным, а носит стохастический характер (см. рисунок). Поэтому целями настоящей работы были математическое описание процессов сорбции и десорбции холестерина плазмы крови в динамике и выявление оптимальных временных параметров проведения гемосорбции.

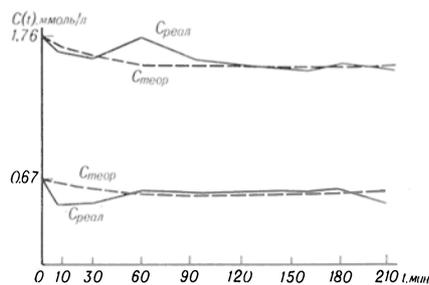
*Описание модели.* Введем следующие обозначения:  $V$  — объем циркулирующей плазмы крови (мл),  $F$  — скорость перфузии (мл/мин),  $C_0$  — исходная концентрация свободного холестерина плазмы крови (ммоль/л),  $C(t)$  — концентрация холестерина в момент времени  $t$ , т. е.  $M(t) = C(t)V$ ;  $m(t) = \frac{M(t)}{V}F$  — количество холестерина, прошедшего через сорбент за 1 мин,  $N$  — количество холестерина, которое способен осадить сорбент. Понятно, что последнее число является достаточно большим, но конечным.  $B(t)$  — количество пор, занятых холестерином к моменту  $t$ . Естественно предположить  $B_0 = 0$ ,  $B(t) \leq N$ .  $p$  — вероятность захвата молекулы холестерина сорбентом в начале сорбции. Эта вероятность убывает

в процессе детоксикации пропорционально количеству свободных пор в сорбенте  $P(t) = \frac{N - B(t)}{N} p$ .

Процесс вымывания метаболитов описан следующим образом.  $\tau$  — среднее время, которое элиминированная молекула холестерина находится в сорбенте. Предположим, что это время не зависит от скорости перфузии. Тогда момент вымывания можно описать показательным законом распределения с функцией  $f(t) = \frac{1}{\tau} e^{-\frac{t}{\tau}}$ . Вероятность десорбции одной молекулы за время  $\Delta t$  будет равна  $P_B(\Delta t) = 1 - e^{-\frac{\Delta t}{\tau}}$ , а среднее количество молекул холестерина:  $B(t) \cdot \left(1 - e^{-\frac{\Delta t}{\tau}}\right) \approx B(t) \frac{\Delta t}{\tau}$ .

Данная модель в целом соответствует теории Лэнгмюра. Далее мы получим функцию, описывающую математическое ожидание концентрации элиминированных метаболитов в зависимости от времени. Уравнение для среднего количества сорбированных и десорбированных молекул метаболита за время с момента  $t$  до момента  $t + \Delta t$  будет иметь следующий вид:

$$B(t + \Delta t) - B(t) = m(t) \Delta t \left( \frac{N - B(t)}{N} \right) - B(t) \frac{\Delta t}{\tau}. \quad (1)$$



Сравнительные данные реальной и расчетной концентрации холестерина при различных условиях проведения гемсорбции

Параметр	Условия экспериментов			
	№ 1 ( $V=1000$ , $F=20$ , $M=80$ , $C_0=1,76$ )	№ 2 ( $V=1000$ , $F=20$ , $M=80$ , $C_0=0,67$ )	№ 3 ( $V=600$ , $F=100$ , $M=271$ , $C_0=0,55$ )	№ 4 ( $V=200$ , $F=100$ , $M=91$ , $C_0=1,22$ )
$C_\infty$ теоретическая	1,524	0,564	0,454	1,011
$C_\infty$ реальная	1,524	0,576	0,429	0,977
Ошибка, %	0	-2,2	-5,7	+3,4

Примечание.  $C_\infty$  — концентрация холестерина в конце сорбции (ммоль/л),  $C_0$  — исходная концентрация холестерина (ммоль/л),  $V$  — объем плазмы крови (мл),  $F$  — скорость проведения сорбции (мл/мин),  $M$  — масса сорбента.

Учитывая, что  $M(t) = M_0 - B(t)$  и обозначая  $\beta(t) = \frac{B(t)}{V}$ ,  $n = \frac{B}{M}$ , имеем

$$V \frac{d\beta}{dt} = (C_0 - \beta(t)) F \left(1 - \frac{\beta(t)}{n}\right) \times \times p - V \frac{\beta(t)}{\tau} \quad (2)$$

Путь  $\frac{V}{F} = 1$ , т. е. примем за единицу время, за которое весь объем циркулирующей плазмы пройдет через сорбент (при различных  $V$  и  $F$  единица времени будет различной). Обозначим  $\frac{1}{p\tau} = \mu$  — коэффициент неустойчивости сорбента к процессу «десорбция — сорбция». Обратная к этой величине  $\frac{1}{\mu} = p\tau$  в теории Лэнгмюра носит название константы, равновесия адсорбционного процесса. Учитывая, что  $C(t) = \frac{M(t)}{V} = C_0 - \beta(t)$ , обозначая  $y = \frac{C_0}{n} = \frac{M_0}{N}$  — коэффициент избыточности холестерина в плазме относительно емкости сорбента, получаем

$$C(t) = C_0 \times \times \left(1 - \frac{2}{1 + \mu + y + \sqrt{(1 + \mu + y)^2 - 4y}}\right) \times \alpha(t) \quad (3)$$

где

$$\alpha(t) = \frac{1 + \exp(-pt \sqrt{(1 + \mu + y)^2 - 4y})}{1 - \exp(-pt \sqrt{(1 + \mu + y)^2 - 4y})} \quad (4)$$

Для выявления значений  $p$ ,  $\tau$  и  $y = \frac{C_0}{n}$  мы использовали количественные данные, полученные при проведении ряда стендовых испытаний с различными объемами циркулирующей плазмы крови, скоростями перфузии, объемами

и сорбентов (см. таблицу). Во всех случаях использовали сорбент СКН-2К.

Для расчета вероятности захвата метаболита [параметр  $p$ ]  $C(t)$  был взят из уравнений (3) и (4) и пренебрегая величинами большего, чем  $\Delta t$ , порядка (при малых  $\Delta t$ ), получим

$$C(\Delta t) \approx C_0(1 - p \Delta t + 0(\Delta t)).$$

Тогда  $p$  можно искать из равенства  $p \approx \frac{1 - \frac{C(\Delta t)}{C_0}}{\Delta t}$ . В экспериментах № 1

и 2, в которых соотношение объемов плазмы, сорбента и скорости перфузии соответствовало их соотношению в условиях клиники, единицей времени служит 50 мин. Следовательно, первое измерение концентрации холестерина через 5 мин от начала сорбции соответствует  $t=0,1$  в условных единицах времени. Поэтому вероятность захвата для холестерина  $p^{xc} = 0,312$ . Для определения величины параметра  $\mu$  средняя предельная концентрация холестерина описывается равенством

$$C_\infty = C_0 \times \times \left(1 - \frac{2}{1 + \mu + y + \sqrt{(1 + \mu + y)^2 - 4y}}\right) \quad (5)$$

При условиях эксперимента № 4 сорбция проводилась в течение 20—30 мин. В этом случае средние значения концентрации холестерина должны быть близки к  $C_\infty$ , так как единицей времени здесь являлось  $t=2$  мин, время сорбции 20 мин соответствует 10 условным единицам времени. Кроме того, в этих экспериментах (№ 4) масса сорбента была практически такой же, как в первых (№ 1 и 2), тем самым величина параметра  $y$  уменьшена более чем в 5 раз. Считая, что  $y$

при этих стендовых испытаниях близок к нулю, получаем  $C_{\infty} = C_0 \frac{\mu}{1 + \mu}$ .  
 Взяв  $C_{\infty}$  как среднее значение  $C$  ( $5 \text{ мин}$ ) =  $C(2,5)$ ,  $C(10 \text{ мин}) = C(5)$ ,  $C(20 \text{ мин}) = C(10)$ ,  $C(30 \text{ мин}) = C(16)$  и усредняя величину  $\mu$  по данным стендовых испытаний, получаем  $\mu = 4,618$ . Отсюда ясно, что среднее время удержания молекулы холестерина сорбентом СКН-2К составляет  $\tau = 0,694$  условных единиц времени. Полученная малая величина параметра  $\tau$  указывает на тот факт, что влияние процесса «вымывания» на результаты гемосорбции достаточно велико.

Величину параметра  $y$  определяли, используя асимптотическую формулу (5) и найденные значения параметра  $\mu$ , используя результаты экспериментов, где  $V = 1000 \text{ мл}$ ,  $F = 20 \text{ мл/мин}$ .

$$y = \frac{C_0}{C_{\infty}} \left( \frac{C_0}{C_0 - C_{\infty}} - (1 + \mu) \right) \quad (6)$$

Находя  $C_{\infty}$ , как среднее значение концентрации для  $C(90 \text{ мин}) = C(1,8)$ , до  $C(210 \text{ мин}) = C(4,2)$ , получаем  $y = 2,125$ , т. е. относительная емкость сорбента для свободного холестерина равна  $0,828 \text{ ммоль/л}$ . Таким образом, подставляя полученные значения в формулу (5) получим теоретически вычисленные значения концентрации холестерина в конце гемосорбции (см. таблицу).

Рассмотрим теперь основной для данной работы вопрос — определение времени сорбции, при котором теоретическое значение концентрации холестерина в плазме, рассчитанное по формулам (3) и (4), близко к ее асимптотическому значению  $C_{\infty}$  в формуле (5).

Можно получить следующую оценку времени сорбции (она тем точнее, чем меньше величина избыточной концентрации  $y$ ):

$$T < \frac{1}{\rho \sqrt{(1 + \mu + y)^2 - 4y}} \times \ln \left( \frac{1}{\mu + y + \sqrt{(1 + \mu + y)^2 - 4y - s}} \right) \times \frac{k + 1}{k - 1}, \quad (7)$$

где  $k = \frac{C(T)}{C_{\infty}}$ .

Пользуясь формулой (7) для определения времени сорбции свободного холестерина, подставляя в нее  $\mu = 4,618$ ,  $y = 2$  (концентрация холестерина =  $1,60 \text{ ммоль/л}$ ), получим  $T \approx \frac{1}{2,207} \ln \left( 0,076 \frac{k + 1}{k - 1} \right)$  и при  $k = 1,01$  (тот момент, когда средняя концентрация отличается от предельной на 1%)  $T = 1,235$ .

Обычно в клинике используют во время гемосорбции скорость перфузии  $100 \text{ мл/мин}$ . В данном случае единицей времени будет являться примерно та же величина, что в экспериментах № 1 и 2 — 50 мин. Подставляя эту величину, получим, что время сорбции в реальном масштабе времени 1 ч 2 мин. Таким образом, результаты наших исследований показывают, что время проведения гемосорбции больным с нарушением холестеринового обмена целесообразно ограничить 1 ч.

Кроме того, из формулы (5) можно получить величину  $\kappa$ , которая характеризует коэффициент полезного действия сорбента.

$$1 - \frac{C_{\infty}}{C_0} = \frac{2}{1 + \mu + y + \sqrt{(1 + \mu + y)^2 - 4y}} = \kappa(\mu, y). \quad (8)$$

Например,  $y = 2$  ( $C = 1,656 \text{ ммоль/л}$ ),  $\kappa(\mu, y) = 0,136$ . Если при заданной концентрации увеличить емкость сорбента в 5 раз, то  $y = 0,4$  и  $\kappa(\mu, y) = 0,168$ , а при бесконечно большой емкости сорбента ( $y = 0$ ),  $\kappa(\mu, 0) = 0,178$ , т. е. значительное увеличение емкости сорбента не приводит к существенному изменению коэффициента  $\kappa$ . Используя формулу (8), можно однозначно решить также вопрос о методике подключения сорбента, а именно, какой метод более целесообразен для повышения эффективности сорбции — последовательное подключение гемосорбентов в процессе сорбции или же пропорциональное увеличение объема его.

Пример.  $C = 1,06 \text{ ммоль/л}$ ,  $y = 1,28$  (таковы средние данные, полученные при лечении 25 больных облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей с использованием угля СКН-2К). При удвоенном объеме сорбента  $\kappa = 0,163$ , при последовательной двукратной сорбции  $\kappa = 0,279$ .

Из этого вытекает, что эффект последовательной гемосорбции существенно выше.

Таким образом, предложенная нами стохастическая модель гемосорбции удовлетворительно описывает процесс «сорбция—десорбция» метаболитов, в частности холестерина плазмы крови, в динамике за период сеанса экстракорпоральной детоксикации. Выявлено, что целесообразное время проведения гемосорбции составляет 1 ч, после чего преобладает процесс вымывания элиминированных

метаболитов. Кроме того, данная модель позволяет объективно оценить эффективность работы гемосорбентов и выбрать наилучший метод подключения его.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Киликовский В. В., Стернин И. Ю. // Гемосорбция. — М., 1977. — С. 39—52.
2. Киселев А. А., Киликовский В. В., Котова И. П. и др. // Там же. — С. 32—39.
3. Лопухин Ю. М., Арчаков А. И., Владимиров Ю. А., Коган Э. М. Холестериноз. — М., 1983.

Поступила 17.01.86

## МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 616-008.939.15-39-074

*В. А. Костюк, А. И. Потапович*

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОДУКТОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ С ПОМОЩЬЮ ТИОБАРБИТУРОВОЙ КИСЛОТЫ В АНАЭРОБНЫХ УСЛОВИЯХ

НИЛ биоэнергетики при кафедре физиологии человека и животных Белорусского университета им. В. И. Ленина, Минск

ТБК-тест является одним из наиболее распространенных методов определения продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Простота анализа, доступность используемого оборудования и реактивов способствовали его широкому применению в различных областях биологии и медицины. В основе этого теста лежит определение количества окрашенного продукта, образующегося при взаимодействии молекулы малонового диальдегида (МДА), одного из конечных продуктов ПОЛ, с двумя молекулами тиобарбитуровой кислоты (ТБК). Проведенные исследования показали, что большая часть МДА, реагирующего с ТБК, образуется из промежуточных продуктов ПОЛ непосредственно при анализе пробы. Такими продуктами могут быть гидроперекиси липидов [2], эндоперекиси [4], простагландинподобные бициклические эндоперекиси [11]. Поэтому в настоящее время ТБК-тест рассматривается как метод

оценки общего содержания продуктов ПОЛ. Однако исследования, подтверждающие возможность применения ТБК-теста с такой целью [2, 6], проводились главным образом с ненасыщенными жирными кислотами и их гидроперекисями, для которых характерно тождество результатов, полученных при анализе в аэробных и анаэробных условиях [3]. В то же время при анализе тканевых гомогенатов до 90 % всего МДА может образовываться в результате свободнорадикальных реакций, активирующихся при кипячении исследуемых образцов в присутствии кислорода [1]. По этой причине принципиальное значение имеет наличие корреляции между количеством образующегося МДА и содержанием первичных продуктов ПОЛ. Приведенные ниже данные не подтверждают наличия такой корреляции при анализе биологического материала. Поэтому предложен метод проведения ТБК-теста, исключая

Влияние кислорода на определение МДА с помощью ТБК в биологическом материале

Условия анализа	Содержание МДА, нмоль на 1 г ткани (мл сыворотки)				
	печень	перфузированная печень	мозг	сердце	сыворотка крови
Аэробные	298±14 (6)	195±11 (15)	218±25 (5)	162±2 (3)	12,5±0,4 (5)
Анаэробные	20±1 (6)	22±2 (15)	25±2 (5)	39±2 (3)	13,3±0,8 (5)

Примечание. В скобках — число определений. Звездочкой отмечено  $P < 0,05$ .

Ющий возможность активации свободнорадикальных реакций во время аналитической процедуры.

### Методика

В работе использовали линолевую кислоту, L- $\alpha$ -диглицирил — фосфатидилхолин («Р — L Biochemicals, Inc.», США), трилинолеин («Sedary Res. Lab. Inc.», Канада), холестериллинолеат («Nakagata Chem, Ltd», Япония).

Для получения соответствующей гидроперекиси линолевую кислоту окисляли в присутствии липоксидазы и затем очищали описанным ранее методом [8]. Остальные липиды окисляли на воздухе при комнатной температуре, растворяли в изопропиловом спирте и хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Гидроперекиси определяли с помощью красителя лейкометиленового голубого [7] в 0,1 мл изопропилового спирта. Для определения эндогенных гидроперекисей в гомогенате печени предварительно проводили экстракцию по Фолчу [5]. Хлороформную фазу уваривали в токе аргона и остаток липидов растворяли в изопропиловом спирте.

Содержание МДА в гомогенате тканей определяли с помощью ТБК следующим методом [9]: 0,2 мл 10 % гомогената ткани на 0,9 % NaCl добавляли к смеси 1,5 мл 20 % уксусной кислоты, 1,5 мл 0,8 % ТБК, 0,2 мл 8,1 % додецилсульфата натрия и 0,5 мл  $\text{H}_2\text{O}$ . Окисленные липиды вносили в 0,1 мл изопропилового спирта. При проведении анализа в анаэробных условиях реакцию смесь без додецилсульфата натрия помещали в стеклянные ампулы, барбатируют аргоном в течение 5 мин, добавляли анализируемую пробу, додецилсульфат натрия и запаивали ампулы в токе аргона.

Пробы инкубировали в кипящей водяной бане 60 мин и после охлаждения экстрагировали окрашенный продукт 5 мл смеси бутанол — пиридин (15:1). Оптическую плотность измеряли при 532 нм, для расчета количества МДА использовали коэффициент молярной экстинкции  $\varepsilon = 1,56 \cdot 10^5 \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

Содержание МДА в сыворотке крови определяли флуориметрически методом [12] с помощью флуориметра «Hitachi 650-10» (Япония), в качестве стандарта использовали тетраэтоксипропан.

### Результаты и обсуждение

Согласно современным представлениям, большая часть МДА, определяемого с помощью ТБК в биологиче-

ском материале, образуется при нагревании исследуемой пробы в кислой среде в результате разрушения промежуточных продуктов ПОЛ, главным образом эндоперекисей [10, 11].

Вместе с тем наличие в исследуемом материале инициаторов и субстратов ПОЛ, а также достаточно высокая температура, при которой проводится ТБК-анализ, дают основание предположить, что часть МДА может образовываться в результате перекисного окисления непосредственно во время анализа.

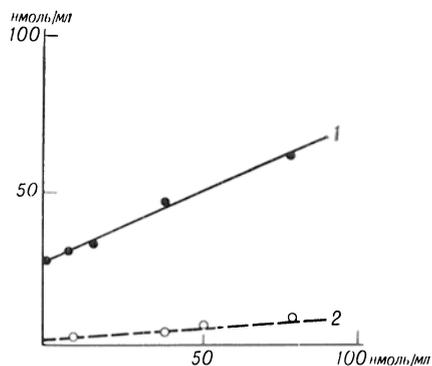
Сравнение результатов, полученных при анализе в обычных и анаэробных условиях, исключая возможность активации перекисного окисления, но не влияющих на реакции образования МДА из промежуточных продуктов ПОЛ [3], подтверждает этот вывод в случае тканевых гомогенатов; в то же время ПОЛ не наблюдается при анализе сыворотки крови (табл. 1). По-видимому, иницирование ПОЛ в условиях ТБК-анализа обусловлено разрушением гидроперекисей липидов по радикальному механизму.

Для проверки этого предположения к гомогенату печени крысы добавляли различные количества гидроперекиси линолевой кислоты. Из рисунка видно, что увеличение количества гидроперекисей в анализируемом образце приводит к усилению образования МДА. Таким образом, в этом случае перекисное окисление выполняет роль своеобразного усилителя, «сигнал» на выходе которого зависит от содержания гидроперекисей. Тем не менее проведение ТБК-анализа с целью определения первичных продуктов ПОЛ в присутствии кислорода имеет смысл только в том случае, если возмущающее влияние других факторов, способных регулировать скорость свободнорадикальных процессов (концентрация активаторов, ни-

гибиторов, субстратов и др.), не искажит данную зависимость.

Для исследования влияния индивидуальных различий на результаты ТБК-анализа были использованы крысы Вистар (160—240 г). Результаты проведенных экспериментов показали, что количество МДА, реагирующего с ТБК при анализе гомогенатов печени крыс, содержащихся в сходных условиях, чрезвычайно варьирует (табл. 2). Из сравнения данных, полученных в анаэробных и аэробных условиях, видно, что вариабельность результатов обусловлена различной интенсивностью ПОЛ во время анализа. Если учесть, что все животные имели приблизительно одинаково низкий уровень гидроперекисей (см. табл. 2), вполне обоснованным является вывод об отсутствии корреляции между результатами ТБК-анализа в аэробных условиях и содержанием первичных продуктов ПОЛ. Этот вывод подтверждается и тем, что добавление к анализируемым образцам равных количеств окисленных липидов, содержащих значительно больше первичных продуктов ПОЛ, чем исходный биологический материал, не только не сглаживает имеющиеся различия, но и усиливает их (см. табл. 2).

Приведенные данные свидетельствуют о том, что результаты ТБК-ана-



Влияние гидроперекиси линолевой кислоты на результаты определения МДА в гомогенате печени крыс в аэробных (1) и анаэробных (2) условиях.

По оси абсцисс — концентрация гидроперекиси (в нмоль/мл); по оси ординат — количество МДА (в нмоль/мл).

лиза в присутствии кислорода значительно больше зависят от факторов, обуславливающих способность биологического материала подвергаться перекисному окислению, чем от содержания продуктов ПОЛ. Этим объясняется значительная разница между результатами ТБК-анализа гомогената перфузированной и неперфузированной печени (см. табл. 1), так как в результате перфузии удаляется гемоглобин крови, способный, вероятно, активировать радикальные про-

Т а б л и ц а 2

Соотношение между количеством гидроперекисей липидов и ТБК-активными продуктами, определяемыми в печени крыс в анаэробных и аэробных условиях (нмоль на 1 мл гомогената)

Добавленная гидроперекись	Гомогенат печени			Экзогенные липиды		Гомогенат+экзогенные липиды	
	гидроперекиси	ТБК-активные продукты		гидроперекиси	ТБК-активные продукты	ТБК-активные продукты	
		анаэробные условия	аэробные условия			анаэробные условия	аэробные условия
Линолевая кислота	4,1	3,2	21,6	50	1,2	5,9	87,5
	1,6	2,3	10,2	50	1,2	4,5	16,8
Фосфатидилхоллин	4,9	2,5	10,7	58	3,5	6,8	28,4
	3,2	3,0	13,6	58	3,5	6,8	54,1
	2,4	2,5	26,4	58	3,5	7,2	69,3
Холестеринлиноленат	2,4	2,1	13,4	55	7,1	10,0	27,5
	3,2	3,0	29,8	55	7,1	11,1	61,1
Трилинолеин	3,2	2,1	10,9	51	11,4	14,1	26,1
	2,4	2,3	17,1	51	11,4	13,9	39,1
	3,2	2,7	20,0	51	11,4	13,6	43,4

П р и м е ч а н и е. Каждое значение представлено как среднее 3 определений.

цессы. Создание анаэробных условий предотвращает реакции перекисного окисления в процессе анализа биологического материала. Полученные в этом случае результаты определяются только содержанием промежуточных продуктов ПОЛ, разлагающихся при нагревании с образованием МДА (см. табл. 2). Таким образом, определение промежуточных продуктов ПОЛ с помощью ТБК в гомогенатах тканей следует проводить только в отсутствие кислорода. Поскольку существующие методические рекомендации по использованию ТБК для анализа продуктов ПОЛ [2, 6, 9] не учитывают эти факты, полученные с их помощью результаты не могут однозначно рассматриваться как доказательство участия ПОЛ в развитии патологических процессов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Костюк В. А., Потапович А. И. // Кислородные радикалы в химии и биологии. — Минск, 1984. — С. 49—53.
2. Asakawa T., Matsushita S. // Lipids. — 1980. — Vol. 15. — P. 137—140.
3. Asakawa T., Matsushita S. // Agricult. Biol. Chem. — 1981. — Vol. 45. — P. 453—457.
4. Dahle L. K., Hill E. G., Holman R. T. // Arch. Biochem. — 1962. — Vol. 98. — P. 253—261.
5. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. H. //

- J. biol. Chem. — 1957. — Vol. 226. — P. 497—505.
6. Gutteridge J. M. C. // Int. J. Biochem. — 1982. — Vol. 14. — P. 649—653.
7. Ohishi N., Ohkawa H., Miike A. et al. // Biochem. Int. — 1985. — Vol. 10. — P. 205—211.
8. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. // Lipid Res. — 1978. — Vol. 19. — P. 1053—1057.
9. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. // Analyt. Biochem. — 1979. — Vol. 95. — P. 351—358.
10. Poubelle P., Chaintrenil J., Bensadoun J. et al. // Biomed. Pharmacother. — 1982. — Vol. 36. — P. 164—166.
11. Pryor W. A., Stanley J. P., Blair E. // Lipids. — 1976. — Vol. 11. — P. 370—379.
12. Yagi K. // Biochem. Med. — 1976. — Vol. 15. — P. 212—216.

Поступила 11.09.85

#### ESTIMATION OF LIPID PEROXIDATION PRODUCTS USING TBA-TEST UNDER ANAEROBIC CONDITIONS

V. A. Kostyuk, A. I. Potapovich

Chair of Human and Animal Physiology, Byelorussian State University, Minsk

Products of lipid peroxidation were estimated in aerobic and anaerobic conditions using thiobarbituric acid (TBA) test. The main amount of malonic dialdehyde estimated in tissue homogenate in presence of oxygen was found to develop during the analytical procedure as a result of lipid peroxidation. At the same time, content of lipid peroxidation primary products did not correlate with amount of malonic dialdehyde in the sample studied. This suggests that TBA analysis may be carried out only under anaerobic conditions.

УДК 616.155.3-008.931:577.152.11-074:543.432

А. Г. Белякович, Л. В. Лахина, Е. В. Панкратова, Б. И. Теплицкий,  
Г. П. Чумакова

#### КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ НЕСКОЛЬКИХ ДЕГИДРОГЕНАЗ В ОДНОМ МАЗКЕ ИЗ ЛЕЙКОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

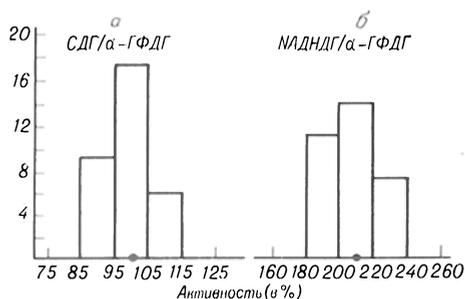
Институт биологической физики АН СССР, Пущино

Изучению дегидрогеназ в медицине уделяют большое внимание [4, 6—12, 14]. Отчасти это определяется значением оксидоредуктаз в метаболизме лейкоцитов. Известные биохимические методы определения активности дегидрогеназ в лейкоцитах человека [4, 6, 7, 10, 12, 14] позволяют в одном препарате клеток определить активность 1 фермента. Предлагаемая методика позволяет путем последовательной инкубации в различных средах 1 мазка из лейкоцитов определять активность нескольких дегидрогеназ в одних и тех же клетках, что приво-

дит к сокращению необходимого для исследования количества лейкоцитов. Поскольку в предлагаемой методике информативными показателями являются не абсолютные, а относительные активности, то в данном методе отличие от предыдущих [4, 6, 7, 10, 12, 14] препарат готовили из произвольного количества лейкоцитов.

#### Методика

Принцип определения активности нескольких дегидрогеназ в лейкоцитах заключается в следующем. Фиксированный в ацетоне мазок из лейкоцитов последовательно инкубируют в



Отношение СДГ/ГФДГ (а) и НАД·Н ДГ/ГФДГ (б) лейкоцитов 32 здоровых доноров. По оси абсцисс — соотношение активности (в %), по оси ординат — число доноров.

средах, из которых каждая содержит по 1 субстрату исследуемых дегидрогеназ, а также искусственный акцептор электронов — соль тетразолия. При окислении субстрата ферментов лейкоцитов соль тетразолия восстанавливается и продукты восстановления локализуются только в клетках мазка, фотометрирование которого в ходе реакции позволяет определить активность данного фермента [13]. Последующая инкубация этого же мазка в среде с субстратом другой дегидрогеназы позволяет определить активность второго фермента и т. д.

Мазок готовили из лейкоконцентрата. После центрифугирования (5—7 мин, 1500 об/мин) 5 мл венозной крови с 0,5 мл 1,34 % цитрата (или оксалата) натрия микрошпатель отбирали 70—100 мкл лейкоконцентрата с границы раздела двух сред (форменные элементы — плазма), наносили каплю на стекло и вводили ее путем прикосновения в стандартный капилляр для определения гематокрита, заключивали с одного конца замазкой и повторно центрифугировали в том же режиме. Затем капилляр надрезали с помощью металлической пластинки, ломали и готовили из суспензии лейкоцитов мазок на стекле, вырезанном из предметного стекла, имеющем размеры кюветы ФЭК. После подсушивания на воздухе при комнатной температуре мазок фиксировали в течение 30 с в 70 % растворе ацетона в 40 мМ фосфатном буфере (2:1) при рН 7,4, затем 30 с отмывали мазок в таком же растворе без

ацетона и без подсушивания помещали в первую среду инкубации.

Каждая среда инкубации содержала 40 мМ фосфат калия (как и в растворе фиксатора) при рН 7,4. Первая среда [для определения активности  $\alpha$ -глицерофосфатдегидрогеназы (ГФДГ) митохондрий] включала в себя 15 мМ  $\alpha$ -глицерофосфат, 0,4 мМ малонат и 1 мМ п-нитротетразолий фиолетовый (п-НТФ); "Reanal", Венгрия), вторая среда [для сукцинатдегидрогеназы (СДГ)] имела 5 мМ сукцинат и 1 мМ п-НТФ, третья (для дегидрогеназ, окисляющих НАД·Н) — 0,2 мМ п-НТФ, 4 мМ малонат и 1 мМ п-НТФ. Приготовление исходного 20 мМ водного раствора п-НТФ обязательно включало фильтрование. Спектральные характеристики п-НТФ представлены в работе [13]. Особое внимание обращали на постоянство значения рН и концентрации п-НТФ во всех средах.

Скорость окислительно-восстановительных реакций измеряли с помощью фотоэлектроколориметра. Теоретическое обоснование возможности использования ФЭК в режиме, позволяющем непрерывно регистрировать скорость любой цветной реакции, а также описание способа эксплуатации прибора (без технических изменений) в указанном режиме представлены в работе [2]. Поскольку восстановленная в ходе реакции соль тетразолия п-НТФ имеет максимум поглощения при  $\lambda$ -510 нм [10], пользовались зеленым светофильтром. Через 3 мин после помещения кюветы со средой и мазком в ФЭК начинали измерять сигнал  $\Delta_1$  строго в течение 2 мин. Сигнал  $\Delta_1$  измеряли на милливольтметре, подключенном к выходу ФЭК, либо на ленте самописца КСП-4 (0—10 мВ), непосредственно соединенном с выходом ФЭК. Затем мазок переносили в кювету со второй средой (для СДГ) и тут же измеряли сигнал  $\Delta_2$  также строго в течение 2 мин, после чего мазок переносили в кювету с третьей средой (для НАД·Н ДГ) и спустя 3 мин начинали измерять сигнал  $\Delta_3$  в течение 2 мин.

Информативными показателями являются относительные активности, определяемые как

СДГ: ГФДГ =  $\frac{\Delta_2}{t_2} : \frac{\Delta_1}{t_1} \cdot 100\%$  и так как  $t_1 = t_2 = 2$  мин, то СДГ/ГФДГ =  $\Delta_2/\Delta_1 \cdot 100\%$ , а также НАД·Н ДГ/ГФДГ =  $\Delta_3/\Delta_1 \cdot 100\%$ . Поскольку относительная активность не зависит

Относительная активность (в %) СДГ/ГФДГ и НАД·Н ДГ/ГФДГ в лейкоцитах здоровых людей

Опыт	Донор	Мазок	СДГ/ГФДГ	НАД·Н ДГ/ГФДГ	Опыт	Донор	Мазок	СДГ/ГФДГ	НАД·Н ДГ/ГФДГ
а	1	1	113	229	в	5	1	91	222
		2	117	233			2	97	218
		3	112	211			6	1	86
		Среднее значение	114±2%	224±3%			2	85	248
	2	1	100	178	г	7	1	98	182
		2	93	176			2	100	192
		3	107	197			8	1	100
		Среднее значение	100±4%	183±3%			9	2	250
	б	3	1	109	241	10	3	100	189
			1	106	232			8	4
4		1	82	242	9	5	115	233	
		1	85	228	10	6	96	189	
		1	87	235					

от количества клеток на мазке, мазок готовили из произвольного количества лейкоцитов.

## Результаты и обсуждение

Все результаты, представленные в таблице и на рисунке, получены при помощи описанной выше методики на лейкоцитах крови здоровых людей — доноров станции переливания крови. Данные таблицы позволяют оценить воспроизводимость результатов в разных условиях: опыт а) из одной порции крови определяли активность в лейкоцитах 3 мазков; опыт б) один и тот же мазок инкубировали повторно; опыт в) активность определяли на 1 порцию крови в день ее взятия (мазки № 1) и через сутки (мазки № 2) в условиях хранения крови при 4 °С; опыт г) без замены сред в кюветах активность определяли в 6 мазках. Эти данные свидетельствуют о хорошей воспроизводимости результатов (ошибка 2—4 %), возможности сохранения крови донора до измерения в ней активности в течение суток, а также о возможности использования одних и тех же сред для инкубации не менее чем 6 мазков.

На рисунке показано распределение относительной активности у 32 доноров. Активность СДГ/ГФДГ у всех доноров находилась в диапазоне 85—115 при среднем значении 100, активность НАД·НДГ/ГФДГ была в диапазоне 180—240 при среднем значении 210.

Известно, что ГФДГ и СДГ локализованы во внутренней мембране митохондрий, а НАД·Н является субстратом для трех дегидрогеназ, локализованных в разных мембранах — внутренней и внешней мембране митохондрий, а также в мембранах эндоплазматического ретикула [1, 5]. Поэтому наиболее вероятно, что в лейкоцитах больных будет наблюдаться отклонение от нормы активности НАД·Н ДГ/ГФДГ и для клинических целей нахождение активностей 5 дегидрогеназ (ГФДГ, СДГ, НАД××Н ДГ<sub>1</sub>, НАД·Н ДГ<sub>2</sub>, НАД·Н ДГ<sub>3</sub>) может оказаться достаточной.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Арчаков А. И. // Микросомальное окисление. — М., 1975. — С. 221.
2. Белякович А. Г. // Вопр. мед. химии, 1987, № 1.
3. Браунштейн А. Е. // Номенклатура ферментов: Пер. с англ. — М., 1979. — С. 38.
4. Захарьин Ю. Л. // Лаб. дело. — 1967. — № 6. — С. 327.
5. Лузиков В. П. // Регуляция формирования митохондрий. — М., 1980. — С. 9.
6. Путилина Ф. Е., Ещценко Н. Д. // Вестн. Ленинград. ун-та. Биол. — 1969. — Вып. 4. — № 21. — С. 113.
7. Сейц И. Ф., Луганова И. С. // Биохимия клеток крови и костного мозга в норме и при лейкозах. — Л., 1967. — С. 121.
8. Соколов В. В., Нарциссов Р. П., Иванова Л. А. // Цитохимия ферментов в профпатологии. — М., 1975. — С. 47; 63; 94.
9. Терентьева Э. И. // Цитохимия элементов кроветворения при лейкозе. — М., 1968.
10. Шепотиновский В. И., Минашинович З. И. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 1. — С. 25.
11. Хейхоу Ф. Г. Дж., Кваглино Д. // Гематологическая цитохимия: Пер. с англ. — М., 1983. — С. 177.
12. Belfiore F. // Boll. Soc. ital. Biol. sper. — 1962. — Vol. 38. — P. 1741.
13. Belyakovich A. G. // Analyt. Biochem. — 1983. — Vol. 131. — P. 404.
14. Berlino J. R., Gabrio B. W., Huennekens F. M. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1960. — Vol. 3. — P. 461.

Поступила 09.08.85

## COLORIMETRIC PROCEDURE FOR SEQUENTIAL ESTIMATION OF SEVERAL DEHYDROGENASES IN ONE SMEAR OF HUMAN LEUKOCYTES

A. G. Belyakovich, L. V. Lakhina, E. V. Pankratova, B. I. Teplitsky, G. P. Chumakova

Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the USSR, Puschino

Activity of several dehydrogenases was estimated by means of sequential incubation of a smear of human leukocytes in various media containing specific substrates for each enzyme and p-nitrotetrazolium violet as an acceptor of electrons. Photometry of the coloured products of redox reactions was carried out in the photoelectrocolorimeter, which was used for registration of steady state kinetics of all the reactions studied under usual conditions. Relative activity of succinate- $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenases and NADH/ $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenases was estimated with an error of 2-4 % in individual donors, while deviations of these values in leukocytes of the donors constituted  $\pm 15$  % as compared with their middle level calculated in 32 donors.

В. Г. Дегтярь, Ю. В. Милосердов

## СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕЦЕПТОРОВ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ

ЦНИЛ 4-го Главного управления при Минздраве СССР, Москва

Многие успехи в фундаментальных исследованиях по биологии и медицине связаны с определением специфической рецепции различных классов соединений в клетках-мишенях человека и животных. Наибольшее число публикаций, по-видимому, посвящено рецепторам стероидных гормонов, так как этот класс низкомолекулярных биорегуляторов обладает широким спектром действия [5, 7], а их определение находит применение в клинической практике, в частности в онкологии [5]. Теоретические вопросы связывания (рецепции) лиганда белками-рецепторами в общем виде разработаны достаточно подробно [2, 11]. Однако подходы к статистической обработке результатов количественного определения рецепторов, в частности стероидов, все еще являются предметом дискуссий [9]. И если в экспериментальных исследованиях правильная статистическая оценка результатов обычно не является проблемой, то в клинических исследованиях при малом количестве биопсийного материала (соответственно при малой выборке) это бывает сделать затруднительно. В то же время правильная оценка результатов количественного определения рецепторов стероидов в биопсийном материале может иметь принципиальное значение при лечении больных с опухолями молочной, и возможно, предстательной желез [10, 14].

В данной работе предлагается один из подходов к простой статистической обработке результатов определения специфического связывания, что показано на примерах рецепции ряда стероидных гормонов цитозольными фракциями различных органов человека и животных.

### Методика

В работе использовали меченные тритием стероиды фирмы «Amersham International» (Англия). Немеченные стероиды получены из фирмы «Sigma» (США). Рецепторы в цитозольных фракциях определяли по описанным ранее методам: [<sup>3</sup>H]-E<sub>2</sub> [4], [<sup>3</sup>H]-ДГТ [1], [<sup>3</sup>H]-3β-диол [3].

*Метод вычисления специфического связывания при насыщающей концентрации лиганда (по одной точке).* При одной концентрации [<sup>3</sup>H]-стероида и концентрации белка цитозольной фракции определяли общее связывание и неспецифическое связывание (в присутствии 100-кратного молярного избытка немеченного лиганда). Вычисляли отдельные величины специфического связывания как разницу между каждым значением общего связывания и каждым значением неспецифического связывания. Из ряда полученных величин вычисляли взвешенное среднее ( $\bar{X}$ ), стандартное отклонение ( $SD$ ) и стандартную ошибку средней ( $SEM$ ). Вероятность различий между величинами специфического связывания цитозольных фракций определяли, используя  $t$ -критерий Стьюдента.

*Графическое определение стандартного отклонения  $K_d$  и  $B_{\max}$ .*

При одинаковой концентрации белка цитозольной фракции и при нескольких повышающих концентрациях [<sup>3</sup>H]-стероида определяли специфическое связывание и вычисляли величины  $\bar{X}$  и  $SD$  для каждой экспериментальной точки, как указано выше. В координатах Скетчарда [13] по оси абсцисс для каждой экспериментальной точки откладывали значения  $\bar{X} \pm SD$ . Концентрацию свободного лиганда для вычисления значений по оси ординат вычисляли как разницу между общей (исходной) концентрацией лиганда и величиной общего связанного лиганда в каждой экспериментальной точке. Методом наименьших квадратов определяли коэффициенты уравнений регрессии для значений в каждой точке:  $\bar{X} + SD$ ,  $\bar{X}$  и  $\bar{X} - SD$ . Проводили линии регрессии до пересечения с осями координат. Пересечение средней линии с осью абсцисс дает взвешенное среднее значение максимального связывания —  $B_{\max}$ , а отрезки по оси от значения  $B_{\max}$  до пересечения с двумя другими линиями регрессии дают значения  $+SD$  и  $-SD$ . Из наклона каждой линии регрессии находили соответствующие величины для  $K_d$ .

### Результаты и их обсуждение

При определении рецепторов любого класса соединений исследователя прежде всего интересует величина  $B_{\max}$ , которая определяется либо различными графическими методами (чаще всего по методу Скетчарда [13]), либо по одной точке при насыщающих концентрациях лиганда. В меньшей степени важна и надежность получаемых результатов не с точки зрения правильности метода как такового (это вопрос особый), а с точки зрения надежности статистики при оценке достоверности отличий между величинами

Расчетные параметры специфического связывания (имп/мин) андрогенов и эстрадиола в тканях-мишенях человека и крысы

№ п/п	Орган, лиганд	Связывание лиганда		Число значений	Специфическое связывание			t для выбранных пар	Достоверность отличий, p
		общее	неспецифическое		$\bar{X}$	SD	SEM		
1	МК, [ <sup>3</sup> H]-E <sub>2</sub>	4431, 4688, 4517	819, 578, 725	9	3838	155	63	1,21	>0,05
2	МК, [ <sup>3</sup> H]-E <sub>2</sub>	4860, 4165, 3893	731, 662, 606	9	3640	435	177		
3	ГМ, [ <sup>3</sup> H]-H <sub>2</sub>	2596, 3041, 3226	767, 544, 605	9	2316	298	122		<0,0005
4	ГФ, [ <sup>3</sup> H]-E <sub>2</sub>	1139, 1121, 1028	372, 367, 449	9	700	65	26	15,03	
5	РМЖ, [ <sup>3</sup> H]-E <sub>2</sub>	2252, 2422, 2698	2010, 1510, 1948	9	735	265	108	1,03	>0,05
6	То же	2574, 2300, 3154	1944, 1644, 1708	9	911	402	164		
7	« «	8668, 8440, 9256	6074, 5288	6	3109	568	284	0,57	>0,2
8	« «	9226, 8908, 10093	5890, 6284	6	3318	588	294		
9	АПЖ, [ <sup>3</sup> H]-E <sub>2</sub>	5480, 6329, 6126	4667, 4873, 4902	9	1164	400	163	1,55	>0,05
10	АПЖ [ <sup>3</sup> H]-E <sub>2</sub>	5548, 7164, 4334	342, 378	6	2051	1280	522		
11	ГМ, [ <sup>3</sup> H]-3β-диол	181, 182, 243	61, 71	6	136	32	16	6,15	<0,0005
12	ГМК, [ <sup>3</sup> H]-3β-диол	290, 288, 300	71, 64	6	224	8	4		
13	ГФ, [ <sup>3</sup> H]-3β-диол	328, 298, 356	67, 86, 34	9	299	39	16	2,56	>0,01
14	ГФ, [ <sup>3</sup> H]-3σ-диол	404, 396, 402	83, 55, 50	9	338	16	6	12,6	<0,0005
								17,14	<0,0005
15	ГФК, [ <sup>3</sup> H]-3β-диол	588, 554, 501	89, 64, 61	9	496	20	8		
16	ПЖК, [ <sup>3</sup> H]-ДГТ	1737, 1726, 1682	495, 572, 652	9	1142	73	30	6,09	<0,0005
17	ПЖК, [ <sup>3</sup> H]-ДГТ	2228, 2216, 2042	776, 778, 738	9	1398	92	37		
18	АПЖ, [ <sup>3</sup> H]-ДГТ	1902, 2242	1897, 1838, 1806	6	196	190	95	2,28	>0,01
19	АПЖ, [ <sup>3</sup> H]-ДГТ	1808, 2079, 1556	1548, 1217, 1235	9	481	278	139		
20	РМЖ, [ <sup>3</sup> H]-ДГТ	2328, 2830, 1906	102, 76, 142	9	2248	402	164	1,63	>0,05
21	РМЖ, [ <sup>3</sup> H]-ДГТ	2202, 2284, 2246	206, 224, 256	9	2015	42	17		

Примечание. Здесь и в табл. 2: МК — матка крыс популяции Вистар, ГМ — гипофиз интактных самцов крыс, ГМК — гипофиз кастрированных самцов крыс, ГФ — гипофиз интактных неполовозрелых самок крыс, ГФК — гипофиз кастрированных неполовозрелых самок крыс, ПЖК — вентральная простата кастрированных крыс, АПЖ — аденома предстательной железы человека, РМЖ — рак молочной железы человека.

ми специфического связывания, по крайней мере при 95 % доверительном интервале [12]. Это принципиально важно как в экспериментальных исследованиях, так и особенно для результатов, получаемых в клинических лабораториях.

Только в самое последнее время появились исследования по теоретическим основам статистической оценки результатов рецепторного анализа стероидных гормонов [6, 12]. Однако все эти исследования связаны с машинной обработкой экспериментальных данных, причем величину стандартного отклонения определяют, исходя из средней ошибки результатов по всем экспериментальным точкам при построении графика в координатах Скетчарда [12]. Метод расчета [6] позволяет также получать данные с величинами стандартного отклонения, однако в этом методе используют только средние величины в каждой экспериментальной точке графика Скетчарда, т. е. фактически учитывается стандартное отклонение средних величин. Нам кажется это не совсем

правомерным, так как «разброс» экспериментальных данных в разных точках графика Скетчарда может существенно различаться [12]. Очевидно также, что в настоящее время в большинстве практических лабораторий не имеется возможности проводить машинную обработку данных.

Использование предлагаемого нами подхода графического определения величин стандартного отклонения для  $\bar{V}_{\text{макс}}$  и равновесной константы диссоциации  $\bar{K}_d$  показано на двух примерах. На рис. 1 приведены данные по графическому определению величин  $\bar{V}_{\text{макс}}$  и  $\bar{K}_d$  и их стандартных отклонений для рецепции [<sup>3</sup>H]-E<sub>2</sub> цитозолем матки крысы, выраженные в координатах Скетчарда [13]. Для сравнения в подписи к рис. 1 приведены вычисленные значения  $\bar{V}_{\text{макс}}$  и  $\bar{K}_d$  и их стандартных отклонений по способу [2]. Видно, что как вычисленные по способу [2], так и полученные графическим путем значения  $\bar{V}_{\text{макс}}$  и  $\bar{K}_d$  близки. На рис. 2 в тех же координатах приведены результаты графического опреде-

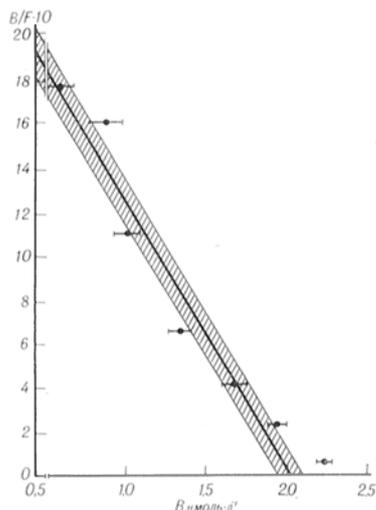


Рис. 1. Определение рецепции  $[^3\text{H}]\text{-E}_2$  в цитозоле матки крысы по методу [13].

Аликвоты цитозоля с общей концентрацией белка  $1,80 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$  инкубировали с одним  $[^3\text{H}]\text{-E}_2$  при концентрациях  $5 \cdot 10^{-10} - 5 \cdot 10^{-8} \text{ моль}\cdot\text{л}^{-1}$  (общее связывание) или в присутствии 100-кратного молярного избытка диэтилстильбэстрола (неспецифическое связывание). Обработку проб проводили по [4], а расчеты — как описано в «Методике». Графически определены:  $B_{\text{макс}} = 2,022 \pm 0,72 \text{ нмоль}\cdot\text{л}^{-1}$ ;  $K_d = 8,10 \pm 0,11 \cdot 10^{-10} \text{ моль}\cdot\text{л}^{-1}$ . Величины, вычисленные с использованием метода [2]:  $B_{\text{макс}} = 1,997 \pm 0,033 \text{ нмоль}\cdot\text{л}^{-1}$ ;  $K_d = 8,89 \pm 0,37 \cdot 10^{-10} \text{ моль}\cdot\text{л}^{-1}$ . В каждой экспериментальной точке на графике указаны: среднее специфического связывания  $\pm$  стандартное отклонение, вычисленное, как указано в «Методике». Заштрихованная область на графике — область значений, учитывающая стандартное отклонение величин специфического связывания в каждой экспериментальной точке.

ления  $\bar{B}_{\text{макс}}$  и  $\bar{K}_d$  и их стандартных отклонений связывания  $[^3\text{H}]\text{-E}_2$  цитозолем аденомы предстательной железы человека. Как и для матки крысы, графически определенные величины и вычисленные по способу [2] очень близки. Следует, однако, отметить, что расчеты по способу [2] более трудоемки, чем предлагаемый графический метод. Кроме того, при графическом методе прямые, построенные методом наименьших квадратов с учетом величины  $B \pm SD$  в каждой экспериментальной точке, будут отсекают на оси абсцисс отрезок  $B_{\text{макс}} \pm SD$ . Из прямых графика легко вычислить и значения  $K_d \pm SD$ . Такой метод графического определения величин значительно проще, чем предложенный ранее [8], поскольку позволяет графически определять величины стандартного отклонения сразу и для  $\bar{K}_d$ , и для  $\bar{B}_{\text{макс}}$  (см. рис. 1 и 2).

Данные по определению специфического связывания трех стероидов в различных органах крысы и человека

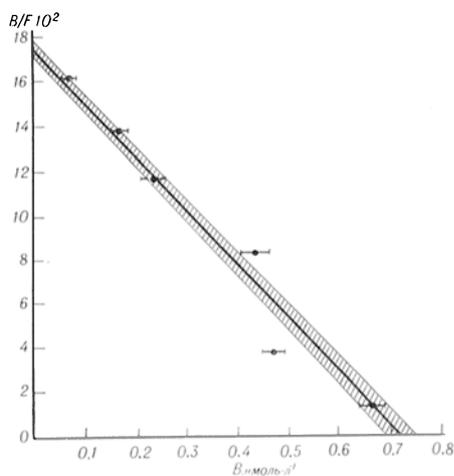


Рис. 2. Определение рецепции  $[^3\text{H}]\text{-E}_2$  в цитозоле аденомы предстательной железы человека по методу [13].

Аликвоты цитозоля с концентрацией общего белка  $1,38 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$  инкубировали с одним  $[^3\text{H}]\text{-E}_2$  (общее связывание) или в присутствии 100-кратного молярного избытка диэтилстильбэстрола (неспецифическое связывание). Графически определены:  $B_{\text{макс}} = 72,05 \pm 3,06 \cdot 10^{-11} \text{ моль}\cdot\text{л}^{-1}$ ;  $K_d = 4,11 \pm 0,13 \cdot 10^{-10} \text{ моль}\cdot\text{л}^{-1}$ . Величины, вычисленные с использованием метода [2]:  $B_{\text{макс}} = 74,55 \pm 2,09 \cdot 10^{-11} \text{ моль}\cdot\text{л}^{-1}$ ;  $K_d = 4,75 \pm 0,29 \cdot 10^{-10} \text{ моль}\cdot\text{л}^{-1}$ . Остальные обозначения — см. рис. 1.

при насыщающих концентрациях лигандов представлены в табл. 1. Статистическую обработку результатов анализа специфического связывания использовали при определении достоверности различий между выбранными парами значений специфического связывания в одном органе для одного  $[^3\text{H}]\text{-стероида}$ . Даже при низких величинах специфического связывания предлагаемый подход позволяет оценить достоверность различий между такими величинами. Так, видно, что специфическое связывание  $[^3\text{H}]\text{-Зв}$ -диола цитозолем гипофиза двух групп самцов крыс, определенных независимо в разное время, статистически недостоверны (см. табл. 1, № 13 и 14).

Предлагаемый в данной работе подход позволяет с помощью несложных расчетов определять величины  $B_{\text{макс}}$  и  $K_d$  и их величины стандартного отклонения при графическом выражении экспериментальных данных, а также величины  $B_{\text{макс}}$ ,  $SD$  и  $SEM$  при определении содержания рецепторов по од-

Сравнение параметров специфического связывания (имп/мин) андрогенов и эстрадиола в тканях-мишенях человека и животных при различных выборках

№ п/п	Ткань, лиганд	Специфическое связывание		Специфическое связывание с учетом вырожденности величины					
		отдельные значения и величина $\bar{X}$	SEM		I вариант		II вариант		среднее значение SEM из 2 вариантов
			n = 9	n = 6	отдельные величины	SEM	отдельные величины	SEM	
1	ПЖК, [ <sup>3</sup> H]-ДГТ	1242, 1165, 1085 1231, 1154, 1074 1187, 1110, 1030 1142	26	30	1165, 1085, 1231 1074, 1187, 1110	25	1242, 1165, 1231 1074, 1187, 1030	35	30
2	То же	1452, 1450, 1490 1440, 1438, 1478 1266, 1264, 1304 1398	33	38	1450, 1450, 1440 1478, 1266, 1264	43	1452, 1450, 1440 1478, 1264, 1304	37	40
3	РМЖ, [ <sup>3</sup> H]-E <sub>2</sub>	2226, 2252, 2186 2728, 2754, 2688 1804, 1830, 1764 2248	142	164	2252, 2186, 2728 1688, 1804, 1830	163	2226, 2252, 2728 2688, 1830, 1764	167	165
4	То же	457, 379, 299 497, 419, 339 718, 640, 560 479	49	57	379, 299, 497 339, 718, 640	69	457, 379, 497 339, 640, 560	46	58
5	МК, [ <sup>3</sup> H]-E <sub>2</sub>	3698, 3939, 3792 3612, 3853, 3706 3869, 4140, 3963 3838	52	63	3853, 3706, 3869 3963, 3698, 3939	46	3612, 3853, 3869 3963, 3939, 3792	52	49
6	МК, [ <sup>3</sup> H]-E <sub>2</sub>	4129, 4198, 4254 3434, 3503, 3559, 3162, 3231, 3287 3640	154	178	4198, 4254, 3434 3559, 3162, 3231	174	4129, 4198, 3434 3559, 3231, 3287	172	188
7	ГФ, [ <sup>3</sup> H]-E <sub>2</sub>	1829, 2052, 1991, 2274, 2497, 2436, 2459, 2682, 2621 2316	105	121	2052, 1991, 2274 2436, 2459, 2682	107	1829, 2052, 2274 2436, 2682, 2631	135	121
8	ГМ, [ <sup>3</sup> H]-E <sub>2</sub>	767, 772, 690, 749, 754, 672, 656, 661, 579 700	23	27	772, 690, 749 672, 656, 661	20	767, 772, 749 672, 661, 579	31	26
9	ГФ, [ <sup>3</sup> H]- $\beta$ -диол	321, 349, 354, 313, 341, 346, 319, 347, 352 338	5,6	6,5	349, 354, 313 346, 319, 347	7	321, 349, 313 346, 347, 352	7	7
10	ГФК, [ <sup>3</sup> H]- $\beta$ -диол	499, 522, 524, 465, 490, 493, 472, 497, 500. 496	7	8	522, 527, 465 493, 472, 497	10,3	499, 522, 465 493, 497, 500	7,5	8,9

ной точке — при насыщающих концентрациях лиганда. За основу взят принцип зависимости каждой величины общего связывания от каждой величины неспецифического связывания при использовании радиоактивных лигандов — самого распространенного метода определения рецепторов многих физиологически активных веществ, в том числе стероидов. При каждой концентрации меченого лиганда учитываются все величины общего и неспецифического связывания, т. е. все экспериментальные пробы, каждая из кото-

рых имеет свою ошибку определения, независимую от ошибок определения других проб в той же серии определений. Следовательно, при данной концентрации лиганда специфическое связывание есть среднее взвешенное, вычисленное из ряда величин специфического связывания, полученных как разница между каждой величиной общего связывания и всеми значениями неспецифического связывания. Исходя из того же ряда величин, вычисляют стандартное отклонение и стандартную ошибку средней. Теоретически при

трех параллельных определениях общего и неспецифического связывания 3 значения специфического связывания из 9 вычисленных являются вырожденными. Следовательно, если подходить строго, для расчета  $SD$  (или  $SEM$ ) требуется учитывать лишь 6 из 9 значений специфического связывания, исключая 3 значения по известному принципу. Понятно также, что для величины среднего не имеет значения, вычисляют ли ее из 6 или 9 значений специфического связывания. Однако при выбраковке вырожденных величин возможен субъективный подход (табл. 2). Чтобы это исключить, мы предлагаем использовать все 9 значений специфического связывания для расчета среднего,  $\bar{X}$  («взвешенное среднее»), и дисперсии, но величину  $n$  рассчитывать, исходя только из  $n=6$ , что фактически учитывает вырожденность. То, что это практически применимо, показано в табл. 2, в которой приведены сравнительные данные величины  $SEM$ , вычисленные из 9 значений специфического связывания, т. е. без учета вырожденности, а также значений  $SEM$ , вычисленных при 2 вариантах вырожденности 3 значений специфического связывания из 9 величин. Для сравнения приведены также значения  $SEM$ , вычисленные, исходя из стандартного отклонения для 9 значений специфического связывания, по значению  $n$  при вычислении  $SEM$  использовали, уменьшая число членов выборки на число вырожденных величин. Значения  $SEM$  в случае использования отдельных величин с учетом вырожденности могут существенно отличаться в зависимости от варианта вырожденности (см. табл. 2, № 1, 2, 4, 7 и 8). Средние же величины  $SEM$ , вычисленные, исходя из 2 вариантов вырожденности, в большинстве случаев совпадают с теми, какие вычислены при  $n=6$  (см. выше), либо отличаются незначительно, за исключением 2 случаев (см. табл. 2, № 5 и 6).

При малом количестве биопсийного материала в клинических исследованиях необходим обоснованный и доступный с практической точки зрения подход к статистике при оценке достоверности различий. Из табл. 1 видно, как неправильно можно интерпретировать результаты анализа рецепторов, если сравнивать только величины среднего специфического связыва-

ния, что делается очень часто. Особенно характерен пример для случаев № 9 и 10 (см. табл. 1). Более того, даже при низких величинах специфического связывания, когда возможность ошибочной интерпретации результатов возрастает, предлагаемый подход позволяет использовать надежную статистику (см. табл. 1, № 11—14, 18 и 19).

Таким образом, предлагаемый принцип статистической оценки дает возможность не только быстро и надежно устанавливать достоверность различий между величинами при анализе рецепторов стероидных гормонов в разных тканях человека и животных при насыщающих концентрациях лиганда, но и просто оценивать достоверные интервалы величины  $K_d$  и  $B_{\max}$  при графическом определении этих величин по методу Скетчарда [13]. Причем, видимо, такой подход применим при построении графиков не только в координатах Скетчарда, но и в других координатах, предлагаемых для анализа рецепторов стероидных гормонов [8, 15]. Очевидно, что данный принцип можно применить в любом случае, когда проводятся исследования по определению рецепторов различного класса соединений с вычислением специфического связывания лиганда, а последнее вычисляется как разность между общим и неспецифическим связыванием этого лиганда.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бассалык Л. С., Кушлинский П. Е., Дегтярь В. Г. // Лаб. дело. — 1983. — № 7. — С. 18—20.
2. Варфоломеев С. Д., Зайцев С. В. Кинетические методы в биохимических исследованиях. — М., 1982.
3. Дегтярь В. Г. // Биохимия. — 1982. — Т. 47, № 4. — С. 587—593.
4. Дегтярь В. Г., Денисов Л. Е., Ярыгин Л. М., Хотченкова Н. В. // Вопр. онкол. — 1985. — № 1. — С. 51—55.
5. Розен В. Б., Смирнов А. И. Рецепторы и стероидные гормоны. — М., 1981.
6. Jawny J., Jochum P., Eiermann W. // J. Steroid Biochem. — 1984. — Vol. 20. — P. 595—603.
7. Katzenellenbogen B. S. // Ann. Rev. Physiol. — 1982. — Vol. 42. — P. 17—35.
8. Keightley D. D., Cressie N. A. C. // J. Steroid Biochem. — 1980. — Vol. 13. — P. 1317—1323.
9. Munson P. J., Rodbard D. // Science. — 1983. — Vol. 220. — P. 979—981.
10. Oxley D. K. // Clinical Laboratory Annual 1982 / Ed. H. Homburger, J. Batsakis. — New York, 1982. — P. 189—207.

11. *Rodbard D.* // Receptors for Reproductive Hormones / Ed. B. W. Malley, A. R. Means. — New York, 1972. — P. 289—326.
12. *Rodbard D., Munson P. J., Thakur A. K.* // Cancer (Philad.). — 1980. — Vol. 46. — P. 2907—2918.
13. *Scatchard G.* // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1948. — Vol. 51. — P. 660—672.
14. *de Voogt H. J., Rao B. P.* // J. Steroid Biochem. — 1983. — Vol. 19. — P. 845—849.
15. *Woodsley J. T., Muldoon T. G.* // Ibid. — 1977. — Vol. 8. — P. 625—629.

Поступила 28.10.85

#### STATISTICAL EVALUATION OF THE DATA OF STEROID HORMONE RECEPTORS ESTIMATION

*V. G. Degtyar, Yu. V. Miloserdov*

Central Research Laboratory, IV Department, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

Statistical evaluation of the data of steroid hormone receptors estimation involved the principle of dependence of each experimentally

obtained magnitude of total binding (in presence of a single labelled ligand) on the magnitude of unspecific binding (at the similar content of labelled ligand but in addition of unlabelled substance excess). The principle enabled to calculate: individual values of specific binding as a difference between each value for total and unspecific binding independently on amount of parallel probes of total and unspecific bindings, mean value of specific binding using the calculated magnitudes, standard deviation (dispersion) and standard error of mean value. Statistical method allowed to determine differences between magnitudes of specific binding (content of receptors) at saturating concentrations of ligand as well as to estimate standard deviation of  $K_D$  and  $V_{max}$  in a plot. The statistical principles were used for estimation of specific binding of  $^3H$ -estradiol-17 $\beta$ ,  $^3H$ -dihydrotestosterone and  $^3H$ -5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol in various rat tissues (hypophysis, prostate, uterus) and human tissues (mammary gland tissue tumor, prostate adenoma). The principle developed may be used for estimation of various receptors of biologically active substances, where the specific binding is calculated as a difference between total and unspecific binding.

УДК 616.153.963.3.43-092: [616.153.1:577.152.53]-074

*Е. Ф. Лунец, Е. Ч. Сперанская, С. Д. Сперанский*

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ NADH-МЕТГЕМОГЛОБИНРЕДУКТАЗЫ С ПОМОЩЬЮ АМИНОПРОИЗВОДНЫХ ОРТОБЕНЗОХИНОНА

Белорусский университет им. В. И. Ленина, Минск

Увеличение содержания метгемоглобина в крови, сопровождающее как наследственные, так и токсические метгемоглобиинемии, приводит к снижению сродства крови к кислороду и уменьшению его количества в ткани, т. е. к развитию гемической гипоксии. Поэтому определение активности метгемоглобинредуцирующих систем, ответственных за поддержание низкого уровня метгемоглобина в крови, имеет важное значение для медицинской практики.

Известен ряд методов оценки активности NADH-метгемоглобинредуктазы [2, 7, 9]. Однако наиболее широко используемый метод с активизируемым субстратом — метгемоглобинферроцианидным комплексом — требует высоких значений кислотности среды, что не соответствует реальным физиологическим условиям. Кроме того, при низких значениях pH на величинах активности может сказываться снижение устойчивости восстановленных форм пиридиновых нуклеотидов [8]. Ис-

пользование 2,6-дихлорфенолиндоферола (ДХФИФ) подтверждает недостаточную специфичность метода к NADH-зависимому ферменту [9]. Применение ДХФИФ при оценке активности NADH-метгемоглобинредуктазы, по нашему мнению, не оправдано также из-за высоких значений скорости неэнзиматического восстановления этого красителя глутатионом и аскорбиновой кислотой, присутствующими в гемолизате в значительном количестве [5]. Поэтому использование окислительно-восстановительных индикаторов для определения активности фермента в сложных условиях гемолизата требует определенной осторожности.

Недавно было показано, что аминокислотные производные ортобензохинона (ОБХ) могут являться акцентирующими субстратами при окислении NADH и NADPH митохондриальными и цитоплазматическими NADH(Ф)H-оксидоредуктазами [3, 5]. В результате ферментативной реакции образуются производные диоксибензола, способные

восстанавливать ионы и комплексы металлов переменной валентности [8], а также гемин и гемсодержащие белки.

В связи с этим нам представлялось интересным изучить взаимодействие производных ОБХ с метгемоглобинредуцирующими системами эритроцитов, а также обосновать необходимость использования этих веществ в качестве индикаторов при определении активности NADH-метгемоглобинредуктазы.

### Методика

Эксперименты были выполнены на эритроцитах 10 кроликов. Взятие крови производили из сонной артерии под местной анестезией. Полученную эритроцитную массу трижды отмывали 0,9 % раствором NaCl. Концентрации общего гемоглобина и метгемоглобина оценивали по методу, описанному в работе [6].

Измерение спектров поглощения гемоглобина, метгемоглобина, гемолизата, ОБХ, а также кинетики восстановления ОБХ и метгемоглобина, окисления оксигемоглобина выполнено на спектрофотометре «Specord M-40» (ГДР). Кинетику восстановления метгемоглобина диоксипензолом изучали на спектрофотометре остановленного потока Д-110 фирмы «Durrum» (США). Скорость восстановления метгемоглобина и ОБХ оценивали по снижению оптической плотности в спектре гемолизата при длине волны соответственно 625 и 525 нм.

Метгемоглобинообразование вызывали добавлением к гемолизату эритроцитов азотнокислого натрия. Анаэробные условия создавали путем барбартирования азота в течение 15 мин через реакционную среду, в 1 мл которой содержалось 100 мкмоль калий-фосфатного буфера (рН 7,2), 28,9 нмоля гемоглобина, 302 нмоля ОБХ.

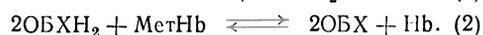
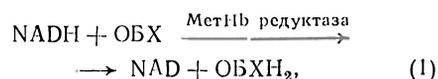
В работе использованы 4-N-(п-сульфанилино)-5-метокси 1,2-бензохинон (АМОБХС), синтезированный в НИЛ биоэнергетики кафедры физиологии человека и животных Белорусского университета им. В. И. Ленина, NADH и NADPH фирмы «Реанал» (ВНР), остальные реактивы отечественного производства марки х. ч. и ч. д. а.

### Результаты и их обсуждение

Известно, что в эритроцитах эндогенными переносчиками восстановительных эквивалентов от NADH- и NADPH-зависимых метгемоглобинредуктаз на гемоглобин служат флавины и цитохром  $b_5$  [10]. В гемолизате по сравнению с интактными эритроцитами системы транспорта электронов к метгемоглобину функционируют недостаточно эффективно. Поэтому для анализа активности этих ферментных систем оправдано применение искусственных переносчиков, скорость неферментативного восстановления метгемоглобина которыми будет значительно

превышать скорость ферментативной реакции восстановления самих переносчиков.

На рис. 1 представлена кинетика восстановления АМОБХС и метгемоглобина NADH-зависимой метгемоглобинредуктазой. Как видно из рис. 1, хинон значительно повышает скорость реакции по сравнению с контролем (в отсутствие переносчика). Эффект рибофлавина и  $K_3Fe(CN)_6$  незначителен. Весьма малое изменение концентрации АМОБХС в начале реакции свидетельствует о том, что ферментативное восстановление хинона является лимитирующей стадией процесса.



Для определения взаимодействия АМОБХС с восстановленным гемоглобином нами проведен сравнительный анализ кинетики неферментативного восстановления метгемоглобина диоксипензолом (прямая реакция 2) и кинетики окисления гемоглобина ортохиноном (обратная реакция 2). Исследования показали, что отношение констант второго порядка прямой ( $k_2$ ) и обратной ( $k_{-2}$ ) реакции ( $k_2/k_{-2}$ ) составляет  $2,8 \cdot 10^3$  при 20 °С. Следовательно, очень медленная реакция восстановления ОБХ гемоглобином практически не влияет на измеряемые значения активности фермента.

Использование ортохинонов для определения активности NADH-метгемоглобинредуктазы оправдано несколькими причинами. Во-первых, низкими скоростями неферментативного восстановления этих веществ глутатином и аскорбиновой кислотой относительно ДХФИФ. По нашим данным, отношение констант псевдопервого порядка восстановления хинона и ДХФИФ аскорбатом ( $k_{\text{ДХФИФ}}/k_{\text{АМОБХС}}$ ) равно 10,4 при 20 °С, константа скорости реакции ДХФИФ с глутатином составила  $1,0 \pm 0,07 \text{ с}^{-1}$  при той же температуре. Реакция между глутатином и АМОБХС практически не протекает. Во-вторых, отсутствием наложения спектров поглощения АМОБХС и метгемоглобина в области 600—630 нм. Максимум полосы поглощения хинона лежит в области 500—510 нм, коэффициент молярной экстинкции равен  $3 \cdot 10^3 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$ . В-третьих, низкой рав-

Рис. 1. Кинетика восстановления метгемоглобина гемоллизатом эритроцитов.

$K$  — скорость реакции в отсутствие переносчика; 1 — в присутствии 300 нмоль АМОБХС; 2, 3 — в присутствии 300 нмоль рибофлавина и 300 нмоль феррицианида соответственно; 4 — кинетика восстановления АМОБХС в процессе ферментативной реакции.

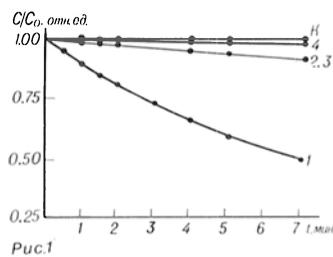
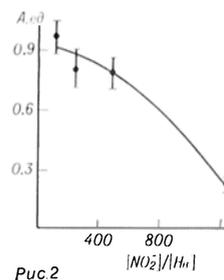


Рис. 2. Зависимость величины активности ( $A$ ) NADH-метгемоглобинредуктазы от относительной концентрации азотистокислого натрия  $[NO_2^-]/[Hb]$ .



новесной концентрацией диоксибензола при восстановлении метгемоглобина в гемоллизате. В-четвертых, специфичностью ортохинонов к NADH-метгемоглобинредуктазе. Установлено, что скорость восстановления метгемоглобина гемоллизатом в присутствии АМОБХС и NADPH составляет менее 10 % от скорости реакции в присутствии АДН.

Учитывая особенности определения активности фермента NADH-метгемоглобинредуктазы ( $A$ , в мг/мин на 1 г гемоглобина) в присутствии АМОБХС, нами предложена следующая формула:

$$A = 15,38 \frac{D^0 - D}{D^0 \cdot \Delta t},$$

где  $D^0$  и  $D$  — значения оптической плотности в спектре гемоллизата при 625 нм соответственно в начале реакции и в процессе ее,  $\Delta t$  — время от начала реакции (в мин).

По нашим данным, активность NADH-метгемоглобинредуктазы нормальных эритроцитов кролика равняется  $1,04 \pm 0,39$  ед.

Использование  $NaNO_2$  в качестве метгемоглобинообразователя может усложнять процесс определения активности фермента. Нами установлена зависимость значения активности от концентрации нитрита натрия. Как видно из рис. 2, увеличение содержания этого вещества в гемоллизате приводит к резкому снижению скорости восстановления метгемоглобина, что обусловлено скорее разной реакционной способностью метгемоглобина и его комплекса с нитритом. Однако, используя данные, представленные на рис. 2, нам удалось установить оптимальное соотношение концентраций нитрита и гемоглобина. Так, определение активности фермента целесообразно проводить в пределах отношения концентраций этих соединений от 1 до

400. При больших значениях этого параметра результаты будут сильно занижены.

Таким образом, на основании наших исследований можно заключить, что использование аминопроизводных ортобензохинона, в частности АМОБХС, дает возможность более эффективно измерять активность NADH-зависимой метгемоглобинредуктазы непосредственно в гемоллизате эритроцитов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Асагиани В. С. Ферментные методы анализа. — М., 1969. — С. 706—731.
2. Дервиш Г. В. // Лаб. дело. — 1976. — № 4. — С. 339—344.
3. Костюк В. А., Лунец Е. Ф. // Биохимия. — 1983. — Т. 21, № 9. — С. 1491—1495.
4. Лунец Е. Ф., Сперанский С. Д. // Кислородные радикалы в химии и биологии. — Минск, 1984. — С. 106—113.
5. Титовец Э. П., Петровский Г. Г. // Актуальные вопросы невропатологии и нейрохирургии. — Минск, 1973. — Вып. 6. — С. 138—143.
6. Harley J. D., Mauer A. M. // Blood. — 1960. — Vol. 16. — P. 1722—1735.
7. Hegesch E., Calmanovici N., Avron M. J. // J. Lab. clin. Med. — 1968. — Vol. 72. — P. 339—344.
8. Lowry O. H., Passonneau J. V., Rick M. K. // J. biol. Chem. — 1961. — Vol. 236. — P. 2756—2761.
9. Scott E. M., McGraw J. C. // J. biol. Chem. — 1962. — Vol. 237. — P. 249—252.
10. Toshitsugy J. // Seikagaku. — 1982. — Vol. 54. — P. 1233—1254.

Поступила 20.01.86

#### ESTIMATION OF NADH METHEMOGLOBIN REDUCTASE ACTIVITY IN HEMOLYSATES OF ERYTHROCYTES

E. F. Lunets, E. Ch. Speranskaya, S. D. Speransky

Rate of methemoglobin reduction was increased in erythrocyte hemolysates in presence of 4-N-(p-sulfanilino)-5-methoxy-1,2-benzoquinone. Kinetic parameters of total reaction and of individual steps showed that the substance and other amino-derivatives of ortho-benzoquinone could be used for estimation of methemoglobin reductase activity.

В. А. Розанов, Г. А. Карпович, Н. А. Мулюкина

## ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПИРИДОКСАЛЬ-5-ФОСФАТА ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ АМИНОТРАНСФЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В ТКАНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Одесский медицинский институт

Роль пиридоксаль-5-фосфата (ПАЛФ) как кофермента аминотрансфераз детально изучена [1]. Имеются указания на необходимость использования ПАЛФ как компонента инкубационной среды при определении активности аспарат (АСТ)- и аланин-аминотрансферазы (АЛТ) в сыворотке крови с диагностическими целями [3, 5]. В частности, приводятся данные о том, что пренкубация сыворотки с ПАЛФ (0,1 мМ) приводит к отчетливому увеличению определяемой активности АСТ и АЛТ [7]. Комитет стандартизации по энзимологии Французского общества клинической биологии также рекомендует эту концентрацию ПАЛФ как оптимальную [10]. При более высоких концентрациях ПАЛФ отмечено его ингибирующее влияние на аминотрансферазную активность, как полагают, вследствие избыточного связывания ПАЛФ с остатками лизина некаталитических участков белковой молекулы фермента [9].

Однако все эти данные касаются определения аминотрансферазной активности в сыворотке крови [5, 10] или изучения свойств чистых ферментных

препаратов [9]. В то же время в медико-биологических экспериментальных исследованиях аминотрансферазную активность часто исследуют в тканях, в частности в головном мозге, в том числе в аутопсийном материале, в опухолевых тканях и т. д. В руководстве по методам биохимических исследований в рекомендуемой модификации метода определения активности АСТ и АЛТ ПАЛФ в числе компонентов инкубационной среды не фигурирует [4].

В связи с изложенным выше мы провели настоящее исследование с целью оценить характер влияния добавленного ПАЛФ на определяемую активность АСТ и АЛТ в гомогенатах различных отделов головного мозга крыс.

### Методика

Объектом исследования были 16 белых крыс-самцов Вистар средней массой 180—220 г. Животных декапитировали в течение 3—4 мин, извлекали головной мозг, освободили его от мягкой мозговой оболочки и сосудистых сплетений и разделяли на мозжечок, кору и ствол (оставшуюся) часть мозга.

Отделы мозга гомогенизировали в 0,05 М трис-ацетатном буфере рН 7,4 в соотношении 1:10. Полученные гомогенаты дополнительно разводили тем же буфером в соотношении 1:10 (для определения активности АЛТ) и 1:100 (для определения активности АСТ), как это рекомендуется в методическом руководстве [4]. Активность АСТ и АЛТ определяли по приросту пирувата (его 2,4-динитрофенилгидразона — 2,4-ДНФГ) модифицированным методом Райтмана и Френкеля [4].

Опыты ставили (с использованием гомогенатов мозга одного и того же животного) в 3 вариантах: 1) инкубация (37 °С, 30 мин) 0,1 мл гомогената (что соответствует, учитывая разведение, 1 мг исходной ткани в случае АЛТ и 0,1 мг — в случае АСТ) в присутствии субстратно-буферной смеси с последующим определением прироста пирувата (стандартный метод); 2) инкубация 0,1 мл гомогената в тех же условиях в присутствии 0,05 мМ ПАЛФ; 3) инкубация 0,1 мл гомогената в тех же условиях, что и для 2-го варианта, но после предварительной 10-минутной пренкубации гомогената с ПАЛФ в концентрации 0,25 мМ.

В отдельной серии опытов исследовали влияние возрастающих концентраций ПАЛФ в тех же условиях, что для 2-го варианта.

Таблица 1

Активность АСТ и АЛТ (в микромолях пирувата на 1 г исходной ткани мозга за 1 мин) гомогенатов различных отделов головного мозга крыс при определении стандартным методом и в присутствии 0,05 мМ ПАЛФ ( $M \pm m$ ;  $n=6-8$ )

Исследуемый показатель	Отдел мозга		
	мозжечок	кора	ствол
<i>Стандартный метод</i>			
Активность АСТ $\bar{P}$	19,93±1,89 <0,05	14,20±1,96	19,14±2,37 >0,05
Активность АЛТ $\bar{P}$	1,10±0,16 <0,01	0,59±0,08	1,11±0,12 <0,01
<i>В присутствии 0,05 мМ ПАЛФ</i>			
Активность АСТ $\bar{P}$	41,73±2,67 >0,05	32,12±1,09	38,53±1,80 >0,05
% активации	109	126	101
Активность АЛТ $\bar{P}$	2,85±0,18 159	2,58±0,18 >0,05	2,34±0,15 111
% активации	>0,05	337	111

Примечание. В этой и последующих таблицах представлена оценка достоверности различий между отделами мозга по отношению к минимальному показателю.

В связи с возможной конкуренцией повышенных концентраций ПАЛФ с образующимися в ходе реакции пируватом за 2,4-ДНФГ [12], контрольные пробы (инкубируемые в присутствии кислого гидразинового реактива) содержали исследуемые концентрации ПАЛФ.

Активность ферментов выражали в микромолях пирувата на 1 г исходной ткани мозга за 1 мин.

Опыты проводили в летнее время года.

Результаты обработаны статистически по методу Стьюдента.

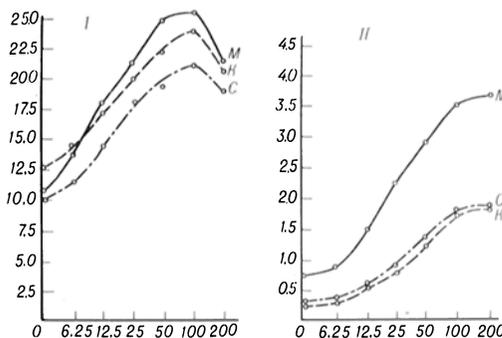
## Результаты и их обсуждение

Как видно из табл. 1, при определении аминотрансферазной активности в стандартных условиях (без добавления ПАЛФ) обнаруживаются отчетливые отличия в активности АСТ и АЛТ различных отделов головного мозга. В частности, при близких значениях активности АСТ и АЛТ в мозжечке и стволовой части головного мозга, в коре больших полушарий активность обоих ферментов достоверно ниже.

Добавление в среду инкубации ПАЛФ в возрастающих концентрациях, начиная от близкой к физиологической — 6,25 мкМ [2], приводило к отчетливому увеличению активности АСТ и АЛТ с насыщением при концентрации ПАЛФ 100 мкМ (см. рисунок). При этом активность АЛТ во всех исследованных отделах мозга при повышении концентрации ПАЛФ еще вдвое (200 мкМ) практически не изменялась, в то время как активность АСТ существенно угнеталась. Последнее может быть связано с уже упомянутой [9] возможностью ковалентной модификации остатков лизина молекулы АСТ, продемонстрированной в препаратах АСТ из сердца свиньи в близком диапазоне концентраций ПАЛФ (1—2 мМ).

Учитывая эти результаты, с целью дальнейшего более детального анализа активирующего влияния ПАЛФ на аминотрансферазную активность в гомогенатах различных отделов головного мозга мы избрали концентрацию 50 мкМ.

Как видно из табл. 1, при добавлении ПАЛФ в указанной концентрации отмечаются две основные закономерности: степень активации АЛТ (отличающейся низкой активностью по сравнению с АСТ) заметно выше, чем степень активации АСТ; степень активации обоих ферментов в коре больших полушарий (где определяется достоверно минимальная их активность)



Влияние возрастающих концентраций ПАЛФ на активности АСТ (I) и АЛТ (II).

По оси ординат — мкмоль пирувата на 1 г ткани за 1 мин; по оси абсцисс — концентрация ПАЛФ, мкМ. М — мозжечок; К — кора; С — ствол.

выше, чем в других отделах мозга. Так, для АСТ она составила 126 %, а для АЛТ — 337 %. Таким образом, низкая активность обеих аминотрансфераз в коре головного мозга сочетается с наибольшим запасом их каталитической мощности, что проявляется при насыщении коферментом. Видимо, это связано с жестко детерминированным уровнем ПАЛФ в различных отделах мозга, что обеспечивается неравномерным распределением пиридоксалькиназы [2].

Представляет интерес определение аминотрансферазной активности в присутствии ПАЛФ после предварительной преинкубации гомогенатов с ПАЛФ и без него. Как видно из табл. 2, в том случае, когда гомогенаты преинкубировали без ПАЛФ, последующее проявление активности АСТ и АЛТ в стандартных условиях было заметно слабее, чем при определении активности без преинкубации. Однако наиболее существенно то, что

Таблица 2

Влияние 10-минутной преинкубации с 0,25 мМ ПАЛФ на активности АСТ и АЛТ (в мкмольях пирувата на 1 г исходной ткани за 1 мин) в гомогенатах различных отделов головного мозга крыс ( $M \pm m$ ;  $n = 6-8$ )

Исследуемый показатель	Отдел мозга		
	мозжечок	кора	ствол
<i>Стандартный метод (после преинкубации гомогенатов без ПАЛФ)</i>			
Активность АСТ	16,07 ± 1,61	13,27 ± 1,73	13,60 ± 1,54
<i>P</i>	> 0,05		> 0,05
Активность АЛТ	0,91 ± 0,12	0,68 ± 0,06	0,45 ± 0,05
<i>P</i>	< 0,01	< 0,05	
<i>В присутствии 0,05 мМ ПАЛФ (после преинкубации с ПАЛФ)</i>			
Активность АСТ	15,10 ± 1,79	12,72 ± 1,12	11,40 ± 1,06
<i>P</i>	< 0,05	> 0,05	
Активность АЛТ	0,52 ± 0,05	0,38 ± 0,03	0,29 ± 0,04
<i>P</i>	< 0,01	> 0,05	

Таблица 3

Влияние 10-минутной преинкубации гомогенатов различных отделов головного мозга крыс с 0,25 мМ ПАЛФ на спонтанное накопление кетонпродуктов (в микромолях условного пирувата на 1 г исходной ткани за 1 мин;  $M \pm m$ ;  $n=6-8$ )

Исследуемый показатель	Отдел мозга		
	мозжечок	кора	ствол
<i>Инкубация гомогенатов без ПАЛФ</i>			
Гомогенат; разведение 1:1000 <i>p</i>	2,40±0,44	2,08±0,78 0,05	3,04±0,44 0,05
Гомогенат; разведение 1:10 000 <i>p</i>	14,66±1,99 >0,05	13,40±1,90	20,17±4,89 >0,05
<i>Инкубация гомогенатов в присутствии ПАЛФ</i>			
Гомогенат; разведение 1:1000 <i>p</i>	7,08±0,78 >0,05	6,81±0,48	7,45±0,78 >0,05
% активации	195	154	145
Гомогенат; разведение 1:10 000 <i>p</i>	69,00±2,33 >0,05	56,57±6,84	72,83±3,25 <0,05
% активации	371	322	256

преинкубация с 0,25 мМ ПАЛФ приводила к исчезновению эффекта последующей активации аминотрансферазной активности при ее определении в присутствии ПАЛФ.

Пытаясь выявить, какие биохимические изменения в период преинкубации влияют на показатели аминотрансферазной активности мы определяли прирост реагирующих с 2,4-ДНФГ компонентов в период преинкубации гомогенатов, разведенных буфером в присутствии 0,25 мМ ПАЛФ и без него. Как выяснилось, за этот короткий период времени при пересчете на 1 мин в гомогенатах мозга происходит значительное повышение концентрации положительно реагирующих с 2,4-ДНФГ компонентов, сравнимое с определяемой стандартной активностью АСТ и АЛТ (табл. 3). Поскольку в этих условиях отсутствует избыток субстратов, направляющих реакцию в желаемом направлении, характер равновесной и обратимой трансaminaзной реакции зависит от содержания эндогенных субстратов, в частности глутамата и аспаргата, концентрация которых в тканях особенно велика.

Таким образом, наблюдаемая в период преинкубации аминотрансферазная активность вполне может быть обусловлена приростом  $\alpha$ -кетоглутарата. Эта активность также резко активируется при добавлении ПАЛФ, причем активация наиболее выражена в мозжечке.

Исходя из всего изложенного выше, можно заключить, что добавление

ПАЛФ в состав инкубационной среды при определении аминотрансферазной активности в тканях является целесообразным; оптимальной концентрацией ПАЛФ, по крайней мере для гомогенатов ткани мозга, следует считать 100 мкМ. Однако мы полагаем, что определение активности АСТ и АЛТ в присутствии ПАЛФ должно сочетаться с их определением в стандартных условиях, без избытка кофермента, как это, например, делалось в работе [11] при исследовании плазмы крови у людей. В этом случае полученные результаты можно интерпретировать с точки зрения существующего в ткани запаса каталитической мощности ферментных систем и степени насыщения апофермента кофактором.

При определении аминотрансферазной активности в тканях нецелесообразно осуществлять преинкубацию гомогенатов с ПАЛФ, так как в этом случае в отличие от сыворотки крови в силу высокой концентрации субстратов возможно интенсивное накопление кетонпродуктов в ходе преинкубации, что влияет на протекание последующей реакции в присутствии субстратно-буферной смеси.

Следует подчеркнуть, что определение внутриклеточной трансaminaзной активности, сильно реагирующей на содержание ПАЛФ, может быть использовано как чувствительный тест на обеспеченность организма витамином В<sub>6</sub>, как это убедительно показано в работе [8], однако в подобных экспериментах на клиническом и особенно аутопсийном материале необходимо учитывать возможное влияние аутолиза тканей, при усилении которого эффекта ПАЛФ на аминотрансферазную активность ослабевает [6].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Браунштейн А. Е. // Успехи совр. биол. — 1953. — Т. 35, № 1. — С. 27—56.
2. Букин Ю. В. // Экспериментальная витаминология. — Минск, 1979. — С. 385—410.
3. Делекторская Л. Н. // Вопр. мед. химии. — 1978. — № 1. — С. 92—96.
4. Осадчая Л. М. // Методы биохимических исследований. — Л., 1982. — С. 246—259.
5. Haskenscheid J. C., Dijt C. C. M. // Z. klin. Chem. klin. Biochem. — 1977. — Vol. 15, N 9. — S. 519—521.
6. Hollaar L., Jansen P. Y., Laarse O. et al. // Clin. chim. Acta. — 1984. — Vol. 139, N 1. — P. 47—53.
7. Horder M., Bowers G. M., Horgenis. lab. et interpret. result. Biol. prospect. Paris, 1976. — P. 315—320.

8. *Lequeu B., Guilaand G. C., Klepping G.* // C. R. Soc. Biol. — 1984. — Vol. 178, N 1. — P. 98—104.
9. *Masugi F., Natori Y., Shimizu S. et al.* // J. nutr. Sci. — 1973. — Vol. 19, N 4. — P. 339—347.
10. *Mathieu M., Bretandiere J.-P., Galteau M.-M.* et al. // Ann. Biol. Clin. — 1976. — Vol. 34. — P. 291—302.
11. *Ohno H., Toniguchi N., Terayama K.* et al. // Industr. Hlth. — 1982. — Vol. 20, N 3. — P. 161—166.
12. *Sohler A., Pfeijfer C. C.* // Experientia (Basel). — 1981. — Vol. 37, N 11. — P. 1144—1145.

Поступила 20.01.86

#### USE OF PYRIDOXAL-5-PHOSPHATE IN ESTIMATION OF AMINE TRANSFERASE ACTIVITY IN BRAIN TISSUES

*V. A. Rosanov, G. A. Karpovich, N. Mulyukina*  
Medical School, Odessa

When aspartate- and alanine transaminase (AST and ALT, respectively) activities were studied in homogenates of rat cerebellum, brain

cortex and brain stem (using a modified procedure by Raitman and Frenkel), addition of 50  $\mu\text{M}$  pyridoxal-5-phosphate (PALP) increased 2-3-fold the activity studied. With an increase in PALP concentration from 6.25  $\mu\text{M}$  up to 200  $\mu\text{M}$  AST- and ALT-activities increased dose-dependently, while at 100-200  $\mu\text{M}$  concentration of PALP saturation of the reaction occurred and 200  $\mu\text{M}$  of PALP decreased the AST activity. 10 min preincubation of these homogenates without and in presence of 0.25 mM PALP led to a distinct increase in amount of ketoderivatives reacting positively with 2,4-dinitrophenyl hydrazine, most markedly elevated in the sample containing PALP. At the same time, prolongation of the preincubation period under standard conditions in presence of an excess of the substrates and 50  $\mu\text{M}$  PALP did not cause any increase in AST- and ALT-activities. During studies of the transaminase activity in brain biopsy, in the material obtained after neurosurgical operations as well as in medico-biological experiments, the activity should be estimated using two sets of conditions: under standard conditions and in presence of 50-100  $\mu\text{M}$  PALP but without preincubation with PALP.

## ДИСКУССИИ

УДК 577.1:378.661(049.2)

*С. И. Табагари, М. С. Кокичашивили*

### НЕРЕШЕННЫЕ ВОПРОСЫ ПРЕПОДАВАНИЯ БИОХИМИИ В МЕДИЦИНСКИХ ИНСТИТУТАХ

Кафедра биохимии Тбилисского медицинского института

В Проекте ЦК КПСС «Основные направления перестройки высшего и среднего специального образования в стране»<sup>1</sup> отмечается, что главная задача высшей школы — поднять качество подготовки специалистов в учебных заведениях различного профиля на уровень современных требований. «Актуальные задачи радикального повышения качества советского здравоохранения настоятельно требуют улучшения медицинского образования, значительного усиления теоретической и практической подготовки специалистов. Предстоит обеспечить более тесную связь в преподавании медико-биологических наук и клинических дисциплин. Выпускники должны владеть современными методами диагностики и лечения человеческого организма как единого целого»<sup>2</sup>. Исходя из этих основополагающих требований, все нерешенные вопросы преподавания биохимии в медицинских институтах приобретают актуальный характер. В связи с этим статью академика Т. Т. Березова, посвященную преподаванию биохимии в медицинских институтах, и последующую дискуссию, организованную редколлегией журнала «Вопросы

медицинской химии», следует считать своевременной и необходимой.

Действующая в настоящее время программа по биологической химии для студентов II курса медицинских институтов несколько устарела и не может в полной мере отвечать требованиям, предъявляемым к теоретическим дисциплинам в деле повышения качества профессиональной подготовки врачей разного профиля.

При разработке новой программы необходимо учитывать следующие важные моменты. Прежде всего новая программа должна иметь целенаправленный характер, что сможет обеспечить более тесную связь в преподавании медико-биологических наук и клинических дисциплин. Иначе говоря, необходимо сблизить современные достижения биохимии как фундаментальной дисциплины в медицинских вузах с практикой здравоохранения. Для этого даже общие вопросы биохимии следует рассматривать через призму практического применения в настоящее время и в перспективе. Последнее предполагает более широкое включение элементов клинической химии и патологической химии при изучении таких разделов, как обмен веществ и его регуляция, а также биохимия органов, тканей и биологических жид-

<sup>1</sup> Известия, 1986, 1 июня.

<sup>2</sup> Там же.

костей. Кстати, такие элементы имеются в прекрасном учебнике Т. Т. Березова и Б. Ф. Корвинкина «Биологическая химия» (1982 г.). Более широкое включение элементов клинической и патологической химии в программу диктуется еще и тем обстоятельством, что студенты II курса в IV семестре приступают к изучению такой важной клинической дисциплины, как пропедевтика внутренних болезней. Такой подход не только обеспечит формирование у студентов диалектико-материалистического мировоззрения на явления жизни в целом, что является главной задачей биохимии, но и покажет студенту место и роль биохимии среди медицинских наук и ее значение для решения многих важных вопросов практического здравоохранения.

Существенным является вопрос координации плана преподавания биохимии с другими дисциплинами по вертикали и по горизонтали. При этом следует хорошо обдумать, обосновать и четко сформулировать тот исходный уровень знаний (как теоретических, так и практических) по биохимии, который необходим студенту для дальнейшего изучения в медицинском институте таких предметов, как пропедевтика внутренних болезней, патологическая физиология, фармакология и др. Особое внимание следует уделить более полной интеграции преподавания биохимии и биоорганической химии. Согласно действующей программе, в курсе биоорганической химии должны рассматриваться химическое строение, свойства и биологическая роль веществ, лежащих в основе процессов жизнедеятельности (аминокислот, белков, липидов, углеводов, нуклеиновых кислот и др.). Более полное освещение этих вопросов в курсе биоорганической химии исключит повторение этого же материала в курсе биохимии и даст возможность уделить больше внимания обмену веществ и его регуляции, вопросам биохимии тканей и биологических жидкостей с увеличением доли элементов клинической химии и патохимии.

Возникает настоятельная необходимость в координации плана курса биохимии по горизонтали с планом преподавания нормальной физиологии. Целый ряд разделов (кровь, пищеварение, обмен веществ и энергии, питание, гормоны и др.) изучаются обеими дисциплинами. Поэтому следует четко и однозначно определить объем и содержание этих разделов в курсах биохимии и нормальной физиологии в целях исключения дублирования материала.

Не вызывает сомнения и тот факт, что в настоящее время общий уровень подготовленности студентов выше, чем было 10–15 лет назад. Поэтому традиционная форма изложения лекционного материала, possessing информативный характер, устарела и не может в полной мере отвечать современным требованиям. Необходимо перейти к проблемному изложению лекционного материала. Естественно, каждой лекции невозможно придать проблемный характер, но при изучении наиболее важных и сложных вопросов проблемные лекции себя оправдывают. При этом необходимо учитывать одно обстоятельство. Фактический материал проблемной лекции должен предварительно прорабатываться на практических занятиях. Предварительная самостоятельная проработка студентами предусмотренного программой фактического материала приучает их к самостоятельной работе, что является пер-

воочередной задачей в деле повышения уровня подготовки молодых специалистов. Проведение после проблемной лекции семинарского занятия по вопросам, изложенным в лекции, закрепляет полученные знания, проверка которых должна осуществляться на коллоквиумах. Поэтому желательно в новой учебной программе по курсу биохимии выделить в семестре хотя бы 2 семинарских занятия по наиболее сложным и важным разделам, которые бы предшествовали коллоквиумам.

Существенного пересмотра требует и содержание практических занятий. Введение проблемных лекций и более широкое включение в программу элементов патологической химии и клинической химии позволит использовать на практических занятиях ситуационные задачи. Разработка и применение ситуационных задач будут способствовать развитию аналитического мышления у студентов и приучать их на основании анализа приходить к логическому умозаключению. Студенты II курса наряду с традиционными лабораторными работами, построенными по принципу доказательств содержания тех или иных органических веществ в исследуемом материале, должны изучать те наиболее важные унифицированные методы биохимических исследований, которые используются в настоящее время в современных клинических лабораториях. Однако в существующих практических руководствах по биологической химии для медицинских вузов эти унифицированные биохимические методы почти не представлены. Кроме того, приводить унифицированные методы биохимических исследований, используемых в клинике, без клинко-диагностической интерпретации полученных данных, неэффективно, а такая интерпретация для студентов II курса, не знакомых с клиническими дисциплинами, невозможна. Отсюда возникает настоятельная необходимость введения в систему медицинского образования нового курса основ патологической и клинической химии. Этот курс, как отмечает акад. Т. Т. Березов «...будет служить недостающим связывающим звеном, соединяющим воедино доклинические медико-биологические науки с клиническими, заполняя ряд самым вакуумом, который существует в настоящее время в подготовке врачей в нашей стране». Практические занятия по курсу патологической и клинической химии должны включать в себя изучение основных унифицированных методов биохимических исследований, применяемых в клинике с их клинко-диагностической и дифференциально-диагностической интерпретацией. Часть этих унифицированных методов может быть изучена на практических занятиях по биохимии на II курсе. При этом обязательным становится расширение до определенных пределов материала клинической патологической химии, включенного в курс биохимии на II курсе. Этот материал должен служить тем отправным пунктом, который будет способствовать более глубокому и основательному изучению патологической и клинической химии студентами на старших курсах медицинских институтов.

Введение в систему медицинского образования нового предмета — основ патологической и клинической химии на старших курсах медицинских институтов обеспечит более тесную связь в преподавании медико-биологических наук и клинических дисциплин, что будет способствовать повышению качества профес-

сиональной подготовки врачей разного профиля.

Мы надеемся, что завершение дискуссии на страницах журнала «Вопросы медицинской химии», подведение ее итогов и реальная помощь со стороны ГУУЗ Минздрава СССР в

решении актуальных вопросов преподавания биохимии в медицинских институтах принесут позитивные результаты, и в ближайшее время в план подготовки врачей разного профиля будет включен самостоятельный курс патологической и клинической химии.

*Т. Т. Березов (Москва)*

## НЕКОТОРЫЕ ИТОГИ ДИСКУССИИ ПО ПРЕПОДАВАНИЮ БИОХИМИИ В МЕДИЦИНСКИХ ИНСТИТУТАХ

В Проекте постановления ЦК КПСС «Основные направления перестройки высшего и среднего специального образования в стране», опубликованном 1.07.86, отмечается, что главная задача высшей школы — поднять качество подготовки специалистов в учебных заведениях различного профиля на уровень современных требований.

По вопросу о здравоохранении и медицинской науке в том же постановлении отмечено, что «актуальные задачи радикального повышения качества советского здравоохранения настоятельно требуют улучшения медицинского образования, усиления теоретической и практической подготовки специалистов. Предстоит обеспечить более тесную связь в преподавании медико-биологических наук и клинических дисциплин. Выпускники должны владеть современными методами диагностики и лечения человеческого организма как единого целого».

Редколлегия журнала «Вопросы медицинской химии» еще в 1984 г. организовала дискуссию на статью Т. Т. Березова «Преподавание биохимии в медицинских институтах»<sup>1</sup>, в которой была поставлена задача поделиться своими впечатлениями по поводу подготовки медицинских кадров и определения роли биохимии в профессиональной подготовке врачей. Были также поставлены вопросы по содержанию программы курса биохимии, в которой определены основные цели и задачи биохимии, ее место в системе медицинского образования, организация лекционного курса, лабораторных и семинарских занятий, роль учебных фильмов и преподавателя в вузовском обучении.

В статье подчеркивалось, что биохимия в последние два десятилетия достигла больших успехов в изучении химического состава живых организмов и природы химических процессов на разных уровнях структурной организации живого организма. Выдающиеся открытия в биохимии и новейших ее разделах выдвинули биохимию в разряд фундаментальных научных дисциплин и сделали ее мощным орудием в решении многих важных проблем биологии и медицины. Овладение этими достижениями и знание основополагающих принципов в биохимии способствуют формированию у будущего врача диалектико-материалистического понимания сущности жизни. Отсюда важность и необходимость глубокого изучения биохимии студентами медицинских институтов. Нет необходимости излагать очевидные истины, в частности вопроса о том, что «современная биология говорит на языке биохимии». Следует подчеркнуть, что в последние два — три десятилетия в науке так сложились обстоятельства, что дальнейшее развитие медицины и

биологии в значительной степени определяется методологическими принципами (подходами) и методическими приемами биохимии.

Что же касается программы курса биохимии в медицинских вузах, то почти вся статическая биохимия (химический состав и структура химических компонентов живых организмов) преподается на курсах; так, бионеорганическая химия, биофизическая биохимия и биорганическая химия преподаются на I курсе. Но поскольку все эти дисциплины преподаются в течение только одного семестра (иногда неполного), чаще всего приводятся примеры структуры и функций отдельных классов органических веществ, что лишает студентов целостного и общего представления о химическом составе живых организмов. Более того, в программе по бионеорганической химии (а также в учебнике Н. А. Тюкавкиной, Ю. И. Баукова «Бионеорганическая химия». М., Медицина, 1985 г.) от студента требуется знание не только структуры, но и функций биомолекул. В частности, фрагментарно излагаются β-окисление жирных кислот, синтез высших жирных кислот и даже метаболические пути превращения арахидоновой кислоты и биосинтез простагландинов, простаглицлинов и лейкотриенов. В сущности представители бионеорганической химии в соответствии с программой основными объектами для изучения считают биологические полимеры (белки, нуклеиновые кислоты, углеводы, липиды, смешанные биополимеры) и низкомолекулярные биорегуляторы (витамины, гормоны, антибиотики, терпены, алкалоиды и др.); в то же время уделяется недостаточно внимания классической органической химии. Действующая программа по бионеорганической химии, как считает проф. Р. А. Юхновец (Полтава), перенасыщена вопросами, изучение которых необходимо лишь для определенных специальностей (фармацевтов, химиков-органиков и др.).

Как видно, бионеорганическая химия претендует на изучение не только структуры биомолекул, но и на их функции и обмен веществ, включая проблемы биорегуляции. Что же остается для биохимии? Оказывается, «основное содержание курса биологической химии в медицинском вузе составляет медицинская биохимия». Это в корне неправильная установка; если это так, тогда в соответствии с программой медицинская биохимия (и, естественно, биохимия) на II курсе «изучает молекулярные основы физиологических функций человека, молекулярные механизмы патогенеза болезней (молекулярная патология), биохимические основы предупреждения и лечения болезней, биохимические методы диагностики болезней и контроля эффективности лечения». В единой программе по бионеорганической и

<sup>1</sup> *Вопр. мед. химии*, 1984, № 2, с. 132.

Биологической химии много места занимают вопросы из курсов патофизиологии и терапии, хотя студент еще не знаком с такими понятиями, как патология, болезнь и т. д. Примером являются, в частности, такие вопросы программы, как «Гиперхолестеринемия и ее причины», «Механизм возникновения желчнокаменной болезни (холестериновые камни)», «Лечение желчнокаменной болезни хенодезоксихолевой кислотой», «Биохимия атеросклероза. Механизм образования атеросклеротических бляшек (инфильтрационная теория)», «Биохимические основы лечения гиперхолестеринемии и атеросклероза». Во то же время в программе почти нет вопросов по химическому составу липидов, а в разделе «Обмен стероидов» от студентов требуется «Представление о биосинтезе холестерина». Но почему же студент не должен знать весь ход биосинтеза холестерина? Эти знания в клинике помогут ему лучше понять молекулярные механизмы развития патологии при атеро- и артериосклерозе.

Не обоснована необходимость изучения в курсе биохимии таких вопросов объединенной программы, как основы молекулярной генетики, в частности проблемы молекулярной мутации: замены, делеции, вставки нуклеотидов, частота мутаций; как и проблемы иммунологии (имеется учебник и отдельный курс), в частности «Понятие об иммунной системе организма. Концепция иммунологического надзора. Наследственные и вторичные дефекты иммунной системы». Относятся ли эти проблемы к биохимии как к фундаментальной науке? Вряд ли. Но это и свидетельство того, что на старших курсах в медицинских вузах не рассматриваются на профессиональном уровне биохимические и молекулярные основы многих болезней, включая наследственную патологию, что еще раз свидетельствует о необходимости и целесообразности включения в учебные планы подготовки врачей курса клинической биохимии.

Подобный субъективный подход к изучению курса биохимии и рекомендуемый в программе в корне отличается даже от определения предмета биохимии, излагаемого во всех учебниках и энциклопедиях мира. «Биохимия — наука, изучающая химическую природу веществ, входящих в состав живых организмов, их превращения, а также связь этих превращений с деятельностью органов и тканей и целостного организма».

В учебнике А. Уайта и др. «Основы биохимии» (М., Мир, 1981 г.) указано: «Выяснение взаимосвязи биологической функции и молекулярной структурой и является главной задачей биохимии». Таким образом, биохимия должна оставаться фундаментальной биологической наукой, достижения которой широко используются в народном хозяйстве и медицине.

Не совсем понятны и отдельные заглавия программы. Например, «Обмен и функции углеводов», «Обмен и функции липидов», «Обмен и функции аминокислот», хотя справедливости ради укажем, что внутри каждого из этих разделов подробно рассматриваются проблемы обмена углеводов, липидов, аминокислот, включая пути анаболизма и катаболизма этих биомолекул.

Отсюда вытекает важный вывод: к составлению проектов программ курсов биологической химии и биоорганической химии, опре-

деляющих не только состояние и перспективы развития этих научных дисциплин, но и в известной степени содержание и объем учебников, руководств и учебных пособий, следует привлекать максимальное число специалистов с большим опытом педагогической работы в вузах. Подобные проекты должны рассматриваться и проходить широкое обсуждение коллективами соответствующих кафедр всех медицинских вузов страны и после внесения необходимых коррективов утверждаться ГУУЗ Минздрава СССР. Об этом же писал проф. М. И. Кужман (Воронеж) в статье «К вопросу о преподавании биохимии в медицинских институтах» (Вопросы медицинской химии, 1984, № 6): «Не следует такое серьезное дело, как создание программы, доверять только одной кафедре... Проект ее должен быть доведен до сведения всех ведущих кафедр биохимии и далее: «Специальная комиссия должна высказать мнение о полученных замечаниях и после этого утвердить программу. Только такая программа не будет вызывать бурных противоречий и справедливых замечаний, которые высказываются по всем утвержденным в последние годы программам».

Нельзя не согласиться и с мнением проф. М. Р. Лифшица (Челябинск), что содержание программы курса по биологической и биоорганической химии «необходимо привести в соответствие с количеством реальных часов, отведенных на реализацию этой программы». Он считает необходимым связывать теоретический курс биохимии с практической подготовкой врача. Для этого студента нужно «не только научить соответствующим методам исследования, но и показать границы их применения, толкования результатов в дифференциально-диагностических целях и т. д. Это еще раз подтверждает необходимость введения курса клинической химии, ибо преподавание этих вопросов на II курсе, оторванное от конкретных форм патологии, бессмысленно».

С аналогичными предложениями на страницах журнала выступили профессор П. П. Бачинский (Днепропетровский), Л. Г. Прокопенко (Курск), П. А. Верболович и соавт. (Львов), Р. А. Юхновец (Полтава). В частности, по мнению проф. П. П. Бачинского, создание отдельной программы по общей биохимии для студентов II курса и специальной программы для самостоятельного курса основ клинической биохимии с введением его в учебный план является обоснованным, своевременным и практически необходимым.

Вопросы о роли и месте биохимии в системе профессиональной подготовки врачей были также предметом пристального внимания I Всесоюзного семинара «Содержание и методы обучения биохимии в медицинских и фармацевтических институтах» в Днепропетровске (25—27.11.86), организованного Минздравом СССР, Центральным методическим кабинетом по высшему медицинскому образованию Минздрава СССР и Центральной проблемной учебно-методической комиссией по химическим дисциплинам при ГУУЗ Минздрава СССР. В работе семинара приняли участие около 80 ведущих кафедр биохимии и биоорганической химии медицинских и фармацевтических институтов. Следует отметить также, что в отличие от названия семинара его программа включала обсуждение учебников и практических работ по биоорганической и биологической хи-

мин, а также координацию преподавания биоорганической и биологической химии.

В ходе дискуссии по программным вопросам было выработано единодушное мнение об организации конкурса на разработку программ по двум курсам — биохимии и биоорганической химии, составление проектов новых программ комиссиями из представителей каждой науки, рассылка проектов во все медицинские вузы и окончательное утверждение с учетом предложенной программы в ГУЗ Минздрава СССР. Об организации клинической биохимии было также принято единогласное решение просить Центральный методический кабинет по высшему медицинскому образованию Минздрава СССР при пересмотре плана подготовки врачей в тринадцатой пятилетке ввести в число обязательных дисциплин учебного плана самостоятельный курс по клинической биохимии; единственное сомнение по данному вопросу высказал проф. А. Я. Николаев (Москва), который не видит аргументов в пользу организации этого курса.

Дискуссии в журнале «Вопросы медицинской химии» подвергалась и организация лекционного курса по биохимии. Имеются разные суждения как по объему фактического материала, так и по обеспечению его наглядными пособиями и учебными фильмами. Лекционный курс, до недавнего времени рассматривавшийся как важнейшая форма обучения в вузе, в настоящее время в связи с указанным выше постановлением о реформе высшей школы и сокращении рабочей недели студента до 26—28 ч на I—III курсах вузов будет существенно изменен. Я не готов дать по этому важному вопросу окончательного суждения, хотя глубоко убежден, что для самостоятельной работы на кафедре (а к этому нас призывает реформа) студент должен самостоятельно изучать основы науки, и для этого его надо снабдить фундаментальными учебниками, наглядными учебными пособиями, учебными фильмами и вычислительной техникой, ЭВМ, работающими как в режиме репетитора (обучения), так и в режиме экзаменатора. Готовы ли сегодня наши кафедры, а также кадры биохимиков обеспечить подобный высокий уровень преподавания курса биохимии в медицинских вузах страны? Однозначного ответа требует наше время, наша партия, взявшая курс на перестройку и ускорение, включая перестройку нашего мышления и делового подхода. Мне представляется, что биохимики должны сами создавать подобные учебные пособия и фундаментальные учебники, отвечающие современным требованиям подготовки высококвалифицированных врачей.

По вопросу о содержании лабораторных и семинарских занятий по биохимии в медицинских вузах все участники дискуссии имеют почти одинаковые и совпадающие точки зрения. В частности, утверждается, что лабораторный практикум должен включать, во-первых, работы, способствующие подтверждению теоретических положений курса биохимии, и, во-вторых, работы, максимально приближенные к методам, используемым в биохимических лабораториях в клинике.

Участники дискуссии обратили внимание и на обеспеченность учебного процесса учебниками и учебными пособиями. Серьезным недостатком, мешавшим совершенствованию учебного процесса, ряд биохимиков считали отсут-

ствие отечественных учебных руководств по биохимии, отражающих современное состояние науки. Проф. П. А. Верболович и соавт. отмечают, что с выходом в свет учебника «Биологическая химия» Т. Т. Березова и Б. Ф. Коровкина «этот пробел устранен». По мнению ряда биохимиков, учебник отражает современное состояние биохимии и отвечает основным требованиям преподавателей и студентов. В ряде статей и официальных отзывов не только перечислены недостатки учебника, опечатки, часто не зависящие от автора, педагогические просчеты, но и указаны пути их устранения. Много ценных предложений и критических замечаний было сделано также участниками читательской конференции в рамках указанного семинара по обсуждению учебников и практических руководств по биоорганической и биологической химии в Днепропетровске. Все эти критические замечания и пожелания приняты авторами учебника.

Относительно роли технических средств обучения в педагогическом процессе участники дискуссии также единодушны. Во-первых, указывается на большую роль в усвоении фактического материала курса наглядных средств обучения и наглядных пособий, включая учебные фильмы; во-вторых, отмечается, что в стране «имеется еще очень мало наглядных средств обучения»; в-третьих, предлагается создать при Всесоюзном биохимическом обществе «небольшую рабочую комиссию, которая должна составить тематику фильмов... определить авторские коллективы и лаборатории НИИ и кафедры, на базе которых эти фильмы будут создаваться» (П. А. Верболович и соавт.). Нет сомнения в важности проблемы наглядности преподавания курса биохимии. У нас имеется немало энтузиастов на кафедрах, разрабатывающих современные наглядные пособия, однако эти разработки издаются только местными издательствами для нужд своей кафедры. Попытки издать их массовым тиражом оказались неудачными из-за бюрократического отношения руководства треста «Медучособие» Минздрава РСФСР к некоторым предложениям. В качестве примера приводим заявку доц. Ю. М. Мохира (Карагандинский медицинский институт). Автор разработал оригинальные метаболические карты по классам органических веществ, по содержанию и наглядности превосходящие известные Берингерские карты. По просьбе издательства треста «Медучособия» я дал положительную рецензию на этот труд и согласен быть научным редактором. Со времени подачи заявки прошло уже более 5 лет, но сдвига нет, несмотря на постоянные ежегодные обещания приступить к выпуску серии наглядных пособий.

С выпуском учебных фильмов дело обстоит еще хуже. Однако вряд ли имеет смысл создавать при ВБО еще одну «рабочую комиссию»; не лучше ли проявить инициативу в создании современных учебных фильмов, мобилизовав для этого все имеющиеся резервы? Нам следует незамедлительно приступить к составлению программированного метода обучения, используя ЭВМ и компьютерную технику. Первые, пока еще робкие шаги в этом направлении уже сделаны на ряде кафедр биохимии. Это вселяет надежду, что персональные компьютеры получат широкое применение не только в научной, но и в педагогической деятельности преподавателя при активном участии студентов.