

ТОМ XXXIII

ВЫПУСК 4

ИЮЛЬ — АВГУСТ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1987



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

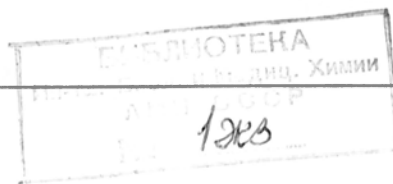
Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. Б. СПИРИЧЕВ (зам. редактора), И. П. АШМАРИН, Т. Т. БЕРЕЗОВ, А. В. ВАСИЛЬЕВ, Е. Н. ГЕРАСИМОВА, В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ, В. Л. КОЗЕЛЬЦЕВ (ответственный секретарь), А. Н. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВКИН, Л. А. ЛОКШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ, Е. Л. РОЗЕНФЕЛЬД, Ю. А. РОМАКОВ, В. А. САКС, С. Е. СЕВЕРИН, В. А. ТУТЕЛЬЯН

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

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

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



В. О. Шпикитер

РОЛЬ МОДИФИКАЦИЙ ЛИПОПРОТЕИДОВ В АТЕРОГЕНЕЗЕ (Обзор)

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Многочисленные эпидемиологические и экспериментальные исследования последних 20 лет показали, что сывороточные липопротеиды (особенно липопротеиды низкой плотности — ЛНП) играют важную роль в формировании белково-липидных образований при атеросклерозе [2, 6, 7, 9]. В настоящее время интенсивно изучается роль липопротеидов в атерогенезе. Исследуется физиологическое значение отдельных классов липопротеидов *in vivo* [9], транспорт липопротеидов [8], генетические нарушения их метаболизма [21, 36] и др. Атерогенные свойства липопротеидов, очевидно, связаны с наличием в них относительно больших количеств неполярных компонентов, нерастворимых в водной среде. На это обращали внимание еще в начале 50-х годов нашего столетия, когда стали интенсивно исследовать физико-химические свойства сывороточных липопротеидов. В частности, высказывалось мнение [53], что молекулы β -липопротеидов (т. е. ЛНП) слишком велики, диспропорционально перегружены липидами и поэтому не могут осуществлять безопасный транспорт липидов через стенки сосудов. Эти опасения оказались преувеличенными, так как последующие исследования показали, что неполярные компоненты в мицеллах липопротеидов очень низкой плотности (ЛОНП), липопротеидов высокой плотности (ЛВП) и ЛНП достаточно скомпенсированы полярными компонентами. В целом мицеллы нативных липопротеидов стабильны в водной среде за счет гидрофильных участков на их поверхности. Тем не менее роль повышенных концентраций липопротеидов в крови как риск-фактора в развитии атеросклероза хорошо

установлена и, очевидно, поэтому для большинства исследований характерно постулирование патогенетической роли нативных липопротеидов в атерогенезе. Однако целый ряд данных указывает на то, что модифицированные липопротеиды могут быть более атерогенны, чем нативные. Речь идет о том, что при ферментативных или других модификациях липопротеиды могут приобретать свойства, изменяющие их структурную стабильность или характер взаимодействия с компонентами межклеточного матрикса или клетками. Эти данные мы и хотели бы рассмотреть в настоящем обзоре.

Первая гипотеза о роли ферментативных модификаций липопротеидов в атерогенезе связана с действием на них липопротеидлипазы. Эту гипотезу высказал Зилверсмит [60—62]. Он отмечал, что гидролиз хиломикрон и ЛОНП липопротеидлипазой происходит на интимальной поверхности аорты. В ходе этого процесса не только возникает высокая концентрация обогащенных холестерином продуктов (так называемых «ремнантов») на поверхности сосудов, но и образуются анионы жирной кислоты, обладающие детергентными свойствами. Таким образом, атерогенез рассматривался как результат образования вблизи эндотелия сосудов промежуточных продуктов липолиза, поглощаемых сосудистой стенкой в присутствии анионов жирной кислоты. Высказывалось мнение [44, 45], что в этом процессе существенную роль играют локальное повышение активности липопротеидлипазы в сосудах сердца и увеличение концентрации обогащенных триглицеридами липопротеидов сыворотки крови. Насколько этот конкретный механизм верен и каков

его удельный вес в накоплении холестерина в стенках сосудов, остается неизвестным. Однако роль ремнантов в атерогенезе подтвердилась позднее при изучении так называемых β -ЛОНП, о чем будет сказано ниже.

На возможную роль в атерогенезе других ферментативных модификаций мы обратили внимание при изучении действия липаз и пепсина на ЛНП [3]. Обнаружено, что после обработки этими ферментами происходит снижение структурной стабильности ЛНП вплоть до потери растворимости и образования обогащенного холестерином и его эфирами остатка. Аналогичное явление наблюдалось при действии на ЛНП катепсина D, выделенного из аорты [4]. В связи с этим было высказано предположение, что при некоторых состояниях (например, воспалительных), связанных с деструкцией клеток и освобождением гидролитических ферментов, может нарушаться нормальный метаболизм ЛНП, проникающих в стенки сосудов. При этом ЛНП могут подвергаться интенсивному гидролизу, приводящему к отложению обогащенных холестерином продуктов, а последние могут служить основой для образования атером. В пользу такой возможности свидетельствуют данные о том, что артериальные повреждения и связанные с ними реактивные процессы благоприятствуют отложению липопротеидов в артериальной стенке [50].

Отложение липопротеидов в стенках сосудов рассматривается как результат их взаимодействия с компонентами межклеточного матрикса: коллагеном, эластином, протеогликанами и др. [23]. Наиболее изучено взаимодействие липопротеидов с гликозаминогликанами и ему придается особая роль в атерогенезе [31, 42]. В связи с этим представляют интерес данные о взаимодействии с гликозаминогликанами ЛНП, обработанных трипсином. Обнаружено [17], что ограниченный протеолиз трипсином, приводящий к удалению 20 % белка из ЛНП, увеличивает образование нерастворимых комплексов модифицированных таким образом ЛНП с артериальными гликозаминогликанами. В нашей лаборатории изучалось взаимодействие ЛНП с другим компонентом внеклеточного матрикса — фибронектином и было показано [14], что обработанные пепсином ЛНП в большей степени связываются с фиб-

ронектином, чем нативные ЛНП. Поскольку пепсин является близким аналогом тканевой протеиназы — катепсина D, эти данные свидетельствуют о возможном значении такой модификации в атерогенезе, тем более что роль фибронектина в этом процессе обсуждается в литературе [58]. Увеличение взаимодействия фибронектина с ЛНП наблюдалось и после ограниченного протеолиза белка ЛНП протеиназой системы свертывания крови — тромбином [15]. В настоящее время число работ, посвященных взаимодействию модифицированных липопротеидов с компонентами межклеточного матрикса и выяснению роли этого процесса в атерогенезе невелико и, по нашему мнению, не соответствует актуальности этого направления исследований.

В качестве модельной системы для изучения атерогенеза в последние годы стали широко использовать взаимодействие липопротеидов с макрофагами. Эти исследования были стимулированы главным образом работами Брауна и Гольдштейна [20]. Эта модель представляет определенный интерес, так как в соответствии с имеющимися данными нагруженные липидами пенстые клетки атеросклеротических очагов (особенно на ранних этапах) представляют собой резидентные макрофаги и макрофаги, которые образовались из моноцитов крови, а также гладкомышечные клетки, которые приобрели функциональные свойства макрофагов [30, 32]. Показано [34], что ацетилированные с помощью уксусного ангидрида ЛНП поглощаются и деградируются мышинными макрофагами в условиях монослойной культуры в 20 раз интенсивнее, чем неацетилированные. Поглощение ацетилированных ЛНП сопровождалось гидролизом их эфиров холестерина лизосомной холестеролэстеразой и последующим синтезом эфиров холестерина на базе поглощенного холестерина ацетилированных ЛНП. Накопление эфиров холестерина в клетках соответствовало кривой поглощения и деградации белков ацетилированных ЛНП и приводило к образованию пенстых клеток. Ранее сообщалось [33], что фибробласты и некоторые другие клетки поглощают ЛНП с помощью рецепторов, находящихся на поверхности клеток. После связывания ЛНП с рецепторами происходит эндоцитоз и деградация ЛНП. Важно, что

при этом уменьшается число рецепторов на поверхности клеток и таким образом осуществляется регуляция поглощения ЛНП, адекватного потребностям клеток. В случае поглощения макрофагами ацетилированных ЛНП имеет место специфическое рецепторное связывание, однако число рецепторов не уменьшается и поэтому отсутствует регуляция поглощения модифицированных ЛНП. В результате даже при сравнительно низкой концентрации ацетилированных ЛНП (25 мк/мл) через 3 дня макрофаги накапливают большие количества эфиров холестерина и превращаются в пенные клетки [19]. Оказалось [48], что и ацетоацетилированные с помощью диетена человеческие и собачьи ЛНП удаляются из крови собак и деградируют макрофагами быстрее, чем нативные. Показано также [57], что обработка ЛНП малоновым диальдегидом приводит к резкому увеличению поглощения таких ЛНП макрофагами с образованием пенных клеток; необработанные ЛНП такого эффекта не давали. Таким образом, в этих исследованиях достаточно четко показано, что в образовании пенных клеток макрофагальной природы принимают участие не нативные, а химически модифицированные ЛНП. В связи с этим, естественно, возникает вопрос о том, имеют ли место такие модификации *in vivo*. Окончательного ответа на этот вопрос пока дать не могут, однако сообщалось [29], что малоновый диальдегид освобождается из тромбоцитов при их агрегации в поврежденных участках артерий, а также образуется при перекисном окислении липидов [16]. Однако концентрации малонового альдегида, выделяемого тромбоцитами, на несколько порядков ниже концентрации, необходимой для химической модификации ЛНП.

Если вопрос о химических модификациях липопротеидов *in vivo* остается открытым, то имеется ряд данных о возможности ферментативных модификаций липопротеидов, имеющих значение в атерогенезе. К данным такого типа относятся результаты исследований β -ЛОНП, липопротеидов, модифицированных определенными ферментами или инкубацией с клетками или тканями, а также данные о расщеплении липопротеидов гидролитическими ферментами и свойствах липопротеидов,

выделенных из атером или очагов воспаления.

β -ЛОНП представляют собой липопротеиды, по плотности соответствующие ЛОНП, но имеющие электрофоретическую подвижность β -липопротеидов, т. е. ЛНП. β -ЛОНП являются, очевидно, продуктами превращений богатых триглицеридами липопротеидов под влиянием липопротеидлипазы [37] и накапливаются у больных гиперлипипропротеидемией типа III, сопровождающейся развитием выраженного атеросклероза. Липопротеиды, близкие по свойствам β -ЛОНП человека, были обнаружены в плазме крови собак, обезьян, кроликов и крыс с экспериментальным атеросклерозом, вызванным холестериновой диетой [47, 49]. Оказалось, что β -ЛОНП интенсивно поглощаются макрофагами в культуре и при этом наблюдается накопление эфиров холестерина в клетках [35]. Эти процессы происходили за счет наличия высокоэффективных участков связывания на поверхности макрофагов, которые опосредовали поглощение и лизосомную деградацию β -ЛОНП. ЛОНП здоровых людей и животных такого эффекта не давали. Найдено, что рецепторы на поверхности макрофагов, связывающие β -ЛОНП, отличаются от рецепторов, взаимодействующих с ацетилированными ЛНП [20]. В связи с этим следует отметить уже упоминавшуюся гипотезу Зилверсмита [60—62] о возможной атерогенности продуктов превращений хиломикрон и ЛОНП под влиянием связанной с эндотелием липопротеидлипазы. В настоящее время β -ЛОНП являются единственным примером модифицированных *in vivo* липопротеидов плазмы крови, для которых четко показаны атерогенные свойства. Что касается других случаев, то обнаружить *in vivo* модифицированные атерогенные липопротеиды среди большой и гетерогенной популяции липопротеидов плазмы крови не удалось.

Имеется ряд работ, указывающих на то, что ферментативные модификации липопротеидов приводят к изменению их взаимодействия с клетками. Показано [25], что удаление 20 % белка с ЛНП путем обработки трипсином приводит к 10—20-кратному увеличению степени их поглощения и деградации фибробластами кожи людей с гомозиготной гиперхолестеринемией по сравнению с поглощением и деградацией

нативных ЛНП. А. В. Попов [12] обнаружил, что обработанные трипсином ЛНП захватываются с большей интенсивностью макрофагами и с меньшей — фибробластами по сравнению с нативными ЛНП. Автор высказал предположение, что в плазме крови и тканевых жидкостях происходят процессы модификации частиц ЛНП, приводящие к активации или угнетению регулируемого захвата этих частиц клетками. В соответствии с полученными в лаборатории данными [15] обработка ЛНП пепсином приводит к увеличению скорости их поглощения и деградации макрофагами, что свидетельствует об увеличении атерогенности модифицированных таким образом ЛНП. Ценность приведенных данных состоит главным образом в том, что они служат отправными пунктами в попытках моделирования возможных модификаций липопротеидов *in vivo* с целью выяснения их роли в атерогенезе.

А. В. Попов и А. Г. Виноградов считают [13], что в основе активации захвата ЛНП клетками с последующей их трансформацией в пенистые клетки лежит изменение свойств ЛНП во внеклеточном пространстве в результате ферментативной деградации, химического взаимодействия с метаболитами, комплексообразования с протеогликанами и антителами.

Естественные виды модификаций были использованы А. Н. Климовым и соавт. [7]. В частности, модификация предусматривала хранение ЛНП при 37°C, кратковременную инкубацию ЛНП с фибробластами, образование иммунного комплекса ЛНП — антитело. При изучении взаимодействия модифицированных таким образом липопротеидов удалось проследить последовательные этапы превращения макрофагов в пенистые клетки. О возможности модификаций ЛНП в кровяном русле свидетельствуют и данные [1], полученные при введении ^{125}I -ЛНП на 4 ч в кровь кроликов. Отмечено возрастание сродства инкубированных в крови ^{125}I -ЛНП к макрофагам и снижение их сродства к фибробластам (по сравнению с нативными ЛНП). ЛВП задерживают такую модификацию ЛНП *in vivo* и элиминацию их из кровотока, а в культуре клеток угнетают захват нативных ЛНП фибробластами и особенно макрофагами [10].

Ранее сообщалось [11], что у части

больных атеросклерозом ЛОНП гидролизуются липопротеидлипазой менее интенсивно, нежели ЛОНП здоровых людей. Это, по-видимому, связано с различным количеством в ЛОНП активаторов (или ингибиторов) липопротеидлипазы и должно сказываться на метаболизме ЛОНП. Показано [38, 39, 51], что при инкубации ЛНП с эндотелиальными клетками изменяются химический состав, плавучая плотность и электрофоретическая подвижность ЛНП. Природа этих изменений не совсем ясна, однако известно, что модифицированные таким образом ЛНП реагируют с макрофагальными рецепторами для ацетилированных ЛНП и что это взаимодействие ведет к накоплению в макрофагах холестерина и его эфиров. Эти данные позволили авторам высказать предположение, что на пути из плазмы крови в субэндотелиальное пространство ЛНП взаимодействуют с эндотелиальными клетками и приобретают атерогенные свойства. Такая гипотеза согласовывалась с результатами экспериментов по деэндотелизации участков аорты, указывающими, что накопление липидов происходит под регенерирующим эндотелием, а не под обнаженными местами аортальной стенки [28].

На возможность существования модифицированных липопротеидов *in vivo* указывают и данные о том, что сывороточные липопротеиды могут подвергаться действию ряда ферментов. Особенно интересны в этом отношении ферменты крови и тканей. Ранее уже отмечалось наличие гидролиза ЛНП катепсином D [4] и тромбином [15]. Кроме того, имеются данные о том, что в полиморфно-ядерных клетках крови обнаружена эластаза, секретируемая при взаимодействии клеток с ЛНП и вызывающая гидролиз апобелка A-II [22]. В препаратах ЛОНП, выделенных из крови здоровых людей и лиц с гипертриглицеридемией, имеется сериновая протеиназа [18]. В результате действия этой протеиназы происходит гидролиз апопротеида E этих ЛОНП с образованием фрагмента с молекулярной массой 12 000 D. Такой же фрагмент получался при действии на эти ЛОНП тромбина. Расщепление апопротеида E уменьшало способность ЛОНП взаимодействовать с рецепторами фибробластов. Сообщалось также [24], что выделенные из сыворотки

крови препараты ЛНП содержат фрагменты, которые получают при обработке ЛНП калликреином. В случае выделения ЛНП в присутствии ингибиторов протеиназ продуктов протеолиза в препаратах ЛНП не наблюдалось. Следует отметить, что калликреин был обнаружен в препаратах ЛОНП и ЛНП, выделенных из сыворотки крови [52]. Обнаружено [59], что при инкубации плазмы крови при 37 °С в течение 24 ч присутствующая в плазме лецитин-холестерин-ацилтрансфераза изменяет химические и физико-химические свойства ЛНП. Модифицированные этим ферментом ЛНП в большей степени, чем нативные ЛНП, деградировались фибробластами. Это свидетельствует о том, что под действием указанного фермента могут происходить изменения метаболизма ЛНП. Показано также [46], что в гомогенатах культур гладкомышечных клеток имеются катепсины В и D, способные гидролизовать ЛНП, о чем судили по освобождению из ¹²⁵I-ЛНП содержащих ¹²⁵I пептидов. Сейчас трудно сказать, какие из этих модификаций ЛНП могут иметь значение в атерогенезе. Выяснение этого вопроса должно быть предметом дальнейших исследований.

Кроме ферментативных модификаций сывороточных липопротеидов *in vivo* могут быть и неферментативные. Об этом свидетельствуют, в частности, данные по изучению свойств ЛНП, выделенных из сыворотки крови больных с хронической почечной недостаточностью. Обнаружено [27], что ЛНП таких больных хуже связываются и метаболизируются фибробластами, чем ЛНП здоровых людей. Полагают, что это может быть обусловлено карбамилрованием ЛНП больных. Известно [26], что карбамилрование 1—2 % остатков лизина ЛНП ведет к значительному снижению поглощения ЛНП фибробластами (на 70—80 %). Имеются данные [56] о наличии в крови больных сахарным диабетом гликозилированных ЛНП. Такие ЛНП хуже поглощаются фибробластами через высокоаффинные рецепторы по сравнению с ЛНП здоровых людей [55]. Патогенетическое значение таких аномальных ЛНП не совсем ясно. Можно думать, что снижение сродства таких ЛНП к клеточным рецепторам для нативных ЛНП, увеличивающее время их

пребывания в кровяном русле [35], увеличивает вероятность дальнейших модификаций ЛНП и увеличивает степень их атерогенности.

На возможность существования *in vivo* модифицированных липопротеидов указывают и данные по изучению свойств липопротеидов, экстрагированных из атером человека. Установлено, что эти липопротеиды отличаются от соответствующих им по плотности сывороточных липопротеидов. Отмечались [43], в частности, увеличение содержания эфиров холестерина и уменьшение содержания триглицеридов в ЛОНП атером, увеличение количества неэтерифицированного холестерина в ЛНП атером по сравнению с ЛНП сыворотки крови. Обнаружено [40, 41] изменение электрофоретической подвижности ЛНП, выделенных из атероматозных участков аорты человека, снижение в этих ЛНП величины отношения эфиры холестерина/свободный холестерин и изменение состава жирных кислот эфиров холестерина и триглицеридов, по сравнению с соответствующими свойствами ЛНП, выделенных из неповрежденных участков этих же аорт. Обнаружены также небольшие изменения химического состава ЛНП, выделенных из неповрежденной интимы по сравнению с составом ЛНП из сыворотки крови. Предполагалось, что эти изменения могут отвечать преимущественному поглощению стенкой аорты определенной популяции ЛНП, состав и свойства которой отличаются от таковых суммарного класса сывороточных ЛНП. Однако нельзя исключить возможность модификации ЛНП после их попадания в сосудистую стенку, нельзя исключить и деградацию ЛНП в самих атеромах. Наконец, следует отметить наличие существенных изменений ЛНП, выделенных из воспалительных очагов. Так, были обнаружены [54] значительные изменения ЛНП, выделенных из интерстициальной жидкости, накапливающейся в подсаженных под кожу животных поливиниловых губках. ЛНП, выделенные из этой жидкости, были близки ЛНП из плазмы крови по содержанию белков и фосфолипидов, но отличались увеличенным почти в 4 раза содержанием холестерина. Эти данные представляют определенный интерес в связи с возможными модификациями липопротеидов в участках воспаления.

В настоящем обзоре мы попытались привести основные данные о возможной роли модификаций (особенно ферментативных) сывороточных липопротеидов в атерогенезе. В этой области, как видно, еще имеется много отрывочных данных и недостаточно результатов систематических исследований. Это объясняется главным образом тем, что атерогенез является следствием действия многих факторов и происходит в сложных биологических системах. Для изучения этого процесса необходимо выбирать разнообразные подходы. В данном обзоре приведен один из таких подходов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградов А. Г., Попов А. В., Плесков В. М. // Международная конф. по профилактической кардиологии: Тезисы докладов. — М., 1986.
2. Карманский И. М., Левитова Е. Н., Шпикитер В. О. // Успехи биол. химии. — 1975. — Т. 16. — С. 89—114.
3. Карманский И. М., Шпикитер В. О. // Бюл. экспер. биол. — 1977. — № 8. — С. 173—175.
4. Карманский И. М., Пичугин А. Л., Шпикитер В. О. // Вопр. мед. химии. — 1979. — № 6. — С. 738—741.
5. Карманский И. М., Ковалева Г. Г., Викторова Л. Н. и др. // Бюл. экспер. биол. — 1986. — № 8. — С. 148—150.
6. Климов А. Н. // Биохимия липидов и их роль в обмене веществ. — М., 1981. — С. 45—75.
7. Климов А. Н., Нагорнев В. А. // Арх. пат. — 1985. — № 6. — С. 12—23.
8. Климов А. Н., Нагорнев В. А. // Успехи совр. биол. — 1984. — Т. 98. — С. 73—83.
9. Климов А. Н., Никуличева Н. Г. Липопротеиды, дислипидопротеидемии и атеросклероз. — Л., 1984. — С. 50—62.
10. Климов А. Н., Попов А. В., Плесков В. М. и др. // Вопр. мед. химии. — 1985. — № 6. — С. 94—97.
11. Левитова Е. Н., Лобова Н. М. // Там же. — 1978. — № 4. — С. 483—486.
12. Попов А. В. // Липопротеиды высокой плотности и атеросклероз. — М., С. 159—166.
13. Попов А. В., Виноградов А. Г. // Актуальные проблемы патогенеза атеросклероза. — Л., 1985. — С. 48—65.
14. Чулкова Т. М. // Бюл. экспер. биол. — 1985. — № 9. — С. 301—303.
15. Чулкова Т. М. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 6. — С. 70—73.
16. Barber A. A., Bernheim F. // Advanc. geront. Res. — 1967. — Vol. 2. — P. 355—403.
17. Bihari-Varga M., Goldstein S., Lagrange D. et al. // Int. J. Biol. Macromol. — 1982. — Vol. 4. — P. 438—441.
18. Bradley W. A., Gilliam E. B., Gotto A. M. et al. // Biochim. biophys. Res. Commun. — 1982. — Vol. 109. — P. 1361—1367.
19. Brown M. S., Goldstein J. L., Krieger M. et al. // J. Cell Biol. — 1979. — Vol. 82. — P. 597—813.
20. Brown M. S., Goldstein J. L. // Ann. Rev. Biochem. — 1983. — Vol. 52. — P. 233—261.
21. Brown M. S., Goldstein J. L., Fredrickson D. S. // The Metabolic Basis of Inherited Disease / J. B. Stanbury et al. — New York, 1983. — P. 655—671.
22. Byrne R. E., Polacek D., Gordon J. et al. // J. biol. Chem. — 1984. — Vol. 259. — P. 14537—14543.
23. Camejo G. // Advanc. Lipid Res. — 1982. — Vol. 19. — P. 1—53.
24. Cardin A. D., Witt K. R., Chao J. et al. // J. biol. Chem. — 1984. — Vol. 259. — P. 8522—8528.
25. Carew T. E., Chapman M. J., Goldstein S. et al. // Biochim. biophys. Acta. — 1978. — Vol. 529. — P. 171—175.
26. Cohen B., Cole T., Hahn K. S. // Ibid. — 1983. — Vol. 754. — P. 201—207.
27. Cohen B., Goldberg A. P., Harter H. R. et al. // Metabolism. — 1985. — Vol. 34. — P. 10—14.
28. Falcone D. J., Hajjar D. P., Minick C. R. // Amer. J. Path. — 1980. — Vol. 99. — P. 81—104.
29. Fogelman A. M., Shechter I., Seager J. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1980. — Vol. 77. — P. 2214—2218.
30. Fowler S., Haley N. J. // Fed. Proc. — 1979. — Vol. 38. — P. 1076.
31. Gero S., Bihari-Varga M. // Biochem. exp. Biol. — 1976. — Vol. 12. — P. 379—398.
32. Gerrity R. G., Naito K. H., Richardson M. // Amer. J. Path. — 1979. — Vol. 95. — P. 775—792.
33. Goldstein J. L., Brown M. S. // Ann. Rev. Biochem. — 1977. — Vol. 46. — P. 897—930.
34. Goldstein J. L., Ho Y. K., Basu S. K. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1979. — Vol. 76. — P. 333—337.
35. Goldstein J. L., Ho Y. K., Brown M. S. et al. // J. biol. Chem. — 1980. — Vol. 255. — P. 1839—1848.
36. Goldstein J. L., Brown M. S. // The Metabolic Basis of Inherited Disease / Ed J. B. Stanbury et al. — New York. — 1983. — P. 672—712.
37. Havel R. J., Kane J. P. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1973. — Vol. 70. — P. 2015—2019.
38. Henriksen T., Mahoney E. M., Steinberg D. // Ibid. — 1981. — Vol. 78. — P. 6499—6503.
39. Henriksen T., Mahoney E. M., Steinberg D. // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 1982. — Vol. 401. — P. 102—116.
40. Hoff H. F., Bradley W. A., Heideman C. L. et al. // Biochim. biophys. Acta. — 1979. — Vol. 573. — P. 361—374.
41. Hoff H. F., Gabotz J. W. // Atherosclerosis. — 1982. — Vol. 42. — P. 273—297.
42. Hollander W. // Exp. molec. Path. — 1976. — Vol. 25. — P. 106—120.
43. Hollander W., Paddock J., Colombo M. // Ibid. — 1979. — Vol. 30. — P. 144—171.
44. Hultsmann W. C., Jansen H. // Energy, Regulation and Biosynthesis in Molecular Biology / Ed. D. Richter. — Berlin. — 1974. — P. 322—335.
45. Hultsmann W. C., Jansen H. // Biochem. Med. — 1975. — Vol. 13. — P. 293—297.
46. Leake D. S., Peters T. J. // Biochim. biophys. Acta. — 1981. — Vol. 664. — P. 108—116.

47. Mahley R. W., Weisgraber K. H., Innerarity T. // *Circulat. Res.* 1974. — Vol. 35. — P. 722—723.
48. Mahley R. W., Innerarity T. L., Weisgraber K. H. et al. // *J. clin. Invest.* — 1979. — Vol. 64. — P. 744—750.
49. Mahley R. W., Innerarity T. L., Brown M. S. et al. // *J. Lipid Res.* — 1980. — Vol. 21. — P. 970—980.
50. Minick C. R. // *Immunity and Atherosclerosis* / Ed. P. Constantinides et al. — London, 1980. — P. 111—120.
51. Nagelkerke J. F., Barto K. P., van Berkel T. J. C. // *J. biol. Chem.* — 1983. — Vol. 258. — P. 12221—12227.
52. Pashina T. S., Polyantseva L. R., Krinskaya A. V. et al. // *Kinins III* / Ed. H. Fritz et al. — New York, 1983. — P. 1119—1126.
53. Phage I. H. // *Circulation.* — 1954. — Vol. 10. — P. 1—27.
54. Raymond T. L., Reynolds S. A. // *J. Lipid Res.* — 1983. — Vol. 24. — P. 113—119.
55. Sasaki J., Arora V., Cottam G. L. // *Biochem. biophys. Res. Commun.* — 1982. — Vol. 108. — P. 791—796.
56. Schleicher E., Deufel T., Wieland O. H. // *FEBS Lett.* — 1981. — Vol. 129. — P. 104.
57. Shechter I., Fogelman A. M., Haberland M. E. et al. // *J. Lipid Res.* — 1981. — Vol. 22. — P. 63—71.
58. Stenman S., Smitten K., Vaheri A. // *Acta med. scand.* 1980. — Suppl. 642. — P. 165—170.
59. Zeicher R., Dieplinger H., Rocher A. et al. // *Biochem. J.* — 1984. — Vol. 224. — P. 569—576.
60. Zilversmit D. B. // *Circulat. Res.* — 1973. — Vol. 33. — P. 633—636.
61. Zilversmit D. B. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 1976. — Vol. 275. — P. 138—144.
62. Zilversmit D. B. // *Circulation.* — 1979. — Vol. 60. — P. 473—485.

Поступила 17.09.86

ROLE OF LIPOPROTEIN MODIFICATIONS IN ATHEROGENESIS

V. O. Shpikiter

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

Structural stability and interaction of modified blood serum lipoproteins with cells and the components of intercellular matrix are reviewed. Modified lipoproteins might possess more distinct atherogenic properties as compared with the native lipoproteins. Existence of modified lipoproteins *in vivo* is considered.

УДК 612.115.35+616.151.5[048.8]

В. А. Белицер, А. А. Мусялковская, Т. Н. Платонова, Я. М. Ена

АНТИТРОМБИН III. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ И МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ (Обзор)

Институт биохимии им. А. В. Палладина АН УССР, Киев

Антитромбин III (АТ III) является важнейшим ингибитором тромбина. Действуя при участии своего активатора — гепарина, АТ III очень быстро инактивирует тромбин. Высокая скорость этого процесса имеет существенное значение. Для остановки кровотечения тромбин продуцируется в неизбежном избытке, что создает угрозу тромбозов. Для предотвращения последних требуется достаточно быстрая инактивация лишнего тромбина. Эту жизненно важную задачу и выполняет система АТ III-гепарин. Данная ингибиторная система блокирует не только тромбин, но и многие другие сериновые протеиназы, в частности фактор свертывания крови Ха — протениназу, превращающую протромбин в тромбин [48, 62]. Таким образом, не только купируется действие тромбина, но и прекращается его новообразование из белка-предшественника (протромбина).

Косвенным указанием на то, что АТ III — жизненно важный белок является тот факт, что среди разных форм нас-

ледственной недостаточности АТ III, при которых риск тромбозов всегда повышен, нет форм где бы он полностью отсутствовал [21, 52]. По-видимому, потеря способности синтезировать АТ III приводит к летальному исходу. Поэтому не удивительно, что определение уровня АТ III в плазме крови привлекает внимание большого числа клиницистов и стало одним из важных лабораторных анализов.

АТ III представляет собой гликопротеид, который относится к α_2 -глобулинам плазмы. Кроме коротких углеводных цепей, молекула АТ III имеет гликолипидный компонент [25]. Молекулярная масса АТ III, по-видимому, составляет около 60 кД [11]. Биосинтез АТ III происходит в печени. Норма содержания АТ III для плазмы крови человека не превышает 0,3 г/л [9].

Гепарин представляет собой кислый полисахарид из числа глюкозаминогликанов [2]. В дисахаридной структурной единице, повторяющейся в молекуле гепарина, аминогруппа и шестой

С-атом остатка глюкозамина сульфатированы. Кроме того, сульфатная группа имеется у второго С-атома остатка глюкоуроновой кислоты. Среднее содержание сульфогрупп — от 2 до 3 на дисахаридную единицу. Благодаря сульфатным группам и карбоксилам, молекула гепарина при физиологических значениях pH несет большое количество отрицательных электрических зарядов, т. е. является полианионом. Молекулярная масса гепарина варьирует от препарата к препарату. Обычно находят величины от 12 до 20 кД [36]. Антикоагулянтная сила гепарина пропорциональна молекулярной массе препарата.

По вопросу об уровне гепарина в плазме крови при нормальном состоянии данные литературы расходятся [26]. Существует мнение, что плазма в норме свободна от гепарина (концентрация ниже порога чувствительности методов анализа). Значительные количества гепарина поступают в кровь при появлении в кровотоке тромбина. Природа этого явления раскрыта Б. А. Кудряшовым [3]. Чувствительные к тромбину хеморцепторы, находящиеся на внутренней поверхности кровеносных сосудов, обнаруживают тромбин и посылают по афферентным нервам сигналы в соответствующий центр продолговатого мозга. Этот центр, в свою очередь, посылает импульсы по эфферентным нервам в ткани, содержащие депоированный гепарин, который мобилизуется и поступает в кровь. Данная рефлекторная дуга обеспечивает быстрый адекватный ответ организма на появление избыточного тромбина.

Еще на раннем этапе изучения антикоагулянтов плазмы выяснилось, что гепарин сам по себе не влияет на свертывание фибриногена тромбином, но действует как чрезвычайно сильный ингибитор в присутствии плазмы или ее определенного белкового компонента [18, 33]. Это говорит о том, что данный белковый компонент обеспечивает проявление чрезвычайно высокой потенциальной активности гепарина. Указанный белок называли кофактором гепарина или антитромбином II по классификации Seegers — AT II [28]. Известно было, что без гепарина плазма медленно инактивирует тромбин [7], как предполагалось, за счет другого белка — AT III. К числу антитромбинов был отнесен также фибрин AT

I — нерастворимый белок, который образуется из фибриногена при действии тромбина. Таким образом, в обиход вошло сокращенное обозначение трех антитромбинов: AT I, AT II и AT III. Попытки подтвердить наличие в плазме двух растворимых антитромбинов (II и III) не удалось и привели к выводу, что в плазме имеется всего один вид AT [6, 61]. За ним закрепилось название AT III, а также кофактор гепарина. Следовательно, эти два названия являются синонимами.

Позже было предложено [9] обозначать единственный антитромбин плазмы буквами AT без индекса III. Одни авторы приняли это предложение [50, 57], другие сохранили прежние обозначения AT III и кофактор гепарина. Теперь в литературе встречается 3 названия: AT, AT III и кофактор гепарина. Ощущается необходимость обсудить целесообразность терминов, особенно термина «кофактор гепарина». Этот термин вполне соответствует приведенному выше представлению о гепарине как особо мощном потенциальном ингибиторе тромбина, который работает с белковым вспомогательным фактором. Но обоснованно ли это представление? При инактивации тромбина действием AT III или смеси AT III с гепарином всегда образуется неактивный комплекс AT III — тромбин в соотношении 1:1. Результаты специальных исследований показали, что строение и свойства этого комплекса не зависят от того, получен он в присутствии или в отсутствие гепарина [7, 20, 48, 56]. Как видно, реакция соединения тромбина с AT III определяется наличием специфического сродства между определенными участками этих двух белковых молекул. Гепарин, функционируя в качестве катализатора, ускоряет реакцию. Далее, прямой причиной полной потери ферментативных свойств тромбина является ковалентная реакция между активным центром этой протеиназы и AT III [46, 48]. Последний играет роль специфически блокирующего псевдосубстрата. Из всего этого ясно, что инактивацию тромбина осуществляет AT III, гепарин же служит вспомогательным ускоряющим фактором. Следовательно AT III можно считать основным фактором, а гепарин — кофактором. Термин «кофактор гепарина», по существу, является дезориентирующим. Он заставляет предпола-

гать, что АТ III помогает гепарину в его воздействии на тромбин. Только вследствие этого в методическом руководстве [4] могло появиться ошибочное утверждение, что АТ III активирует гепарин. В связи с вопросом о ведущей роли белка АТ III можно вспомнить о том, что в системах фермент — кофермент основным фактором всегда является специфический белок.

Недавно был открыт новый анти-тромбин плазмы крови. Он назван гепариновым кофактором II (ГК II) [19, 32, 58]. Ему свойственны многие особенности, характерные для АТ III. Сильнейшим активатором ГК II является гепарин, хотя активирующее действие в той или иной степени оказывают и другие сульфатированные полисахариды [53]. Молекула ГК II несколько больше молекулы АТ III. Подобно АТ III новый ингибитор, инактивируя тромбин, образует с ним комплекс в соотношении 1:1. По активности ГК II уступает АТ III и имеет более узкую специфичность. Так, в отличие от АТ III он совершенно не действует на фактор Ха и плазмин. В одном случае, однако, активируемым оказался ГК II, но не АТ III: дерматансульфат значительно усиливает действие ГК II на тромбин, но совершенно неэффективен при действии АТ III. Таким образом, дерматансульфат, возможно, является специфическим активатором ГК II.

Следует особо отметить, то ГК II и АТ III не являются разновидностями одного и того же белка. Это совершенно разные белки. ГК II не дает перекрестной реакции с антисывороткой, специфической для АТ III.

По своей функциональной специфичности ГК II является четко выраженным анти-тромбином, причем его анти-тромбиновая направленность выражена строже, чем у АТ III. Хотя функции АТ III и ГК II очень близки, эти анти-тромбины не являются близко родственными белками. Не найдено и иммунологического родства между ГК II и другими ингибиторами протеиназ плазмы — α_2 -макроглобулином, α_1 -антитрипсином. Биологическая роль ГК II пока не установлена [58].

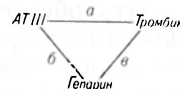
Реакция АТ III — тромбин особенно чувствительна к ускоряющему влиянию гепарина. Даже в такой низкой концентрации, как 0,005 ед/мл гепарин дает заметный эффект. С другой сто-

роны, для заметного замедления действия плазмина (в присутствии АТ III) концентрация гепарина должна быть не менее 2 ед/мл [16, 55]. Тромбин имеет повышенное сродство к АТ III. Так, в растворе, содержащем избыточное количество двух протеиназ — тромбина и фактора Ха, АТ III избирательно реагирует с тромбином [44].

Для гепарина характерна каталитическая природа его действия [13, 24]. После завершения инактивации тромбина в системе, содержащей АТ III и гепарин, продуктом является только комплекс АТ III — тромбин; весь гепарин остается в свободном состоянии, сохраняет свою биологическую активность. 1 моль гепарина способен участвовать в быстрой инактивации нескольких молей тромбина [16, 39].

Очевидно, что быстрая инактивация тромбина является результатом ряда промежуточных реакций, в которых участвуют АТ III, гепарин и тромбин. Глубокий кинетический анализ раскрыл общую картину процесса [47].

Гепарин комплексирован как с тромбином, так и с АТ III. К возникающим комплексам гепарин — АТ III и гепарин — тромбин быстро присоединяются тромбин и АТ III. Следовательно, тройной комплекс образуется двумя путями [31, 42] (рис. 1). Оба эти пути согласно кинетическим данным реализуются с одинаковой вероятностью. Тройной комплекс, который может быть представлен в виде треугольника,



претерпевает очень быстро конформационные изменения, в результате которых связь *a* консолидируется, а связи *б* и *в* ослабевают. Это приводит к закреплению комплекса АТ III — тромбин и отщеплению гепарина. Послед-

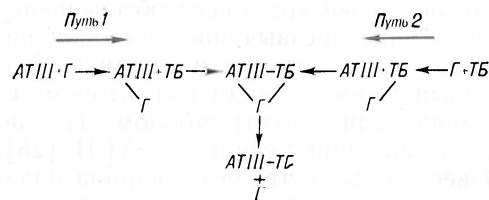


Рис. 1. Промежуточные реакции инактивации тромбина с помощью АТ III.

Здесь и на рис. 2: ТБ — тромбин; Г — гепарин.

ний, таким образом, является катализатором образования комплекса АТ III — тромбин, который может (хотя и медленно) получиться из АТ III и тромбина и без участия гепарина.

На рис. 1 приведен механизм инактивации тромбина системой АТ III — гепарин, но по существу она отражает действие этой системы на все чувствительные к ней сериновые протеиназы. При переходе от одной протеиназы к другой меняются значения кинетических параметров (например, констант диссоциации), но выражаемые схемой качественные закономерности превращений сохраняются. Чтобы перейти от тромбина, например, к фактору Ха, достаточно заменить в системе тромбин на фактор Ха.

Между молекулами АТ III и тромбина имеется очевидное сродство, но в отсутствие гепарина реакция их соединения идет медленно [37]. По-видимому, какие-то структурные детали этих молекул препятствуют их быстрому соединению. Ускоряющий эффект гепарина очень велик, скорость реакции может увеличиваться более чем в 1800 раз [35]. Тройной комплекс, возникающий при реакциях гепарина с АТ III и тромбином, подобен михаэлисовскому комплексу и образуется, вероятно, также с молниеносной скоростью как первичный нековалентный комплекс фермент — субстрат [45]. При построении этого комплекса АТ III и тромбин могут соединяться между собой беспрепятственно за долю секунды.

При построении гипотетической модели тройного комплекса — промежуточного продукта — следует принять во внимание, что каталитическую функцию выполняет маленькая полианионная молекула гепарина, которая взаимодействует одновременно с двумя значительно более крупными белковыми молекулами: тромбина и АТ III. По стерическим причинам связанные между собой молекулы гепарина и тромбина должны находиться по одну сторону наиболее крупной молекулы АТ III (рис. 2). Расположение гепарина и тромбина по двум противоположным сторонам молекулы АТ III, как это принимается в модели [27], неправдоподобно.

Молекулярные механизмы взаимодействий между компонентами рассматриваемой системы могут быть описаны только в общих чертах. Быст-

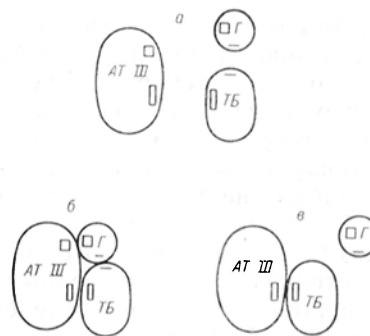


Рис. 2. Взаимное расположение компонентов тройного комплекса при инактивации тромбина с помощью АТ III.

а, б и в — последовательные стадии образования тройного комплекса.

рые реакции образования промежуточных соединений (см. выше) обеспечивают определенные комплементарные участки, расположенные на поверхностях молекул-партнеров. Благодаря этим участкам создаются системы межмолекулярных нековалентных связей специфического характера. Особенно существенны электростатические связи, в которых участвуют отрицательные заряды молекулы гепарина [43]. Тройной комплекс в литературе рассматривается как соединение типа комплекса Михаэлиса с низкой константой диссоциации. На стадии тройного комплекса или после нее наступает реакция ацилирования активного серина в каталитическом центре тромбина при разрыве определенной пептидной группы, содержащей остаток карбоксильной группы аргинина в молекуле АТ III [14, 15, 29]. В данном случае АТ III действует в качестве псевдосубстрата, давая стабильное ацильное производное, в результате чего каталитическая функция тромбина блокируется.

Образование продукта АТ III — ТБ долгое время считали необратимым процессом. Однако более новые работы показали, что соединение АТ — тромбин спонтанно, хотя и очень медленно, распадается с образованием активного тромбина и неактивного АТ III [34]. Время полураспада составляет 3,5 сут.

Комплекс АТ III — тромбин удаляется из кровотока. Таким образом, реакция инактивации тромбина протекает в организме практически необратимо. Выше говорилось о том, что продукт инактивации (АТ III — тромбин),

полученный в отсутствие гепарина, т. е. непосредственно из АТ III и тромбина, спонтанно распадается с той же скоростью, что и продукт, полученный с участием гепарина. Следовательно, участие гепарина в механизме инактивации тромбина не делает получаемый продукт более устойчивым.

В следующем разделе обзора рассматривается весьма существенный вопрос о принципах методов определения концентрации АТ III в плазме крови. По своему типу эти методы разделяются на функциональные и иммунологические [22, 27]. Функциональные методы основаны на количественном определении снижения — под действием АТ III — активности тромбина, введенного в образец исследуемой плазмы. В иммунологических методах определяется количество белка, прореагировавшего со специфическими для АТ III антителами.

Результаты функциональных определений концентрации АТ III обычно выражают в процентах, принимая за 100 % концентрацию АТ III в нормальной стандартной плазме (это смешанная плазма 10—20 здоровых молодых мужчин, усредненная норма). У здоровых людей содержание АТ III колеблется от 85 до 115 % стандартной усредненной нормы. Результаты иммунологических определений АТ III выражаются в весовых единицах на единицу объема плазмы. При 100 % концентрации содержание АТ III составляет около 0,3 г/л [59]. Зная это, нетрудно переходить от процентов активности к весовым единицам и наоборот. Показано, что результаты, полученные функциональным и иммунологическим методами, как правило, хорошо совпадают [5, 54]. Однако в некоторых случаях эти результаты расходятся. При нормальном [60] или даже несколько повышенном [41, 51] содержании АТ III, обнаруженном иммунологически, функциональный метод может показать пониженный его уровень. В этих случаях белковая молекула АТ III сохраняет свои антигенные детерминанты, но оказывается неполноценной в функциональном отношении. Подобное положение, как известно, наблюдается и для других специфически активных белков плазмы.

При функциональных определениях АТ III можно использовать кроме тромбина и другую протеиназу — фак-

тор Ха [12, 44]. Однако, как выяснилось, существенных преимуществ Ха не имеет. Переходить от тромбина к менее доступному ферменту Ха нет смысла.

Для функциональных тестов на АТ III в принципе пригодны все субстраты тромбина. Используется как классический субстрат — фибриноген, так и низкомолекулярные синтетические субстраты [22]. Фибриноген применяют в виде очищенных препаратов, хотя в некоторых случаях его можно заменить плазмой бычьей крови [8].

Методика определения активности тромбина диктуется природой применяемого субстрата. Если субстратом служит фибриноген, то показателем активности тромбина является время свертывания. При работе с синтетическими субстратами скорость реакции, катализируемой тромбином, регистрируется при помощи соответствующих физических или химических методов.

До начала 80-х годов наилучшими были методы, основанные на определении времени свертывания. Существовавшие в то время синтетические субстраты успеха не имели. С появлением новых синтетических субстратов положение изменилось.

Синтетические субстраты, расщепление которых осуществляется под действием тромбина, являются специфическими для проявления его активности (эстеразной, амидолитической). Природа синтетических субстратов различна — это эфиры, пептиды с хромогенными или флюорогенными свойствами. Они, как правило, содержат «активный» остаток, присоединенный связью, расщепляемой ферментом. У хромогенных субстратов — это *p*-нитроанилин, который является хромоформом. Его количество определяется спектрофотометрически при 405 нм. У флюорогенных субстратов отщепляется диметиловый эфир 5-аминоизофталевой кислоты. Измерение проводится на флюориметре. Наиболее широко используются хромогенные субстраты, поскольку они не требуют больших затрат времени, дают точные и хорошо воспроизводимые результаты, допускают возможность автоматизации процесса определения.

К сожалению, хромогенные субстраты представляют собой очень дорогие импортные реактивы, что препятствует их широкому применению в отечествен-

ных лабораториях. Определение АТ III с применением фибриногена как субстрата тромбина в обычных клинических лабораториях осуществимо. Однако для получения надежных результатов требуется большая тщательность в подготовке и проведении анализа.

Существует 2 варианта определения АТ III с использованием фибриногена. По первому варианту АТ III, содержащийся в пробе исследуемой плазмы, полностью связывается (инактивируется) тромбином, который вносится в некотором избытке по сравнению с имеющимся АТ III (количество внесенного тромбина должно быть точно известно). Для ускорения реакции между тромбином и АТ III добавляется гепарин. Количество тромбина, оставшегося после реакции, определяется при помощи фибриногена. Количество тромбина, использованного в реакции (разница между внесенным и оставшимся), точно соответствует содержанию АТ III в образце исследуемой плазмы, так как АТ III и тромбин реагируют между собой в молярном отношении 1:1, а АТ III, по условиям теста, израсходован без остатка.

По второму методическому варианту исследуется сравнительно медленное прогрессивное действие АТ III, протекающее в отсутствие гепарина [8]. При этих условиях в инактивации тромбина, кроме АТ III, участвуют и другие ингибиторы плазмы, особенно α_2 -макроглобулин. Главным ингибитором является АТ III. Он инактивирует более 70 % тромбина, на долю α_2 -макроглобулина приходится 25 % [30]. Учитывая, что молярные концентрации АТ III и α_2 -макроглобулина примерно одинаковы, можно заключить, что молекула АТ III реагирует с тромбином значительно быстрее молекулы α_2 -макроглобулина. В ходе реакции концентрация АТ III в плазме должна быстро уменьшаться, а доля участия α_2 -макроглобулина — возрастать. Ясно, что в начальный период реакции разница между скоростями действия АТ III и α_2 -макроглобулина максимальна. При достаточно коротком времени инкубации реакцией тромбина с α_2 -макроглобулином можно пренебрегать. Начальная скорость инактивации тромбина в плазме отражает действие практически одного АТ III. Начальная скорость инактивации тромбина неодинакова для разных образцов плазмы. Она тем

больше, чем выше концентрация АТ III в данной плазме [40]. По соотношению начальных скоростей инактивации тромбина в двух плазмах можно определить отношение концентраций в них АТ III, а если одна из плазм является стандартной, то определение дает процентное содержание АТ III в исследуемой плазме. Время инкубации при 37°C при определении начальной скорости может составлять 2—3 мин, но не более 5 мин.

Существенным недостатком второго методического варианта является то, что в случаях больных, получающих с лечебной целью гепарин, этот метод непригоден. Для первого методического варианта такого ограничения не существует.

Определение содержания АТ III в плазме крови в настоящее время рассматривается как один из существующих лабораторных анализов. Однако информативность сведений о содержании АТ III в плазме, насколько можно судить по литературным данным [17, 23, 27], переоценивать не следует. Данные об уровне АТ III могут оказаться очень ценными, если они сочетаются с другими сведениями о состоянии больного. Низкое содержание АТ III в плазме далеко не всегда говорит о высокой вероятности тромбоза. У людей с наследственной недостаточностью АТ III связь понижения содержания АТ III с вероятностью тромбоза или эмболии проявляется четко. Если уровень АТ III в плазме снижен примерно до 50 % нормы, у всех больных с наследственной аномалией АТ III в течение жизни наступают тромбозы или эмболии, причем рецидивы не являются редкостью. Склонность к тромбозам появляется и при нефротическом синдроме. Это, очевидно, связано с протеинурией [54]. В качестве сравнительно низкомолекулярного белка АТ III легко переходит из крови в мочу. Отмечено, что если за сутки организм теряет с мочой более 5,5 г белка, то уровень АТ III в плазме резко снижается и возникает серьезная опасность эмболии.

С другой стороны, неоднократно отмечалось, что при некоторых состояниях организма содержание АТ III может быть резко пониженным без склонности к тромбозу или эмболии [61]. Так, при циррозе печени, несмотря на очень низкое содержание АТ III в плазме, тромбозов не возникает. Очевидно, что

для появления тромбоза, кроме низкого уровня АТ III, существенное значение имеют и другие факторы, в частности системы прокоагулянтов [38].

Представляет интерес вопрос о возможной природе наследственного дефекта, ответственного за функциональную неполноценность белка АТ III. Одна из нескольких разновидностей наследственных дефектов АТ III заключается в аномально низкой чувствительности АТ III к гепарину [51, 60]. При исследовании медленного, прогрессивного действия без гепарина этот аномальный АТ III ничем не отличается от нормального. Но при концентрации гепарина, обычной для тестов на торможение тромбина, он оказывается малоактивным. Если резко повысить концентрацию гепарина, что не повышает эффективности нормального АТ III, то аномальный белок действует сильно и по активности не уступает нормальному белку. Как видно, снижение чувствительности АТ III к гепарину объясняется уменьшением к нему сродства. Повышение концентрации гепарина компенсирует недостаток сродства и возвращает функцию к норме.

Здесь можно вспомнить о том, что при некоторых патологических состояниях организма гепарин в значительной степени теряет свои противосвертывающие свойства [1]. Это явление пока не получило объяснения. Предполагается, что и здесь причиной слабой эффективности гепарина является нарушение реакции между ним и АТ III. Причину нарушения нетрудно себе представить. Специфическое сродство АТ III к гепарину создается тенденцией к образованию прочной системы нековалентных связей между ними [43], в первую очередь за счет анионных групп и протонированных аминокислотных групп лизина АТ III. Упорядоченная нативная структура АТ III должна обеспечивать оптимальное межмолекулярное взаимодействие групп на поверхностях молекул при их контакте. Изменение фиксированной топографии групп, участвующих в образовании системы связей, неблагоприятно: снижаются точность соединения, прочность образующегося продукта, сродство между АТ III и гепарином.

Нарушения нативной топографии поверхности молекулы АТ III можно ожидать как в результате мутационно-

го изменения первичной структуры появления наследственной аномалии, так и при некоторых патологических состояниях. Если это так, то АТ III представляет собой наиболее уязвимый компонент системы. Конечно, изложенная концепция представляет собой гипотезу, не исключающую другие альтернативные предположения.

В течение ряда лет в печати появляются публикации об изготовлении и использовании для лечения и профилактики концентратов АТ III [10]. Судя по некоторым работам, получаются в высшей степени обнадеживающие результаты. Но пока имеются лишь короткие сообщения предварительного характера. Предполагается, что концентраты АТ III найдут применение при некоторых тяжелых хирургических и гинекологических заболеваниях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баркаган З. С., Бишевский К. М., Видяков Г. Е., Кунгуров И. А. // Кардиология. — 1981. — № 8. — С. 31—35.
2. Бычков С. М. // Вопр. мед. химии. — 1981. — № 6. — С. 726—736.
3. Кудряшов Б. А. Биологические проблемы регуляции жидкого состояния крови и ее свертывания. — М., 1975. — С. 279—298.
4. Метод определения антитромбина III по Абильтгаарду // Методы исследования фибринолитической системы крови / Под ред. Г. В. Андреевко. — М., 1981. — С. 81.
5. Накабанда А., Кацадзе Ю. Л., Котовицкова М. А. // Лаб. дело. — 1984. — № 5. — С. 276—279.
6. Abildgaard U. // Scand. J. clin. Lab. Invest. — 1968. — Vol. 21, N 1. — P. 89—91.
7. Abildgaard U. Ibid. — 1969. — Vol. 24, N 1. — P. 23—27.
8. Abildgaard U., Gravem K., Godal H. C. // Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttg.). — 1970. — Bd 24, N 1—2. — S. 224—229.
9. Abildgaard U. // Recent Advances in Blood Coagulation / Ed. L. Poller. — Edinburgh, 1981. — Vol. 3. — P. 151—173.
10. Allain J. P. // Vox Sang. — 1984. — Vol. 46. — Suppl. 1. — P. 23—25.
11. Andersson L.-O. // The Physiological Inhibitors of Coagulation and Fibrinolysis / Ed. D. Collen et al. — Amsterdam, 1979. — P. 39—42.
12. Biggs R., Denson K. W. E., Akman N. et al. // Brit. J. Haemat. — 1970. — Vol. 19, N 2. — P. 283—307.
13. Björk I., Nordenman B. // Europ. J. Biochem. — 1976. — Vol. 68, N 2. — 507—511.
14. Björk I., Jackson C. M., Jönvall H. et al. // J. Biol. Chem. — 1982. — Vol. 257, N 5. — P. 2406—2411.
15. Blackburn M. N., Smith R. L., Carson J., Sibley C. C. // Ibid. — 1984. — Vol. 259, N 2. — P. 939—941.
16. Blomback B., Blomback M., Olsson P. // Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttg.). — 1963. — Bd 9, N 3—4. — S. 368—386.

17. Brandt P. // *Thrombos. Res.* — 1981. — Vol. 22, N 1/2. — P. 15—24.
18. Brinkhous K. M., Smith H. P., Warner E. D., Seegers W. H. // *Amer. J. Physiol.* — 1939. — Vol. 125, N 4. — P. 683—687.
19. Briginshaw G. F., Shanberge J. N. // *Archiv. Biochem.* — 1974. — Vol. 191, N 2. — P. 683—690.
20. Chan J. Y. C., Burrowes C. E., Habal F. M., Movat H. L. // *Biochem. biophys. Res. Commun.* — 1977. — Vol. 74, N 1. — P. 150—158.
21. Chaase J. F., Esnord F., Guillon J. D. et al. // *Thrombos. Res.* — 1984. — Vol. 34, N 4. — P. 297—302.
22. Conard J. // *Seminars Thrombos Hemostas.* — 1983. — Vol. 9, N 4. — P. 257—261.
23. Damus P. S., Wallace G. A. // *Thrombos. Res.* — 1975. — Vol. 6, N 1. — P. 27—38.
24. Danielsson A., Björk I. // *Biochem. J.* — 1983. — Vol. 213, N 2. — P. 345—353.
25. Danishefsky I., Lweben A., Stomiany B. L. // *J. biol. Chem.* — 1978. — Vol. 253, N 1. — P. 32—37.
26. Engelberg H. // *Fed. Proc.* — 1977. — Vol. 36, N 1. — P. 70—72.
27. Fareed J., Messmore H. L., Walenga J. M. et al. *Seminars Thrombos Haemostas.* — 1982. — Vol. 8, N 4. — P. 288—301.
28. Fell C., Ivanovic N., Johnson S. A., Seegers W. H. // *Proc. Soc. exp. Biol.* (N. Y.). — 1954. — Vol. 85, N 2. — P. 199—202.
29. Fish W. W., Björk I. // *Europ. J. Biochem.* — 1979. — Vol. 101, N 1. — P. 31—38.
30. Fisher A. M., Tapon-Bretaudiere J., Bros A., Josso F. // *Thromos. Haemostas.* — 1981. — Vol. 45, N 1. — P. 51—54.
31. Griffith M. // *J. biol. Chem.* — 1982. — Vol. 257, N 13. — P. 7360—7365.
32. Griffith M. J. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.* — 1983. — Vol. 80, N 18. — P. 5460—5464.
33. Howell W. H. // *Amer. J. Physiol.* — 1925. — Vol. 71, N 3. — P. 553—562.
34. Jesty I. // *J. biol. Chem.* — 1979. — Vol. 254, N 4. — P. 1044—1049.
35. Jordan R., Beeler D., Rosenberg R. // *Ibid.* — P. 2902—2913.
36. Lanrent T. C., Tenblad A., Thunberg L. et al. // *Biochem. J.* — 1979. — Vol. 175, N 2. — P. 691—701.
37. Lytleton J. W. // *Ibid.* — 1964. — Vol. 58, N 1. — P. 8—15.
38. Lundsgaard-Hensen P., Ehrenguber E., Frei E. et al. // *Vox Sang.* — 1983. — Vol. 46, N 1. — P. 19—28.
39. Machovich R., Aranyi P. // *Biochem. J.* — 1978. — Vol. 173, N 3. — P. 869—875.
40. Monkous F. C. // *Meth. Enzymol.* — 1970. — Vol. 19. — P. 915—924.
41. Mortensen J. L. // *Thrombos. Res.* — 1984. — Vol. 33, N 5. — P. 511—515.
42. Nesheim M. E. // *J. biol. Chem.* — 1983. — Vol. 258, N 23. — P. 14708—14717.
43. Nordenman B., Björk I. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1981. — Vol. 672, N 3. — P. 227—238.
44. Odegard O. R., Lie M. // *Thrombos. Res.* — 1978. — Vol. 12, N 4. — P. 697—700.
45. Olson S. T., Shore J. D. // *J. Biol. Chem.* — 1982. — Vol. 257, N 24. — P. 14891—14895.
46. Owen W. G. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1975. — Vol. 405, N 2. — P. 380—387.
47. Pomerantz M. W., Owen W. G. // *Ibid.* — 1978. — Vol. 535, N 1. — P. 66—77.
48. Rosenberg R. D., Damus P. S. // *J. biol. Chem.* — 1973. — Vol. 248, N 18. — P. 6490—6505.
49. Rosenberg J. S., McKenna P. W., Rosenberg R. D. // *Ibid.* — 1975. — Vol. 250, N 23. — P. 8883—8888.
50. Rosenberg R. D., Lam L. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.* — 1979. — Vol. 76, N 3. — P. 1218—1222.
51. Sakuragawa N., Takahashi K., Kondo S.-J., Koide T. // *Thrombos. Res.* — 1983. — Vol. 31, N 2. — P. 305—317.
52. Scully M. F., Haas H. D., Chan P., Kakkar V. V. // *Brit. J. Haemat.* — 1981. — Vol. 47, N 2. — P. 235—240.
53. Scully M. F., Kakkar V. V. // *Thrombos. Res.* — 1984. — Vol. 36, N 2. — P. 187—194.
54. Sherman L. A. // *Clin. Haemat.* — 1984. — Vol. 13, N 1. — P. 17—38.
55. Smith G., Sundboom M. L. // *Thrombos. Res.* — 1981. — Vol. 22, N 1/2. — P. 115—133.
56. Stead N., Kaplan A., Rosenberg R. D. // *J. biol. Chem.* — 1976. — Vol. 251, N 21. — P. 6481—6488.
57. Thunberg L., Lindahl U., Tengblad A. et al. // *Biochem. J.* — 1979. — Vol. 181, N 1. — P. 241—243.
58. Tollefsen D. M., Majerus D. W., Blank M. K. // *J. biol. Chem.* — 1982. — Vol. 257, N 5. — P. 2162—2169.
59. Triplett D. A., Banez E. I., Harms C. S. // *Thrombos. Res.* — 1983. — Vol. 31, N 6. — P. 855—862.
60. Tran T. H., Bondeli C., Marbet G. A., Duckert F. // *Thrombos. Haemostas.* — 1980. — Vol. 44, N 2. — P. 92—95.
61. Weiner C. P., Brandt J. // *Obstet. Gynec.* — 1980. — Vol. 56, N 5. — P. 601—603.
62. Yin E. T., Wessler S., Stoll P. J. // *J. biol. Chem.* — 1971. — Vol. 246, N 11. — P. 3712—3719.

Поступила 17.09.86

ANTITHROMBIN III. FUNCTIONAL ROLE AND METHODS OF ESTIMATION

V. A. Belitser, A. A. Musjalkovskaya,
T. N. Platonova, Ya. M. Ena

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences
of the Ukrainian SSR, Kiev

Antithrombin III (AT III) is the most important inhibitor of thrombin and other serine proteinases in the system of blood coagulation. AT III not only removes the excess of thrombin from blood but it inhibits the enzyme synthesis. AT III became functionally active in presence of heparin, which operates as a catalyst and accelerates significantly the formation of inactive complexes between AT III and proteinases, which usually developed slowly in absence of the activator. AT III and heparin cofactor are synonyms and designate the same substance. Modern procedures for estimation of AT III in blood plasma are reviewed.

Л. И. Филановская, А. В. Того, А. С. Цвейбах, М. Н. Блинов,
Н. А. Алексеев, Е. А. Ушакова

АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗА, ПУРИННУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗА И ЭКТО-5'-НУКЛЕОТИДАЗА—МАРКЕРЫ ВАРИАНТОВ ОСТРОГО ЛЕЙКОЗА

НИИ гематологии и переливания крови, Ленинград

В настоящее время общепризнано, что острые лейкозы, особенно лимфоидной природы, представляют гетерогенную группу заболеваний и успех в их лечении во многом зависит от точности диагностики субварианта. Современные подходы к диагностике острых лейкозов, помимо клинико-морфологических, цитохимических, иммунологических и цитогенетических исследований, включают в себя и биохимический анализ энзиматических маркеров. Среди них особого внимания заслуживают ферменты, катализирующие процессы распада пуриновых нуклосотидов: аденозиндезаминазы (АДА), пурииннуклеозидфосфоорилазы (ПНФ) и экто-5'-нуклеотидазы (5'-Н).

Изучение этих ферментов, начатое с выяснения роли осуществляемых с их участием процессов метаболизма пуринов в возникновении иммунной недостаточности, привело к пониманию ценности их анализа для диагностики отдельных форм острых лейкозов. Показано [20], что малигнизированные лейкоциты ряда форм лейкоза имеют характерные отличия в распределении активностей АДА, ПНФ и 5'-Н и в их соотношениях, что коррелирует с наличием на поверхности лейкозных клеток некоторых антигенов [10] и специфических иммунологических маркеров [16].

Нами было предпринято изучение активности ферментов дегградации пуринов — АДА, ПНФ и 5'-Н в мононуклеарных клетках (бластах, лимфоцитах) при различных иммунологических вариантах острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), при остром миелобластном лейкозе (ОМЛ) и остром недифференцированном лейкозе (ОНЛ) с целью определения возможного их значения для дифференциальной диагностики вариантов острого лейкоза и выяснения биологической природы лейкозно-трансформированных гематopoэтических клеток.

Методика

Работа проведена на лимфоцитах периферической крови 12 здоровых людей и мононуклеарных клетках крови (бласты, лимфоциты) 47 больных ОЛЛ (из них 9 больных Т-клеточным ОЛЛ и 38 больных ни Т ни В ОЛЛ), 11 больных ОМЛ и 13 ОНЛ. Основную часть больных ОЛЛ и ОНЛ составляли дети в возрасте от 1 до 15 лет, тогда как большинство пациентов с диагнозом ОМЛ были в возрасте от 19 до 76 лет. Острый лейкоз диагностировали на основании клинико-морфологических, цитохимических и (у ряда больных) иммунологических данных. Диагноз ОНЛ ставили в тех случаях, когда не получали четких цитохимических данных в пользу ОЛЛ или ОМЛ.

Лимфоциты от здоровых людей и мононуклеарные клетки больных выделяли путем центрифугирования на градиенте фиколл-верографин $d=1,076$ дефибринированной крови или суспензии клеток, полученной из плазменного слоя после отстаивания крови с желатино-цитратным раствором. Активность ферментов АДА и ПНФ определяли в лизатах клеток, а активность 5'-Н — на intactных клетках радиохимическими методами, основанными на изолировании продуктов изучаемых ферментативных реакций хроматографией на бумаге и тонкослойной хроматографией на пластинках силифол УФ-254 [3].

Для иммунологической характеристики мононуклеарных клеток больных использовали ряд методов: реакцию розеткообразования с бараньими (Е-РОК при 4 и 37 °С), человеческими (Н-РОК) и мышинными (М-РОК) эритроцитами (причем использовали как intactные эритроциты, так и клетки, обработанные полиглокином); определение C_{3b} - и C_{3a} -рецепторов; поверхностных и цитоплазматических иммуноглобулинов, а также детектировали поверхностные антигены Т-клеток, общий-ОЛЛ и антигены к моноклональным антигенам ИКО-1, ИКО-10, ИКО-11, ИКО-12 [1, 2].

Результаты и обсуждение

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что активность ферментов пуринового катаболизма в исследуемых бластных клетках больных острым лейкозом варьирует в широких пределах и зависит от варианта заболевания. Так, у 4 больных, которым на основании иммунологического обследования был поставлен диагноз Т-клеточного ОЛЛ, активность АДА (1126,0—1376,5 нмоль на 10^6 клеток в 1 ч), как

видно из данных табл. 1, превышает в 7—8,3 раза среднюю активность фермента в нормальных периферических лимфоцитах ($164 \pm 15,4$ нмоль), тогда как активность ПНФ не отличается от таковой в норме. Это свидетельствует о высокой ($11,5 \pm 21,2$) величине соотношения активностей АДА и ПНФ в лимфобластах, являющейся отличительной особенностью Т-клеточных лимфоидных популяций [10]. Активность поверхностно-клеточной 5'-Н в 2 случаях Т-ОЛЛ на лимфобластах отсутствовала, а в 1 случае была в 5 раз ниже, чем в норме.

Картина распределения величин активностей исследуемых ферментов, подобная описанной выше, была выявлена в лимфобластах еще у 5 больных ОЛЛ, что позволяет предположить у них Т-клеточный вариант заболевания, хотя иммунологического исследования лейкозного клона этих больных не проводилось. Правомерность такого предположения подкрепляется тем, что у 3 из 5 упомянутых больных ОЛЛ активность АДА в бластах, как видно из данных табл. 1, была хотя и ниже, чем у обследованных нами больных Т-ОЛЛ, однако ее величина, а также активности ПНФ и 5'-Н были сравнимы с таковыми в тимоцитах здорового человека. Более того, у 1 больного в терминальной стадии ОЛЛ экстремально высокая активность АДА (4596 нмоль на 10^6 клеток в 1 ч) в лимфобластах и активность других ферментов были сопоставимы с обнаруженными в клетках эмбрионального тимуса (см. табл. 1). Приведенные данные демонстрируют зависимость уровня активности АДА и величины АДА/ПНФ в Т-клеточных лимфоидных популяциях от стадии клеточной дифференцировки. Они показывают, что обнаружение в бластах при ОЛЛ высокой активности АДА, сравнимой с нормальной величиной активности ПНФ, дефицита 5'-Н и высокого соотношения АДА/ПНФ служит указанием на тимусное происхождение лейкозных клеток.

Среди обследованных нами больных ОЛЛ большинство (38 человек) составляли такие, у которых развитие заболевания не было связано с резким повышением содержания лейкоцитов в периферической крови, а в ряде случаев, напротив, сопровождалось лейкопенией. При иммунологическом исследовании лейкозных клеток, проведенном

Таблица 1
Активность ферментов (в нмоль превращаемого субстрата на 10^6 клеток за 1 ч) катаболизма пуриновых нуклеотидов в лимфоидных клетках в норме и при различных вариантах ОЛЛ

Лимфоидные клетки здорового человека различной степени зрелости				Т-клеточный ОЛЛ				НиТ ниВ-клеточный ОЛЛ			
АДА	ПНФ	5'-Н	АДА/ПНФ	АДА	ПНФ	5'-Н	АДА/ПНФ	АДА	ПНФ	5'-Н	АДА/ПНФ
Лимфоциты периферической крови				Лимфобласты				Лимфоциты			
$164 \pm 15,4$ (105—300)	$97 \pm 6,8$ (40—137)	$66,6 \pm 8,2$ (29,4—145)	$2,06 \pm 0,21$ (0,97—3,63)	1126,1 1263,0 1355,2 1367,5 1326,9 1519,2 655,4 569,1 4596,0	97,0 59,7 151,2 73,3 93,7 82,3 83,0 76,4 70,8	— 11,1 0,0 0,0 2,3 5,7 10,6 5,3	11,5 21,2 9,0 18,7 14,2 6,3 7,9 7,4 64,9	1, (n=11) 152,4 \pm 21,6 (45,3—328,2) 2, (n=7) 277,6 \pm 30,8 (195,4—430,3)	271,6 \pm 36,0 (68,9—608,8) 162,0 \pm 21,4 (70,7—296,8) 253,0 \pm 29,3 (93,2—517,4) 102,0 \pm 13,2 (44,0—246,2)	29,2 (0,0—137,0) 40,8 (0,0—181,9) 6,1 (0,0—36,9) 0,0	$0,58 \pm 0,04$ (0,20—0,91) $2,0 \pm 0,31$ (1,34—3,55) $0,48 \pm 0,06$ (0,17—0,95) $2,94 \pm 0,40$ (1,44—5,7)
Клетки тимуса				Лимфоциты				Лимфоциты			
1. Взрослого человека 696,7	31,9	0,0	21,8	1419,8 \pm 301,8	87,5 \pm 6,3	5,0 \pm 1,25	17,9 \pm 4,3	110,2 \pm 8,4 (32,3—255,4) 2, (n=6) 251,6 \pm 18,8 (116,5—396,5)	253,0 \pm 29,3 (93,2—517,4) 102,0 \pm 13,2 (44,0—246,2)	6,1 (0,0—36,9) 0,0	$0,48 \pm 0,06$ (0,17—0,95) $2,94 \pm 0,40$ (1,44—5,7)
2. Эмбриона 10320,8	312,5	—	33,0								

у части таких больных, было обнаружено, что их лимфоциты не имеют маркеров Т- или В-клеток и поэтому вариант заболевания был идентифицирован как ни-Т ни-В ОЛЛ. У других больных рассматриваемой группы такой вариант ОЛЛ можно было подразумевать на основании сходства величин активностей исследуемых ферментов в бластах с обнаруженными в клетках больных ОЛЛ с ни-Т ни-В иммунологическими характеристиками лейкозного клона. Результаты, представленные в табл. 1, показывают, что у больных ни-Т ни-В ОЛЛ картина распределения величин активностей АДА, ПНФ и 5'-Н в бластных клетках неоднородна и совершенно иная, чем в нормальных лимфоцитах и Т-лимфобластах. Так, у 11 больных (подгруппа 1) активность АДА колебалась от значений, в несколько раз ниже (45,3 нмоль на 10^6 клеток в 1 ч), чем в лимфоцитах здоровых лиц, до верхних границ нормы (328,2 нмоль). Активность ПНФ в лимфобластах этих больных ни-Т ни-В ОЛЛ значительно превосходила таковую АДА и, как правило, была в несколько раз выше, чем активность фермента в нормальных лимфоцитах и Т-лимфобластах. Таким образом, в рассматриваемых случаях ни-Т ни-В ОЛЛ распределение активностей АДА и ПНФ в бластных клетках противоположно наблюдаемому в лимфобластах при Т-ОЛЛ, в результате чего отношение АДА/ПНФ измеряется величинами, меньше 1,0. В то же время в бластах 7 других больных (подгруппа 2) ни-Т ни-В ОЛЛ активность как ПНФ, так и АДА в среднем были в 1,5 раза выше, чем в нормальных лимфобластах, но соотношение АДА/ПНФ не отличалось от нормального.

Наряду с исследованием ферментов деградации пуринов в бластных клетках больных ни-Т ни-В ОЛЛ мы изучали их активность у 20 пациентов этой же формой острого лейкоза, в периферической крови которых основная часть моноклеарных клеток была представлена не бластами, как у рассмотренных выше 18 больных, а лимфоцитами (см. табл. 1). Оказалось, что и в этом случае в зависимости от уровня активности АДА и ПНФ и величины отношения АДА/ПНФ прослеживается четкое разделение больных на 2 подгруппы, сходные с таковыми больных ни-Т ни-В ОЛЛ, протекающим с вы-

сокой бластемией. Эти данные показывают, что лимфоциты при ни-Т ни-В ОЛЛ по интенсивности и соотношению процессов катаболизма пуринов существенно отличаются от нормальных лимфоцитов, что может являться следствием перераспределений при ОЛЛ в составе лимфоидных субпопуляций [4], гетерогенных по показателям пуринового метаболизма [17].

Среди больных ни-Т ни-В ОЛЛ, обследованных иммунологически, у 5 на поверхности лейкозных клеток был обнаружен общий ОЛЛ-антиген. Причем он экспрессировался на моноклеарных клетках только у больных подгруппы 1 с «обратным» нормальным клеткам и Т-лимфобластам распределением активностей АДА и ПНФ. Поскольку общий-ОЛЛ-антиген обнаруживается главным образом в пределах ограниченной по объему популяции малодифференцированных клеток [12, 13], можно предположить, что на начальных этапах лимфоидной дифференцировки в ни-Т ни-В клетках имеет место противоположное Т-лимфоидным клеткам соотношение активностей АДА и ПНФ. Установленный факт наличия при ни-Т ни-В ОЛЛ двух типов распределения исследованных ферментных активностей согласуется с представлениями о гетерогенности пула ни-Т ни-В клеток по своим биологическим потенциям [18а], включающего предшественники пре-Т и пре-В клеток [9].

Активность 5'-Н, как показывают данные табл. 1, у большинства больных ни-Т ни-В ОЛЛ на моноклеарных клетках не обнаруживалась, хотя в некоторых случаях этого заболевания активность фермента на бластах была очень высокой (181,3 нмоль на 10^6 клеток в 1 ч). По данным литературы, высокая активность 5'-Н при ОЛЛ совпадает с выявлением на лимфоидных клетках общего-ОЛЛ-антигена [15]. В данной работе мы не установили такой корреляции. Напротив, во всех этих случаях активность 5'-Н на лимфоцитах и бластах отсутствовала. Кроме того, отсутствие этого фермента при ни-Т ни-В ОЛЛ, по нашим данным, всегда сопровождалось наличием на поверхности лимфоидных клеток Ia-подобного (ИКО-1) антигена.

Анализ результатов изучения активности ферментов метаболизма пуринов в лейкозных клетках больных ОМГ

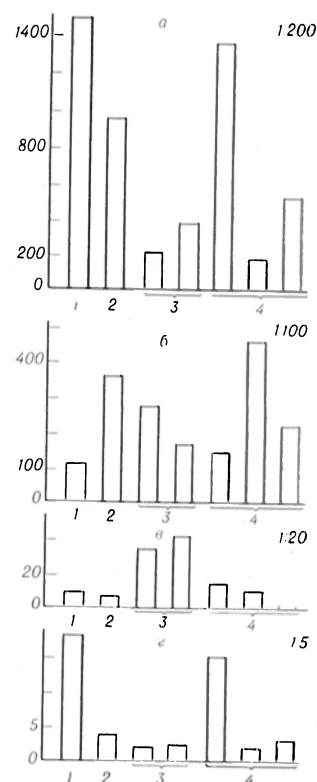
Активность ферментов (нмоль/10⁶ клеток/час) распада пуринов в мононуклеарных клетках больных острым миелобластным лейкозом (ОМЛ) и острым недифференцированным лейкозом (ОНЛ)

Иммунологические маркеры	АДА	ПНФ	5'-Н	АДА/ПНФ
Острый миелобластный лейкоз (n=11)				
	934,7±67,7 (584,6—1410,4)	330,2±28,2 (209,2—459,5)	4,7±1,3 (0,0—6,0)	3,2±0,36 (1,46—7,56)
Острый недифференцированный лейкоз				
Т-клеток, пре-Т-клеток	1. (n=4) 1256,2 (601,6—1761,8)	114,8 (52,2—185,6)	9,75 (0,0—14,5)	14,4 (5,8—34,0)
Ни-Т ни-В-клеток	2. (n=7) 136,0 (66,4—253,8)	435,5 (106,2—1136,1)	2,6 (0,0—7,7)	0,48 (0,12—0,88)
Ни-Т ни-В с общим-ОЛЛ-антигеном	3. (n=2) 462,4 547,5	237,5 166,4	0,0 0,0	1,94 3,3

(табл. 2) показывает, что в миелобластах, так же как и в лимфобластах больных Т-ОЛЛ, наблюдается высокая активность АДА и почти полное отсутствие на их поверхности фермента 5'-Н. Однако характерным отличием бластных клеток при ОМЛ является то, что в них активность ПНФ всегда в несколько раз (в среднем в 3 раза) выше, а величина соотношения АДА/ПНФ — соответственно ниже, чем в Т-лимфоцитах. Таким образом, распределение активностей ферментов АДА, ПНФ и 5'-Н в миелобластах при ОМЛ, несмотря на известное сходство с обнаруживаемым в лимфобластах больных Т-ОЛЛ, имеет типичные черты, по которым миелоидный вариант острого лейкоза надежно отличается от Т-ОЛЛ.

Результаты изучения активности АДА, ПНФ и 5'-Н в мононуклеарных клетках при ОНЛ, представленные в табл. 2, показывают, что в этих случаях заболевания, когда методами цитохимии не удастся установить принадлежность пролиферирующих лейкозных клеток к лимфоидному или миелоидному ряду, клоны злокачественных лейкоцитов неоднородны по величине и соотношению активностей исследованных ферментов. Из данных табл. 2 видно, что у 4 больных ОНЛ распределение активностей АДА, ПНФ и 5'-Н в бластах сопоставимо с наблюдаемым в лимфобластах больных Т-ОЛЛ (см. табл. 1 и рисунок). При иммунологическом изучении на бластных клетках 3 больных ОНЛ были обнаружены поверхностные маркеры или антигены,

свойственные Т-клеткам. Совпадение результатов биохимического и иммунологического анализов, характеризую-



Различия в величинах (в нмоль на 10⁶ клеток в 1 ч) ферментативной активности бластных клеток при острых лейкозах.

а, б и в — активность соответственно АДА, ПНФ и 5'-Н, г — соотношение АДА/ПНФ. 1 — Т-клеточный ОЛЛ, 2 — ОМЛ, 3 — ни-Т ни-В-клеточный ОЛЛ, 4 — ОНЛ.

щих фенотип бластных клеток больных ОНЛ как Т-клеточный, подтверждает их лимфоидную природу.

У 7 других больных ОНЛ в бластах и лимфоцитах наблюдали «обратное» нормальным клеткам и Т-лимфоцитам распределение активности АДА и ПНФ, характерное для лимфоидных клонов большинства больных ни-Т ни-В ОЛЛ. Эти данные в совокупности с результатами иммунологического анализа, проведенного в 4 из 7 обсуждаемых случаев ОНЛ, и определяющими фенотип лейкозных клеток как ни-Т ни-В, дают основание рассматривать как ОЛЛ и другие входящие в данную группу случаи заболевания.

Что касается 2 последних из 13 обследованных больных ОНЛ, то их мононуклеарные клетки по величине активности АДА и ПНФ отличались как от лимфобластов больных Т-ОЛЛ, так и от лимфоидных клеток больных ни-Т ни-В ОЛЛ и могли быть сравнимы по этим параметрам с бластами больных ОМЛ. В то же время иммунологически фенотип бластных клеток одного из этих больных ОНЛ определялся как ни-Т ни-В с общим-ОЛЛ-антигеном, что свидетельствовало в пользу острого лимфоидного лейкоза. Следует заметить, что в данном случае ОНЛ (как и при ни-Т ни-В ОЛЛ) экспрессия общего-ОЛЛ-антигена на лейкозных клетках не была связана с наличием активности поверхностно-локализованной 5'-Н. Таким образом, при цитохимически недифференцированном остром лейкозе у 11 из 13 обследованных больных распределение величин активностей ферментов АДА, ПНФ и 5'-Н в мононуклеарных клетках аналогичное обнаруживаемому при Т-ОЛЛ и в большинстве случаев ни-Т ни-В ОЛЛ. Подтверждение этих биохимических данных выявлением на поверхности лейкозных клеток больных ОНЛ иммунологических маркеров Т-клеток или ни-Т ни-В фенотипа служит основанием для диагностирования ОЛЛ соответствующего варианта.

Наши данные указывают на четкие различия величин активности трех ферментов деградации пуриновых нуклеотидов — АДА, ПНФ и 5'-Н в мононуклеарных клетках больных Т-ОЛЛ, ни-Т ни-В ОЛЛ и ОМЛ. Обнаружение в бластных клетках и лимфоцитах типичной для каждой из перечисленных форм острого лейкоза картины

распределения активностей ферментов (см. рисунок) подчеркивает целесообразность применения анализа активности АДА, ПНФ и 5'-Н для диагностики вариантов острого лейкоза.

Результаты нашей работы свидетельствуют также о значительной информативности анализа активности ферментов метаболизма пуриновых нуклеотидов для определения биологической природы лейкозных клеток при цитохимически недифференцированном остром лейкозе. Вывод, сделанный нами на основании анализа активности АДА, ПНФ и 5'-Н в мононуклеарных клетках больных ОНЛ, что среди них у большинства можно диагностировать ОЛЛ, хорошо согласуется с данными литературы, полученными при использовании панели иммунологических маркеров [14]. Отмеченный в работе факт, что мононуклеарные клетки в одном из случаев ОНЛ по распределению активностей ферментов имеют сходство с миелобластами при ОМЛ и в то же время экспрессируют поверхностные маркеры лимфоидных клеток, позволяет предположить «смешанную» или гибридную форму острого лейкоза, когда малигнизированные лейкоциты обнаруживают черты как лимфоидных, так и миелоидных клеток [6, 7].

Итак, полученные нами показатели и данные литературы [11, 18], даже внутри одного подварианта ОЛЛ (Т-ОЛЛ или ни-Т ни-В ОЛЛ) активности ферментов катаболизма пуринов распада, варьируют в широких пределах, сохраняя, однако, типичные черты, характерные для той или иной формы ОЛЛ.

То, что при острых лейкозах клоны малигнизированных лейкоцитов различаются по интенсивности и сбалансированности процессов катаболизма пуринов, во многом, по-видимому, определяет неоднозначность ответа на терапию, проводимую с применением фармакологических средств, являющихся производными пуринов (6-тиогуанин, 6-меркаптопурип, аллопуринол, дезоксигоформин). Анализируя данные нашей работы, можно прийти к выводу, что в лимфобластах больных Т-ОЛЛ, несмотря на высокий уровень активности АДА, скорость распада пуриновых нуклеотидов ограничена крайне низкой активностью фермента ПНФ, осуществляющего следующий за АДА этап превращения пуринов. Это может

стать одной из причин накопления избыточных концентраций дезоксирибонуклеотидов (д-АТФ или д-ГТФ), что, по современным представлениям, составляет основу биохимического механизма высокой чувствительности Т-клеток к различным цитотоксическим агентам [8] и быстрой элиминации лейкозного клона при лечении Т-ОЛЛ дезоксиформинином [19]. В качестве другого примера можно привести следующий факт: у одного из обследованных больных ОЛЛ, резистентного к лечению с применением антимабоцитов, в лейкозных клетках распределение активностей исследованных ферментов соответствовало наблюдаемому при ни-Т ни-В ОЛЛ, но с необычно высокой активностью ПНФ. Исходя из этого, можно предположить, что отсутствие терапевтического эффекта, в данном случае ОЛЛ, может быть обусловлено повышенной скоростью распада пуринов, свойственной клону лейкозных клеток данного больного, препятствующей накоплению продуктов превращения антимабоцитов в концентрациях, вызывающих цитолитический эффект [5].

Таким образом, данные нашей работы показывают, что систематический анализ активности ферментов метаболизма пуринов, в частности АДА, ПНФ и 5'-Н, может внести определенный вклад не только в решение проблемы точной диагностики при острых лейкозах, но и в развитие подходов к избирательной химиотерапии при ОЛЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алмазов В. А., Цвейбах А. С., Гольдман Е. И. и др. // Гематол. и трансфузиол. — 1984. — № 2. — С. 7—12.
2. Барышников А. Ю. // Стволовые клетки и опухолевый рост. — Киев, 1985. — С. 22—26.
3. Филиановская Л. И., Вартамян Н. Л., Того А. В. и др. // Вопр. мед. химии. — 1985. — № 3. — С. 48—53.
4. Шардаков В. И., Рябов Н. В., Рябова Т. И. и др. // Гематол. и трансфузиол. — 1985. — № 7. — С. 19—21.
5. Belousova A. K., Gerasimova G. K. // Antibiot. Chemother. — 1980. — Vol. 28. — P. 48—52.
6. Ben-Bassat I., Gale R. P. // Leukem. Res. — 1984. — Vol. 8, N 6. — P. 929—936.
7. Chan L. C., Greaves M. F. // Brit. J. Haemat. — 1984. — Vol. 58, N 1. — P. 203—204.
8. Cohen A., Lee J. W. W., Gelfand E. W. //

- Blood. — 1983. — Vol. 78, N 2. — P. 333—341.
9. Cowan M. J., Fraga M., Ammann A. J. // Cell. Immunol. — 1983. — Vol. 78, N 2. — P. 333—341.
 10. Demeocq F., Viallard J. L., Boumsell L. et al. // Leukem. Res. — 1982. — Vol. 6, N 2. — P. 211—220.
 11. Dornand J., Bonnafous J.-C., Favero J., Mani J. C. // Biochem. Med. — 1982. — Vol. 28, N 2. — P. 144—156.
 12. Foon K. A., Billing R. J., Terasaki P. I., Cline M. J. // Blood. — 1980. — Vol. 56, N 6. — P. 1120—1126.
 13. Foon K. A., Schroff R. W., Gale R. P. // Ibid. — 1982. — Vol. 60, N 1. — P. 1—19.
 14. Greaves M. F., Bell R., Amess J., Listen T. A. // Leukem. Res. — 1983. — Vol. 7, N 6. — P. 735—746.
 15. Gutensohn W., Thiel E., Emmerich B. // Klin. Wschr. — 1983. — Bd 61, N 1. — S. 57—62.
 16. van Laarhoven J. P. R. M., Spierenburg G. Th., Bakkeren J. A. et al. // Leukem. Res. — 1983. — Vol. 7, N 3. — P. 407—420.
 17. van Laarhoven J. P. R. M., Spierenburg G. Th., Collet H. et al. // Purine Metabolism in Man. — New York, 1984. — P. 114—118.
 18. Ma D. D. F., Massaia M., Sylwestrowicz T. A. et al. // Brit. J. Haemat. — 1983. — Vol. 54, N 3. — P. 451—457.
 - 18a. Okamura J., Letarte M., Gelfand E. W. // Leukem. Res. — 1984. — Vol. 8, N 3. — P. 335—343.
 19. Smyth J., Prentice H. G., Hoffbrand A. V. // J. Cell Biochem. — 1982. — N 6, Suppl. 1. — P. 379.
 20. Sylwestrowicz T. A., Ma D. D. F., Murphy P. P. et al. // Leukem. Res. — 1982. — Vol. 6, N 4. — P. 475—482.

Поступила 20.02.86

ADENOSINE DEAMINASE, PURINE NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASE AND ECTO-5'-NUCLEOTIDASE — MARKERS OF ACUTE LEUKOSES

L. I. Filanovskaya, A. V. Togo, A. S. Tsveybakh, M. N. Blinov, N. A. Alexeev, E. A. Ushakova

Institute of Hematology and Blood Transfusion, Leningrad

Estimation of enzymes participating in degradation of purine nucleotides—adenosine deaminase (ADA), purine nucleoside phosphorylase (PNP), ecto-5'-nucleotidase as well as the ratio of ADA/PNP in leukocytes was shown to be of importance in differential diagnosis of acute lymphoblast leukemia subforms and for identification of a nature of malignized leukocytes clone in acute undifferentiated leukemia. Importance of these analyses is determined by specific differences in distribution of the enzymatic activity in mononuclear cells in T-, non-T-, non-B-cell acute lymphoblast leukemia and acute myeloblast leukemia as well as due to similar level and ratios of these enzymatic activities in most cases of acute undifferentiated leukemia and in acute lymphoblast leukemia.

*В. И. Крылов, А. Д. Петрушина, Г. В. Морева, Г. К. Гранник,
А. Н. Дурыгин, Т. Д. Журавлева, Г. В. Портнягина*

РОЛЬ НАРУШЕНИЙ СТРУКТУРЫ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН В ФОРМИРОВАНИИ ГОРМОНОРЕЗИСТЕНТНЫХ ВАРИАНТОВ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПОЧЕК У ДЕТЕЙ

Медицинский институт, Тюмень

Иммунодепрессивное и противоспалительное действие глюкокортикоидных гормонов при патоиммунных нефропатиях у детей способствовало широкому внедрению этих препаратов в комплексное лечение заболеваний почек [1]. Однако в ряде случаев применение гормонов в рекомендуемых дозах не дает должного терапевтического эффекта из-за формирования в организме ребенка тахифилаксии или наличия исходной гипочувствительности к глюкокортикоидам [12, 14]. При этом установлена определенная зависимость между морфологическими особенностями поражения почек и формированием гормонорезистентности [7]. Однако в целом проблема остается нерешенной, поскольку при прочих равных условиях эффект гормонов различен вплоть до полного отсутствия его [10]. В настоящее время физиологическое действие гормонов в организме рассматривается в аспекте их взаимодействия с клеточными мембранами [5, 8]. Трансмембранный перенос гормонов осуществляется в виде липофильного комплекса, в котором ведущая роль принадлежит цито- и плазматическим белкам. Скорость же переноса данного комплекса зависит от фазового состояния («текучести») мембран, обусловленного свойствами липидной фазы [2]. На моделях искусственных мембран установлено, что стероидные гормоны активно взаимодействуют с мембранными липидами [8]. При этом для реализации действия стероидных гормонов имеет значение природа мембранных фосфолипидов и расположение их полярных группировок. Особое значение придается содержанию в мембранах фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилинозитола, а также холестерина, повышение которого способствует уменьшению включения меченых гормонов в мембраны [8].

Таким образом, одним из возможных механизмов гормонорезистентности мо-

жет быть приобретенное или врожденное нарушение транспорта гормонов через клеточные мембраны, обусловленное нарушением основных характеристик липидной фазы.

Методика

Нами исследовано содержание в клеточных мембранах (на моделях теней эритроцитов венозной крови) ряда липидов и продуктов их перекисного окисления у 65 больных гломерулонефритом с различной реакцией на гормональную глюкокортикоидную терапию. У 42 детей была нефротическая гормонозависимая форма заболевания, у 23 гормонорезистентная. Тени эритроцитов получали после двукратного отмывания клеток крови физиологическим раствором путем гипотонического гемолиза и последующего осаждения центрифугированием. Липидный экстракт из теней эритроцитов получали по методу Блюра. Из общего липидного экстракта методом тонкослойной хроматографии на силикагеле ЛС (ЧССР) выделяли и анализировали фосфолипиды (лизофосфатидилхолин, фосфатидилсерин, сфингомиелин, фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин) в системе хлороформ — метанол — аммиак (30:8,8:2,0), стерины (дигидрохолестерин, холестерин, эпихолестерин, холестерилацетат) в системе хлороформ — ацетон (90:10).

Процессы перекисного окисления липидов характеризовали по содержанию диеновых конъюгатов полиненасыщенных жирных кислот мембран эритроцитов, которые определяли как описано в работе [9] и по содержанию флюоресцирующих шиффовых оснований липидов [6]. Деформируемость эритроцитов [4] определяли как показатель физико-химического состояния клеточных мембран. Все исследования у больных проведены в периоде активности патологического процесса.

Результаты и обсуждение

Как видно из табл. 1, у больных гломерулонефритом независимо от чувствительности к гормонам статистически достоверно повышено содержание в мембранах эритроцитов лизофосфатидилхолина, фосфатидилсерина, сфингомиелина, дигидрохолестерина. Однако у больных с гормонорезистентным вариантом заболевания увеличение концентрации лизофосфатидилхолина и дигидрохолестерина более значительно, чем у детей с гормонозависимой па-

Таблица 1

Содержание фосфолипидов и стерина (в ммоль/л) в мембранах эритроцитов при различных вариантах гормоночувствительности у детей с гломерулонефритом

Липиды	Здоровые	Больные гломерулонефритом				
		гормонозависимый	<i>p</i>	гормонорезистентный	<i>p</i>	<i>p</i> ₁
Лизофосфатидилхолин	0,130±0,012 (34)	0,215±0,020 (22)	<0,001	0,316±0,034 (22)	<0,001	<0,01
Фосфатидилсерин	0,240±0,019 (32)	0,598±0,028 (23)	<0,001	0,524±0,057 (21)	<0,001	
Сфингомиелин	0,473±0,015 (39)	0,583±0,027 (23)	<0,05	0,619±0,029 (23)	<0,001	
Фосфатидилхолин	0,543±0,013 (37)	0,535±0,030 (23)		0,678±0,041 (23)	<0,001	<0,01
Фосфатидилэтаноламин	0,247±0,006 (28)	0,388±0,028 (21)	<0,001	0,237±0,014 (21)	<0,001	
Дигидрохолестерин	0,224±0,014 (27)	0,371±0,021 (22)	<0,001	0,486±0,039 (11)	<0,02	<0,01
Холестерин	0,229±0,013 (19)	0,282±0,017 (21)	<0,02	0,237±0,019 (10)		<0,05
Эпихолестерин	0,282±0,022 (22)	0,277±0,024 (20)		0,257±0,027 (13)		
Холестерилацетат	0,277±0,022 (24)	0,224±0,018 (19)		0,262±0,030 (11)		

Примечание. Здесь и в табл. 2: *p*—достоверное различие между показателями у здоровых детей и больных гломерулонефритом; *p*₁—между показателями у больных гормонозависимым и гормонорезистентным вариантами гломерулонефрита; в скобках—число обследованных.

тологией. Наряду с этим для гормонозависимого варианта гломерулонефрита характерно более высокое содержание фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина.

Как видно из табл. 2, гломерулонефрит характеризуется накоплением в мембранах эритроцитов диеновых конъюгатов и шиффовых оснований, причем у больных с гормонорезистентным вариантом патологии повышение содержания продуктов перекисного окисления липидов было более значительным. Особенно существенны различия между анализируемыми группами больных в показателях деформируемости эритроцитов.

Изменения деформируемости эритроцитов как интегрального показателя физико-химического состояния мембран свидетельствуют о том, что для гормонорезистентных вариантов заболевания почек характерна более выраженная нестабильность их. Можно считать, что это состояние обусловлено прежде всего избыточной активностью процессов перекисного окисления мембранных липидов и, что особенно важно, значительным накоплением шиффовых оснований, представляющих собой «сшивки» между альдегидами, в частности малоновым диальдегидом, увеличение содержания которого также установлено при заболеваниях почек

Таблица 2

Содержание продуктов перекисного окисления липидов в мембранах эритроцитов и показатели деформируемости эритроцитов у больных гломерулонефритом при различных вариантах гормоночувствительности ($\bar{X} \pm x$)

Показатель	Здоровые	Больные гломерулонефритом				
		гормонозависимый	<i>p</i>	гормонорезистентным	<i>p</i>	<i>p</i> ₁
Диеновые конъюгаты, ммоль/мл	39,48±0,84 (19)	51,80±2,54 (24)	<0,001	65,52±3,61 (17)	<0,001	<0,01
Шиффовые основания, усл. ед.	9,84±0,73 (25)	20,71±1,27 (20)	<0,001	33,63±2,22 (20)	<0,001	<0,001
Деформируемость эритроцитов, мин	2,97±0,37 (25)	8,42±0,62 (18)	<0,001	16,47±1,25 (16)	<0,001	<0,001

у детей [3], и азотсодержащими группами белков. Накопление шиффовых оснований в структуре биомембран способствует повышению их ригидности и изменению физико-химических констант. Определенное значение в развитии гормонорезистентных вариантов заболевания почек может иметь также избыточная активность эндогенных фосфолипаз, обуславливающих повышенное содержание лизофосфатидилхолина в мембранах эритроцитов этих больных. Хотя накопление указанной лизоформы эквивалентно повышению содержания фосфатидилхолина, тем не менее детергентоподобное влияние лизофосфатидилхолина (за счет образования дополнительных гидрофильных каналов и солюбилизации мембранных ферментов) пропорционально его концентрации [15].

Другой особенностью изменения клеточных мембран при заболеваниях почек у детей является накопление в их структуре стерина. При гормонорезистентных вариантах патологии оно обусловлено дигидрохолестерином, при гормонозависимом — холестерином. Накопление холестерина и его производных в структуре мембран будет способствовать уменьшению микровязкости, текучести, переходу их из жидкокристаллического фазового состояния в гелеобразное. Однако указанные свойства стерина, а также процессов перекисного окисления липидов у больных частично могут быть нивелированы накоплением в мембранах эритроцитов при соответствующих вариантах нефропатий фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина. Специфика клинко-биохимических взаимосвязей, установленная в настоящих исследованиях, позволяет предположить, что компенсаторное влияние фосфатидилхолина менее выражено, чем эффект фосфатидилэтаноламина, и это в конечном итоге и реализует формирование гормонорезистентных вариантов патологии почек у детей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вильбрандт В. // Рецепторы клеточных мембран для лекарств и гормонов. — М., 1983. — С. 262.

2. Жмуров В. А. Роль дестабилизации клеточных мембран и состояния антиоксидантных функций в патогенезе, клинических проявлениях и исходах гломерулонефритов у детей: Автореф. дис... д-ра. мед. наук. — М., 1985.
3. Игнатова М. С., Вельтищев Ю. Е. Болезни почек у детей. — М., 1973.
4. Левин Г. Я., Шереметьев Ю. В. // Лаб. дело. — 1981. — № 9. — С. 527—529.
5. Ляшко В. И., Гринберг К. Н. // Реф. мед. журн. — 1985. — р. XXI, № 9. — С. 2—8.
6. Меерсон Ф. З., Каган В. Е., Прилико Л. Л. и др. // Бюл. exper. биол. — 1979. — № 10. — С. 404—406.
7. Мухин Н. А., Тареева И. Е. Диагностика и лечение болезней почек. — М., 1985.
8. Сергеев П. В., Сейфулла Р. Д., Майский А. И. Молекулярные аспекты действия стероидных гормонов. — М., 1971.
9. Стальная И. Д. // Современные методы в биохимии. — М., 1977. — С. 63—64.
10. Харрис Г. Основы биохимической генетики человека: Пер. с англ. — М. 1973. — С. 11—37.
11. Шталь Э. Хроматография в тонких слоях: Пер. с нем. — М., 1965.
12. Bourgeois S., Newby R. F. // Cell. — 1977. — Vol. 11. — P. 423—430.
13. Cattaneo R., Rocchietta S. // Minerva med. — 1966. — Vol. 57. — P. 3397—3405.
14. Condrea E. // Experientia (Basel). — 1980. — Vol. 36, N 5. — P. 531—533.
15. Sibley C. H., Tomkins G. M. // Cell. — 1977. — Vol. 11. — P. 221—227.

Поступила 20.01.86.

ROLE OF CELL MEMBRANES DESTRUCTION IN DEVELOPMENT OF HORMONE-RESISTANT FORMS OF KIDNEY DISEASES IN CHILDREN

V. I. Krylov, A. D. Petrushina, G. V. Moreva, G. K. Grannik, A. N. Durygin, G. V. Portnyagina

Medical School, Tyumen

Distinct increase in content of lysophosphatidyl choline, dehydrocholesterol, decrease in concentration of phosphatidyl ethanolamine simultaneously with high level of diene conjugates and Schiff bases were found in children with hormone-resistant form of nephrotic glomerulonephritis as compared with children suffering from a hormone-dependent form of the disease. Peroxidation of membrane lipids appears to cause a destabilization of cell membranes, which is responsible for development of hormone-resistance.

Т. В. Володина, Е. Е. Колоскова, С. С. Шишкин, В. Л. Козельцев

ИЗУЧЕНИЕ БЕЛКОВ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС МЕТОДОМ ДВУМЕРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Научно-исследовательская лаборатория биологических структур Минздрава СССР; Институт медицинской генетики АМН СССР, Москва

Одним из направлений в каталогизации белков, входящих в состав различных клеток, является анализ белкового состава отдельных органелл и надмолекулярных комплексов [7, 9]. Значительное внимание в этом отношении привлекает изучение белков митохондрий. На их долю в некоторых клетках приходится до 35 % общего белка [4, 10]. Значительным достижением в каталогизации митохондриальных белков явилось выявление тех из них, синтез которых детерминируется митохондриальным геномом. Благодаря расшифровке полной нуклеотидной последовательности ДНК митохондрий, было установлено, что митохондриальный геном млекопитающих несет информацию о 13 белках, из которых 6 уже идентифицированы [17]. Митохондриальные белки, кодируемые ядерным геномом, охарактеризованы менее полно.

Андерсон, используя двумерный электрофорез и ингибирование биогенеза митохондрий, исследовал митохондриальные белки в суммарных лизатах клеток [8]. Для 30 белков была выявлена митохондриальная принадлежность. В работе Герон и соавт. с помощью двумерного электрофореза проанализирован белковый состав изолированного из митохондрий комплекса I [15]. Имеется еще несколько сообщений об изучении белкового состава целых митохондрий и их отдельных фракций двумерным электрофорезом [5, 12, 20]. Однако до сих пор еще не получено достаточно полной двумерной карты митохондрий. По-видимому, одним из шагов к построению такой карты должно быть получение двумерных электрофореграмм целых митохондрий.

В данной работе мы предприняли попытку охарактеризовать методом двумерного электрофореза белки препаратов целых митохондрий печени крыс и оценить возможное влияние эндогенной протеиназной активности на результаты фракционирования.

Методика

Работу проводили на белых беспородных крысах (самках) массой 150—180 г. Ткань печени декапированных животных измельчали путем продавливания через металлическое сито с диаметром отверстий 0,8 мм. Для получения препарата митохондрий, свободного от примеси лизосом, был использован метод Ловенштейн [18]. Субфракции митохондрий приготавливали по методу Соттокаса [22].

Инкубационные пробы для выявления эндогенной протеолитической активности митохондрий представляли собой суспензию органелл в 0,02 М трис-HCl буфере pH 7,5 с концентрацией белка 20—25 мг/мл. В отдельных случаях в пробы добавлялся раствор АТФ (pH 7,5) в конечной концентрации 4 мМ.

Белки из целых препаратов митохондрий и отдельных фракций солюбилизовали в 9,5 М растворе мочевины, содержащем 2 % тритона X-100, 5 % 2-меркаптоэтанол, 0,2 % амфолитов pH 3,5—10 (LKB, Швеция) и озвучивали на ультразвуковом дезинтеграторе (MSE, Англия).

Двумерный электрофорез по О'Фарреллу проводили с небольшими модификациями, как описано ранее [6]. Образцы наносили с анодного конца геля для изоэлектрического фокусирования (ИЭФ), гели окрашивали кумасси R-250. Для одномерного электрофореза использовали метод Лэммли [16], применяя пластины с градиентом концентрации акриламида 5—25 %. Образцы для одномерного электрофореза готовили, растворяя препараты митохондрий и их отдельных фракций в 0,05 М трис-HCl буфере pH 6,8, содержащем 2 % додецилсульфата натрия и 5 % 2-меркаптоэтанол. Одномерные электрофореграммы сканировали на спектрофотометре «Гилфорд» (Франция) при 570 нм. Молекулярные массы отдельных белковых фракций определяли с помощью белков-маркеров, полученных из лизатов сердечной мышцы, как описано ранее [2]. Концентрацию белка в пробах определяли методом Флорес с бромфеноловым синим [13].

Результаты и обсуждение

Препараты нативных митохондрий и их различные фракции уже достаточно подробно охарактеризованы методом одномерного электрофореза в ПААГ с додецилсульфатом натрия [11, 21]. Различные авторы выделяют в суммарном белковом препарате митохондрий от 20 до 22 фракций, среди которых описан доминирующий в количественном отношении белок с молекулярной массой 130—165 кД. Этот белок был

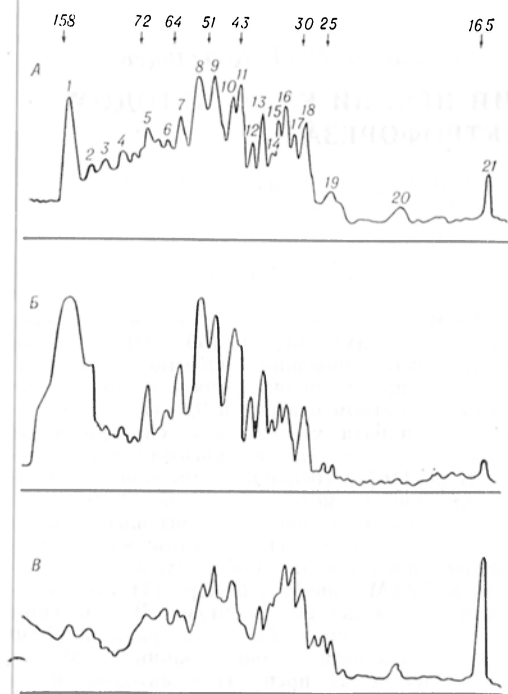


Рис. 1. Фракционирование белков митохондрий одномерным электрофорезом по Лэммли. А — В — препараты суммарных белков митохондрий, белков матрикса и белков внутренней мембраны соответственно. Денситограммы гелей записаны при 570 нм. Стрелками отмечено положение маркерных белков лизата сердечной мышцы мыши. Молекулярные массы выражены в килодальтонах.

идентифицирован как локализованная в матриксе карбамоилфосфатсинтетаза [11]. Полученные нами препараты целых митохондрий также давали при одномерном электрофорезе 21 белковую фракцию, с доминированием компонента с молекулярной массой 159 кД (рис. 1, а). При этом, как видно из рис. 1, б и в, препараты белков внутренней мембраны практически не содержали компонента с молекулярной массой 158 кД, тогда как количество этого компонента среди матриксных белков было осуществлено больше по сравнению с целыми митохондриями.

Таким образом, дальнейшее изучение белков митохондрий методом двумерного электрофореза проводили на препарате митохондрий, характеристики которого при одномерном электрофорезе хорошо совпали с литературными данными. Параллельно была предпринята попытка выявить наличие в митохондриях активности эндогенных протеолитических ферментов, присутствие которых в этих органеллах отмечалось рядом авторов [1, 19]. После инкубации препарата митохондрий в услови-

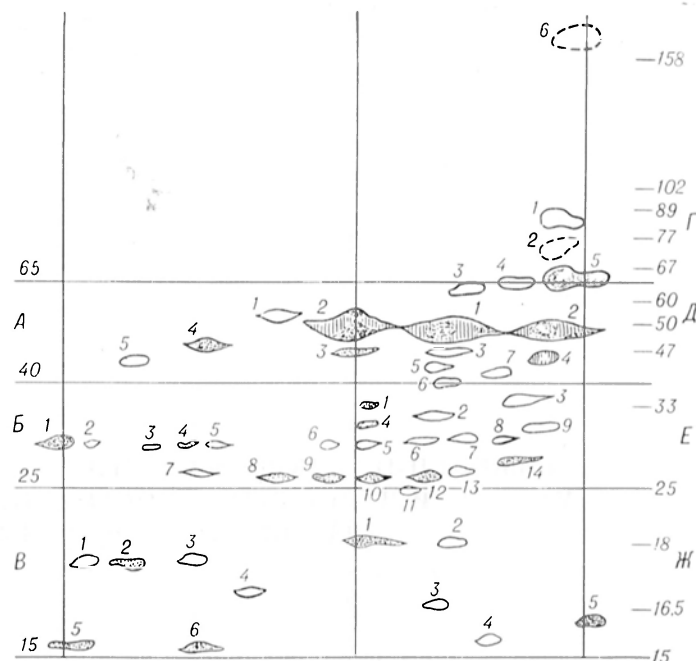
ях, обеспечивающих проявление активности эндогенных протеиназ, выявить различия в белковом составе по сравнению с таковым нативного препарата при одномерном электрофорезе не удалось.

При проведении двумерного электрофореза митохондриальных белков по О'Фарреллу обнаружилась значительная агрегация белков на стадии изоэлектрофокусирования. Нами были опробованы различные режимы изоэлектрофокусирования, и значительно уменьшения агрегации удалось добиться при следующих условиях: 100 В — 1 ч; 200 В — 18 ч; 600 В — 2 ч.

Фотография гелевой пластины, полученной при двумерном электрофорезе белков митохондрий печени крыс, представлена на рис. 2 (см. вклейку), а схема распределения пятен — на рис. 3. Для анализа полученной электрофореграммы вся площадь гелевой пластины была разбита на несколько прямоугольников (они обозначены на схеме буквами), причем условные вертикальные линии соединяли между собой наиболее яркие и хорошо воспроизводимые (маркерные) пятна. Положение горизонтальных линий соответствует молекулярным массам 65, 40, 25 и 15 кД. С молекулярной массой более 65 кД выявлено 6 пятен, от 65 до 40 кД — 12, от 40 до 25 кД — 20 и от 25 до 15 кД — 10. При этом общее количество выявляемых белковых пятен превышает 50. Пятно г6, соответствующее белку с молекулярной массой 158 кД, обнаруживалось не на всех электрофореграммах, что, по-видимому, связано с трудностями при изоэлектрофокусировании высокомолекулярных белков [21].

После инкубации препарата митохондрий в целях выявления эндогенной протеолитической активности обнаружено исчезновение ряда пятен (см. рис. 3, б), таких как д1, б9, е5, е6. В связи с тем, что на электрофореграмме определяются хорошо сохранившиеся другие белки с аналогичной молекулярной массой, становится понятной причина отсутствия различий на денситограммах при одномерном электрофорезе. При этом обращает на себя внимание сохранение интенсивности ряда маркерных пятен (б1, в5, а2, ж1, г5, ж5). Добавление в инкубационную пробу АТФ приводило к значительному усилению гидролиза белков и

Рис. 3. Схема расположения белковых пятен на двумерной электрофореграмме нативного препарата митохондрий.



исчезновению еще большего количества пятен.

На рис. 4 (см. вклейку) представлена фотография пластины ПЛАГ, полученной при электрофорезе белков внутренней мембраны. Стрелкой указано пятно, исчезающее, по-видимому, при анализе митохондриальных белков, подвергнутых самоперевариванию.

Таким образом, полученные нами ранее данные о наличии в митохондриях собственной протеолитической активности [1] нашли подтверждение в настоящей работе при анализе белков митохондрий методом двумерного электрофореза в ПЛАГ. Исчезновение пятен, соответствующих белкам внутренней мембраны, согласуется с данными о локализации протеиназы митохондрий во внутренней мембране [14].

ЛИТЕРАТУРА

1. Володина Т. В., Козельцев В. Л. // Биохимия. — 1978. — Т. 43. — С. 1150—1157.
2. Громов Л. С., Шандала А. М., Ковалев М. И., Шишкин С. С. // Бюл. exper. биол. — 1986, № 7. — С. 28.
3. Остерман Л. А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. — М., 1983. — С. 43—53.
4. Робертис Э., Новинский В. Биология клетки: Пер. с англ. — М., 1967. — С. 182.
5. Стожаров А. Н. // Биохимия. — 1985. — Т. 50. — С. 337—345.
6. Шишкин С. С., Володина Т. В., Понтрягина Н. Ю., Дебов С. С. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 6. — С. 126—131.
7. Шишкин С. С. // Вестн. АМН СССР. — 1985. — № 1. — С. 84—90.
8. Anderson N. L. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1981. — Vol. 78. — P. 2407—2411.
9. Anderson N. G., Anderson N. L. // Clin. Chem. — 1982. — Vol. 28. — P. 739—748.
10. Capaldi R. A. // Biochim. biophys. Acta. — 1982. — Vol. 694. — P. 291—306.
11. Clarke S. // J. biol. Chem. — 1976. — Vol. 251. — P. 1354—1363.
12. Dean B. // Analyt. Biochem. — 1979. — Vol. 99. — P. 105—111.
13. Flores R. // Ibid. — 1978. — Vol. 88. — P. 605—611.
14. Haas R., Nagasawa T., Heinrich P. C. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1977. — Vol. 74. — P. 1060—1065.
15. Heron C., Smith S., Ragan C. T. // Biochem. J. — 1979. — Vol. 181. — P. 435—443.
16. Laemmli U. K. // Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 680—685.
17. Lindahl K. F. // Trends Genet. — 1985. — Vol. 1. — P. 135—139.
18. Loewenstein J., Scholte H. R., Wit-Peters E. M. // Biochim. biophys. Acta. — 1970. — Vol. 223. — P. 432—436.
19. Lovaas E. // FEBS Lett. — 1974. — Vol. 45. — P. 244—247.
20. Marzuki S., Linnane A. W. // Meth. Enzymol. — 1983. — Vol. 97. — P. 294—305.
21. Melnick R. L., Finberg H. M., Maquire J., Packer L. // Biochim. biophys. Acta. — 1973. — Vol. 311. — P. 230—241.
22. Soltocasa G. L., Kylenstierna B., Ernster L., Bergstrand A. // Meth. Enzymol. — 1967. — Vol. 10. — P. 448—463.

Поступила 15.02.86

TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS IN STUDIES OF RAT LIVER MITOCHON- DRIAL PROTEINS

*T. V. Volodina, E. E. Koloskov, S. S. Shishkin,
V. L. Kozel'tsev*

Laboratory of Biological Structures, Ministry
of Public Health of the USSR, Institute of Med-
ical Genetics, Academy of Medical Sciences
of the USSR, Moscow

About 50 protein fractions with molecular
mass 15-158 kDa were detected in purified

mitochondria isolated from rat liver homogenate
after two-dimensional electrophoresis performed
as described by O'Farrell. Individual spots, cor-
responding to proteins of inner mitochondrial
membrane, disappeared from electrophoregrams
as a result of incubation of the isolated mito-
chondria at 37° and pH 7.5. Degradation of
these proteins was augmented if ATP was ad-
ded into incubation mixtures. Intrinsic proteo-
lytic activity occurred in rat liver mitochondria
as shown by these and previously obtained
data.

УДК 615.385.25.014.41:612.111.7.014.462.1

В. А. Кузнецов, С. Г. Мелконян, И. Л. Лисовская, Р. И. Волкова

ИЗМЕНЕНИЕ МИКРОВЯЗКОСТИ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ПГЕ₁ ТРОМБОЦИТОВ, ХРАНЯЩИХСЯ ПРИ 22 И 4 °С

Институт химической физики АН СССР, Москва,
Центральный НИИ гематологии и переливания крови Минздрава СССР, Москва

В последние годы все шире применя-
ют трансфузии концентратов тромбоци-
тов (КТ) для обеспечения гемостаза у
больных с низким содержанием тром-
боцитов в крови [9, 25]. Поскольку ге-
мостатический эффект трансфузий
тромбоцитов существенно зависит от
функциональной сохранности перели-
ваемых клеток, важно обеспечить та-
кие условия хранения КТ, при которых
различия между хранившимися клет-
ками и интактными были бы мини-
мальными. Для хранения КТ в течение
1—3 сут применяют 2 основных темпе-
ратурных режима: 22 и 4 °С [11].

В настоящее время подробно изуче-
ны многочисленные функциональные,
биохимические и морфологические
сдвиги, происходящие в тромбоцитах
при различных условиях выделения и
хранения [22, 24]. Первичные механиз-
мы, ответственные за эти изменения,
до сих пор не установлены, однако
часть из них действует на уровне плаз-
матической мембраны клетки [6]. Из-
вестно, что плазматическая мембрана
играет центральную роль в осуществ-
лении и регуляции основных функций
тромбоцита [8, 21]. Синтез одного из
важнейших регуляторов активации
тромбоцита — циклического АМФ —
осуществляется встроенным в плазма-
тическую мембрану ферментом — аде-
нилатциклазой (АЦ), чувствительной
к действию различных эффекторов, в
том числе простагландинов Е₁ и I₂ [3].
Чувствительность АЦ (а значит и клет-

ки в целом) к действию соответствую-
щих эффекторов зависит в значитель-
ной мере от физико-химического со-
стояния плазматической мембраны
[4]. Опыты с клетками, плазматиче-
ская мембрана которых имеет повы-
шенное содержание холестерина, а так-
же изучение температурных эффектов
показали, что возрастание чувствитель-
ности АЦ различным клеткам к активи-
рующему действию ПГЕ₁ наблюдается
при уменьшении микровязкости плаз-
матической мембраны и, наоборот, при
увеличении микровязкости чувстви-
тельность АЦ к ПГЕ₁ снижается
[15, 23].

Показано, что хранение тромбоцитов
при 22 °С приводит к усилению актива-
ции АЦ под действием ПГЕ₁; одновре-
менно повышается и чувствительность
тромбоцитов к ингибирующему дейст-
вию ПГЕ₁ на агрегацию, индуцирован-
ную АДФ, коллагеном и ионофором А
23187, но в тромбоцитах, хранившихся
при 4 °С, изменения чувствительности
к ПГЕ₁ не обнаружено [10, 12]. Пред-
полагают, что в процессе хранения КТ
происходят изменения микровязкости
плазматических мембран тромбоци-
тов [7].

В настоящей работе изучали влия-
ние хранения тромбоцитов при 22 и
4 °С на микровязкость тромбоцитарных
мембран (методом ЭПР спиновых зон-
дов) и на чувствительность тромбоци-
тов к ингибирующему АДФ-индуциро-
ванную агрегацию действию ПГЕ₁ в

зависимости от температуры измерения.

Методика

Тромбоциты получали из донорской крови, заготовленной на консерванте Глюглицер. КТ выделяли из обогащенной тромбоцитами плазмы в пластиковых контейнерах и хранили в течение 24—72 ч при $22 \pm 2^\circ\text{C}$ или при $4 \pm 2^\circ\text{C}$.

Для измерения спектров ЭПР тромбоциты отмывали от плазмы и ресуспендировали в глюкозо-солевой среде по методу [7] с некоторыми модификациями. Состав ресуспендируемого раствора: 136 мМ NaCl, 5,4 мМ KCl, 0,44 мМ KH_2PO_4 , 0,34 мМ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 11,2 мМ D-глюкоза, pH 7,4 (при 37°C).

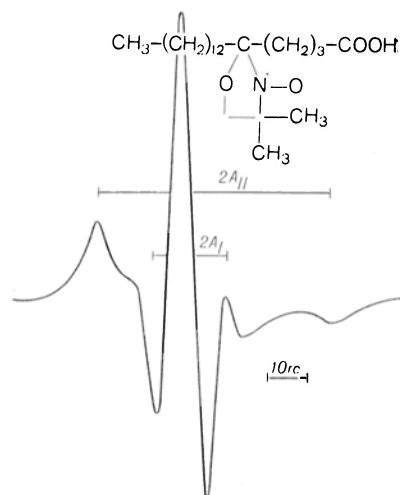
В качестве липидного зонда использовали 5-доксилстеарат («Syva» США; рисунок). Спиртовой раствор зонда (спирта не более 0,2 %) вводили в суспензию тромбоцитов (5 мкг зонда на $2 \cdot 10^9$ клеток). Содержание тромбоцитов в суспензии было $(2-4) \cdot 10^9$ клеток на 1 мл.

Для оценки степени упорядоченности и микровязкости липидного бислоя определяли расстояние между экстремумами спектра ЭПР липидного зонда (см. рисунок) — $2A_{II}$ и $2A_I$ и вычисляли параметр S [2]. Спектры ЭПР регистрировали на спектрометре ER-200 (фирма «Bruker», ФРГ) с температурной приставкой.

Для измерения агрегации КТ разбавляли обедненной тромбоцитами плазмой (до концентрации 250—400 тыс. клеток в 1 мкл). Агрегацию, индуцированную АДФ в конечной концентрации 20 мкМ, регистрировали нефелометрическим методом. Простагландин E_1 в конечной концентрации $5 \cdot 10^{-8}$ М добавляли к пробе, обогащенной тромбоцитами плазмы за 1 мин до добавления АДФ и начала регистрации агрегации. Процент ингибирования агрегации под действием ПГЕ₁ определяли как $I = (1 - A/A_0) \cdot 100\%$, где A_0 — степень АДФ-агрегации без ПГЕ₁, A — степень агрегации в присутствии ПГЕ₁.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены параметры, характеризующие состояние липидного бислоя мембран свежевыделенных и хранившихся при различных температурах тромбоцитов. Мембраны тром-



Спектр ЭПР зонда I в тромбоцитах при 20°C .

боцитов, хранившиеся при комнатной температуре, имели меньшую, а хранившиеся при 4°C — большую микровязкость по сравнению с интактными свежевыделенными клетками, что соответствует уменьшению параметров $2A_{II}$ и S в тромбоцитах, хранившихся при 22°C , и увеличению их в случае тромбоцитов, хранившихся при 4°C . Указанные различия были более выраженными при температурах измерения $20-25^\circ\text{C}$, чем при 37°C .

Поскольку микровязкость плазматической мембраны в ряде случаев влияет на чувствительность АЦ к активирующему действию ПГЕ₁, можно было ожидать, что ингибирование агрегации в присутствии ПГЕ₁ будет выражено сильнее в случае тромбоцитов, хранившихся при 22°C , и слабее — в случае тромбоцитов, хранившихся при 4°C . Данные, приведенные в табл. 2, подтверждают данное предположение. Свежевыделенные тромбоциты занимают по чувствительности к ПГЕ₁, как и по величине микровязкости, промежуточное положение между клетками,

Таблица 1

Параметры степени упорядоченности липидного зонда в тромбоцитарной плазматической мембране в зависимости от температуры хранения КТ и температуры измерения

Температура измерения, $^\circ\text{C}$	Параметры степени упорядоченности					
	свежевыделенные тромбоциты		тромбоциты, хранившиеся в течение 24—72 ч			
			при 22°C		при 4°C	
	$2A_{II}$, Гс	S	$2A_{II}$, Гс	S	$2A_{II}$, Гс	S
20	$55,7 \pm 0,20$	$0,741 \pm 0,006$	$55,2 \pm 0,20$	$0,726 \pm 0,006$	$56,3 \pm 0,20$	$0,756 \pm 0,006$
25	$53,8 \pm 0,20$	$0,688 \pm 0,006$	$53,6 \pm 0,20$	$0,680 \pm 0,006$	$55,1 \pm 0,20$	$0,722 \pm 0,006$
37	$51 \pm 0,30$	$0,604 \pm 0,007$	$51,0 \pm 0,30$	$0,604 \pm 0,007$	$51,05 \pm 0,30$	$0,607 \pm 0,007$

Зависимость чувствительности тромбоцитов к ингибирующему действию ПГЕ₁ от температуры хранения КТ и температуры измерения ($M \pm \sigma$)

Температура измерения, °C	Ингибирование АДФ-индуцированной агрегации под действием ПГЕ ₁ , %		
	свежевыделенные тромбоциты	тромбоциты, хранившиеся 24—72 ч	
		при 22 °C	при 4 °C
23	47,2 ± 7,1 n=8	66,6 ± 15,2 n=5 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,001$	17,8 ± 15,4 n=6 $p_1 < 0,01$
37	75,0 ± 16,9 n=7 $p_2 < 0,01$	87,5 ± 13,5 n=9 $p_1 > 0,1$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,001$	52,3 ± 14,5 n=12 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,05$

Конечная концентрация АДФ—20 мкМ. Конечная концентрация ПГЕ₁— $5 \cdot 10^{-8}$ М.

p_1 —значимость отличия от ингибирования для свежевыделенных клеток при одной и той же температуре; p_2 —то же для свежевыделенных клеток при температуре измерения 23 °C; p_3 —то же для клеток, хранившихся при 4 °C, при одной и той же температуре измерения.

хранившимися при двух указанных температурах. При этом различия по чувствительности к ПГЕ₁ между тромбоцитами, хранившимися при 22 и 4 °C, так же как и различия по микровязкости более выражены при 23 °C, чем при 37 °C.

Известно, что тромбоциты, хранившиеся при 2—6 °C, обладают повышенной активностью по сравнению с таковой свежевыделенных клеток, а хранившиеся при 20—24 °C — пониженной функциональной активностью *in vitro*. Гиперфункция хранившихся при 2—6 °C тромбоцитов, по-видимому, является причиной их высокой гемостатической эффективности снижения посттрансфузионной приживаемости и укорочения времени жизни таких клеток [13]. Приживаемость и время жизни тромбоцитов, хранившихся при комнатной температуре, практически не отличаются от нормы, но их гемостатическая эффективность снижена и нормализуется только через несколько часов после трансфузии [14]. Ранее нами было показано, что разные температуры хранения (22 и 4 °C) противоположным образом влияют на способность тромбоцитов переходить в состояние рефрактерности при инкубации с АДФ [17]. Все эти данные свидетельствуют о том, что изменения, происходящие в тромбоцитах в процессе хранения при указанных температурах, носят разнонаправленный характер. Результаты настоящей работы подтверждают предположение о том, что в основе функциональных изменений клеток при хранении лежат структурные или биохимические перестройки плазматической мембраны.

Изменение микровязкости может быть следствием изменения соотношения содержания холестерина и фосфолипидов в составе плазматической мембраны хранившихся тромбоцитов. Это, однако, кажется маловероятным, так как, согласно данным работы [5], при 22 °C за 72 ч клетки теряют около 15 % всех фосфолипидов и 7—11 % всего холестерина, что не должно существенно сказываться на степени упорядоченности липидного бислоя [1]. Хранение КТ при 4 °C не вызывает изменений в липидном составе мембран [21]. Другим возможным объяснением может быть изменение структуры мембраны, связанное с происходящей при хранении клеток перестройкой цитоскелета [20], аналогичное тому, что имеет место при активации тромбоцита [10, 18, 19].

Хранение тромбоцитов, вероятно, вызывает структурные перестройки плазматической мембраны и, как следствие этого, изменение эффективности взаимодействия ПГЕ₁ с соответствующими рецепторами.

Известно, что синтезируемый в сосудистой стенке простагландин I₂ (простациклин) действует на тромбоциты, подобно ПГЕ₁, и имеет с ним общий рецептор [26]. Очевидно, что он будет сильнее ингибировать агрегацию и адгезию перелитых тромбоцитов, если они хранились при комнатной температуре, в меньшей степени — в случае свежевыделенных тромбоцитов и еще более слабо — при тромбоцитах, хранившихся при 4 °C.

Поэтому можно ожидать, что гемостатическая эффективность хранившихся КТ при их переливании реципиенту

будет существенно зависеть от температуры хранения.

При необходимости быстрого купирования геморрагий более эффективными — даже по сравнению с трансфузиями свежезаготовленных КТ — могут оказаться трансфузии КТ, хранившихся 1—2 сут при 4 °С.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ивков В. Т., Берестовский Г. Н. Динамическая структура липидного бислоя. — М., 1981.
2. Метод спиновых меток / Под ред. Л. Берлинера: Пер. с англ. — М., 1979.
3. Alvares R., Taylor A., Fazzari J., Jacobs J. R. // *Molec. Pharmacol.* — 1981. — Vol. 20, N 2. — P. 302—309.
4. Berridge M. J. // *Cell Surface Receptors* / Ed. P. G. Strange. — New York, 1983. — P. 207.
5. Hamid M. A., Kunicki T. J., Aster R. H. // *Blood*. — 1980. — Vol. 55, N 1. — P. 124—130.
6. Jamieson G. A., Ordinas A. // *Vox Sang.* — 1981. — Vol. 40, Suppl. 1. — P. 18—21.
7. Gerrard J. M. // *Meth. Enzymol.* — 1982. — Vol. 86. — P. 642—654.
8. Kawahara Y., Yamanishi J., Tsunemitsu M., Fukuzaki H. // *Circulation*. — 1983. — Vol. 68, N 2. — P. 317.
9. Kahn R. A. // *Vox Sang.* — 1981. — Vol. 40, Suppl. 1. — P. 87—97.
10. Kowalska M. A., Cierniewski C. S. // *J. Membr. Biol.* — 1980. — Vol. 40. — P. 437.
11. Maroff G. // *Blood Storage and Preservation*. — Arlington, 1982. — P. 23—42.
12. Maroff G., Chang C. H. // *Transfusion*. — 1980. — Vol. 19, N 6. — P. 704—718.
13. McGill M., Brindley D. C. // *J. Lab. Clin. Med.* — 1979. — Vol. 94, N 2. — P. 370—380.
14. McGill M. // *Vox Sang.* — 1981. — Vol. 40, Suppl. 1. — P. 98—109.
15. Mruk J., Bakarjiev A., Burgermeister W. // *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* — 1982. — Bd 363. — S. 745—756.
16. Mc Cue J. P., Stevens D. J., Kermon V. L. // *Scand. J. Haemat.* — 1980. — Vol. 25, N 4. — P. 301—307.
17. Lisovskaya I. L., Agranenko V. A. // *Folia*

haemat. — 1985. — Bd 112, N 5. — S. 769—777.

18. Nathan I., Fleisher G., Livne A. et al. // *J. biol. Chem.* — 1979. — Vol. 254. — P. 9822—9828.
19. Nathan I., Fleisher G., Dvilansky A. et al. // *Biochim. biophys. Acta*. — 1980. — Vol. 598. — P. 417—421.
20. Pribluda V., Rotman A. // *Biochemistry (Wash.)*. — 1982. — Vol. 21, N 2. — P. 2825—2832.
21. Shattil S. J., Bennett J. S. // *Ann. intern. Med.* — 1980. — Vol. 94. — P. 108—118.
22. Snyder E. L., Hezzy A., Kalz A. J., Bock J. // *Vox Sang.* — 1981. — Vol. 41. — P. 172—177.
23. Sinha A. K., Shattil S. J., Colman R. W. // *J. biol. Chem.* — 1977. — Vol. 252. — P. 3310—3314.
24. Rock G., Figueredo A. // *Transfusion*. — 1976. — Vol. 16. — P. 571—579.
25. The Blood Platelets in Transfusion Therapy / Ed. T. J. Greenwalt, G. A. Jamieson.
26. Whittle B. J. R., Moncada S., Vane J. R. // *Prostaglandins*. — 1978. — Vol. 16. — P. 373.

Поступила 15.02.86

CHANGES OF PLATELET MEMBRANE MICROVISCOSITY AND PGE₁-SENSITIVITY OF PLATELETS STORED AT 22° AND 4°

V. A. Kuznetsov, S. G. Melkonyan, I. L. Lisovskaya, R. I. Volkova

Institute of Chemical Physics, Academy of Sciences of the USSR, Central Institute of Hematology and Blood Transfusion, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

Effect of platelet storage within 1-3 days on the cell membranes microviscosity, studied by means of a spin probe, and their sensitivity to PGE₁, inhibitor of ADP aggregation, were studied. The highest values of fluidity and PGE₁ sensitivity exhibited plasmatic membranes of platelets stored at 22°; lower values were found in the membranes stored at 4° as compared with native fresh platelets. The data obtained suggest the dissimilar character of alterations in structure and functions of platelet plasmatic membrane during storage at 22° and 4°.

УДК 616-005.1-036.11-092.9-07:616.36-008.9:577.121.7]-074

Т. А. Зорькина, Т. В. Казуева, М. В. Ассур

СОСТОЯНИЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ОСТРОЙ ОДНОКРАТНОЙ КРОВОПОТЕРЕ

НИИ скорой помощи, Ленинград

В литературе имеются лишь единичные сведения о снижении содержания АТФ в печени крыс при острой однократной кровопотере [12—14], но отсутствуют данные об изменении системы адениновых нуклеотидов, ее энергетического потенциала и редокс-со-

стояния клеток. В связи с этим, а также учитывая важную роль дегидрирования субстратов в процессе образования макроэргических фосфорных соединений в клетке, нами было проведено исследование активности дегидрогеназ цикла Кребса, цитохромоксидазы

(ЦХО) и содержания метаболитов энергетического обмена в ткани печени при острой однократной кровопотере.

Методика

Работа выполнена на 98 белых крысах-самцах массой 250—300 г. Обезболивание животных достигалось внутрибрюшинным введением нембутала (40 мг на 1 кг массы тела). Острую кровопотерю вызывали однократным кровопусканием (2,5 % от массы тела) из бедренной артерии. Состояние подопытных животных оценивали по величине артериального давления (АД) в бедренной артерии, частоте сердечных сокращений, дыхания, а также по изменению ректальной температуры.

Содержание метаболитов энергетического обмена в печени крыс определяли через 3 ч после кровопотери в фазе декомпенсации кровообращения при АД 40 мм рт. ст. (1-я группа) и через 7 ч в периоде стабилизации АД на уровне 60—80 мм рт. ст. (2-я группа). Исследование ферментативной активности в гомогенатах печени крыс проводили через 5 мин после кровопотери (3-я группа), через 25—30 мин в раннем периоде стабилизации гемодинамики при АД 70—80 мм рт. ст. (4-я группа), а также через 3 ч гипотензии у животных с наступающей к этому времени декомпенсацией кровообращения и падением АД до 40 мм рт. ст. (5-я группа) и у животных со стабильно поддерживаемым АД на уровне 70—80 мм рт. ст. (6-я группа). Контролем служили интактные животные и крысы, подвергнутые фиксации соответственно подопытным группам.

Содержание метаболитов энергетического обмена (аденозинтри-, ди- и монофосфатов, лактата, пирувата и глюкозы) в пробах печени, взятых *in situ* охлажденными в жидком азоте щипцами, определяли ферментативными методами [11], гликоген — по методу [7], энергетический потенциал вычисляли, как описано в работе [10]. Для исследования ферментатив-

ной активности тканей животных декапитировали. В гомогенатах печени определяли активность дегидрогеназ цикла Кребса — НАД- и НАДФ-зависимых изоцитрат- и малатдегидрогеназы (ИЦДГ и МДГ), α -кетоглутарат- и сукцинатдегидрогеназ (α -КДГ и СДГ) неотетразолиевым методом [6]. Активность ЦХО устанавливали индофеноловым методом [8].

Результаты и обсуждение

В печени фиксированных крыс энергетический потенциал системы адениновых нуклеотидов был высоким, а отношение лактат/пируват — низким (табл. 1). Лишь через 7 ч фиксации наблюдали небольшое, но достоверное снижение энергетического потенциала (на 4 %) за счет некоторого сдвига в сторону повышения содержания нефосфорилированных форм адениновых нуклеотидов и их суммы. Уровень глюкозы и гликогена снижался в зависимости от продолжительности фиксации.

У более устойчивых к кровопотере животных (2-я группа) с продолжительным периодом стабилизации гемодинамики содержание адениновых нуклеотидов и конечных продуктов гликолиза в печени не изменялось. У менее резистентных к кровопотере крыс (1-я группа) с коротким периодом стабилизации и более глубокой гипотонией (у половины животных этой группы АД не превышало 45 мм рт. ст.) даже в периоде декомпенсации кровообращения при АД 40 мм рт. ст. наблюдалось лишь небольшое снижение энергетического потенциала (на 7 %) на фоне двукратного увеличения содер-

Таблица

Содержание метаболитов энергетического обмена в печени (в мкмоль на 1 г свежей ткани) и ректальная температура (в °С) у крыс после острой однократной кровопотери ($M \pm m$)

Показатель	Фиксация, 3 ч (8)	Через 3 ч после кровопотери: декомпенсация кровообращения (6)	Фиксация, 7 ч (6)	Через 7 ч после кровопотери: стабилизация гемодинамики (6)
АТФ	3,39 \pm 0,11	2,99 \pm 0,30	3,49 \pm 0,06	3,80 \pm 0,14
АДФ	0,50 \pm 0,07	0,76 \pm 0,10	0,71 \pm 0,08	0,61 \pm 0,10
АМФ	0,12 \pm 0,02	0,26 \pm 0,03*	0,18 \pm 0,01**	0,17 \pm 0,01
Сумма адениновых нуклеотидов	4,01 \pm 0,13	4,02 \pm 0,34	4,38 \pm 0,06**	4,57 \pm 0,23
Энергетический потенциал	0,908 \pm 0,011	0,840 \pm 0,015*	0,875 \pm 0,005**	0,896 \pm 0,011
Лактат	1,45 \pm 0,29	1,83 \pm 0,36	1,35 \pm 0,21	1,37 \pm 0,20
Пируват	0,262 \pm 0,051	0,196 \pm 0,016	0,219 \pm 0,018	0,215 \pm 0,060
Лактат/пируват	5,69 \pm 0,69	9,24 \pm 1,31*	6,20 \pm 0,86	6,37 \pm 0,88
Глюкоза	27,39 \pm 4,41	5,83 \pm 1,21*	18,17 \pm 4,22	11,08 \pm 3,69
Гликоген	73,12 \pm 10,16	3,75 \pm 0,39*	53,24 \pm 13,09	9,16 \pm 1,58*
Ректальная температура	35,5 \pm 0,3	28,2 \pm 0,5*	35,6 \pm 0,3	30,7 \pm 0,4*

Примечание. Здесь и в табл. 2 в скобках — число наблюдений. Одна звездочка — достоверность различий по сравнению с соответствующим контролем, две — то же между контрольными группами.

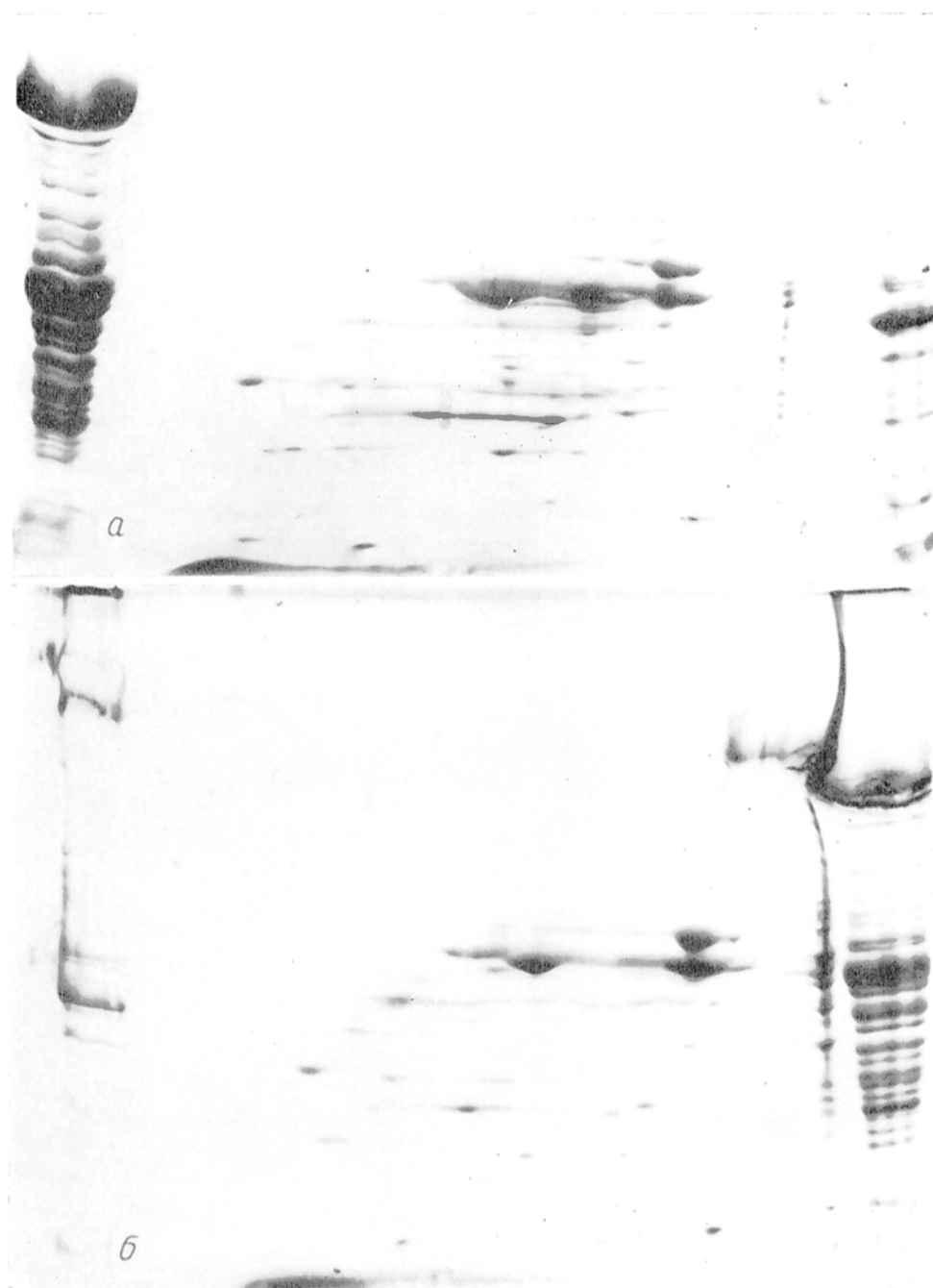


Рис. 2. Фракционирование суммарных белков митохондрий двумерным электрофорезом.
а и б — фотографии гелей, полученных в результате анализа нативного и инкубированного (18 ч;
37 °С) препарата митохондрий соответственно.

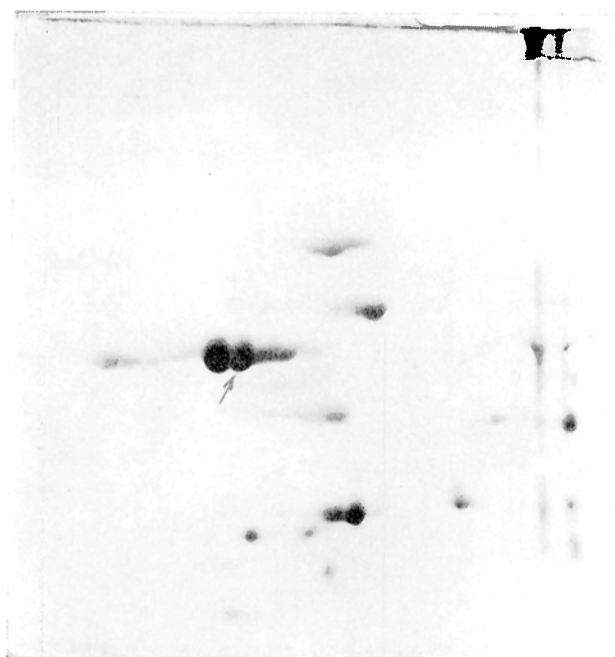


Рис. 4. Фракционирование белков внутренней мембраны митохондрий двумерным электрофорезом.

К ст. А. А. Ахунова и соавт.

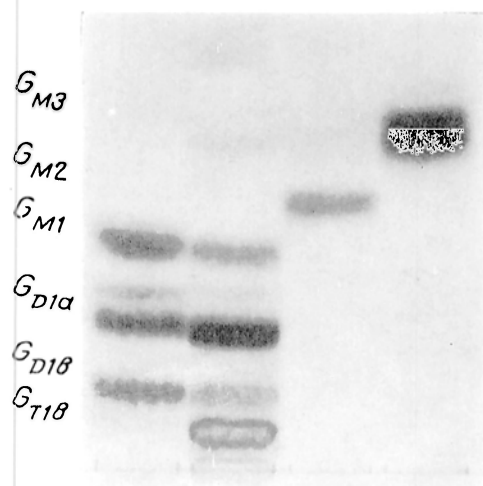


Рис. 1

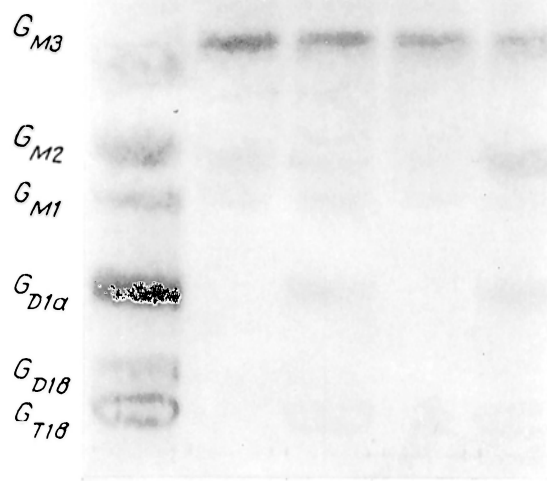


Рис. 2

Рис. 1. Тонкослойная хроматография ганглиозидов из различных тканей. 1 — стандарты ганглиозидов; 2, 3, 4 — ганглиозиды, выделенные соответственно из крысиного мозга, мышечной и человеческой печени.

Рис. 2. Тонкослойная хроматография ганглиозидов фибробластов до и после нагрузки. 1 — смесь ганглиозидов мозга крысы, мышечной и человеческой печени; 2, 3 — ганглиозиды нормальных фибробластов до и после нагрузки соответственно; 4, 5 — ганглиозиды фибробластов при болезни Тея — Сакса до и после нагрузки соответственно.

Таблица 2

Активность дегидрогеназ цикла Кребса и цитохромоксидазы в печени (моль на 1 г свежей ткани в 1 мин) у крыс после острой однократной кровопотери

Показатель	Интактный контроль (15)	Фиксация, 3 ч (9)	Через 5 мин после кровопотери (10)	Через 25—30 мин после кровопотери (10)	Через 3 ч после кровопотери	
					декомпенсация кровообращения (11)	стабилизация гемодинамики (16)
ИЦДГ (НАД)	16,16±0,54	15,93±0,92	19,11±0,67*	16,23±0,22	17,98±1,00	18,59±0,83*
ИЦДГ (НАДФ)	10,88±0,42	10,61±1,42	16,73±0,45*	13,61±0,60*	9,33±0,49*	9,99±0,87
МДГ (НАД)	17,80±0,71	16,42±1,38	22,49±0,74*	18,85±0,89	16,97±1,07	18,67±0,66
МДГ (НАДФ)	14,00±0,47	14,64±1,37	22,49±1,03*	16,93±0,50*	14,49±1,66	17,57±1,36*
α-КДГ	16,22±0,67	15,89±1,42	24,45±0,86*	19,77±0,37*	17,91±1,57	18,82±0,81*
СДГ	17,06±0,98	17,35±1,11	24,27±0,93*	20,88±0,56*	19,14±1,19	18,85±1,04
ЦХО	7,97±0,19	7,40±0,65	9,85±0,27*	8,99±0,23*	5,82±0,61*	5,92±0,32*
Ректальная температура, °C	34,0±0,27	30,9±0,52**	32,2±0,22*	29,0±0,31*	26,2±0,32*	27,4±0,35*

жания АМФ. Достоверных сдвигов в концентрации лактата и пирувата не было найдено, но отношение лактат/пируват увеличилось на 60 %. Необходимо отметить, что в печени устойчивых к кровопотере животных отмечено большее содержание глюкозы и гликогена, запасы которых, как известно, в значительной степени определяют продолжительность жизни животных, хотя и не влияют на исход процесса [15].

В гомогенатах печени интактных крыс отмечена наиболее высокая активность НАД-зависимых ИЦДГ, МДГ, а также СДГ (табл. 2), что согласуется с данными о высокой скорости окислительных процессов в печени млекопитающих [1]. Фиксация животных не оказывала существенного влияния на активность изучаемых ферментов.

Через 5 мин после кровопотери (3-я группа) активность всех исследуемых ферментов возрастала, особенно НАДФ-зависимых дегидрогеназ: ИЦДГ на 55 %, МДГ на 61 %, что может служить косвенным проявлением повышения интенсивности синтетических процессов после кровопотери, поскольку имеются сведения об увеличении скорости синтеза белка в печени в раннем постгеморрагическом периоде [2]. Через 25—30 мин после кровопотери активность НАДФ-зависимых дегидрогеназ, СДГ, α-КДГ и цитохромоксидазы (ЦХО) оставалась повышенной, а НАД-зависимых ферментов (ИЦДГ и МДГ) снижалась до контрольных значений (4-я группа). Повышение активности ферментов ткани печени в на-

чальный период после кровопотери, когда резко ухудшается кровообращение и кислородный режим этого органа [3, 9], свидетельствует, по-видимому, об адаптивной перестройке системы биологического окисления печени в ответ на кровопотерю.

Через 3 ч после кровопотери как у животных со стойкой стабилизацией АД на уровне 70—80 мм рт. ст. (6-я группа), так и у менее устойчивых к кровопотере крыс с развивающейся к этому времени декомпенсацией кровообращения и падением АД до 40 мм рт. ст. (5-я группа), активность ИЦДГ и МДГ, а также СДГ возвращалась к исходному уровню. Активность ЦХО не резко снижалась в одинаковой степени (на 26 и 27 %) в обеих группах животных. Эти данные согласуются с сохранением содержания макроэргических фосфорных соединений в печени крыс независимо от их устойчивости к кровопотере (1-я и 2-я группы). Стабильность энергетического состояния печени связана, вероятно, с тем, что при кровопотере даже в периоде декомпенсации кровообращения кровоснабжение этого органа остается относительно удовлетворительным и тканевое pO_2 поддерживается выше критических значений, необходимых для работы дыхательной цепи митохондрий [9].

По данным литературы, степень снижения содержания АТФ в печени крыс после острой кровопотери различна. Наибольшее уменьшение АТФ (до 18 % от исходного) было отмечено [14] при исследовании животных в фазе резкого нарушения дыхания (АД не

измеряли). При этом исходное содержание АТФ было также очень низким (0,80 мкмоль на 1 г свежей ткани), что связано, вероятно, с потерей части АТФ вследствие взятия проб печени после замораживания в жидком азоте целого животного [5]. По данным других авторов [13], снижение содержания АТФ было более умеренным, зависело от тяжести процесса и коррелировало со степенью снижения артериального рН. Через 3 ч гипотензии сохранялось еще 60 % АТФ, несмотря на искусственное поддержание нормальной температуры тела животных [12], что снижало их резистентность к кровопотере [4].

Полученные нами данные свидетельствуют об устойчивости системы адениновых нуклеотидов, редокс-состояния клеток печени и сохранении активности дегидрогеназ цикла Кребса и ЦХО в гомогенатах этого органа даже при тяжелом течении процесса в фазе декомпенсации кровообращения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аблаев Х. А. Активность дегидрогеназ цикла Кребса в филогенезе позвоночных: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Алма-Ата, 1968.
2. Бармина Е. Ф. // Бюл. exper. биол. — 1968. — № 10. — С. 23—25.
3. Зорькина Т. А. // Травматический шок. — Л., 1978. — С. 82—88.
4. Казуева Т. В., Кваша Л. В., Ассур М. В., Селезнев С. А. // Травматический шок. — Л., 1983. — С. 59—69.
5. Казуева Т. В., Селезнев С. А., Коврижных Э. Е., Кузьмина Р. И. // Пат. физиол. — 1980. — № 2. — С. 35—40.

6. Наточин Ю. В. // Докл. АН СССР. — 1963. — Т. 150, № 6. — С. 1359.
7. Прохорова М. И., Туликова З. Н. Большой практикум по углеводному и липидному обмену. — Л., 1965.
8. Третьякова К. А. Изменение цитохромоксидазной и сукцинатдегидрогеназной активности тканей при атеросклерозе в сочетании с гипертонией по данным эксперимента: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 1955.
9. Удовиченко В. И., Штихно Ю. М. // Анест. и реаниматол. — 1981. — № 5. — С. 41—44.
10. Atkinson D. E. // Surgery. — 1971. — Vol. 70, N 4. — P. 555.
11. Harberg H., Haljamae H., Johansson B. et al. // Circulat. Shock. — 1983. — Vol. 10, N 1. — P. 61—70.
12. Methoden der enzymatischen Analyse / Hrsg. H. U. Bergmeyer. — Weinheim, 1974.
13. Pass L. J., Schloerb P. R., Chow F. T. et al. // J. Trauma. — 1982. — Vol. 22, N 9. — P. 730—735.
14. Staples D., Topuzlu C., Blair E. // Surgery. — 1969. — Vol. 66, N 5. — P. 883—885.
15. Strawitz J. G., Hift H., Ehrhard A., Cline D. W. // Amer. J. Physiol. — 1961. — Vol. 200, N 2. — P. 261—263.

Поступила 03.09.86

THE STATE OF ENERGY METABOLISM IN LIVER TISSUE OF RATS WITH ACUTE SINGLE HEMORRHAGE

T. A. Zor'kina, T. V. Kazueva, M. V. Assur
Institute of Urgent Medical Service, Leningrad

A system of adenine nucleotides and redox state of liver cells as well as activities of dehydrogenases of the tricarboxylic acid cycle and of cytochrome oxidase in liver cell homogenates were not altered after an acute single hemorrhage in rats even though the process run into the step of circulation decompensation (AP 40 mm Hg).

УДК 616.12-008.331.1-092:[612.128:577.152.361]-064:612.124

Е. А. Рогаева, Н. В. Перова, А. А. Александров, Р. Г. Оганов,
О. Д. Лопина, А. А. Болдырев

СУЩЕСТВУЕТ ЛИ СВЯЗЬ МЕЖДУ ПРИСУТСТВИЕМ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ БЕЛКОВОГО КОМПОНЕНТА с M_r 15 кД И ИНГИБИРУЮЩИМ ДЕЙСТВИЕМ СЫВОРОТКИ НА Na, K-АТФазу?

МГУ им. М. В. Ломоносова, Институт профилактической кардиологии ВКНЦ АМН
СССР, Москва

Сыворотка крови больных артериальной гипертензией обладает более сильным ингибирующим действием на очищенную Na, K-АТФазу, чем сыворотка, полученная от лиц контрольной группы. Установлено, что в сыворотке крови таких больных белковые

компоненты с M_r 12 и 15 кД содержатся в большем количестве, чем в сыворотке здоровых. В некоторых случаях обнаружено сильное ингибирование фермента сывороткой, совсем не содержащей этих белковых компонентов. Делается вывод, что ингибирующее

действие сыворотки крови на Na, K-АТФазу и присутствие в ней специфических белковых компонентов могут в сочетании свидетельствовать более надежно о развитии гипертонической болезни.

Природа гипертонической болезни до настоящего времени не известна. В результате интенсивных исследований, проводившихся в последние годы, удалось установить, что как у людей, так и у животных с наследственной артериальной гипертензией имеются изменения в структуре клеточных мембран [19, 20]. В результате увеличивается скорость входа Na^+ в клетки: обнаружено, что в эритроцитах людей, а также крыс разных генетических линий активирована система, обеспечивающая вход Na^+ (Na/Li-обмен, который *in vivo*, вероятно, выполняет функцию Na/K-обмена [6, 8], а также увеличена пассивная проницаемость для Na^+ [6, 10]. Одновременно уменьшается активность системы, обеспечивающей выход Na^+ —Na, K-котранспорта, ингибируемого фуросемидом и чувствительного к Cl^- [8].

Кроме того, в крови больных гипертонической болезнью и животных с артериальной гипертензией обнаружен фактор, ингибирующий Na-насос [22, 26] — систему, обеспечивающую активное выведение Na^+ из клетки. Вследствие этих изменений повышается концентрация внутриклеточного Na^+ [7]. Это в свою очередь обеспечивает активацию системы Na/Ca-обмена, обнаруживаемой в плазматической мембране гладкомышечных и сердечных клеток и обеспечивающей обмен внутриклеточного Na^+ на внеклеточный Ca^{2+} [5]. Как следствие активации этой системы в гладкомышечных клетках сосудов повышается уровень Ca^{2+} , что соответственно увеличивает их сократимость.

Поскольку аккумуляция норадреналина в терминалях симпатической нервной системы также зависит от концентрации Na^+ и K^+ и ингибируется убаином, фактор, обнаруженный в крови больных артериальной гипертензией, способен затормозить обратный захват медиаторов, что также приведет к возрастанию сократимости клеток сосудистой стенки [25]. Особенно важную роль ингибитор Na-насоса играет, видимо, в развитии низкорениновой гипертензии [11].

Установлено, что фактор, обеспечивающий ингибирование Na-насоса при гипертонической болезни, имеет органическую природу [1, 6]. Одновременно показано, что сыворотка крови больных этим заболеванием содержит белковый компонент с M_r 15 кД, который не выявляется в крови здоровых [18, 24]. Целью настоящей работы явилось сопоставление ингибирующего действия сыворотки крови с наличием в этой сыворотке низкомолекулярных белков.

Методика

Обследован 21 больной артериальной гипертензией в возрасте от 29 до 55 лет (20 мужчин, 1 женщина). Гипертоническая болезнь I—II стадии была у 16 больных, симптоматическая артериальная гипертензия, связанная с наличием хронического пиелонефрита, — у 5. Ожирение I—III степени имелось у 14 больных. Гипертрофия миокарда отмечена у 16 больных, гипертензионная ретинопатия — у 6, артериальная гипертензия в семейном анамнезе — у 15.

Диагноз гипертонической болезни ставился при систолическом давлении ≥ 160 мм рт. ст. и (или) диастолическом ≥ 95 мм рт. ст., а также при отсутствии клинических и лабораторных данных, подтверждающих симптоматический характер повышения артериального давления.

Всех больных обследовали не ранее чем через 2 нед после прекращения приема гипотензивных препаратов.

Контрольную группу составили 13 человек в возрасте от 16 до 43 лет (11 мужчин, 2 женщины). Систолическое давление было ≤ 140 мм рт. ст. и (или) диастолическое ≤ 90 мм рт. ст. Ни один из них не имел клинических или лабораторных признаков заболеваний сердечно-сосудистой системы.

Исследование биохимических показателей проводилось в сыворотке, полученной из крови поверхностных вен локтевого сгиба, натощак. Кровь выдерживали 30 мин при 4°C , форменные элементы отделяли центрифугированием при 1500 g 10 мин. Полученную сыворотку хранили при -20°C до 4 мес.

У каждого обследованного определяли способность сыворотки крови ингибировать активность Na, K-АТФазы из солевых желез уток, выдержанных на диете с высоким содержанием NaCl [2]. Активность Na, K-АТФазы, составляющую 10—20 мкмоль/мин на 1 мг белка, определяли в 1 мл среды инкубации следующего состава: NaCl 90 мМ, KCl 60 мМ, MgCl_2 3 мМ, АТФ 3 мМ, имидазол 30 мМ (рН 7,4), белок Na, K-АТФазы 10 мкг, белок сыворотки крови 20 мг (250 мкл сыворотки). Реакцию останавливали добавлением ТХУ до конечной концентрации 10 %, после чего пробы выдерживали 5 мин на холоду и отделяли белок центрифугированием (1200 g, 5 мин). Содержание неорганического фосфата в надосадочной жидкости определяли методом Фiske — Суббароу [9].

У 9 больных гипертонической болезнью I—II стадии и у 10 лиц контрольной группы проводили электрофоретическое разделение

белков сыворотки крови для характеристики ее белкового состава в низкомолекулярной области (10—20 кД). Сыворотку разводили в 20 раз буферным раствором следующего состава: 0,025 М трис-HCl, pH 6,8; 5 % глицерин; 0,2 % додецилсульфат Na; 2,5 % β -меркаптоэтанол. Полученную смесь прогревали 3 мин при 80 °С. Электрофорез в полиакриламидном геле проводили по методу Лемли [14]. Разделяющий гель имел следующий состав: 13 % акриламид; 0,34 % N,N'-метилен-бисакриламид; 0,2 % додецилсульфат Na; 0,03 % персульфат аммония; 0,025 % тетраметил-этилендиамин; 0,375 М трис-HCl, pH 8,8. Концентрирующий гель состоял из 4,3 % акриламида; 0,1 % персульфата аммония; 0,1 % N,N'-метилен-бисакриламида; 0,2 % додецилсульфата Na; 0,05 % тетраметилэтилендиамина и 0,125 М трис-HCl, pH 6,8. Разделение белков проводили при постоянной силе тока (40 мА на пластинку), используя прибор для вертикального электрофореза фирмы «Bio-Rad», модель 220. Белковые полосы окрашивали 0,25 % раствором Кумасси R-250 в 20 % растворе изопропанола и 7 % растворе уксусной кислоты в течение 30 мин при 100 °С. Избыток краски отмывали в растворе, содержащем 20 % раствор изопропанола и 7 % раствор уксусной кислоты. Сканирование проводили на приборе «Ultrascan laser densitometer-2202» фирмы LKB.

В качестве белков-стандартов для определения M_r использовали бычий сывороточный альбумин (67 кД), яичный альбумин (42 кД), химотрипсиноген А (25 кД), миоглобин (17,8 кД) и цитохром с (12,3 кД).

Содержание белковых компонентов оценивали по величинам площади пиков, полученных при сканировании электрофореграммы, отражающих процентное содержание в препарате белков с определенным M_r .

Результаты и обсуждение

Сыворотка крови больных артериальной гипертензией, как и сыворотка крови здоровых лиц, оказывает ингибирующее действие на активность Na,K-АТФазы. В присутствии 250 мкл сыворотки в пробе АТФазная активность снижается на 43—88 % для больных артериальной гипертензией и на 41—73 % для лиц с нормальным артериальным давлением. Однако в послед-

ней группе выявлен только 1 случай, когда ингибирующий эффект сыворотки превысил 60 %, тогда как в группе больных в 15 случаях из 21 ингибирование составляло более 60 %. Показано, что активность Na,K-АТФазы в присутствии сыворотки крови больных артериальной гипертензией снижалась по сравнению с исходным показателем в среднем на $68,8 \pm 1,7$ % и достоверно отличалась ($p < 0,05$) от аналогичной величины для контрольной группы ($52,8 \pm 2,3$ %).

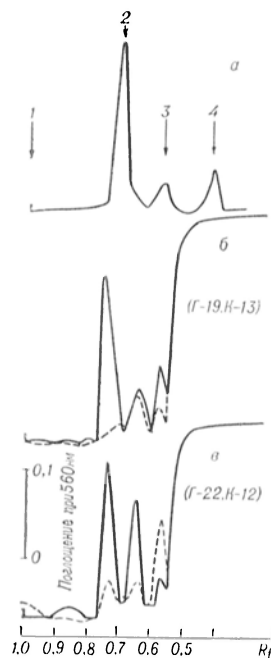
При анализе изучаемых показателей у больных артериальной гипертензией различной этиологии обнаружено, что ингибирующая способность сыворотки крови у больных гипертонической болезнью была существенно выше, чем у больных симптоматической артериальной гипертензией: $72,2 \pm 3,5$ и $58,0 \pm 4,8$ % соответственно ($p < 0,05$). Эти группы больных не различались по возрасту, росту-весовым параметрам, частоте семейного анамнеза артериальной гипертензии и наличию гипертрофии сердечной мышцы (табл. 1).

Сыворотка крови 9 больных гипертонической болезнью и 10 лиц контрольной группы как с высоким, так и с низким ингибирующим действием на Na,K-АТФазу была подвергнута электрофорезу для характеристики ее белкового состава в низкомолекулярной области (10—20 кД). Из рисунка видно, что электрофореграммы 2 больных гипертонической болезнью и 2 здоровых показывают присутствие в сыворотке белков с M_r 12 и 15 кД. Трудно сказать, какой из этих белков соответствует компоненту, который, судя по данным Нарди и соавт. [18], является специфическим белком сыворотки крови больных гипертонической болезнью, поскольку белки с M_r 12 и 15 кД обнаружены в крови как боль-

Таблица 1

Клинико-анамнестические показатели у больных гипертонической болезнью I—II стадии и больных симптоматической артериальной гипертензией

Заболевание	Число обследованных	Возраст, годы	Семейный анамнез артериальной гипертензии, % от общего числа лиц	Индекс массы тела, кг/м ²	Гипертрофия миокарда, % от общего числа лиц
Гипертоническая болезнь I—II стадии	16	42,2	81,2	$28,58 \pm 0,84$	68,7
Симптоматическая гипертензия	5	44,0	80,0	$30,04 \pm 1,91$	80,0
P_{1-2}			$>0,05$	$>0,05$	$>0,05$



Денситограммы гелей после электрофореза. а — белки-стандарты; б, в — сыворотка крови здоровых (пунктирная линия) и больных гипертонической болезнью (сплошная). Приведены электрофореграммы сыворотки крови больных (Г-19 и Г-22), а также здоровых (К-12 и К-13). 1 — финиш; 2 — цитохром с (12,3 кД); 3 — миоглобин (17,8 кД); 4 — химотрипсиноген А (25 кД).

ных, так и здоровых. Только у 2 лиц контрольной группы в сыворотке крови отсутствовали оба компонента, у 2 — компонент с M_r 12 кД (табл. 2).

Сравнение электрофореграмм сыворотки крови больных и здоровых показало, что для больных гипертониче-

ской болезнью характерно более высокое содержание как компонента с M_r 12 кД, так и 15 кД компонента (см. рисунок). При допущении, что белки прокрашиваются с одинаковой интенсивностью, величина площади пика, полученного при сканировании электрофореграммы, отражает процентное содержание белка в сыворотке.

Наши результаты по ингибирующему действию сыворотки крови на Na, K -АТФазу подтверждают полученные ранее данные [22], свидетельствующие, что у пациентов с наследственной формой артериальной гипертензии (гипертонической болезнью) обнаруживается увеличенное содержание в крови ингибитора Na -насоса. Несмотря на то что первые сообщения о присутствии этого фактора в организме животных появились около 15 лет назад, природа его не выяснена. Известно лишь, что эта субстанция обладает «дигиталисподобной» активностью, т. е. ингибирует убаинзависимый транспорт Na^+ и K^+ в клетке [13] и Na, K -АТФазу [4, 17]; конкурирует с меченым убаином и его аналогами за участки связывания [17]; обладает положительным инотропным действием на сердце [17].

Хотя в ряде лабораторий удалось достигнуть существенного увеличения концентрации «дигиталисподобной» субстанции в экстрактах из разных тканей, однако до сих пор это соединение не получено в чистом виде. Нельзя исключить, что под общим названием «дигиталисподобное» соединение объ-

Таблица 2

Сравнение степени ингибирования Na, K -АТФазы сывороткой крови больных гипертонией и здоровых с присутствием в сыворотке белковых компонентов с молекулярной массой 12 и 15 кД

Больные				Здоровые			
№ обследо- дуемого	степень ин- гибирования Na, K-АТФа- зы, %	количество белка, отн. ед.		№ обследо- дуемого	степень ин- гибирования Na, K-АТФа- зы, %	количество белка, отн. ед.	
		12 кД	15 кД			12 кД	15 кД
1. Г-8	88	1,5	3,3	1. К-3	73	0	0
2. Г-7	85	4,0	1,5	2. К-1	60	1,9	1,9
3. Г-22	80	4,0	2,2	3. К-6	59	0	0
4. Г-22	72	5,2	4,6	4. К-7	52	1,3	2,1
5. Г-18	68	4,6	1,9	5. К-10	48	2,0	2,1
6. Г-6	67	2,0	3,8	6. К-12	48	1,0	1,9
7. Г-23	67	5,0	2,3	7. К-13	48	0	1,5
8. Г-19	62	6,0	1,9	8. К-5	46	5,9	3,6
9. Г-24	43	3,2	5,2	9. К-11	41	2,0	1,5
$M \pm S_m$	70,7±4,1	3,9±0,4	2,8±0,4		53,2±2,9	1,4±0,6	1,6±0,3

единено несколько веществ различной природы. В большинстве работ под таким названием описан низкомолекулярный компонент (M_r менее 1 кД), имеющий органическую природу и устойчивый к трипсинолизу и нагреванию [11, 12]. Однако сообщалось также, что Na-насос ингибируется соединением с M_r от 14 до 19 кД [3, 18, 24].

Поскольку в крови больных гипертонической болезнью ранее был обнаружен белковый фактор с M_r 15 кД, не встречающийся в крови здоровых, оправдано было предположить, что именно он ответствен за повышенное ингибирующее действие сыворотки на Na-насос. Однако наши данные показывают, что белковый фактор с массой 15 кД встречается не только у больных гипертонической болезнью. Мы обнаружили в сыворотке крови как больных, так и здоровых два низкомолекулярных белковых фактора (12 и 15 кД). Хотя в среднем в крови больных гипертонической болезнью оба эти фактора содержатся в большем количестве, отсутствие корреляции между их содержанием у отдельных пациентов и ингибирующим действием сыворотки их крови на Na, K-АТФазу означает, что либо эти белковые факторы не имеют отношения к ингибирующему действию сыворотки, либо ингибирующий эффект обусловлен присутствием в крови как этих белков, так и других ингибиторов.

Авторы, обнаружившие у больных гипертонической болезнью белковый фактор с M_r 15 кД, предлагали использовать его в качестве молекулярного маркера этого заболевания [24]. Необходимо отметить, что многие исследования, проводимые в последние годы, посвящены поиску маркера гипертонической болезни. Однако, с нашей точки зрения, попытка отыскать такой единый маркер обречена на неудачу. Поскольку наследственная форма артериальной гипертензии — заболевание полигенное [23], появление лишь одного дефекта (маркера) может и не привести к возникновению болезни. Вероятность заболевания возрастает при наличии нескольких дефектов, каждый из которых в отдельности, а возможно, и несколько вместе, могут встречаться и у здоровых людей. В такой ситуации задача профилактики гипертонической болезни должна заключаться в установлении минимального

для данной популяции или индивидуума количества дефектов (маркеров), присутствие которых в определенных условиях может вызвать гипертоническую болезнь.

Известно, что «дигиталисноподобный» ингибитор Na-насоса появляется в крови как больных, так и здоровых в том случае, когда почки не справляются с выведением Na^+ из организма [16, 17]. Чем хуже работают почки, тем выше будет в крови концентрация свободного ингибитора, синтезируемого в гипоталамусе в ответ на соответствующее увеличение объема жидкости в организме [16]. Таким образом, повышенное ингибирующее действие сыворотки на Na-насос будет в определенной степени характеризовать неспособность почек справиться с выделением Na^+ . Однако этот факт сам по себе не приведет к развитию гипертонической болезни. Только при появлении еще каких-то дефектов (например, уменьшение синтеза молекул Na, K-АТФазы, которое наблюдается при некоторых видах ожирения [15], повышенная проницаемость клеточной мембраны для Na^+ [6, 8, 10] и т. п.), повышение концентрации ингибитора Na-насоса в крови пациентов будет сопровождаться повышением артериального давления.

Таким образом, если в сочетании с одним маркером (повышенное ингибирующее действие сыворотки крови на Na, K-АТФазу) использовать другие маркеры, характеризующие какие-либо дефектные системы, вероятность выявления предрасположенных к этому заболеванию людей значительно возрастает. Хотя патогенетическое значение белковых компонентов с M_r 12 и 15 кД не установлено, они, по-видимому, имеют отношение к развитию гипертонической болезни, поскольку их содержание в крови у больных достоверно повышено. Предполагаем, что если учитывать оба фактора: повышенную ингибирующую способность сыворотки и возросшее содержание в крови белковых компонентов с M_r 12 и 15 кД, то вероятность того, что конкретный индивидуум в исследуемой популяции окажется подвержен развитию гипертонической болезни, может существенно возрастать.

Несомненно, что, кроме этих двух факторов, распределение которых у разных пациентов исследовано в дан-

ной работе, имеются и другие, наличие которых является необходимым, но еще недостаточным условием возникновения и развития гипертонической болезни. Выявить сочетания этих факторов, достаточных для появления болезни, а также установить их роль в развитии гипертонической болезни — задача наших дальнейших исследований.

Авторы признательны В. А. Ткачуку и В. О. Рыбину за помощь в проведении экспериментов по электрофоретическому разделению белков сыворотки крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александров А. А., Рogaева Е. А., Лопина О. Д., Болдырев А. А. // Международная конф. по профилактической кардиологии: Тезисы докладов. — М., 1985. — № 0333.
2. Болдырев А. А., Лопина О. Д., Свинухова И. А. // Биохимия. — 1981. — Т. 46. — С. 1519—1525.
3. Akagava K., Hara N., Tsukada Y. // J. Neurochem. — 1984. — Vol. 42. — P. 775—780.
4. Akera T., Takeda K., Bordy T. M. // Pharmacologist. — 1980. — Vol. 33. — P. 287.
5. Blostein M. // Amer. J. Physiol. — 1977. — Vol. 232. — P. C165—C173.
6. Canessa M., Bize I., Solomon H. et al. // Clin. exp. Hypertens. — 1981. — Vol. 3. — P. 783—795.
7. Clegg G., Morgan D. B., Davidson C. // Lancet. — 1982. — Vol. 2. — P. 891—894.
8. Cusi D., Barlassina C., Ferrari P. et al. // Topics in Pathophysiology of Hypertension / Ed. H. Villarreal, M. Sambhi. — Boston, 1984. — P. 136—145.
9. Fiske C. H., Subbarow Y. // J. biol. Chem. — 1925. — Vol. 66. — P. 375—400.
10. Garray R. P., Price M., Hannaert P., Nazaret C. // Phys. Chem. Trans. Motions. — 1983. — Vol. 6. — P. 642—645.
11. Haddy F. J. // Topics in Pathophysiology of Hypertension / Ed. H. Villarreal, M. Sambhi. — Boston, 1984. — P. 223—236.
12. Halperin J., Schaeffer R., Galvez L., Malave S. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1983. — Vol. 80. — P. 6101—6104.
13. Hauptert G. T., Sancho I. M. // Ibid. — 1980. — Vol. 76. — P. 4658—4660.
14. Laemmli U. K. // Nature. — 1978. — Vol. 227. — P. 680—685.
15. de Luise M., Blackburne G. T., Flier J. S. // New Engl. J. Med. — 1980. — Vol. 303. — P. 1017—1022.
16. MacGregor G. A., de Wardener H. E. // Topics in Pathophysiology of Hypertension / Ed. H. Villarreal, M. Sambhi. — Boston, 1984. — P. 258—260.
17. Morgan T. O., Fitzgibson W., Meyers J. B. // New Engl. J. Med. — 1984. — Vol. 307. — P. 101—104.
18. Nardi R., Russaert R., Carretta R. et al. // Clin. exp. Hypertens. — 1984. — Vol. 3. — P. 775—780.
19. Orlov S. N., Postnov Yu. V. // Clin. Sci. — 1982. — Vol. 63. — P. 281—284.
20. Orlov S. N., Postnov Yu. V., Gulak P. V., Litvinov I. S. // Ibid. — P. 43—45.
21. Parascevova J., Alken R. G. // Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. — 1979. — Bd 307. — S. R37.
22. Poston L., Sewell R. B., Wilkinson S. R. et al. // Brit. med. J. — 1981. — Vol. 282. — P. 847—849.
23. Rapp J. // Hypertension, Physiopathology and Treatment / Ed J. Genest et al. — New York, 1983. — P. 23—31.
24. Van de Voorde A., de Broe M., Pollet O. et al. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1983. — Vol. 111. — P. 1015—1021.
25. Vannoutte P. M., Lorenz R. R. // J. cardiovascular. Pharmacol. — 1984. — Vol. 6. — P. 588—594.
26. de Wardener M. A., Pernolet M. G. // Kidney int. — 1980. — Vol. 18. — P. 1—9.

Поступила 31.01.86

ARE THERE ANY CORRELATIONS BETWEEN THE PRESENCE OF A 15 kDa PROTEIN COMPONENT IN BLOOD SERA OF THE PATIENTS WITH ARTERIAL HYPERTENSION AND ITS INHIBITORY ACTIVITY TOWARDS Na^+, K^+ -ATPase?

E. A. Rogaeva, N. V. Perova, A. A. Alexandrov, R. G. Oganov, O. D. Lopina, A. A. Boldyrev

Institute of Prophylactic Cardiology, All-Union Cardiological Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Biological Faculty, M. V. Lomonosov State University, Moscow

Blood sera from patients with arterial hypertension exhibited more distinct inhibitory effect on purified Na^+, K^+ -ATPase as compared with blood sera of healthy persons. Moreover, the fraction of 12-15 kDa protein components was usually increased in blood sera of the patients. At the same time, strong inhibition of the enzyme occurred after addition of blood sera which did not contain the protein fraction. The data obtained suggest that both these patterns — the degree of blood sera inhibitory effect on Na^+, K^+ -ATPase activity and content of 12-15 kDa protein components in blood serum — should be considered as diagnostically valuable at early steps of development of hypertension.

Т. В. Казуева, Э. Е. Коврижных, Р. И. Кузьмина, М. В. Ассур

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ОБМЕН В СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТРАВМАТИЧЕСКОМ ШОКЕ

Ленинградский НИИ скорой помощи им. И. И. Джанелидзе

Известно, что неповрежденные скелетные мышцы выполняют важную роль в поддержании циркуляторного гомеостаза в организме при шоке [3, 15], но при этом они испытывают резкий дефицит в снабжении кровью и кислородом [7, 9], что может привести к нарушениям энергетического обмена в ткани. Сведения об энергообеспечении скелетных мышц при травматическом шоке немногочисленны и касаются в основном шока от сдавления мягких тканей или ишемии задних конечностей [13, 18]. При травматическом шоке по Кеннону содержание макроэнергетических фосфорных соединений в неповрежденной скелетной мышце исследовали лишь Радев и соавт. [6]. Данные о редокс-состоянии клеток этой ткани при шоке также единичны [5]. Нами исследованы содержание адениновых нуклеотидов и их энергетический потенциал, а также уровень метаболитов углеводного обмена в неповрежденной икроножной мышце крыс в динамике травматического шока по Кеннону.

Методика

Опыты поставлены на 26 белых крысах-самцах с массой тела 250—300 г. Животных фиксировали на станке; под местной анестезией 0,5 % раствором новокаина катетеризировали правую сонную артерию для измерения системного артериального давления (АД) ртутным манометром. Травматический шок воспроизводили по Кеннону травмированием мягких тканей бедра левой задней конечности. Общая продолжительность шока составляла около 3 ч.

Энергетический обмен в неповрежденной скелетной мышце исследовали в периоде стабилизации торпидной фазы (АД 90—100 мм рт. ст.), ее конечном периоде (около 40 мм рт. ст.) и в терминальной фазе шока (25—30 мм рт. ст.). Под эфирным наркозом ткань икроножной мышцы правой задней конечности брали охлажденными в жидком азоте щипцами [19]. Навески тканей растирали в ступке, экстрагировали 6 % раствором HClO_4 из расчета 1:4 с применением гомогенизации. Пробы центрифугировали при 4°C в течение 15 мин при 3000 об/мин, осадок промывали 6 % HClO_4 до конечного разведения ткани 1:5 и вновь центрифугировали при тех же условиях. Безбелковые экстракты ткани нейтрализовали 5 М раствором K_2CO_3 до pH 3,5—

4,0 по метиловому оранжевому. Через 30 мин осадок перхлората калия удаляли центрифугированием, надосадочные фракции хранили на ледяной бане в холодильнике и использовали для анализа в течение нескольких часов. Метаболиты энергетического обмена определяли ферментативными методами [12] на спектрофотометре СФ-16 при длине волны 340 нм. Использовали реактивы фирм «Boehringer» и «Реанал». Энергетический потенциал вычисляли по [11].

Результаты и обсуждение

Содержание адениновых нуклеотидов и их сумма в неповрежденной скелетной мышце в динамике шока не снижались (см. таблицу). Наблюдались даже небольшое (на 30 %) достоверное увеличение содержания АДФ и тенденция к повышению остальных параметров. Энергетический потенциал в терминальной фазе шока был на 1 % (но достоверно) ниже исходного. Это небольшое снижение энергетического потенциала может быть проявлением его регуляторной функции, направленной на обеспечение постоянства фонда адениновых нуклеотидов [16], о чем свидетельствует тенденция к увеличению последнего. Содержание креатинфосфата (КФ) резко (на 24 %) снижалось лишь в терминальной фазе шока.

По мере прогрессирования процесса наблюдалось 4-кратное увеличение содержания лактата и отношения лактат/пируват за счет накопления лактата.

Таким образом, в неповрежденной скелетной мышце крыс, подвергнутых шокогенной травме, не найдено существенных изменений содержания АТФ, обнаружено лишь некоторое снижение концентрации КФ в терминальной фазе шока на фоне усиления анаэробного гликолиза.

В отличие от работы [6] полученные нами результаты подтверждают данные большинства авторов, отмечавших устойчивость уровня АТФ при той или иной степени снижения содержания КФ в скелетной мышце при других видах шока [14, 17, 18]. Поддержание энергетического гомеостаза в скелет-

Содержание (в мкмоль/г сырой ткани) метаболитов энергетического обмена в скелетной мышце крыс при травматическом шоке

Условия опыта	Статистический показатель	АТФ	АДФ	АМФ	Сумма адениновых нуклеотидов	Энергетический потенциал	КФ	Лактат	Пируват	Лактат/пируват
Контроль 1 интактные животные (n=5)	M ±m	5,69 0,14	0,60 0,03	0,08 0,008	6,73 0,18	0,940 0,002	13,1 0,17	2,13 0,33	0,126 0,020	17,0 0,89
Контроль 2 фиксированные животные (n=4)	M ±m P	6,13 0,36	0,68 0,06	0,09 0,02	6,90 0,43	0,938 0,002	13,6 1,28	2,27 0,44	0,145 0,011	15,5 2,50
Травматический шок Торпидная фаза: период стабилизации (n=7)	M ±m P ₁ P ₂	6,32 0,32	0,72 0,07	0,09 0,008	7,13 0,38	0,937 0,002	13,7 0,71	4,15 0,49 <0,01 <0,02	0,184 0,016	23,4 3,72
конечный период (n=5)	M ±m P ₁ P ₂	6,20 0,30	0,75 0,03	0,10 0,006	7,04 0,31	0,932 0,003	12,1 0,83	5,73 0,67 <0,002 <0,002	0,130 0,019	45,7 3,92 <0,002 <0,002
Терминальная фаза (n=5)	M ±m P ₁ P ₂	6,26 0,34	0,78 0,04 <0,01	0,10 0,007	7,14 0,37	0,931 0,002 <0,02 <0,05	10,4 0,89 <0,02	8,88 1,01 <0,002 <0,02	0,135 0,015	70,2 15,2 <0,01 <0,01

Примечание. P₁ и P₂—достоверность различий показателей по отношению к контролям 1 и 2.

ных мышцах в наших опытах осуществляется, несмотря на глубокие расстройства кровообращения и кислородного режима в этой ткани. Так, при травматическом шоке по Кеннону в торпидной и предтерминальной фазах его кровотока в конечности почти полностью прекращается [2, 4], рО₂ в мышечной ткани падает соответственно до 1/4 исходного и близких к нулю значений [7], поглощение О₂ снижается в 2—3 раза, несмотря на 2-кратное увеличение артериовенозной разности [2]. Стабильность содержания макроэргических фосфорных соединений в скелетных мышцах при сниженной доставке О₂ обеспечивается выраженной способностью этой ткани к анаэробному гликолизу и высоким исходным содержанием КФ, что мы и наблюдали в наших опытах, а также наличием миоглобина. По современным представлениям, последний не только является носителем запаса О₂, но и облегчает транспорт и регулирует поглощение О₂ независимо от условий его доставки, особенно при Р_{VO}₂ близких к критическим, когда экстракция О₂ из крови становится предельной [1, 8]. Поддержанию энергетических ресурсов в скелетных мышцах при шоке, оче-

видно, способствуют резкое снижение мышечного тонуса [10] и развивающаяся в динамике процесса гипотермия. Эти особенности метаболизма мышц не только позволяют сохранить их жизнеспособность в условиях характерной для шока циркуляторной гипоксии, но и дают возможность использовать сосуды мышечной ткани в качестве «демпфера» для перераспределения кровотока в пользу жизненно важных органов и обеспечения выживаемости организма в целом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Г. Е., Пантелеева Н. С. Функциональная биохимия: Избранные главы. — Л., 1965.
2. Гальцева И. В., Тарелкина М. Н. // Травматический шок. — Л., 1975. — Вып. 2. — С. 32—39.
3. Джурко Б. И., Пронин О. В. // Пат. физиол. — 1985. — № 5. — С. 16—20.
4. Ковалев В. А. // Патогенез, лечение и профилактика травматического шока. — Л., 1979. — С. 42—43.
5. Лысак В. Ф., Кеериг Ю. Ю. // Патологическая физиология травмы. — Л., 1979. — С. 115—120.
6. Радев С. Г., Кеериг Ю. Ю., Кулагин В. К., Иванов И. И. // Вопр. мед. химии. — 1969. — № 3. — С. 289—303.
7. Селезнев С. А. // Пат. физиол. — 1971. — № 6. — С. 15—20.

8. Скардс Я. В., Матисоне Д. Р., Дзерве В. Н. // Физиология, патология и экспериментальная терапия болезней сердечно-сосудистой системы. — Рига, 1981. — С. 181—186.
9. Удовиченко В. И., Штыхно Ю. М. // Анест. и реаниматол. — 1981. — № 5. — С. 41—44.
10. Шерман Д. М. // Травматический шок. — Л., 1983. — С. 83—92.
11. Atkinson D. E. // Surgery. — 1971. — Vol. 70, N 4. — P. 555.
12. Goranson E. S., Hamilton J. E., Haist A. E. // J. biol. Chem. — 1948. — Vol. 174, N 1. — P. 1—9.
13. Hagberg H., Haljamae H., Johansson B. et al. // Circulat. Shock. — 1983. — Vol. 10, N 1. — P. 61—70.
14. Halmagyi D. T. J., Goodman A. H., Neering J. R. // J. appl. Physiol. — 1969. — Vol. 27, N 4. — P. 508—513.
15. Methoden der enzymatischen Analyse / Hrsrg. H. U. Bergmeyer. — Weinheim, 1974.
16. Siesjo B. K. Brain Energy Metabolism. — New York, 1978.
17. Slotman G. J., Adams M. D. M., Ghosh B. A. A. et al. // Amer. Surg. — 1979. — Vol. 45, N 12. — P. 783—792.
18. Stoner H. B., Threlfold C. J. // The Biochemical Response to Injury. — Oxford, 1960. — P. 105—108.
19. Wollenberger A., Krause E. G., Wahler B. E. // Naturwissenschaften. — 1958. — Bd 45, N 2. — S. 294—297.

Поступила 29.01.86

ENERGY METABOLISM IN SKELETAL MUSCLES DURING EXPERIMENTAL TRAUMATIC SHOCK

T. V. Kazueva, E. E. Kovrizhnyk, R. I. Kuz'mina, M. V. Assur

Institute of Urgent Medicine, Leningrad

Content of ATP and adenylate nucleotides was not markedly altered in rats during a traumatic shock induced by Cannon's procedure involving an impairment of skeletal muscles. Energy potential and content of creatine phosphate were only slightly decreased in these tissues, while the level of lactate and the lactate/pyruvate ratio were increased at the terminal phase.

УДК 616-056.43-002.828-092:612.017.1-06:582.282.232-119

А. В. Ермолаев, И. А. Гукасян, В. И. Огарков

ВЫДЕЛЕНИЕ ПОВЕРХНОСТНЫХ АНТИГЕНОВ CANDIDA MALTOSE, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА КАНДИДОСЕНСИБИЛИЗАЦИЮ, И ИХ ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Всесоюзный НИИ биосинтеза белковых веществ, Москва

Дрожжеподобные грибы рода *Candida* могут входить в состав микробных ассоциаций, присутствующих на слизистых оболочках носоглотки, желудочно-кишечного и мочеполового тракта человека. Являясь одним из компонентов биоценоза, грибы рода *Candida* способны, с одной стороны, влиять на нормальную микрофлору указанных органов, создавая тем самым условия для развития бактериальной инфекции [5], а с другой стороны, могут вступать в определенные взаимоотношения с макроорганизмом, приводящие либо к развитию кандидоза со всеми его проявлениями [6—8], в том числе гиперергическими реакциями [4, 9], либо к микогенной сенсibilизации организма при отсутствии специфического заболевания [9]. В настоящее время дрожжеподобные грибы рода *Candida* находят широкое применение в качестве микроорганизмов-продуцентов в некоторых отраслях микробиологической промышленности. Это создает опасность искусственного загрязнения окружающей среды производственными штаммами *Candida* и воздействия на организм че-

ловека таких количеств микроорганизма, которые не встречаются в условиях его естественной циркуляции в природе. Использование в производстве непатогенных штаммов *Candida* исключает опасность возникновения кандидоза у лиц, связанных с производством. В то же время попадание непатогенной культуры в организм человека может привести к гиперергической перестройке его с развитием гиперчувствительности как замедленного, так и немедленного типа. Однако до сих пор остается неясным, какие компоненты дрожжевой клетки ответственны за сенсibilизацию организма. Данные клетки ответственны за сенсibilизацию организма. Данные литературы [3, 10, 12] позволяют полагать, что специфическую реакцию при кандидосенсibilизации в естественных условиях индуцируют поверхностные антигены этих микроорганизмов. В связи с этим целями настоящей работы были выделение поверхностных антигенов *Candida* щадящими воздействиями, их иммунохимическая характеристика и оценка их активности в аллергологических тестах.

Методика

В основу методической разработки были взяты данные работы [11] по выделению поверхностных гликопротеидных структур из *C. albicans* с помощью β -меркаптоэтанол и проназы.

Источником получения поверхностных антигенов служила биомасса *Candida maltosa* штамма А из коллекции Всесоюзного НИИ биосинтеза белковых веществ. Инокулят выращивали в колбах на качалке при температуре $33 \pm 1^\circ\text{C}$. В качестве засевного материала использовали культуру, синхронизированную методом низкотемпературного шока. Биомассу накапливали в аппарате для непрерывного стерильного культивирования (Анкум-2) емкостью 5 л на среде следующего состава (г/л): H_3PO_4 (70 %) — 0,87; KCl — 0,82; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 1,2; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,11; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,03; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,012; NaMoO_4 — 0,0016; CaCl_2 — 0,275; Na_2SiO_3 — 0,037; глюкозы — 1 % от массы. Процесс накопления биомассы осуществляли в условиях периодического культивирования. Биомассу отбирали в конце логарифмической фазы роста, отделяли от культуральной жидкости центрифугированием при 3000 об/мин в течение 20 мин, лиофилизировали и использовали для получения поверхностных антигенов. Схема выделения представлена на рис. 1.

Антигенную активность полученных препаратов (экстракта I и экстракта II) оценивали в реакции иммунодиффузии (РИД) по Оухтерлони [2] с использованием видоспецифической кроличьей антисыворотки к убитой культуре *C. maltosa* штамма Б.

Анализ фракционного состава экстрактов I и II осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонках Ultro-Rac TSKG 3000 (голубых) фирмы LKB (Швеция). Для построения калибровочной кривой (график зависимости молекулярной массы от объема собранного элюента) использовали коммерческий набор высокоочищенных белковых калибраторов с молекулярной массой 1000—550 000 дальтон.

Исследование экстракта I и экстракта II в аллергологических тестах выполнено на 148 морских свинок обоего пола с массой тела 200—250 г.

Реактогенность препаратов оценивали путем введения их интактным морским свинкам внутрикожно в дозах 50—1000 мкг в объеме 0,1 мл физиологического раствора или внутрисердечно в дозе 20 мг в объеме 1 мл физиологического раствора.

Для исследования аллергизирующей активности экстракта I и экстракта II последние вводили морским свинкам в смеси с полным адъювантом Фрейнда субплантарно в дозе 1,25—200 мкг. Наличие гиперчувствительности оценивали путем постановки внутрикожных проб на 12-й день после сенсibilизации. Кожную реакцию учитывали через 30 мин — 1,5 ч, 3—5, 24, 48 ч и считали положительной, если диаметр зоны гиперемии был не менее 5 мм.

Способность изучаемых препаратов выявлять кандидосенсибилизацию исследовали в опытах на морских свинках, сенсibilизированных живой культурой *C. maltosa* штамма А, выращенной в стерильных условиях на среде с глюкозой. Взвесь дрожжевых клеток в смеси с полным адъювантом Фрейнда вводили в объеме 0,5 мл, содержащем 4×10^8 клеток,

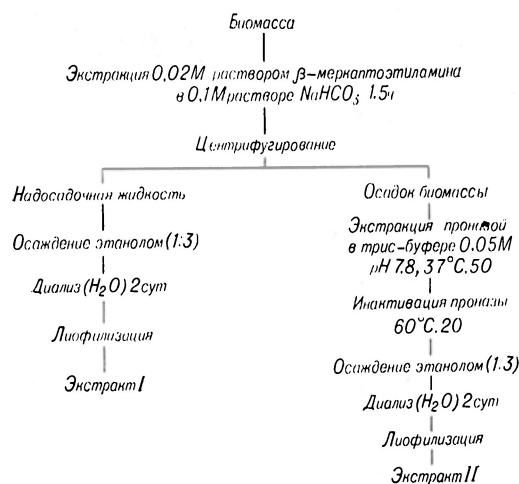


Рис. 1. Получение поверхностных антигенов из *C. maltosa* штамма А.

субплантарно по 0,1 мл в каждую заднюю конечность и подкожно в область шеи в объеме 0,3 мл. В этой серии опытов животные были разделены на 2 подгруппы. У животных подгруппы I выявляли гиперчувствительность замедленного и немедленного типа путем постановки внутрикожных проб с каждым из исследуемых препаратов, вводимых на 12-й и 21-й дни после сенсibilизации в дозе 3—100 мкг в 0,1 мл физиологического раствора. Кожную реакцию учитывали в те же сроки, что и при сенсibilизации экстрактами I и II. Животным подгруппы II разрешающую дозу антигена (20 мг/мл) вводили внутрисердечно на 21-й день после сенсibilизации и оценивали наличие гиперчувствительности немедленного типа по развитию общей анафилактической реакции.

Статистическую обработку данных, полученных при аллерготестировании, проводили методом пробит-анализа с расчетом ED_{50} [1].

Результаты и обсуждение

В результате последовательной обработки биомассы *C. maltosa* штамма А β -меркаптоэтиламином и проназой были получены экстракты I и II, количественный выход которых от массы лиофилизированной биомассы составил 8 и 10 % соответственно.

Иммунохимическое исследование полученных препаратов свидетельствовало об их антигенной гетерогенности. В РИД с поливалентной антисывороткой каждый из экстрактов формировал как минимум 2—3 полосы преципитации (рис. 2). При иммунохимическом сравнении препаратов в РИД удалось выявить наличие в их составе общего антигенного компонента.

Разделение полученных экстрактов по молекулярной массе методом высо-

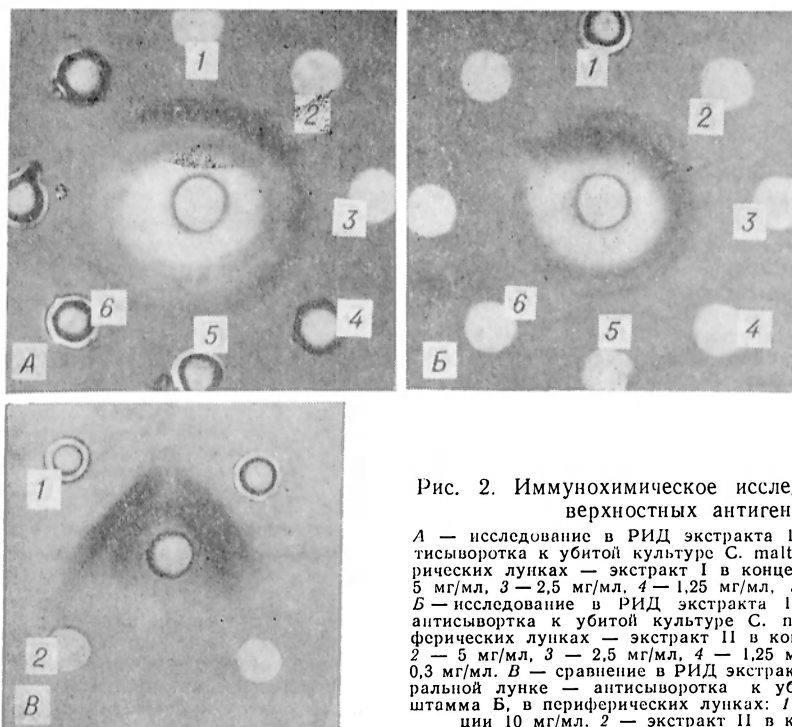


Рис. 2. Иммунохимическое исследование препаратов поверхностных антигенов в РИД.

А — исследование в РИД экстракта I. В центральной лунке — антисыворотка к убитой культуре *S. maltosa* штамма Б, в периферических лунках — экстракт I в концентрации: 1 — 10 мг/мл, 2 — 5 мг/мл, 3 — 2,5 мг/мл, 4 — 1,25 мг/мл, 5 — 0,6 мг/мл, 6 — 0,3 мг/мл. Б — исследование в РИД экстракта II. В центральной лунке — антисыворотка к убитой культуре *S. maltosa* штамма Б, в периферических лунках — экстракт II в концентрации: 1 — 10 мг/мл, 2 — 5 мг/мл, 3 — 2,5 мг/мл, 4 — 1,25 мг/мл, 5 — 0,6 мг/мл, 6 — 0,3 мг/мл. В — сравнение в РИД экстракта I и экстракта II. В центральной лунке — антисыворотка к убитой культуре *S. maltosa* штамма Б, в периферических лунках: 1 — экстракт I в концентрации 10 мг/мл, 2 — экстракт II в концентрации 10 мг/мл.

коэффициентной жидкостной хроматографии подтвердило данные об их гетерогенности. Оказалось, что экстракт I состоит из 6 компонентов и содержит относительно высокомолекулярные фракции, отсутствующие в экстракте II (рис. 3). Последний содержит только 2 относительно низкомолекулярные фракции, близкие по молекулярной массе к таковым в экстракте I.

Результаты внутрикожного титрования исследуемых препаратов на интактных морских свинках свидетельствуют о более высокой реактогенности экстракта II по сравнению с экстрактом I (табл. 1). В то же время при внутрисердечном введении препаратов в дозе 20 мг/мл ни один из них не вызывал видимой реакции у интактных морских свинок в течение 24 ч наблюдения. Это позволило использовать указанную дозу для дальнейших опытов на сенсibilизированных животных.

Исследование алергизирующей активности поверхностных антигенов, полученных из *S. maltosa*, показало, что повышенная чувствительность развивается как к экстракту I, так и к экстракту II, а выраженность и характер ее зависят от дозы вводимого антигена. Так, оба экстракта, будучи введенными животным в дозе 25—200 мкг, вызывали в организме состояние выраженной

аллергии. В этом случае разрешающее введение как экстракта I, так и экстракта II животным, сенсibilизированным гомо- и гетерологичными препаратами, вызывало развитие кожной гиперемии уже через 3 ч наблюдения. Можно предположить, что подобная реакция относится к поздней фазе гиперчувствительности немедленного типа и опосредована антителами, сенсibilизирующими тучные клетки. Сохранение

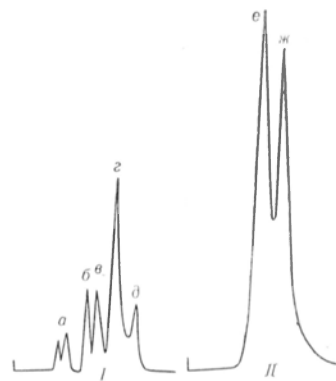


Рис. 3. Исследование фракционного состава экстракта I (I) и экстракта II (II) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

а — ж — фракции с молекулярной массой (в дальтонах): а — 2 200 000, б — 1 350 000, в — 62 000, г — 15 000, д — 2500, е — 28 000, ж — 5000.

Таблица 1

Оценка реактогенности и аллергизирующих свойств экстракта I и экстракта II в опытах на интактных морских свинках

Исследуемый экстракт	Способ введения	Доза, мкг	Число животных		ЕД ₅₀ , мкг	ЕД ₅₀ при разрешении	
			в группе	из них дало реакцию		экстрактом I	экстрактом II
I	Внутрикожно	200	20	0	400 (345—580)	2,7 (1,9—3,9)	31,0 (15,5—62,0)
		400	10	4			
		500	10	8			
		800	8	7			
		1000	8	8			
II	Внутрисердечно	20 000	10	0	180 (116—279)	35,0 (15,2—80,5)	4,1 (2,3—7,4)
	Внутрикожно	50	10	0			
		100	10	1			
		200	10	6			
		400	10	9			
		500	10	10			
		600	8	8			
	Внутрисердечно	20 000	10	0			

выраженной кожной гиперемии и инфильтрации в месте внутрикожного введения препарата через 24—48 ч наблюдения может свидетельствовать о присоединении реакции, связанной с гиперчувствительностью замедленного типа. При снижении сенсibilизирующей дозы исследуемых препаратов «ранний» компонент реакции был выражен слабо или отсутствовал совсем. При сравнении ЕД₅₀ существенной разницы в сенсibilизирующей способности экстракта I и экстракта II обнаружено не было (см. табл. 1). Аллерготестирование с использованием гетерологичных препаратов позволило в биологическом тесте подтвердить иммунохимические данные о наличии в составе обоих препаратов общего антигенного компонента. Об этом, в частности, свидетельствует способность экстракта I выявлять сенсibilизацию, вызванную экстрактом II, и наоборот (см.

табл. 1). Наблюдаемые при этом значительно более высокие величины ЕД₅₀ для гетерологичных препаратов указывают на то, что общий антигенный компонент не является доминирующим и составляет лишь незначительную часть от общей антигенной активности исследуемых препаратов.

Изучение в кожно-аллергологическом тесте способности экстракта I и экстракта II выявлять кандидосенсibilизацию, обусловленную попаданием в организм целых дрожжевых клеток, показало, что экстракт I как на 12-й, так и на 21-й день опыта обладает высокой разрешающей способностью (табл. 2), выявляя, однако, при этом только гиперчувствительность замедленного типа. Кожная реакция развивается не ранее 8 ч после внутрикожного введения препарата, достигает максимума через 24 ч и сохраняется в течение 48 ч наблюдения. В то же время экстракт II,

Таблица 2

Оценка разрешающей способности экстракта I и экстракта II в опытах внутрикожного титрования на морских свинках, сенсibilизированных живой культурой *S. maltosa* штамма А

Исследуемый экстракт	Срок наблю- дения, дни	Число животных								ЕД ₅₀ . мкг
		в группе	из них дало реакцию при дозе, кг							
			1,5	3	6	12	25	50	100	
I	12-й	10	—	1	3	6	8	9	9	16,0 (6,3—22,8)
	21-й	10	1	4	8	9	9	9	9	
II	12-й	10	—	0	0	2	2	2	—	50
	21-й	10	—	0	0	0	0	1	—	50

будучи введенным в максимальной ареактогенной дозе в те же сроки, что и экстракт I, выявлял гиперчувствительность (также только замедленного типа) не более чем у 20 % животных (см. табл. 2). Высокая реактогенность экстракта II, выявляемая при внутривенном титровании его на интактных морских свинках (см. табл. 1), исключала возможность дальнейшего повышения дозы препарата, вводимой при разрешении и, следовательно, точной количественной характеристики его активности в данном тесте.

Способность изучаемых препаратов выявлять гиперчувствительность немедленного типа, развивающуюся под влиянием *C. maltosa*, определяли при внутрисердечном введении разрешающей дозы антигена на 21-й день после сенсibilизации. Введение как экстракта I, так и экстракта II вызывало при этом у животных общую анафилактическую реакцию со смертельным исходом у половины из них.

Таким образом, получены поверхностные антигены из *C. maltosa* и дана их иммунохимическая характеристика. Показаны антигенная гетерогенность изученных препаратов и наличие в их составе общего компонента. Установлена способность поверхностных антигенов индуцировать как гиперчувствительность замедленного типа, так и реакцию, связанную, по-видимому, с поздней фазой гиперчувствительности немедленного типа. Показана также способность поверхностных антигенов выявлять гиперчувствительность замедленного и немедленного типа, обусловленную попаданием в организм живой культуры *C. Maltosa* штамма А. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования поверхностных антигенов *C. maltosa* для

приготовления диагностически ценных аллергенов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бельский М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. — Л., 1963.
2. Бем Э. // Иммунологические методы: Пер. с нем. — М., 1979. — С. 31—37.
3. Игнатова С. М., Нефедов М. П. // Микотическая инфекция и сенсibilизация. — Л., 1982. — С. 67—71.
4. Никифоров Ю. Ф., Яробкова Н. Д. // Там же. — С. 82—86.
5. Реброва Р. Н. Грибы рода *Candida* при бактериальных инфекциях. — М., 1979.
6. Хмельницкий О. К. // Микотическая инфекция и сенсibilизация. — Л., 1982. — С. 45.
7. Шувалова Е. П. и др. // Там же. — С. 46.
8. Яробкова Н. Д. // Там же. — С. 48.
9. Segal E. et al. // Acta allerg. (Kbh.). — 1975. — Vol. 30, N 1. — P. 1—8.
10. Suzuki M., Fukazawa Y. // Microbiol. Immunol. — 1982. — Vol. 26, N 5. — P. 385—402.
11. Tronehin G. et al. // Arch. Microbiol. — 1984. — Vol. 139. — P. 221—224.
12. Winterrowd G. E., Cutler J. E. // Infect. Immun. — 1983. — Vol. 41, N 1. — P. 33—38.

Поступила 31.01.86

ISOLATION OF SURFACE ANTIGENS FROM *CANDIDA MALTOSA* RESPONSIBLE FOR CANDIDOSENSITIZATION AND THEIR IMMUNOCHEMICAL PROPERTIES

A. V. Ermolaev, I. A. Gukasyan, V. I. Ogarkov
Institute of Protein Substances Biosynthesis,
Moscow

Surface antigens from *Candida maltosa* were shown to be of heterogenous nature while common component was present in all the preparations. These antigens were able to induce both the slow type hypersensitivity and the reaction related apparently to the later phase of immediate hypersensitivity. Hypersensitivity of slow and immediate types developed in response to invasion of living culture of *C. maltosa* A strain. The data obtained suggest that surface antigens from *Candida* might be used for production of diagnostic allergens.

УДК 616.24-002.1/2-07:616.153.962.4+616.153.1:577.152.344.042.2

С. И. Комар, Э. Н. Коробейникова

ДИНАМИКА α_1 -АНТИТРИПСИНА И α_2 -МАКРОГЛОБУЛИНА У БОЛЬНЫХ ОСТРОТЕКУЩЕЙ И ЗАТЯЖНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ

Кафедра пропедевтики внутренних болезней и Центральная научно-исследовательская лаборатория Челябинского медицинского института

В защитной реакции организма на повреждающее действие протеиназ микроорганизмов и собственных гра-

нулоцитов основная роль отводится трем ингибиторам протеолиза: α_1 -антитрипсину, α_2 -макроглобулину и α_1 -

антихимотрипсину [3, 4, 9]. Врожденный или приобретенный дефицит ингибиторов может привести к углублению процесса повреждения тканей [2, 9]. В настоящее время накоплено достаточно данных в пользу гипотезы о ведущей роли недостаточности α_1 -антитрипсина в генезе первичной эмфиземы легких [1, 11—13]. Однако патогенетическое значение ингибиторов протеолиза в течении острых воспалительных заболеваний легких изучено недостаточно [8, 10].

Цель настоящей работы состояла в изучении изменений содержания α_1 -антитрипсина и α_2 -макроглобулина сыворотки крови у больных с остротекучей и затяжной пневмонией.

Методика

Обследовано 250 человек: 200 больных пневмонией (120 мужчин, 80 женщин) и 50 практически здоровых лиц. Больные были разделены на 2 группы: 100 человек с остротекучей и 100 человек с затяжной пневмонией. Больные обследованы 3—4 раза в динамике заболевания. В сыворотке крови исследуемых лиц определяли α_1 -антитрипсин и α_2 -макроглобулин унифицированным энзиматическим методом В. Ф. Нартиковой, Т. С. Пасхиной [5]. Результаты обработаны с использованием критериев Стьюдента и Уайта.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования показали, что в острый период заболевания у 71 % больных концентрация α_1 -антитрипсина в сыворотке крови увеличивалась в 1,5—2,5 раза. Причем из общего числа больных с остротекучей пневмонией увеличение содержания этого белка отмечалось у 60 %, среди лиц с затяжной пневмонией — у 84 %. Максимум увеличения α_1 -антитрипсина приходился на первую декаду бо-

лезни, в последующем его концентрация постепенно уменьшалась (табл. 1). Содержание α_1 -антитрипсина в сыворотке крови больных с замедленным рассасыванием пневмонии заметно выше, чем у лиц с нормальной скоростью рассасывания пневмонического очага. Отличия в содержании α_1 -антитрипсина при остротекущих и затяжных пневмониях наиболее отчетливо проявились в первой и заключительной декадах болезни. В период клинического выздоровления концентрация исследуемого ингибитора оставалась повышенной у 33 % больных с остротекучей и у 44 % лиц с затяжной пневмонией.

Отмечена взаимосвязь между частотой и степенью увеличения α_1 -антитрипсина у больных перед выпиской из стационара и выраженностью остаточных явлений в легких (табл. 2). Так, наиболее частое и значительное увеличение ингибитора наблюдалось у лиц с сохранением рентгенологических признаков инфильтрации и воспалительных изменений крови. Значительно повышенным оставался α_1 -антитрипсин у больных с рентгенологическими признаками фиброза или цирроза в зоне бывшего воспаления. Такая же закономерность отмечена и у больных, у которых при выписке сохранялись массивные плевральные наложения. В то же время у больных, у которых перед выпиской оставалось лишь усиление легочного рисунка, средние значения α_1 -антитрипсина мало отличались от контрольных.

Проанализировано течение болезни в группе больных, у которых не выявлено существенного увеличения α_1 -антитрипсина в острый период и в последующей динамике заболевания. Эта группа составила 22 % от общего чис-

Таблица 1
Динамика α_1 -антитрипсина при затяжных и остротекущих пневмониях (в ИЕ/мл)

Группа обследуемых	Декада болезни			
	1-я	2-я	3-я	4-я
1. Здоровые лица	24,3±1,6	—	—	—
2. Больные с остротекучей пневмонией	34,0±0,5	37,5±1,2	34,0±0,7	23,2±5,2
3. Больные с затяжной пневмонией	49,4±0,8	45,1±1,7	40,5±1,1	36,0±2,8
$P_{1,2}$	<0,05	<0,01	<0,05	>0,05
$P_{2,3}$	<0,01	<0,05	<0,01	<0,05
$P_{1,3}$	<0,05	<0,01	<0,01	<0,05

Таблица 2
Содержание α_1 -антитрипсина в сыворотке крови больных пневмонией перед выпиской из стационара в зависимости от наличия остаточных явлений в легких

Группа обследуемых	α_1 -антитрипсин, ИЕ/мл	% лиц с увеличением α_1 -антитрипсина
Здоровые лица	24,1±1,61	4,2
Больные пневмонией:		
с полным рассасыванием очага	29,5±1,32 $P>0,05$	25,0
с сохранением инфильтрации	45,0±2,42 $P<0,01$	75,3
с сохранением воспалительных изменений в крови	37,0±0,52 $P<0,01$	100
с фиброзом и циррозом	41,5±2,60 $P>0,01$	60
с плевральными наложениями	35,0±0,31 $P>0,05$	43
с усилением легочного рисунка	22,0±1,30 $P<0,05$	23

ла больных. Отмечены благоприятное течение болезни, быстрое рассасывание инфильтрата у большинства больных, отсутствие осложнений. Случаи затяжного течения в этой группе встречались в 6 раз реже, чем в группе лиц с увеличением ингибитора (соответственно в 7 и 42,5 % случаев).

Проанализирована также частота дефицита α_1 -антитрипсина у больных острой пневмонией. В острый период болезни не выявлено значительного дефицита ингибитора, что свидетельствует об отсутствии в обследуемой группе больных лиц с гомозиготной недостаточностью α_1 -антитрипсина. В фазе клинического выздоровления у 7,7 % больных обнаружен дефицит α_1 -антитрипсина, в контрольной группе он отмечен лишь у 1 % лиц. Концентрация

α_1 -антитрипсина у больных этой группы составляла от 0 до 50 % от нормальной величины. Течение заболевания и скорость рассасывания воспаления у больных этой группы не имели существенных особенностей.

У лиц, злоупотреблявших алкоголем, в 1/3 случаев в острый период болезни отсутствовало увеличение α_1 -антитрипсина, а в стадии разрешения выявлено значительное снижение ингибитора (более чем на 50 % от нормальных цифр).

Как видно из табл. 3, содержание α_2 -макроглобулина, ответственного за выведение протеиназ из плазмы крови через ретикулоэндотелиальную систему, имеет тенденцию к некоторому снижению, которое держится в течение всего периода болезни, но не достигает уровня статистической значимости.

Известно, что при воспалительных заболеваниях ускорение метаболизма системы ингибиторов протеиназ и повышение их концентрации в крови объясняется действием самих протеиназ. Так, например, ускорение метаболизма кислотостабильных ингибиторов происходит в результате действия эластазы, трипсина, панкреатического калликреина на интер-ингибитор трипсина [6, 7]. В нашей работе показано, что α_1 -антитрипсин увеличивается чаще и в большей степени у больных с затяжным течением пневмонии, чем при остroteкущих пневмониях. Поскольку увеличение концентрации ингибиторов протеолиза является ответной реакцией на появление избытка протеиназ, постольку высокие цифры ингибитора являются указанием не только на хорошо функционирующую защитную реакцию системы ингибиторов, но также информацией о значительном избытке протеиназ в очаге воспаления, способном вызвать допол-

Таблица 3
Содержание α_2 -макроглобулинов у больных остroteкущей и затяжной пневмонией в динамике заболевания (в ИЕ/мл)

Группа обследуемых	Декада болезни			
	1-я	2-я	3-я	4-я
Здоровые лица	5,33±0,7			
Больные пневмонией:				
острое течение	4,7±0,65	5,0±1,2	4,8±1,1	4,5±0,8
затяжное »	5,0±0,8	5,1±0,5	4,9±0,7	5,3±0,5

нительное повреждение легочной ткани. Затяжное течение любого воспалительного процесса нередко связано со значительно выраженными альтернативными процессами в очаге воспаления, часто с необратимыми изменениями ткани. Поэтому мы предполагаем, что обнаружение высоких цифр α_1 -антитрипсина в острый период болезни может рассматриваться как один из показателей риска затяжного течения пневмонии наряду с другими клиническими признаками.

Стойкое сохранение увеличения α_1 -антитрипсина коррелирует с длительно сохраняющимися клинико-лабораторными и рентгенологическими признаками остаточных воспалительных явлений в легких. Это обстоятельство также допустимо использовать в качестве показателя скрыто протекающего воспалительного процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гембицкая Т. Е. // Тер. арх. — 1984. — № 3. — С. 70—73.
2. Мешалкин Е. Н., Сергиевский В. С., Сувернев А. В., Глейм Г. К. Трипсинемия в реакциях организма на повреждение. — Новосибирск, 1982. — С. 1—67.
3. Мосолов В. В. Протеолитические ферменты. — М., 1971. — С. 276—283.
4. Мосолов В. В. // Баховские чтения. — М., 1983. — № 36. — С. 30—31.
5. Нартикова В. Ф., Пасхина Т. С. // Вопр. мед. химии. — 1979. — № 4. — С. 494—495.

6. Оглоблина О. Г. // Биохимия. — 1982. — Т. 47. — № 10. — С. 1587—1599.
7. Оглоблина О. Г., Платонова Л. В., Мяникова Л. В. и др. // Вопр. мед. химии. — 1980. — № 3. — С. 387—390.
8. Селиванова К. Ф., Корниенко Н. В. // Казан. мед. журн. — 1977. — № 2. — С. 18—20.
9. Сыновец А. С., Левицкий А. П. Ингибиторы протеолитических ферментов в медицине. — Киев, 1979. — С. 3—21.
10. Финогенова Л. Г., Разин А. С., Шевелев В. Н. // Сов. мед. — 1981. — № 11. — С. 97—97.
11. Eriksson S. // Acta med. scand. — 1977. — Suppl. 432. — P. 1—85.
12. Kueppers F., Bearn A. G. // Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.). — 1966. — Vol. 121. — P. 1207—1209.
13. Talamo R. G., Blennerhassett J. B., Austen K. F. // New. Eng. J. Med. — 1966. — Vol. 275. — P. 1301—1304.

Поступила 06.02.86

DYNAMICS OF α_1 -ANTITRYPSIN AND α_2 -MACROGLOBULIN IN PATIENTS WITH ACUTE AND CHRONIC PNEUMONIA

S. I. Komar, E. N. Korobeynikova

Medical School, Chelyabinsk

Content of α_1 -antitrypsin and α_2 -macroglobulin was studied in blood serum of patients with acute and chronic forms of pneumonia. Within the first decade of the disease α_1 -antitrypsin was more distinctly increased in the patients with chronic pneumonia. Stable elevation of α_1 -antitrypsin correlated with long-term presence of the inflammation symptoms. Content of α_2 -macroglobulin was slightly decreased during the disease.

УДК 616.33-006.6-07:616.153.96-074

В. М. Соркин, С. Н. Борисенко, Г. А. Касимова ФУКОЗИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПРИ РАКЕ ЖЕЛУДКА

Кафедра онкологии и кафедра биохимии Крымского медицинского института, Симферополь

В литературе имеются данные о том, что малигнизация клеток возникает в результате химических изменений клеточных мембран, специфические нарушения структуры которых приводят к отклонениям в составе гликопротеидов и гликолипидов клеточной поверхности. Ряд авторов указывает на экспрессирование фуколипидов и фукопептидов поверхностных мембран клетки в процессе злокачественной трансформации [7]. Так, например, в гликоконъюгатах плазматической мембраны клеток аденокарциномы толстой кишки обнаружена не-

обычная фукозильная связь, которая характерна для межклеточных взаимодействий в раннем эмбриональном периоде, но отсутствует в неопухлевых клетках зрелого организма [6]. Известно, что малигнизированные клетки обладают способностью «сбрасывать» в кровотоки связанные с их поверхностными мембранами вещества [1, 5]. Так, появление фукозосодержащих структур на поверхности опухолевых клеток может служить, по-видимому, одной из причин повышения содержания фукозы в сыворотке крови больных раком. Кроме того, установ-

лено, что при раке желудка, печени и гениталий содержание фукозы возрастает также в составе сывороточного альбумина, в то время как для неопухолевого патологического процесса это нехарактерно [3]. Известно, что в сыворотке крови здорового человека фукоза содержится преимущественно в белках глобулиновых фракций, а при опухолевом росте появляется в значительных количествах в сывороточном альбумине. Представляет определенный интерес использование этой особенности в диагностических целях, в частности для диагностики рака желудка.

С этой целью в настоящей работе было проведено сравнительное исследование общего содержания фукозы в сыворотке крови, а также в составе сывороточных альбумина и глобулинов здоровых людей и пациентов с различной патологией желудка.

Методика

Исследована сыворотка крови 27 практически здоровых доноров, 19 больных хроническими атрофическими гастритами, 71 больного раком желудка разных стадий, находившихся на лечении в Крымском областном онкологическом диспансере (1983—1985 гг.). Обследованию подвергнуты лица в возрасте от 40 до 70 лет (68 мужчин и 49 женщин). Диагнозы были подтверждены при патогистологическом исследовании биопсийного и операционного материалов. Сывороточные альбумин и глобулины получали методом препаративного электрофореза в 7% ПААГ. Содержание фукозы в сыворотке крови и в препаратах сывороточных белков определяли описанным методом [3], измеряя оптическую плотность на спектрофотометре СФ-16 при 396 и 427 нм. Содержание фукозы в сыворотке крови выражали в миллиграммах на 1 л, в сывороточном альбумине — в молях фукозы на 1 моль белка и в микрограммах на 1 г белка, в сывороточных глобулинах — в микрограммах на 1 г белка.

Содержание белка в сыворотке крови измеряли биуретовым методом, в белковых препаратах — микробиуретовым методом [2]. Процентное содержание белковых фракций сыворотки крови определяли на основании электрофоретического разделения на бумаге с использованием вероналового буфера с pH 8,6 [4]. Используя данные в содержании фукозы в альбумине и глобулинах, выраженные в микрограммах на 1 г белка, рассчитывали концентрацию связанного с фукозой белка каждой фракции, выражая в микрограммах на 1 л сыворотки крови. Для дальнейшего расчета соотношения фукозилированных белков во фракциях сыворотки крови, сумму фукозилированного альбумина и фукозилированных глобулинов принимали за 100%. Расчет проводили по формулам:

$$фА = \frac{[ОБ \cdot А \cdot Фа]}{100} \text{ и } фГ = \frac{ОБ \cdot Г \cdot Фг}{100},$$

где фА — фукозилированный сывороточный альбумин (в мкг на 1 л сыворотки крови), фГ — фукозилированные сывороточные глобулины (в мкг на 1 л сыворотки крови), ОБ — общий белок сыворотки крови (в г/л), А — содержание альбумина в сыворотке крови (в отн. %), Г — содержание глобулинов в сыворотке крови (в отн. %), Фа — содержание фукозы в препарате альбумина (в мкг на 1 г белка), Фг — содержание фукозы в препарате глобулинов (в мкг на 1 г белка).

Результаты и обсуждение

Содержание фукозы в сыворотке крови практически здоровых людей составило в среднем 69,1 мг/л. Оно не зависело от возраста и пола и ни в одном случае не превышало 80 мг/л. Как видно из табл. 1, развитие патологического процесса в желудке вызывало возрастание концентрации фукозы в сыворотке крови в зависимости от характера и тяжести заболевания и было особенно характерным в случаях распространенного рака желудка.

Таким образом, при ранних формах рака желудка показатели содержания

Таблица 1

Содержание фукозы в сыворотке крови и альбумине здоровых и больных людей

Объект исследования	Содержание фукозы в сыворотке, мг/л	Содержание фукозы в альбумине, моль/моль
Доноры	69,1±5,4 (24)	0,43±0,02 (24)
Хронический гастрит	97,5±18,2 (19) $p_1 < 0,01$	0,53±0,13 (18) $p_1 < 0,01$
Рак желудка I и II стадий	115,4±18,3 (16) $p_2 < 0,05$	0,91±0,18 (18) $p_2 < 0,01$
Рак желудка III стадий	172±20,9 (30) $p_3 < 0,01$	1,42±0,29 (28) $p_3 < 0,01$
Рак желудка IV стадий	202±28,1 (25) $p_4 < 0,05$	1,51±0,33 (25) $p_4 > 0,5$

Примечание. Здесь и в табл. 2 в скобках — число обследованных; p_1 — различие по сравнению с донорами, p_2 — по сравнению с хроническим гастритом, p_3 — по сравнению с раком желудка I и II стадий, p_4 — по сравнению с раком желудка IV стадий.

Таблица 2

Соотношение фукозилированных белковых фракций сыворотки крови здоровых и больных людей (в %)

Объект исследования	Фукозилиро- ванный аль- бумин	Фукозилиро- ванные гло- булины
Доноры (16)	26,3±2,9	73,7±2,9
Хронический гастрит (8)	33,6±9,6	66,4±9,8 $p_1 < 0,05$
Рак желудка (18)	46,7±9,8	53,3±9,8 $p_2 < 0,01$

фукозы в сыворотке крови, по-видимому, мало пригодны для использования в диагностических центрах. В то же время наиболее высокие уровни фукозы в сыворотке крови наблюдаются в случае обширных и распространенных опухолевых процессов в желудке и могут быть применены для оценки распространенности рака желудка в дооперационном периоде.

Более четкая зависимость между содержанием фукозы и стадиями опухолевого процесса была получена при исследовании содержания фукозы в составе сывороточного альбумина (см. табл. 1). Полученные данные показывают, что наиболее низкий уровень фукозы в альбумине отмечен в группе доноров — 0,43 моль/моль. У лиц с хроническим гастритом выявлено статистически достоверное повышение концентрации альбуминсвязанной фукозы до 0,53 моль/моль.

Развитие злокачественной опухоли в желудке вызывает резкое возрастание содержания фукозы в составе альбумина сыворотки крови. Среди всех больных раком желудка разных стадий (71 человек) только у 9 пациентов (12,6 %) содержание фукозы в составе сывороточного альбумина не превышало соответствующей величины в альбумине здоровых лиц и больных хроническим гастритом. Уже в начальных стадиях развития опухоли в желудке, при заболевании I и II стадий, концентрация связанной с альбумином фукозы повышалась вдвое и достигала 0,91 моль/моль. При дальнейшем распространении опухоли содержание фукозы в альбумине возрастало еще более значительно и составляло 1,42 и 1,51 моль/моль при III и IV стадиях рака желудка соответственно. В то же время не выявлено достоверного различия в содержании

альбуминсвязанной фукозы между пациентами с III и IV стадиями рака.

Таким образом, возрастание уровня альбуминсвязанной фукозы происходит уже на предраковой стадии развития опухоли в желудке и особенно характерно при I и II стадиях заболевания, что может быть использовано в целях ранней диагностики этой патологии.

Результаты исследования содержания фукозы в белковых фракциях сыворотки крови представлены в табл. 2. Как видно, содержание связанных с фукозой белков сыворотки крови изменяется в зависимости от характера патологического процесса в желудке. В сыворотке крови доноров с фукозой связано всего 26,3 % сывороточного альбумина, в то время как среди белков глобулиновых фракций фукозилировано 73,7 %. Развитие патологического процесса в желудке приводит к возрастанию концентрации содержащего фукозу альбумина и снижению доли фукозилированных белков глобулиновых фракций. Так, при хроническом гастрите наблюдается фукозилирование 33,6 % альбумина, а при раке желудка 46,7 % молекул сывороточного альбумина связаны с фукозой. В то же время при хроническом гастрите наблюдается снижение доли содержащих фукозу глобулинов (66,4 % по сравнению с 73,7 % у доноров). При раке желудка происходит еще более значительное снижение содержания фукозилированных глобулинов, в результате чего в сыворотке крови этих больных с фукозой связано примерно равное количество белков альбуминовой и глобулиновых фракций — 46,7 и 53,3 % соответственно.

Анализ полученных данных позволяет сделать вывод о том, что в процессе развития опухоли в желудке наряду с повышением общего содержания фукозы в сыворотке крови происходит фукозилирование сывороточного альбумина с одновременным снижением доли связанных с фукозой белков глобулиновых фракций. Изучение содержания фукозы в сывороточном альбумине и в сыворотке крови с целью диагностики рака желудка показало, что содержание фукозы в сыворотке крови больных достоверно возрастает в более поздних, особенно в запущенных, стадиях заболевания, в то время как в составе сывороточного

альбумина фукоза появляется уже на начальных стадиях развития опухоли, т. е. значительно раньше, чем в сыворотке крови. Полученные данные недостаточны для обсуждения вопроса о роли фукозы в организме при опухолевом росте, однако позволяют высказать предположение, что фукозилирование альбумина, по-видимому, является защитной реакцией организма, ведущей к удалению избыточного количества фукозы, «сбрасываемой» с поверхности подвергшихся злокачественной трансформации клеток в сыворотку крови.

Определение содержания фукозы в сыворотке крови, а также в составе сывороточного альбумина наряду с другими методами исследования может быть использовано в процессе отбора лиц с повышенным онкологическим риском, как дифференциально-диагностический тест в ранней диагностике рака желудка и для определения распространенности опухолевого процесса в дооперационном периоде.

Авторы считают своим долгом выразить благодарность член-корр. АН УССР Г. В. Троицкому за постановку задачи исследования и помощь при обсуждении его результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бассалык Л. С., Новиков А. М., Соколова В. Д., Сорокин Е. Н. // *Вопр. мед. химии.* — 1984. — № 3. — С. 124.
2. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. — М., 1971. — С. 309—311.
3. Троицкий Г. В., Багдасарьян С. Н. // *Бюл. экспер. биол.* — 1981. — № 11. — С. 586.
4. Троицкий Г. В. // *Электрофорез белков.* — Харьков, 1962. — С. 262—270.
5. Nordquist R. E., Anglin I. N., Lerner M. O. // *Brit. J. Cancer.* — 1978. — Vol. 37. — P. 776.
6. Miyauchi T., Yonezawa S., Takamura T. et al. // *Nature.* — 1982. — Vol. 299. — P. 168.
7. Richards C. S., Medina D., Butel J. S., Steiner M. R. // *Cancer Res.* — 1981. — Vol. 41. — P. 4967.

Поступила 06.02.86

FUCOSYLATION OF BLOOD SERUM PROTEINS IN STOMACH CANCER

V. M. Sorkin, S. N. Borisenko, G. A. Kasymova
Crimean Medical School, Simpheropol

Content of fucose and of fucosylated protein fractions was studied in blood serum of healthy donors as well as in blood serum of patients with chronic gastritis and with stomach cancer. Concentration of fucose was increased in blood serum under conditions of the tumor generalization. At the same time, content of fucosylated albumin was elevated within early steps of stomach cancer, while the content of fucosylated globulins was decreased. Estimation of albumin-bound fucose might be used in diagnosis of stomach cancer.

УДК 616.379-008.64-092.9-06:616.153.455-008.64-07:616.153.96-074

Н. В. Пушкина, И. Е. Цыбульский, А. И. Лукаш

АМИДИРОВАННОСТЬ БЕЛКОВ КРОВИ В УСЛОВИЯХ ГИПЕРГЛИКЕМИИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Кафедра биохимии и биотехнологии Ростовского университета им. М. А. Суслова

При сахарном диабете обнаружены многосторонние нарушения метаболизма, в том числе белкового [14, 19]. Патогенез сахарного диабета имеет определенное сходство с нарушениями метаболизма при старении. Для них характерны некоторые общие признаки: нарушение обеспеченности инсулином (часто из-за снижения его биологической активности), повышение уровня аутоантител, патологические изменения биоструктур на молекулярном уровне. Замедленная утилизация глюкозы при диабете и часто наблюдаемое в старости снижение толерантности к глюкозе вызывают повышенное в течение длительного времени

содержание глюкозы в крови, что определяет такие постсинтетические модификации белков, как неферментативное гликозилирование и ковалентное сшивание гликозилированных белковых молекул [18].

Другим процессом модификации белков при старении является пепферментативное дезамидирование аминокислотных остатков аспарагина и глутамина [6], изменяющее физико-химические свойства и функциональную активность белковых молекул [3]. В экспериментах *in vitro* показана взаимосвязь между процессами неферментативного гликозилирования и дезамидирования [8]. Это дало основание пред-

положить наличие такой взаимосвязи при гипергликемии, вызванной сахарным диабетом.

Задачей настоящего исследования явилось изучение амидированности альбумина и гемоглобина в условиях гипергликемии аллоксанового диабета.

Методика

Свежеприготовленный раствор аллоксана вводили подкожно в дозе 200 мг на 1 кг массы белым крысам, не получавшим пищи в течение 24 ч. На 15-е сутки после введения определяли уровень глюкозы в крови О-толуидиновым методом и в случае нормального содержания глюкозы инъекции повторяли. Контролем служили животные, инъецированные физиологическим раствором.

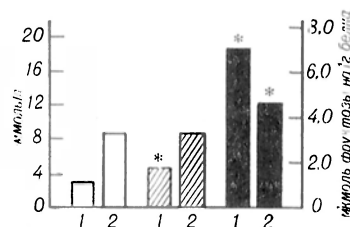
Для контроля за глубиной развившегося заболевания определяли содержание гликозилированного гемоглобина (Hb A₁) усовершенствованным колориметрическим методом [17]. К 1 мл гемолизата отмытых в физиологическом растворе эритроцитов, содержащего 10 мг гемоглобина (или стандарта фруктозы), добавляли 1 мл 0,5 М раствора щавелевой кислоты и инкубировали в автоклаве 60 мин при 124 °С. Белок осаждали ТХУ. В надосадочной жидкости определяли количество 5-оксиметилфурфурола (образуется из остатков глюкозы гликозилированного белка в кислой среде при 124 °С) характерной реакцией с тиобарбитуровой кислотой. Результаты выражали в микромолях фруктозы на 1 г белка.

Альбумин из осажденных ТХУ белков сыворотки крови экстрагировали этанолом [20]. Диск-электрофорезом в полиакриламидном геле [4] показана достаточная чистота полученных препаратов альбумина, содержавших 82 % альбумина мономерной формы и незначительное количество его димеров.

Из спиртовых экстрактов сывороточного альбумина и гемолизатов эритроцитов, которые содержат 98 % гемоглобина, белки осаждали добавлением ТХУ, очищали органическими растворителями и использовали для определения суммарной амидированности (САГ), а также фракций легкогидролизуемых (ЛАГ) и трудногидролизуемых (ТАГ) амидных групп [7].

Результаты и обсуждение

Модель сахарного диабета, полученная в нашем эксперименте, позволила исследовать амидированность и гликозилирование белков крови в условиях продолжительной инсулиновой недостаточности и гипергликемии. После инъекций аллоксана были отобраны крысы с четкими признаками диабета (экспериментальная группа животных). Уровень глюкозы в крови этих животных поднялся до 14,7–25,0 ммоль/л против 3,6 ммоль/л в контрольной группе и в среднем превысил контрольный уровень в 5 раз (см. ри-



Содержание глюкозы (1) и гликозилированного гемоглобина (2) при введении аллоксана крысам.

Светлые столбики — контрольные животные; заштрихованные — резистентные к аллоксану; темные — животные с развившимся диабетом; звездочкой отмечены изменения, статистически достоверные по отношению к группе контрольных животных ($p < 0.001$). По осям ординат: слева — содержание глюкозы в крови, ммоль/л; справа — содержание HbA₁, ммоль фруктозы на 1 г белка.

сунок). Животных с неразвившимся сахарным диабетом (резистентных к аллоксану) использовали для доказательства отсутствия непосредственного влияния аллоксана на исследуемые показатели амидированности.

Количество Hb A₁ в крови резистентных к аллоксану крыс практически не отличалось от содержания гликозилированного гемоглобина в контрольной группе ($p > 0.1$). Напротив, уровень гликозилирования гемоглобина у животных с высоким содержанием глюкозы на 41,7 % превысил концентрацию Hb A₁ в крови контрольных и резистентных к аллоксану крыс. Следовательно, повышенное содержание гликозилированного гемоглобина свидетельствует о стабильно высоком уровне глюкозы в крови животных экспериментальной группы в течение продолжительного времени, что является надежным показателем развившегося диабета.

Общая амидированность, а также содержание фракций ЛАГ и ТАГ в альбумине заболевших диабетом и резистентных к аллоксану крыс статистически достоверно не отличаются от амидированности альбумина контрольных животных (см. таблицу) и соответствуют данным литературы по содержанию амидов в молекуле альбумина [13].

Степень и характер амидированности гемоглобина животных с неразвившимся диабетом также не отличаются от показателей амидированности гемоглобина в контроле (см. таблицу). Однако содержание САГ, ЛАГ и ТАГ в гемоглобине заболевших диабетом крыс оказалось соответственно

Амидированность альбумина и гемоглобина при введении аллоксана крысам (в мкмольях амидного азота на 1 г белка)

Содержание амидов в белках		Группа животных		
		контрольные (n = 12)	резистентные (n = 7)	с диабетом (n = 5)
Альбумин	САГ	582 ± 8,30	578 ± 12,70	574 ± 12,71
	ЛАГ	232 ± 3,47	236 ± 5,24	234 ± 3,84
	ТАГ	349 ± 9,22	341 ± 12,46	341 ± 15,04
Гемоглобин	САГ	460 ± 5,01	460 ± 8,51	399 ± 4,03*
	ЛАГ	173 ± 2,96	165 ± 4,03	142 ± 3,11*
	ТАГ	287 ± 5,64	296 ± 11,42	257 ± 4,93*

Примечание. В скобках — число животных. Звездочкой отмечено $p < 0,01$ по отношению к контролю.

на 13,1, 17,6 и 10,4 % ниже, чем в гемоглобине животных контрольной группы.

Расчет количества молей амидов на 1 моль белка показал, что из 29,9 моля амидных групп молекула гемоглобина теряет вследствие развития диабета приблизительно 4 моля, из них 2 моля — легкогидролизуемых. Следовательно, вклад обеих фракций амидных групп в процесс изменения амидированности гемоглобина приблизительно одинаков, но относительное снижение количества ЛАГ в 1,7 раза превосходит уменьшение ТАГ вследствие их различных уровней в контроле.

Деаминация амидов гемоглобина не может быть следствием общей интоксикации организма при отравлении аллоксаном. Об этом свидетельствует одинаковый уровень амидированности этих белков в группе контрольных и резистентных к аллоксану животных. По-видимому, существенно повышенный уровень глюкозы в крови больных диабетом животных является основной причиной ускоренного деаминации гемоглобина.

Вероятно, неоднозначность изменений амидированности белков возникает по причине существенных различий во времени жизни альбумина и гемоглобина. Время полужизни альбумина составляет 19 сут [15], продолжительность функционирования гемоглобина сравнима со временем жизни самой эритроцитарной клетки [5]. До выделения белков состояние диабета у животных в эксперименте поддерживалось в течение 1,5—2 мес. Этого времени достаточно для существенного обновления альбумина и только около $1/2$ молекул гемоглобина. Процесс неферментативного деаминации в

физиологических условиях протекает сравнительно медленно (при деаминации γ -глобулина период «полужизни» аспарагина равен 36 дням, глутамина — 65 дням [2]). Следовательно, более продолжительное время жизни гемоглобина в условиях гипергликемии нашего эксперимента способствует его неферментативному деаминации.

Не исключена возможность аналогичного ускорения деаминации и амидов альбумина. Однако при этом неизбежно повышается чувствительность деаминации альбумина к сывороточным протеиназам и скорость его выведения из кровяного русла [1]. Можно также предположить включение иммунологической системы в ускорение деаминации альбумина, который, вероятно, может инициировать синтез аутоантител. Эритроцитарный гемоглобин, напротив, недоступен действию сывороточных протеиназ и антител, его разрушение происходит совместно с эритроцитами после завершения их жизненного цикла [5].

Нарушения метаболизма и биоструктур при диабете, аналогичные наблюдаемым при старении, рассматриваются как признаки ускоренного старения больных диабетом [19]. Биологический возраст больных сахарным диабетом выше, чем их здоровых ровесников, а продолжительность жизни — на несколько лет меньше. В основе многих характерных для диабета нарушений, по мнению некоторых авторов [11, 18], лежит ускоренное старение коллагена, связанное с его гликозилизацией и накоплением поперечных ковалентных сшивок. В связи с этим особый интерес представляют эксперименты, продемонстрировав-

шие ускоренное «старение» коллагена и РНКазы *in vitro* в присутствии глюкозы [10, 14].

Реакция неферментативного дезамидирования амидов в белках также тесно связана с процессами старения на уровне отдельных белков, клеток, тканей и всего организма в целом [6]. Следовательно, дезамидирование остатков аспарагина и глутамина в гемоглобине в условиях гипергликемии можно рассматривать как признак ускоренного «старения» этого белка при диабете.

Другой вопрос, вытекающий из результатов нашего исследования, связан с функциональной характеристикой дезамидированного гемоглобина. Гликозилирование гемоглобина влияет на его сродство к кислороду [16]. Не менее важна роль амидированности в поддержании функциональной активности и свойств многих белков, включая гемоглобин [9]. Вероятно, обнаруженное при диабете дезамидирование аминокислотных остатков амидов в гемоглобине может наряду с гликозилированием изменить сродство гемоглобина к кислороду, что отразится на функции эритроцитов. Подтверждением нашему предположению является показанное *in vivo* дезамидирование остатков аспарагина и глутамина β -цепи Hb A_{1b} [12].

По-видимому, при диабете происходит ускоренное дезамидирование остатков амидов не только в гемоглобине, но и в других, главным образом медленно обновляемых белках, что может отразиться на их свойствах. Таким образом, представляется вероятным участие процесса дезамидирования в патогенезе сахарного диабета.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кизильштейн А. Л., Пушкина Н. В. Влияние дезамидирования сывороточного альбумина на скорость его выведения из организма животных // Рукопись депонир. в ВИНТИ № 5037-83.
2. Кричевская А. А., Лукаш А. И., Пушкина Н. В., Шерстнев К. Б. // *Вопр. мед. химии.* — 1978. — № 2. — С. 160—163.
3. Лукаш А. И., Шепелев А. П., Пушкина Н. В. и др. // Там же. — 1985. — № 4. — С. 104—108.
4. Маурер Г. Диск-электрофорез: Пер. с нем. — М., 1971.
5. Петров В. Н. // Физиология системы крови: Физиология эритропоэза. — Л., 1979. — С. 172—210.

6. Пушкина Н. В. // *Укр. биохим. журн.* 1979. — Т. 51, № 6. — С. 680—683.
7. Пушкина Н. В., Лукаш А. И. // *Изв. Сев.-Кавказ. науч. центра высш. школы: Естеств. науки.* — 1976. — № 2. — С. 95—97.
8. Цыбульский И. Е. Изменение свойств и функций некоторых белков при дезамидировании: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Ростов-н/Д., 1985.
9. Charache S., Fox J., McCurdy P. et al. // *J. clin. Invest.* — 1977. — Vol. 59, N 4. — P. 652—658.
10. Eble A. S., Thorpe S. R., Baynes J. W. // *J. biol. Chem.* — 1983. — Vol. 258, N 15. — P. 9406—9412.
11. Kohn R. R., Hamlin C. R. // *Genetic Effects on Aging* / Ed. D. Bergsma, D. Harrison. — New York, 1978. — P. 387—401.
12. Krishnamoorthy R., Gacon G., Labie D. // *FEBS Lett.* — 1977. — Vol. 77, N 1. — P. 99—101.
13. Meloun B., Moravek L., Kostka V. // *Ibid.* — 1975. — Vol. 58, N 1. — P. 134—137.
14. Monnier V. M., Kohn R. R., Cerami A. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.* — 1984. — Vol. 81, N 2. — P. 583—587.
15. Morgenthaler J. J., Nidegger U. E. // *Int. J. Artif. Organs.* — 1984. — Vol. 7, N 1. — P. 27—34.
16. Oimomi M., Hatanaka H., Ishikawa K. et al. // *Arch. Geront. Geriatr.* — 1984. — Vol. 3, N 1. — P. 59—64.
17. Parker K. M., England J. D., Da Costa J. et al. // *Clin. Chem.* — 1981. — Vol. 27, N 5. — P. 669—672.
18. Pongor S., Ulrich P. C., Bencsath F. A., Cerami A. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.* — 1984. — Vol. 81, N 9. — P. 2684—2688.
19. Schnider S. L., Kohn R. R. // *J. clin. Invest.* — 1981. — Vol. 67, N 6. — P. 1630—1635.
20. Tokuzo I., Chiromu I., Holland F. // *J. Amer. Ass. clin. Chem.* — 1968. — Vol. 14, N 1. — P. 22—30.

Поступила 03.09.86

THE RATE OF BLOOD PROTEINS AMIDATION IN HYPERGLYCEMIA CAUSED BY ALLOXAN DIABETES

N. V. Pushkina, I. E. Tsybulsky, A. I. Lukash

Chair of Biochemistry and Biotechnology, State University, Rostov-on-Don

Rates of amidation of blood serum albumin and hemoglobin was studied in hyperglycemia developed during alloxan diabetes mellitus. Content of glucose in blood of the animals with diabetes exceeded 5.2-fold its level in blood of controls; amount of glycosylated hemoglobin was increased by 41.7 %. Concentration of total, readily and hardly hydrolyzed amide groups was decreased in hemoglobin of the impaired animals by 13.1 %, 17.6 % and 10.4 %, respectively, as compared with control group. The degree of blood serum albumin amidation was not altered. Hyperglycemia, accompanied by glycosylation of proteins, was the most probable cause of accelerated deamidation of hemoglobin. Participation of the protein deamidation in pathogenesis of diabetes mellitus is discussed.

А. А. Болдырев, С. Н. Орлов, И. А. Свинухова, Н. У. Стецюк
**Na, K-АТФаза НАРУЖНОЙ МЕДУЛЛЫ ПОЧКИ СПОНТАННО
 ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС В ОНТОГЕНЕЗЕ**

Кафедра биохимии МГУ им. М. В. Ломоносова

В многочисленных исследованиях обнаружено, что при эссенциальной гипертонии человека и спонтанной гипертонии крыс наблюдаются множественные нарушения функционирования плазматических мембран: изменяется пассивный транспорт одновалентных катионов, ухудшается связывание кальция с внутренней поверхности мембраны. Спектр объектов исследования достаточно широк: эритроциты [6, 15, 18], лимфоциты [7], адипоциты [16], синапсомы и гепатоциты [9], что свидетельствует о всеобъемлющем характере упомянутых нарушений. В таких условиях Na, K-АТФаза — фермент, основная функция которого — поддержание постоянства внутриклеточной среды, должен работать в измененном, компенсирующем режиме. Об участии этого фермента в патогенезе эссенциальной гипертонии свидетельствует и содержание ингибитора Na, K-АТФазы в сыворотке крови больных гипертонией [13].

Учитывая эти данные, а также ключевую роль Na, K-АТФазы почечных нефронов в процессе реабсорбции ионов, а следовательно, и в регуляции уровня почечной экскреции и объема внеклеточной жидкости в организме, мы поставили перед собой задачу сопоставить величины гидролитической активности Na, K-АТФазы медуллярного слоя почки в норме и при патологии по мере ее развития.

Методика

Исследования проводили на самках крыс линии SHR (Spontaneously Hypertensive Rats). В качестве контроля использовали крыс линии KWR (Kyoto—Wistar Rats), соответствующих по полу, массе и возрасту.

Уровень артериального давления у крыс определяли на приборе «Мингограф» фирмы «Siempson» (Япония).

В эксперименте использовали животных трех возрастных групп: 1-ю составили крысы 5—7 нед (предгипертензивная стадия), 2-ю — животные 12—14 нед (стадия стабильной гипертонии), 3-ю — животные 25—27 нед (стадия злокачественного течения гипертонии). Критерием развития гипертенгической болезни слу-

жил уровень артериального давления: давление выше 150 мм рт. ст. у крыс линии SHR является признаком гипертонии.

Фракцию микросом из наружной медуллы почки получали по методу Йоргенсена [11]. Содержание белка оценивали по методу Лоури [12]. Удельную активность препарата определяли по накоплению неорганического фосфата в среде инкубации, содержащей 30 мМ имидазол (pH 7,4 при 37°C), 3 мМ АТФ, 3 мМ MgCl₂, 130 мМ NaCl, 20 мМ KCl. Содержание белка в пробе составляло 20—30 мкг, объем пробы 1 мл, время инкубации 2—3 мин. Содержание Р_i в пробе определяли по методу Ратбуна и Бетлах [17]. Mg-АТФазную активность регистрировали в присутствии 1 мМ убаина. Na, K-АТФазную активность рассчитывали как разность между общей АТФазной и убаиннезависимой АТФазной активностью.

Для оценки состояния липидной фазы мембранных препаратов микросом регистрировали температурную зависимость соотношения флуоресценции эксимерной и мономерной форм (I_3/I_m) гидрофобного зонда пирена. Регистрацию проводили на спектрофлюориметре «Hitachi-512» с термостатируемым кюветным отделением (длина волны возбуждающего света 330 нм, флуоресценцию эксимера и мономера измеряли при 465 и 372 нм соответственно). Состав пробы: 150 мМ KCl, 15 мМ MOPS (3-N-морфолинопропансульфоновая кислота; pH 7,0 при 25°C), 600 мкг белка, 15 мкМ пирен, объем 2 мл.

Сыворотку крови получали после удаления форменных элементов и сгустков крови центрифугированием при 10 000 g в течение 10 мин. Кровь предварительно выдерживали 30 мин при 4°C. Ингибирующее действие сыворотки крови крыс линии SHR и KWR оценивали на очищенных препаратах Na, K-АТФазы из солевых желез утки [1], 20—30 мкг очищенного препарата фермента инкубировали в присутствии 250 мМ сыворотки (объем пробы 1 мл). Содержание белка в сыворотке составляло 50 мг/мл. Реакцию останавливали добавлением 0,5 мл 13 % ТХУ, белок отделяли центрифугированием при 12 000 g в течение 5 мин. Содержание неорганического фосфата в надосадочной жидкости определяли по методу Фiske—Суббароу [10].

Значимость полученных различий в удельных активностях Na, K-АТФазы оценивали по критерию Вилкоксона—Манна—Уитни для независимых малых выборок [4].

Результаты и обсуждение

В предгипертензивной стадии, когда уровень давления у SHR и KWR практически не различается, не обнаруживается разницы и в удельных активностях Na, K-АТФазы микросомальных препаратов почек ($25,4 \pm 3,3$ и

Удельная активность Na, К-АТФазы наружной медуллы почки крыс линий SHR и KWR в разных возрастных группах

Линии крыс	Возраст, нед	Число животных в опыте	Артериальное давление, мм рт. ст.	Выход белка, мг на 1 г ткани	Удельная активность, мкмоль P_i на 1 мг в 1 ч
SHR	5—7	20	131,2±1,8	7,5±0,4	25,4±3,3
KWR	5—7	20	121,0±7,5	8,0±0,2	26,7±3,5
SHR	12—14	12	173,0±5,1	10,7±0,5	42,6±4,4
KWR	12—14	12	94,2±4,5	11,3±0,8	32,8±7,3
SHC	25—27	8	176,3±4,3	3,9±0,4	44,5±5,5
KWC	25—27	8	98,8±4,7	4,3±0,4	26,7±2,5

26,7±3,5 мкмоль P_i на 1 мг белка в 1 ч соответственно). Повышение артериального давления сопровождается увеличением удельной активности Na, К-АТФазы у крыс линии SHR (см. таблицу). На стадии стабильной гипертонии удельная активность фермента в препаратах из почек крыс линии SHR достоверно превышает контрольный уровень ($42,6 \pm 4,4$ и $32,8 \pm 7,3$ мкмоль P_i на 1 мг белка в 1 ч соответственно). В возрасте 25—27 нед (животные 3-й группы) эта разница достигает уже 67 %. Таким образом, у крыс линии SHR обнаружена положительная корреляция между уровнем артериального давления и удельной активностью Na, К-АТФазы наружной медуллы почки. У нормотензивных крыс такой корреляции нет (рис. 1).

Выявленное различие в удельных активностях Na, К-АТФазы из наружной медуллы почек крыс линий SHR и KWR можно объяснить следующими причинами: 1) морфологической гетерогенностью выделяемых фракций; 2) увеличением содержания фермента в мембране; 3) изменением свойств самого фермента; 4) изменениями в его мембранном окружении [2]. Пер-

вое предположение кажется маловероятным. В этом убеждают результаты оценки выхода белка: он одинаков для крыс обеих линий. Снижение выхода белка у крыс 3-й группы, вероятно, является следствием возрастных изменений и не имеет отношения к патогенезу гипертонии, так как происходит в равной степени у подопытных и контрольных животных.

Определение содержания Na, К-АТФазы в мембранных препаратах из наружной медуллы почки крысы затруднено вследствие низкого относительного содержания фермента в этих мембранах. Чтобы оценить роль липидной фазы мембран в модификации ферментативной активности, проведение сравнительное изучение состояния микросомальных мембран в норме и при патологии с помощью флуоресцентного зонда пирена. Измерение эксимеризации пирена в мембранном бислое является надежным способом оценки структурного состояния мембраны, поскольку соотношение флуоресценции эксимерной и мономерной форм прямо пропорционально жидкости мембран [3, 8]. Графики температурной зависимости соотношения флуоресценции эксимера и мономера пирена, представленные в координатах Арениуса (рис. 2), не выявляют значимых различий в состоянии мембран SHR и KWR. Этот результат снижает вероятность участия липидной фазы мембран в модификации свойств фермента и, кроме того, свидетельствует об идентичности микросомальных фракций, получаемых из медуллы крыс обеих линий.

Для характеристики свойств фермента в норме и при патологии проведено сравнение температурных зависимостей активности Na, К-АТФазы крыс линий SHR и KWR. Вид температурной зависимости активности фермента у крыс обеих линий в интерва-

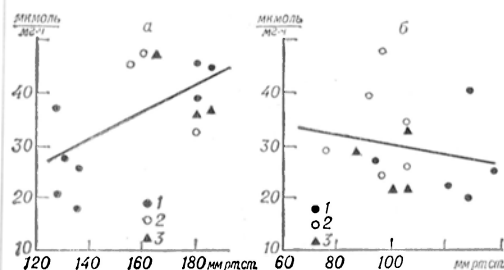


Рис. 1. Корреляция между высотой артериального давления и удельной активностью Na, К-АТФазы (в мкмоль/мг·ч).

а — линия SHR (коэффициент корреляции $r=0,613$); б — линия KWR (коэффициент корреляции $r=-0,226$); 1—3 — животные 1—3-й групп соответственно.

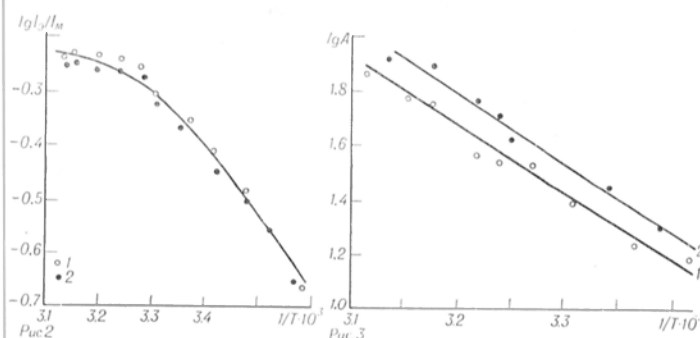


Рис. 2. Температурная зависимость микровязкости микросом наружной медуллы почки крыс линии KWR (1) и SHR (2), измеренная по степени эксимеризации пирена (I_0/I_n).

Рис. 3. Зависимость удельной активности Na, К-АТФазы наружной медуллы почки от температуры.

1 — крысы линии KWR, 2 — крысы линии SHR.

ле от 20 до 50°C не различается (рис. 3). Наклон прямых в обоих случаях одинаков, значение кажущейся энергии активации составляет $48 \pm 0,7$ кДж/моль. С учетом всех ограничений трактовки подобных графиков данный результат можно рассматривать как свидетельство того, что молекулярные свойства самого белка Na, К-АТФазы в норме и при гипертензии не различаются. По-видимому, повышение удельной активности фермента связано с увеличением его относительного содержания в мембране.

Этот вывод хорошо согласуется с другим фактом, полученным в данной работе. Инкубация очищенного препарата Na, К-АТФазы из солевых желез утки в присутствии сыворотки крови гипертензивных крыс снижает активность фермента до 34 % от исходной, в то время как сыворотка крови контрольных крыс — лишь до 64 %. Ингибирующий эффект сыворотки крови животных и людей на Na, К-АТФазу связан с наличием в крови эндогенного ингибитора этого фермента, содержание которого, по данным ряда авторов, увеличивается при гипертензии [5, 13].

В целом можно представить следующую картину. Генетически обусловленные изменения, приводящие к развитию гипертонической болезни, обуславливают увеличение продукции эндогенных ингибиторов Na, К-АТФазы, циркулирующих в крови. В почечной ткани ингибирование этого фермента вызывает компенсаторное увеличение синтеза дополнительных молекул Na, К-АТФазы. Однако, по-видимому, и в этих условиях Na, К-АТФаза почечной ткани с трудом справляется со своей функцией. Если учесть, что активность мембранного препарата Na, К-АТФазы в присутствии сыворотки крови крыс линии SHR в 1,9 раза ниже, чем тако-

вая в присутствии сыворотки животных KWR, а удельная активность Na, К-АТФазы почек крыс линии SHR превышает таковую животных KWR в 1,3 раза (2-я группа) и 1,7 раза (3-я группа), то можно предположить, что *in vivo* активность Na, К-АТФазы почек животных KWR будет превышать уровень таковой крыс у SHR. К аналогичным выводам пришли и авторы, изучавшие активность Na, К-АТФазы гладких мышц сосудов *in vivo* и *in vitro* [14].

Таким образом, можно считать, что Na, К-АТФаза почечной ткани не является мишенью действия ингибитора, увеличение продукции которого характерно для развития гипертензии. Однако действие его на Na, К-АТФазу других тканей, в частности гладкомышечных клеток сосудов, вызовет увеличение в этих клетках содержания Na и активацию Na/Ca-обмена. Такая последовательность процессов может привести к возрастанию уровня Ca^{2+} в гладкомышечных клетках и к стойкому возрастанию тонуса гладкомышечных клеток, приводящему к сужению сосудистого русла [13].

ЛИТЕРАТУРА

1. Болдырев А. А., Лопина О. Д., Свинухова И. А. // Биохимия. — 1981. — Т. 46, № 8. — С. 1519—1525.
2. Болдырев А. А., Лопина О. Д., Прокопьева В. Д. // Нейрохимия. — 1985. — Т. 4, № 1. — С. 80—95.
3. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. — М., 1980.
4. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. — Л., 1973.
5. Лопина О. Д., Рогаева Б. А., Александров А. А., Перова Н. В. // Проблемы современной биохимии и биотехнологии. — Рига, 1985. — С. 108.

6. Постнов Ю. В., Орлов С. Н., Шевченко А. С. // Кардиология. — 1975. — № 10. — С. 88—91.
7. Ambrosiani E., Tartagni F., Montebygnoli L., Magnani B. // Clin. Sci. — 1979. — Vol. 57. — P. 325—327.
8. Boldyrev A. A., Lopina O. D., Prokopjeva B. D. // Biochem. int. — 1984. — Vol. 7. — P. 851—859.
9. Devynk M. A. // Clin. exp. Hypertens. — 1981. — Vol. 3. — P. 797—808.
10. Fiske C. H., Subbarow J. // J. biol. Chem. — 1925. — Vol. 66. — P. 375.
11. Jorgensen P. L. // Biochim. biophys. Acta. — 1974. — Vol. 356. — P. 36—52.
12. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
13. MacGregor G. A., de Wardener H. E. // Topics in Pathophysiology of Hypertension. — Boston, 1984. — P. 258—260.
14. Overbeck H. W. // Ibid. — P. 196—209.
15. Postnov Yu. V., Orlov S. N., Shevchenko A. N., Adler A. M. // Pflügers Arch. — 1977. — Vol. 371. — P. 263—269.
16. Postnov Yu. V., Orlov S. N. // Ibid. — 1980. — Vol. 385. — P. 85—89.
17. Rathbun W., Betach V. // Analyt. Biochem. — 1969. — Vol. 28. — P. 436.
18. Tobian L., Binion J. T. // Circulation. — 1952. — Vol. 5. — P. 754—758.

Поступила 10.02.86

Na,K-ATPase FROM OUTER KIDNEY MEDULLA OF SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS IN ONTOGENESIS

A. A. Boldyrev, S. N. Orlov, I. A. Svinukhova, N. U. Stetsyuk

Chair of Biochemistry, M. V. Lomonosov State University, Moscow

Specific activity of Na,K-ATPase from kidney outer medulla microsomes of spontaneously hypertensive rats (SHR) and of normotensive Kyoto-Wistar rats (WKY) at different stages of ontogenesis was studied. A positive correlation was observed between the blood pressure level and specific Na,K-ATPase activity in SHR kidney medulla. At the malignant stage of the disease, the specific activity of Na,K-ATPase exceeded that of control by 67 %. The inhibiting effect of blood serum from SHR on purified preparations of Na,K-ATPase was far more pronounced than that of WKY.

УДК 617.713-002-022:578.832.1/-07:616.155.32-008.931:577.152.1]-074

Ю. А. Петрович, Н. А. Терехина, Н. Г. Гольдфельд **АКТИВНОСТЬ ОКСИДОРЕДУКТАЗ ЛИМФОЦИТОВ** **ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ГЕРПЕТИЧЕСКИМ** **КЕРАТИТОМ**

Кафедра биохимии Московского медицинского стоматологического института и кафедры биохимии и глазных болезней Пермского медицинского института

Среди вирусных заболеваний поражения вирусом простого герпеса (ВПГ) по частоте и тяжести осложнений занимают 2-е место после гриппа. Около 90 % населения поражено ВПГ, преимущественно в латентной форме. Ежегодно в СССР регистрируется 300 000—500 000 больных офтальмогерпесом (ОГ) [4].

В тканях герпесинфицированного глаза обмен веществ перестраивается в связи с реализацией генетической информации вируса [6].

Известно, что при острой герпетической инфекции с вирусемией лимфоциты периферической крови содержат ВПГ [15, 17, 21, 23]. Лимфоциты служат важным звеном в иммунной реакции организма при ОГ. Однако в литературе отсутствуют данные об активности ферментов лимфоцитов и сыворотки крови при герпетическом кератите.

Целью работы явилось исследование активности ряда оксидоредуктаз в

лимфоцитах периферической крови больных герпетическим кератитом в период обострения инфекции.

Методика

Кровь получали из локтевой вены у 43 больных герпетическим кератитом и у 55 здоровых лиц. Лимфоциты из 4 мл крови выделяли в градиенте плотности фиколла—верографина [9]. На спектрофотометре СФ-16 определяли активность глутатионпероксидазы (ГПО), КФ 1.11.1.9) [3]; глутаматдегидрогеназы (ГЛДГ; КФ 1.4.1.3) [20]; малатдегидрогеназы (МДГ; КФ 1.1.1.37) [8]; лактатдегидрогеназы (ЛДГ; КФ 1.1.1.27) [12]; глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ; КФ 1.1.1.49) [14].

Возраст больных колебался от 20 до 67 лет, здоровых — от 18 до 60 лет. Среди больных насчитывалось 12 лиц с герпетической язвой роговицы, 17 с метагерпетическим кератитом с изъязвлением, 14 человек с дисковидным кератитом. Больных обследовали при поступлении в больницу до назначения лечения.

Результаты и обсуждение

Из таблицы видно, что активность 4 оксидоредуктаз в лимфоцитах боль-

Активность оксидоредуктазы в лимфоцитах периферической крови больных герпетическим кератитом (мкмоль/мин на 10^6 клеток)

Фермент	Контроль	Герпетический кератит	Герпетическая язва	Метагерпетический кератит с изъязвлением	Дисковидный кератит без изъязвления
ЛДГ	29,0±2,2	8,5±1,6	9,1±1,5	7,5±1,6	9,0±1,6
МДГ	118,2±4,3	27,9±4,7	18,0±4,5	27,9±3,6	37,8±6,1
ГЛДГ	22,1±1,1	5,5±0,8	5,3±0,6	4,7±0,9	6,5±0,8
Г-6-ФДГ	1,8±0,1	12,4±1,8	17,8±2,5	11,2±1,5	8,3±1,5
ГПО	0,63±0,04	0,07±0,01	0,05±0,008	0,06±0,01	0,10±0,01

Примечание. $p < 0,001$ по отношению к контролю.

ных в период обострения герпетического кератита была достоверно ниже, чем у здоровых лиц ($p < 0,05$ — $0,001$). Особенно резко (в 6—13 раз), снижалась активность ГПО, что позволило предположить снижение антиоксидантной защиты. Активность ГЛДГ и МДГ снижалась в 3—5 раз, а ЛДГ — в 3—4 раза.

В отличие от названных ферментов активность Г-6-ФДГ при обострении офтальмогерпеса в лимфоцитах повышалась в 5—10 раз. Возможно, повышение активности Г-6-ФДГ связано с необходимым увеличением образования пентозофосфатов для синтеза вирусной ДНК.

В связи с тем что герпетическая инфекция у обследованных больных протекала в разных клинических формах, статистически обработанные данные по каждому ферменту проанализированы по клиническим формам герпетического кератита (см. таблицу).

Если активность ГЛДГ и ЛДГ не отличалась достоверно у больных разных групп, то активность Г-6-ФДГ была существенно выше при герпетической язве, чем при метагерпетическом кератите ($p < 0,05$) и при дисковидном кератите без изъязвления ($p < 0,001$).

Активность МДГ и ГПО более резко снизилась при герпетической язве роговицы по сравнению с другими клиническими формами герпетического кератита. Так, активность МДГ при герпетической язве роговицы снизилась в 6,5 раза по сравнению с контролем, при метагерпетическом кератите с изъязвлением — в 4 раза, при дисковидном кератите — в 3 раза. Активность ГПО при герпетической язве роговицы снизилась почти в 13 раз по сравнению с активностью фермента в лимфоцитах крови здоровых лиц, при метагерпетическом кератите — в 10 раз,

при дисковидном кератите — в 6 раз. Различия МДГ и ГПО при герпетической язве и дисковидном кератите без изъязвления достоверны ($p < 0,05$ — $0,01$). Достоверны также отличия ГПО при метагерпетическом кератите и дисковидном кератите ($p < 0,05$).

Переходя к обсуждению, следует отметить, что лимфоциты обладают низкой активностью ЛДГ и Г-6-ФДГ [1, 11]. Активность ЛДГ в Т-лимфоцитах в 2 раза выше, чем в В-лимфоцитах [19]. В Т-лимфоцитах преобладают изоферменты ЛДГ 1 и ЛДГ 3, а в В-лимфоцитах — ЛДГ 5 и ЛДГ 3 [10].

В последние годы выяснена роль лимфоцитов как резервуара ВПГ. В этих клетках ВПГ способен реплицироваться [15—17, 23]. Для своей репликации вирус перестраивает ферментные системы клеток [2, 6, 7]. В предыдущих обзорах имелись указания относительно энзимной перестройки клеток различных органов и тканей при герпетической инфекции [6, 7]. Однако сведений о ферментах лимфоцитов при ОГ в доступной литературе не оказалось. Известно, что лимфоциты транспортируют ВПГ при вирусемии и способствуют персистенции герпетической инфекции в ее латентной фазе [17]. Имеются указания, что латентность ВПГ в известной мере обусловлена нахождением генома вируса преимущественно в узле тройничного нерва [7]. В последнее время успешно проводятся исследования энзимных механизмов острой и латентной инфекции ВПГ.

В зараженной клетке ВПГ индуцирует синтез вирусспецифических энзимов, необходимых для его собственной авторепродукции. Так, в инфицированной ВПГ клетке во много раз увеличивается активность тимидинки-

назы, дезоксицитидинкиназы, тимидилаткиназы, рибонуклеозиддифосфатредуктазы; при этом в клетке синтезируются новые изоферменты перечисленных энзимов, которые отличаются по ряду свойств от их же изоферментов в незараженной клетке [7]. В ядрах инфицированных клеток значительно увеличивается активность вирусспецифического изофермента ДНК-зависимой ДНК-полимеразы, катализирующей репликацию генома ВПГ из дАТФ, дГТФ, дЦТФ и ТТФ. Даже при латентной инфекции ВПГ в узле тройничного нерва выявляются вирусспецифические изоферменты синтеза ДНК ВПГ, которые не обнаруживаются в незараженной клетке [22].

Определенное значение в изменении активности ферментов лимфоцитов при ВПГ-инфекции клетки имеет и участие лимфоцитов в клеточном иммунитете против ВПГ, при подавлении которого наступает рецидив герпетической инфекции [16—18]. Лимфоциты играют определенную роль в ограничении распространения вируса с места инокуляции [5, 17]. Иммуный ответ на ВПГ опосредован Т-лимфоцитами, в которых может персистировать ВПГ [15, 17, 21]. Установлена возможность поражения Т- и В-лимфоцитов при герпетической инфекции со снижением их количества в циркулирующей крови. Дефицит Т-лимфоцитов способствует формированию хронической инфекции [5]. Известно, что Т- и В-лимфоциты человека имеют на своей поверхности рецепторы для герпесвирусов [13].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что оксидоредуктазы лимфоцитов чутко реагируют на герпетическую инфекцию, что позволит воспользоваться их определением в дальнейших изысканиях в плане диагностики, прогноза и лечения ВПГ-инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бельченко Д. И., Голованов С. А., Доманский В. Ю. и др. // *Вопр. химии.* — 1980. — № 2. — С. 236—239.
2. Голубев Д. Б. Ферменты в системах инфицированных вирусами клеток. — Л., 1979.
3. Гуткин Д. В., Петрович Ю. А. // *Бюл. экспер. биол.* — 1982. — № 1. — С. 33—35.
4. Каспаров А. А. // *Всероссийный съезд офтальмологов, 6-й: Тезисы докладов.* — М., 1985. — Т. 6. — С. 3—14.
5. Мальханов В. Б. // *Вестн. офтальмол.* — 1982. — № 2. — С. 38—40.

6. Петрович Ю. А., Терехина Н. А. // *Вопр. вирусол.* — 1977. — № 6. — С. 643—649.
7. Петрович Ю. А., Терехина Н. А. // *Сов. мед.* — 1981. — № 2. — С. 77—81.
8. Bergmeyer H. U., Bernt E. // *Methoden der enzymatischen Analyse.* — Weinheim, 1974. — Bd 1. — S. 649—653.
9. Böyum A. // *Scand. J. clin. lab. Invest.* — 1968. — Suppl. 97.
10. Davis S. // *New Engl. J. med.* — 1981. — Vol. 304. — P. 425—425.
11. Gartler S. M., Hornung S. K., Motulsky A. G. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.* — 1981. — Vol. 78. — P. 1916—1919.
12. Henry R., Chiamori N., Golub O., Berkman S. // *Amer. J. clin. Path.* — 1960. — Vol. 34. — P. 381—389.
13. Johnson D. R., Klein G., Falk I. // *Intervirology.* — 1980. — Vol. 13. — P. 21—27.
14. Kornberg A., Horecher B. // *Meth. Enzymol.* — 1955. — Vol. 1. P. 323—327.
15. Larsen H. S., Feng M., Horohov D. W. et al. // *J. Virol.* — 1984. — Vol. 50. — P. 56—59.
16. Lawman M. J., Rouse B. T., Courteny R. J., Walker R. D. // *Infect. a. Immun.* — 1980. — Vol. 27. — P. 133—139.
17. Lehtinen M. Expression of and Antibody Response to the Herpes Simplex Virus specified Major DNA-Binding Protein in Acute and Chronic Herpes Simplex Virus Infections. — Tampere, 1985.
18. Pelton B. K., Duncan I. B., Denman A. M. // *Nature.* — 1980. — Vol. 284. — P. 176—177.
19. Rambotti P., Davis S. // *Blood.* — 1981. — Vol. 57. — P. 324—327.
20. Schmidt E. // *Methoden der enzymatischen Analyse.* — Weinheim, 1974. — Bd 1. — S. 669—696.
21. Teute H., Baun R., Kirchner H. et al. // *Intervirology.* — 1983. — Vol. 20. — P. 32—41.
22. Yamamoto H., Walz M. A., Notkins A. L. // *Virology.* — 1977. — Vol. 76. — P. 866—869.
23. Westmoreland D. // *J. gen. Virol.* — 1978. — Vol. 40. — P. 559—575.

Поступила 10.02.86

ACTIVITY OF OXIDOREDUCTASES IN LYMPHOCYTES OF PERIPHERIC BLOOD OF PATIENTS WITH HERPETIC KERATITIS

Yu. A. Petrovich, N. A. Teryokhina,
N. G. Goldfeld

Chair of Biochemistry, Medical Stomatological School, Moscow, Chairs of Biochemistry and Eye Diseases, Medical School Perm.

Activities of glutathione peroxidase, lactate-, malate- and glutamate dehydrogenases were decreased, while glucose-6-phosphate dehydrogenase was activated in peripheric blood lymphocytes of patients with herpetic keratitis within the acute period. Alterations in the enzymatic activity were especially distinct in herpetic ulcer of sclera as compared with other clinical forms of herpetic keratitis. As lymphocyte oxidoreductases responded distinctly to herpetic infection, estimation of their activity could be used for diagnosis, prognosis and monitoring of herpes treatment.

И. А. Горошинская, А. А. Ананян, Л. В. Могильницкая, В. С. Шугалей

БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ХОЛОДОВОГО СТРЕССА И АДАПТАЦИИ

Ростовский университет, Ростов-на-Дону

Акклиматизация человека и животных к низкой температуре включает в себя по меньшей мере два функционально различных состояния: холодовой стресс, когда устойчивость к температуре снижена, и холодовую адаптацию, когда резистентность существенно повышается. Важнейшими пусковыми универсальными механизмами в реакции на действие многих экстремальных факторов среды являются усиление свободнорадикальных процессов и повышение интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ), ведущих прежде всего к изменению состояния мембранных структур и модификации свойств мембранных ферментов.

В связи с этим исследованы в процессе холодовой адаптации уровень ПОЛ, активность и каталитические свойства моноаминоксидазы (МАО), фермента наружной мембраны митохондрий, участвующего в функционировании моноаминергических медиаторных систем, активность лизосомальных пептид-гидролаз, ряд биохимических показателей, характеризующих стабильность эритроцитарных мембран.

Методика

Опыты проводили в зимние месяцы (январь—февраль). Животных (взрослых белых крыс) помещали в холодовую камеру при температуре 2°C на срок от 1 до 45 сут (для отдельных показателей — до 60 сут). Контролем служили крысы, взятые из этой же группы и содержащиеся такое же время в условиях вивария при температуре 20—22°C. Интенсивность спонтанного ПОЛ в тканях мозга и печени определяли по уровню малонового диальдегида, как описано ранее [6]. Митохондрии мозга выделяли методом дифференциального центрифугирования [9]. Моноаминоксидазную активность определяли в митохондриальной фракции и надосадочной жидкости, полученной после осаждения митохондрий центрифугированием при 24 000 g в течение 20 мин и содержащей микросомы, лизосомы и растворимые компоненты. Активность МАО типа А (субстраты серотонин и норадреналин), а также дезаминирование глюкозамина, путресцина, гистамина, ГАМК, в норме не являющихся субстратами МАО, определяли по освобождению аммиака после инкубации суспензии мито-

хондрий с одним из субстратов в насыщающей концентрации (для серотонина — 2,5 мМ, для остальных субстратов — 10 мМ). Инкубацию проводили в воздушной среде при 37,5°C и рН 7,45 в течение 30 мин [1]. Содержание аммиака определяли спектрофлуориметрическим методом на флуориметре «Хитачи 650—60» [15] после изотермической отгонки [14]. На основании величины активности фермента при 6 разных концентрациях серотонина вычисляли K_m графическим способом Лайнуивера—Бэрка. Использовали концентрации серотонина от $7,5 \cdot 10^{-5}$ до $2,5 \cdot 10^{-3}$ М. Активность МАО типа Б исследовали колориметрическим методом с использованием в качестве субстрата п-нитрофенилэтиламина [9]. При исследовании влияния хлоргиллина надосадочную жидкость преинкубировали в течение 15 мин при 20°C с ингибитором в концентрации 10^{-6} М.

Фракцию, обогащенную лизосомами, получали центрифугированием при 16 000 g после предварительного осаждения ядер и митохондрий. Активность кислых пептидгидролаз определяли в осадке и надосадочной фракции по возрастанию содержания фоллинположительных кислоторастворимых продуктов протеолиза при инкубации ферментного препарата, как описано ранее [7]. В сыворотке крови определяли суммарную пероксидазную активность (СПА) с субстратом бензидином [11], содержание внеэритроцитарного гемоглобина (ВЭГ) циан-гемоглобиновым методом [5], активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФД) — по скорости образования НАДФ·H₂ в инкубационной пробе при 340 им [2], содержание белка в тканях — модифицированным методом Лоури [13].

Результаты и обсуждение

В начальный период действия холода (1—3-и сутки) имеет место усиление ПОЛ в мозге крыс, достигающее максимума на 3-и сутки холодового воздействия. В переходный период между стрессом и адаптацией (15—30-е сутки) интенсивность ПОЛ в мозге снижается по сравнению со стрессорным периодом, устанавливаясь на уровне контроля к моменту адаптации (45 сут). Сходные изменения в интенсивности ПОЛ наблюдаются и в печени (рис. 1).

Активность МАО типа А (субстраты серотонин и норадреналин) снижается в митохондриальной фракции мозга при 1-суточном действии холода более чем вдвое, при 3-суточном холодовом воздействии снижение актив-

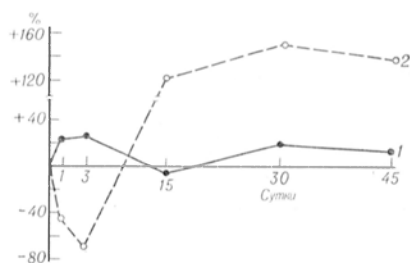


Рис. 1. Изменение содержания малонового диальдегида (1) и отношения кислых пептидгидролаз (2) в обогащенной лизосомами фракции к активности в растворимой фракции в мозге крыс при акклиматизации к холоду (в % к контролю).

Темными кружочками отмечены недостоверные; светлыми — достоверные изменения относительно контроля.

ности на 30 % сопровождается изменением субстратной специфичности (трансформацией) фермента, он приобретает способность дезаминировать глюкозамин, путресцин, гистамин и ГАМК (табл. 1). При адаптации к холоду на 45-е сутки экспозиции активность МАО типа А остается сниженной. В то же время дезаминирование необычных субстратов возвращается к контрольному уровню, т. е. субстратная специфичность фермента нормализуется. Активность МАО типа Б, непосредственно не связанной с обменом медиаторов, не претерпевает существенных изменений при холодовом воздействии.

Поскольку МАО является маркерным ферментом митохондрий, достаточно прочно связанным с фосфолипидными компонентами митохондриальной мембраны, появление ее в надосадочной жидкости свидетельствует о нарушении структуры и проницаемости мембраны митохондрий при холодовом стрессе. Снижение активности

МАО типа А в митохондриальной фракции сопровождается появлением серотонин- и глюкозаминдезаминирующей активности в надосадочной жидкости в условиях холодового стресса (рис. 2). Этот процесс предотвращается ингибитором МАО типа А хлоргилином, что свидетельствует о моноаминоксидажном происхождении поступающей в развернутую фракцию гомогената ферментативной активности. У адаптированных к холоду животных интенсивность дезаминирования серотонина и глюкозамина не отличается от уровня контрольных животных.

В процессе холодовой адаптации имеют место фазные изменения кинетических свойств МАО типа А. У интактных животных K_m реакции дезаминирования серотонина составляет $0,167 \pm 0,023$ мМ, а при 3-суточном холодовом воздействии увеличивается более чем в 2 раза и достигает величины $0,383 \pm 0,059$ мМ ($p < 0,001$). У адаптированных к холоду животных K_m снижается до $0,074 \pm 0,015$ мМ, т. е.

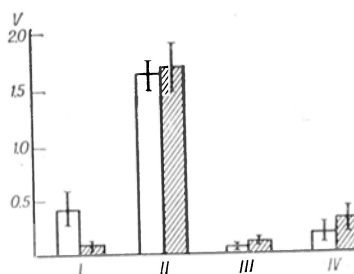


Рис. 2. Дезаминирование азотистых соединений в растворимой фракции гомогената мозга крыс, подвергавшихся воздействию холода.

Светлые столбики — серотонин, заштрихованные — глюкозамин. I — контроль; II — IV — холодовое воздействие 3 сут. 3 сут.+хлоргилин и 45 сут. соответственно. По оси ординат — дезаминирования (нмоль азота аммиака на 1 мг белка в 1 мин).

Таблица 1

Дезаминирование азотистых соединений митохондриями мозга крыс в процессе холодовой акклиматизации (в нмоль азота аммиака на 1 мг белка в 1 мин)

Длительность опыта, сут	Серотонин	Норадреналин	Глюкозамин	Путресцин	Гистамин	ГАМК	п-нитрофениламин
Контроль	$7,17 \pm 0,42$ (12)	$5,46 \pm 0,44$ (13)	$0,54 \pm 0,24$ (13)	$0,57 \pm 0,21$ (13)	$0,54 \pm 0,18$ (12)	$0,22 \pm 0,08$ (13)	$3,43 \pm 0,16$ (14)
1	$3,41 \pm 0,33$ (9)	$2,53 \pm 0,58$ (9)	$1,22 \pm 0,56$ (9)	$0,69 \pm 0,28$ (9)	—	—	$2,96 \pm 0,05$ (9)
3	$4,85 \pm 0,52$ (12)	$3,85 \pm 0,65$ (12)	$4,51 \pm 0,54$ (10)	$1,43 \pm 0,34$ (10)	$2,30 \pm 0,32$ (4)	$1,31 \pm 0,39$ (10)	$3,20 \pm 0,21$ (9)
45	$5,12 \pm 0,50$ (20)	$3,69 \pm 0,30$ (19)	$1,15 \pm 0,37$ (19)	$0,57 \pm 0,15$ (20)	—	$0,55 \pm 0,22$ (16)	$2,79 \pm 0,08$ (17)
p	<0,001	<0,001	>0,05	>0,05	<0,005	<0,01	<0,05
p	<0,01	<0,01	>0,05	>0,05	—	>0,05	<0,001

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

СПА (в ед. на 1 мл), содержание ВЭГ (в мг%) и активность Г-6-ФД (в мкмоль НАДФ·Н₂ на 1 мг белка) сыворотки крови крыс в процессе акклиматизации к холоду

Серия	Контроль	Продолжительность акклиматизации, сут							
		1	3	5	7	15	30	45	60
СПА	3,38±0,21 (13)	6,58±1,03 (9)	6,66±0,88 (10)	3,12±0,27 (9)	4,3±0,33 (8)	5,23±0,52 (13)	3,93±0,29 (10)	2,75±0,21 (22)	3,47±0,33 (10)
<i>p</i>		<0,01	<0,001	>0,1	>0,05	<0,01	>0,1	<0,05	>0,5
ВЭГ	26,71±2,95 (14)	27,04±0,96 (12)	43,91±3,21 (10)	17,01±0,67 (11)	22,59±0,59 (8)	35,36±2,11 (15)	23,88±0,84 (10)	24,69±0,96 (14)	28,21±2,14 (8)
<i>p</i>		>0,1	<0,001	<0,01	>0,1	<0,05	>0,1	>0,1	>0,1
Г-6-ФД	0,072±0,007 (11)	0,121±0,019 (8)	0,283±0,006 (17)	0,07±0,025 (9)	0,068±0,01 (7)	0,22±0,029 (10)	0,156±0,009 (9)	0,147±0,005 (12)	0,173±0,018 (9)
<i>p</i>		<0,02	<0,01	>0,1	>0,1	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

в 2 раза по сравнению с контролем ($p<0,01$) и в 5 раз по сравнению с холодовым стрессом.

Изменение каталитических свойств МАО при холодовом воздействии обусловлено, по-видимому, как конформационными изменениями в структуре фермента, происходящими в результате окисления сульфгидрильных групп МАО липидными перекисями, максимум накопления которых происходит на 3-и сутки, т. е. именно тогда, когда имеет место трансформация фермента, так и выходом МАО в цитоплазму в результате нарушения мембранных структур. Снижение до определенной степени интенсивности дезаминирования норадреналина, сохраняющееся в ходе всего адаптационного процесса, вероятно, способствует увеличению эффективности норадренергической передачи и является элементом адаптивных изменений метаболизма [10]. Изменение субстратной специфичности МАО может способствовать развитию характерных для холодового воздействия нарушений метаболизма, в частности являться одной из причин снижения полиаминов [12]. Дезаминирование аминсахаров модифицированной МАО вносит, по-видимому, вклад в нарушение структуры и свойств мембран при холодовом стрессе. Согласно последним данным, трансформация МАО вызывает лавинообразное усиление ПОЛ [3]. Следовательно, ПОЛ и повреждение митохондриальных мембран является причиной изменения каталитических свойств МАО. С другой стороны, трансформация МАО может способствовать дальнейшему усилению ПОЛ и нарушению мембранных структур при холодовом стрессе.

Одной из наиболее лабильных внутриклеточных мембран является мем-

брана лизосом, увеличение проницаемости которой отмечено при многих экстремальных воздействиях [8]. Показателем состояния лизосомальных мембран может быть отношение активности кислых пептидгидролаз во фракции, обогащенной лизосомами, к активности в надосадочной фракции (см. рис. 1). На 1-е сутки холодового воздействия активность кислых пептидгидролаз в мозге увеличивается как во фракции, обогащенной лизосомами, так и в растворимой фракции. Величина отношения активности кислых пептидгидролаз в обогащенной лизосомами фракции и активности в растворимой фракции снижается на 45 % относительно контроля. Особенно отчетливо дестабилизация лизосомальных мембран проявляется на 3-и сутки холодового воздействия, о чем свидетельствует увеличение активности кислых пептидгидролаз в надосадочной фракции на 148 % и одновременное снижение активности этих ферментов в обогащенной лизосомами фракции на 22 %. Отношение активностей в субклеточных фракциях при этом снижается на 69 %. Изменение активностей пептидгидролаз в растворимой фракции печени имеет ту же направленность, что и в мозге, но выражено в меньшей степени. К моменту наступления адаптации происходит стабилизация лизосомальных мембран, о чем свидетельствует возвращение к контрольному уровню активности кислых пептидгидролаз в обогащенной лизосомами фракции при почти двукратном снижении активности в растворимой фракции.

В условиях холодового стресса имеет место и дестабилизация мембран эритроцитов, на что указывает резкое увеличение в сыворотке крови содержания ВЭГ, СПА и активности Г-6-

ФД, фермента эритроцитарных мембран (табл. 2). На 5—7-е сутки холодового воздействия наблюдается нормализация изучаемых показателей, сменяющаяся еще одним подъемом на 15-е сутки, коррелирующим с гибелью до 30 % исследуемых животных именно в этот период. Ко времени наступления адаптации уровень ВЭГ и СГА возвращается к контрольному, а активность Г-6-ФД стабилизируется на новом метаболическом уровне, значительно более низком, чем на 3-и сутки, хотя и превышающем уровень контроля. Повышенный уровень активности Г-6-ФД в сыворотке крови адаптированных к холоду животных отражает, по-видимому, активацию пентозофосфатного пути превращения глюкозы в тканях и эритроцитах, что является важным механизмом адаптивных изменений при акклиматизации к холоду [4].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о фазном характере процесса адаптации к холоду. Фаза холодового стресса (1—3-и сутки) характеризуется усилением ПОЛ, дестабилизацией мембранных структур всех типов, модификацией каталитических свойств МАО. При продолжении экспозиции наступает компенсаторно-приспособительный период (15—30-е сутки), сопровождающийся значительной перестройкой метаболизма, направленной на повышение устойчивости организма при действии холода. Фаза адаптации (45-е сутки и далее) характеризуется повышением стабильности мембранных структур и нормализацией каталитических свойств МАО.

ЛИТЕРАТУРА

1. Горкин В. З., Вережкина И. В., Гриднева Л. И. и др. // Современные методы в биохимии. — М., 1968. — Ч. 2. — С. 155—177.
2. Захарьин Ю. Л. // Лаб. дело. — 1967. — № 6. — С. 327—330.
3. Каган В. Е., Смирнов А. В., Савов В. М.,

Горкин В. З. // *Вопр. мед. химии.* — 1984. — № 3. — С. 112—118.

4. Казначеев В. П. *Современные аспекты адаптации.* — Новосибирск, 1980.
5. Каракашов А. В., Вичев Е. П. *Микрометоды в клинической лаборатории.* — София, 1973. — С. 114—115.
6. Ломакина Л. В. // *Укр. биохим. журн.* — 1980. — Т. 52, № 3. — С. 305—308.
7. Ломакина Л. В., Шугалей В. С. // *Физиол. журн. СССР.* — 1980. — Т. 66, № 3. — С. 400—403.
8. Маянская Н. Н., Панин Л. Е. // *Успехи совр. биол.* — 1981. — Т. 92, № 1 (4). — С. 64—80.
9. Москвитина Т. А. // *Современные методы в биохимии.* — М., 1977. — С. 22—26.
10. Пастухов Ю. Ф., Хаскин В. В. // *Успехи физиол. наук.* — 1979. — Т. 10, № 3. — С. 121—142.
11. Определение незначительных концентраций гемоглобина, растворенного в плазме крови. // *Биохимические методы исследования в клинике* / Под ред. А. А. Покровского. — М., 1969. — С. 349.
12. Цветненко Е. З., Шугалей В. С., Кричевская А. А. // *Укр. биохим. журн.* — 1983. — Т. 55, № 1. — С. 69—71.
13. Schacterle G. R., Pollack R. L. // *Analyt. Biochem.* — 1973. — Vol. 51, N 2. — P. 654—655.
14. Seligson D., Seligson H. // *J. Lab. clin. Med.* — 1951. — Vol. 38. — P. 324—330.
15. Sugawara K., Oyama F. // *J. Biochem. (Tokyo).* — 1981. — Vol. 89, N 3. — P. 771—774.

Поступила 29.10.86

BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF COLD STRESS AND ADAPTATION

I. A. Goroshinskaya, A. A. Ananyan, L. V. Morgilnitskaya, V. S. Shugaley

Institute of Biology, State University, Rostov-on-Don

Monoamine oxidase, acid peptide-hydrolase activities, intensity of lipid peroxidation in brain and liver tissues, hemoglobin content in blood serum, total peroxidase activity and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity were investigated during the cold acclimation within 1-45 days, 4°. Cold stress within 1-3 days destabilized erythrocyte, lysosomal and mitochondrial membranes in the rat tissues studied. At the same time, cold adaptation within 45 days prevented the membrane labilization.

ЛИЗОЦИМ КАК МОДУЛЯТОР ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

Кафедра молекулярной биологии и иммунологии Горьковского университета им. Н. И. Лобачевского

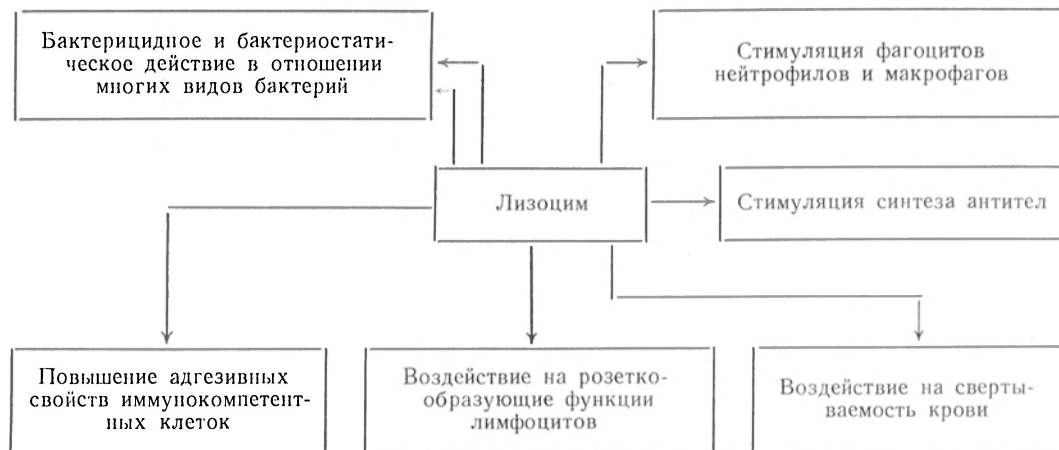
Лизоцим — фермент (КФ 3.2.1.17), гидролизующий β -1-4-гликозидную связь между N-ацетилмурамовой кислотой и N-ацетилглюкозамином в пептидогликане клеточных стенок бактерий. Лизоцим встречается на всех этапах эволюции живых организмов: от вирусов до высших млекопитающих и человека [3].

В настоящее время пересматривается и расширяется система факторов неспецифической резистентности организма и ее взаимосвязь с системой иммунитета. Понять многогранную функциональную активность комплекта, пропердина, острофазных белков крови (гаптоглобина, церулоплазмينا, трансферрина и других) возможно в плане не только комплексной оценки основной, манифестной активности, но и участия их в неспецифической резистентности и иммунитете. Не изучен в этом аспекте и лизоцим. Очевидно, полифункциональная активность этого фермента будет дополняться новыми формами функциональной активности. Ниже представлена предварительная схема возможной биологической активности лизоцима, составленная на основании собственных исследований по лизоцимам различного происхождения и анализа данных современной литературы [7, 11, 12, 14].

В настоящее время расширяется и уточняется точка зрения о бактерицидном действии лизоцима только на грамположительные микроорганизмы. Антибактериальная защита этим не ограничивается. Лизоцим существенно и избирательно изменяет качества слизистых оболочек [2]. Он не только непосредственно, но и опосредованно влияет на структуру и активность бактерий, в том числе на фагоцитоз и другие системы защиты. Очевидно, правомерно считать, что спектр биологического действия мурамидазы широк. Лизоцим не только участвует в различных системах защиты организма, но и в других механизмах сохранения гомеостаза, регуляции проницаемости тканевых барьеров, клеточной дифференцировки, свертываемости крови и т. д. [1].

Есть предположение, что лизоцим влияет (а возможно, и участвует) на различные стадии фагоцитоза [10], хемотаксис, опсонизацию и деградацию антигенного материала. Однако клеточные молекулярные механизмы этого явления не выяснены.

Возможно влияние лизоцима на синтез антител. В основном он выступает как стимулятор этого процесса, причем стимуляция антителообразования к различным антигенам неодинакова [4].

Лизоцим, факторы иммунитета и неспецифической резистентности

Задачей настоящей работы является изучение влияния лизоцима на розеткообразующую способность Т-лимфоцитов, на адгезивные свойства иммунокомпетентных клеток, а также на активацию комплемента по классическому и альтернативному пути. Таким образом, основной целью работы было изучение роли лизоцима в системе иммунитета и неспецифической резистентности организма.

В работе использованы препараты лизоцима различного происхождения, в том числе и плацентарный лизоцим человека, производство которого разработано в ГНИИЭМ [6].

Методика

В работе использованы следующие препараты: лизоцим для внутримышечного введения, лизоцим фирмы «Sevga», лизоцим Олайнского завода химреактивов, плацентарный лизоцим производства ГНИИЭМ.

Розеткообразующую способность Т-лимфоцитов периферической крови человека оценивали по методу А. О. Ляпона [8]. Исследовали кровь практически здоровых людей, больных, находящихся на лечении и диспансерном наблюдении в клинике ГНИИЭМ по поводу дисбактериозов и дисфункций желудочно-кишечного тракта, а также больных с осложненной легочной патологией¹.

В работе изучали влияние лизоцима как на общие «холодовые» (18—20 °C, 4 °C), так и на активные «теплые» розетки (30 мин, 37 °C).

Для изучения действия лизоцима на активацию системы комплемента за основу был взят микрометод определения комплементарной активности сыворотки с некоторыми модификациями [9]. Адгезивные свойства лимфоцитов исследовали по прилипанию клеток к капроновому волокну [15]. Активность фер-

мента определяли турбидиметрическим методом с лиофилизированной культурой тест-организма [13].

Результаты и обсуждение

В ходе исследований установлено, что лизоцим статистически достоверно влияет на реакцию розеткообразования, повышая количество розеток (табл. 1).

Под действием лизоцима происходят нормализация значительно сниженного у больных уровня «общих» РОК (с 32 до 54 %; $p < 0,05$) и достоверное увеличение относительного содержания «активных» розеток: с 32 % в контроле до 46 % у доноров при неизменном уровне «общих» розеток ($p < 0,05$).

Влияние лизоцима на реакцию розеткообразования Т-лимфоцитов оказалось достаточно эффективным уже при низких концентрациях препарата (20—50 мкг/мл). Повышение концентрации лизоцима в 2—10 раз не вызывает заметных изменений розеткообразования. Этот на первый взгляд парадоксальный факт находит свое объяснение в наших предыдущих исследованиях, которые показывают, что в концентрациях, превышающих 30 мкг/мл, лизоцим, как правило, менее активен, так как находится в ассоциированной форме [5].

Особый интерес представляет исследование иммунологических реакций при непосредственном введении лизоцима в организм человека.

С этой целью была изучена розеткообразующая способность Т-лимфоцитов периферической крови человека при эндобронхиальном введении лизоцима в комплексной терапии больных

¹ Отбор больных производился под руководством канд. мед. наук В. М. Григорьева, за что выражаем ему искреннюю благодарность.

Таблица 1
Влияние различных концентраций яичного лизоцима на розеткообразующие свойства Т-лимфоцитов ($n = 20$)

Концентрация лизоцима, мкг/мл	Общие розетки, %		Активные розетки, %	
	здоровые лица	больные	здоровые лица	больные
20	49±2,6	54±2,0	42±3,8	29<1,17
50	50±4,9	55±3,3	44±2,4	37±2,5
100	50±1,7	44±2,2	41±2,5	35±3,4
250	47±1,1	38±1,96	46±2,3	36±1,2
500	50±2,6	38±1,96	46±3,5	32±1,86
Контроль (без лизоцима)	50±1,9	32±2,2	32±1,9	29±1,3
P		$P_{1,2} < 0,05$	$P < 0,05$	$P_{2-4} < 0,05$

Таблица 2
Влияние белковых препаратов на адгезивные свойства лимфоцитов

Препарат	Прилипание, %		
	опыт	контроль	p
Лизоцим для внутримышечного введения	48,7±2,84	32,5±1,45	<0,01
Лизоцим фирмы «Sergva»	48,2±2,14	33±2,65	<0,01
Лизоцим Олайнского завода химреактивов	41,5±0,98	30,2±2,72	<0,01
Альбумин	19,17±1,56	37,5±0,98	<0,01
γ-Глобулин противокоревой	27,0±0,9	37,5±0,98	<0,001

с осложненной легочной патологией².

В результате проведенных исследований наблюдалась аналогичная зависимость повышения «общих» РОК (до лечения — 46 %, после — 58 %, $p<0,05$). Также отмечалось достоверное увеличение «активных» РОК (до лечения — 29 %, после — 36 %, $p<0,05$). Таким образом, лизоцим оказывает стимулирующее действие на розеткообразующие свойства Т-лимфоцитов.

Параллельно определяли активность лизоцима в сыворотке больных до и после лечения. Активность фермента достоверно возрастала в 4,5 раза ($p<0,01$). Данные о повышении концентрации эндогенного лизоцима в сыворотке крови больных под влиянием его лечебного применения заслуживают внимания в связи с назначением препаратов лизоцима как стимулятора неспецифической реактивности организма.

² Отбор больных производился под руководством проф. В. В. Костиной (больница № 10), за что выражаем ей искреннюю благодарность.

Возможно, влияние лизоцима связано с изменением адгезивных свойств лимфоцитов за счет взаимодействия молекул фермента с рецепторами, находящимися на поверхности клеток [16]. Для подтверждения было изучено действие фермента на адгезию лимфоцитов путем определения процента прилипания клеток, обработанных лизоцимом, к капроновому волокну. В ходе работы установлено, что под влиянием препарата способность лимфоцитов к адгезии увеличивается на 33 % (табл. 2). Этот эффект лизоцима имеет специфический характер: в тех же условиях и альбумин вызывал снижение адгезии на 48 %, а гаммаглобулин противокоревой обнаруживал тенденцию к уменьшению адгезивных свойств лимфоцитов (см. табл. 2).

При изучении влияния лизоцима на активацию системы комплемента был использован лизоцим яичного белка производства Олайнского завода химреактивов и плацентарный лизоцим производства ГНИИЭМ. В качестве комплемента использовали сыворотку крови доноров с Горьковской областной станции переливания крови.

В ходе проведенных исследований установлено, что лизоцим яичного белка оказывает влияние как на классический, так и на альтернативный путь активации системы комплемента, однако характер влияния различен и зависит от времени инкубации препарата с комплементом. Отмечено достоверное ($p<0,02$) повышение комплементарной активности сыворотки при инкубации лизоцима и системы комплемента в течение менее 1 ч, как в классическом, так и в альтернативном пути (на 13—16 %; табл. 3). При инкубации лизоцима с комплементом в

Таблица 3
Влияние лизоцима на активацию системы комплемента в % по отношению к контролю, принятому за 100 %

Препарат	Концентрация мкг/мл	Методы активации			
		классический		альтернативный	
		менее 1 ч	20 ч	менее 1 ч	20 ч
Яичный лизоцим	500	116±2,3 $p<0,01$	115±4,0 $p<0,01$	113±2,7 $p<0,01$	93±3,9
	100	109±2,3 $p<0,02$	95±3,5	97±1,1 $p<0,05$	84±1,4
	20	103±2,2	95±8,4	98±1,6	94±3,3
Плацентарный лизоцим	40	130±3,4 $p<0,001$	98±4,0	108±2,4 $p<0,02$	90±3,3 $p<0,02$

течение 20 ч в альтернативном пути выявлено достоверное ($p < 0,02$) снижение комплементарной активности (на 16 %), что свидетельствует о связывании белков системы комплемента, тогда как в классическом пути наблюдалось достоверное ($p < 0,01$) повышение активности на 15 %.

Тот факт, что лизоцимы разного происхождения активируют систему комплемента по классическому пути, может свидетельствовать о том, что эту реакцию вызывает сам лизоцим, а не примеси, возможно, содержащиеся в препарате. Механизм активации остается невыясненным. Возможно, он опосредован через иммунные комплексы. Наибольшее изменение комплементарной активности сыворотки отмечено при концентрации яичного лизоцима 500 мкг/мл, плацентарного — 40 мкг/мл, что указывает на большую эффективность последнего. Таким образом, изменение комплементарной активности сыворотки под действием лизоцима зависит от концентрации фермента, а также субстрата, из которого он получен.

Таким образом, лизоцим оказывает стимулирующее влияние на розеткообразующие свойства Т-лимфоцитов. Эффект обнаружен при действии фермента на популяцию лимфоцитов крови больных и практически здоровых людей и зависит от концентрации фермента и первичного уровня розеткообразующих клеток.

При эндобронхиальном введении лизоцима в комплексной терапии больных с бронхолегочной патологией обнаружено существенное увеличение розеткообразующих клеток.

При эндобронхиальном введении лизоцима в комплексной терапии больных с бронхолегочной патологией обнаружено существенное увеличение розеткообразующих клеток. Выявлено повышение адгезивных свойств лимфоцитов под действием препарата. Установлено влияние лизоцима на классический и альтернативный пути активации комплемента. Эффект изменения комплементарной активности зависит от концентрации фермента и времени инкубации препарата с комплементом. Выявлено значительное повышение активности лизоцима сыворотки в процессе комплексной терапии (при экзогенном введении лизоцима)

больных с осложненной легочной патологией.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабаян С. С. Лизоцим человека, его выделение и свойства: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 1973.
2. Барабаш А. Д., Левицкий А. Б. // *Вопр. мед. химии*. — 1978. — № 3. — С. 291—303.
3. Бухарин О. В., Васильев Н. В. Лизоцим и его роль в биологии и медицине. — Томск, 1974.
4. Вершигора А. Е. Основы иммунологии: 2-е изд. — Киев, 1980.
5. Добротина Н. А., Казанцева И. В., Казанская Ж. А. // *Методы получения и анализа биохимических препаратов*. — Рига, 1982. — Ч. 1. — С. 129—130.
6. Кравченко Н. А., Комарова Т. П., Ногичева М. А. // *Всероссийский биохимический съезд, 4-й: Тезисы симпозиумов докладов*. — М., 1979. — С. 121.
7. Кравченко Н. А., Черкасов И. А. // *Молекул. биол.* — 1979. — № 1. — С. 36—39.
8. Ляпон А. О. // *Лаб. дело*. — 1980. — № 1. — С. 36—39.
9. Мотавкина Н. С., Ковалев Б. М., Шаронов А. С. // *Там же*. — № 7. — С. 433—434.
10. Покровский В. И., Лаврбах М. М., Литвинов В. И., Рубцов И. В. Приобретенный иммунитет и инфекционный процесс. — М., 1979. — С. 34—35.
11. Суй В. Н. // *Теоретическая иммунология — практическому здравоохранению*. — Таллин, 1978. — С. 150—154.
12. Шербакова Э. Г., Рагунова Г. А. // *Антибиотики*. — 1984. — № 11. — С. 840—844.
13. Cherreire J., Fause A., Bach J. // *Immunology*. — 1975. — Vol. 29, N 3. — P. 423—432.
14. Lenthek A. L. The Induction of Augmented Granulocyte Adherence by Inflammation Mediation by a Plasma Factor. — Philadelphia, 1974.
15. Parry R. // *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*. — 1965. — Vol. 119, N 1. — P. 384—386.
16. Showell H. J., Gloussky M., Ward P. // *Int. Arch. Allergy*. — 1982. — Vol. 67. — P. 227—232.

Поступила 18.02.86

LYSOZYME AS A MODULATOR OF IMMUNOLOGICAL REACTIONS

N. A. Dobrotina, Zh. A. Kazatskaya, G. Yu. Emel'yanova

Chair of Molecular Biology and Immunology, State University, Gorki

Effect of lysozyme on some immunochemical reactions was studied, involving rosette-developing properties of T lymphocytes and lymphocyte adhesion. The rosette-forming activity of the cells was shown to increase after addition of lysozyme *in vitro* as well as after treatment with lysozyme *in vivo*. Participation of lysozyme in activation of complement via various pathways is considered.

Б. В. Давыдов, П. П. Голиков

ВЛИЯНИЕ ДИБУНОЛА НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ И УРОВЕНЬ α -ТОКОФЕРОЛА В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА

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

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) играет важную роль в повреждении кардиомиоцитов при инфаркте миокарда [13, 25, 26]. Значительное накопление продуктов ПОЛ в зоне ишемии сопровождается нарушением сократительной функции сердца [13]. В то же время при инфаркте миокарда происходит нарушение функций и других органов, в том числе печени [5, 10, 15]. Печень является одним из важнейших органов, обеспечивающих в организме метаболизм, который при инфаркте миокарда существенно нарушается [10]. Можно предположить, что в нарушении метаболизма при инфаркте миокарда важную роль играет усиление ПОЛ в печени.

Вполне вероятно, что наблюдаемое при инфаркте миокарда лечебное действие антиоксидантов обусловлено их влиянием не только на сердечную мышцу, но и на печень [4, 17].

В связи с этим целью данной работы явилось исследование в печени уровня продуктов ПОЛ и мембранного антиоксиданта α -токоферола при инфаркте миокарда и влияния на эти показатели синтетического антиоксиданта дибунола.

Методика

Исследование проводили на 32 крысах-самцах Вистар массой 180—220 г. Инфаркт миокарда вызывали перевязкой верхней трети левой коронарной артерии по Когану [7]. Животные были разделены на 4 группы: 1-ю группу составили интактные животные, 2-ю — крысы, подвергшиеся контрольной операции (воспроизводили все этапы операции, кроме перевязки коронарной артерии); 3-ю — животные, у которых вызывали инфаркт миокарда; 4-ю — крысы с инфарктом миокарда, получавшие дибунол. Дибунол в форме масляного раствора вводили внутривенно в дозе 120 мг/кг через 15 мин после перевязки коронарной артерии.

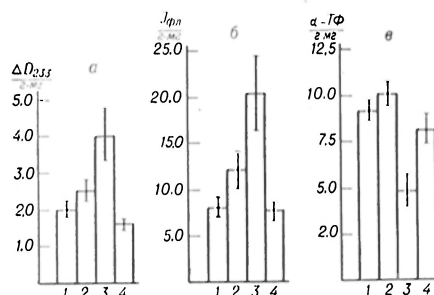
Содержание α -токоферола и продуктов ПОЛ в гомогенатах печени определяли через 24 ч после операции. Ткань печени гомогенизировали в охлажденном фосфатном буфере (67 мМ KH_2PO_4 +67 мМ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$; pH 7,4) в соотношении 1:3. Содержание

α -токоферола в гомогенатах определяли спектрофлуорометрически в гексановом экстракте [21]. В том же гексановом экстракте измеряли содержание диеновых конъюгатов [9] и шиффовых оснований [20]. Количество общих липидов определяли гравиметрически [8]. Все операции с гомогенатом проводили при 4 °С. Результаты для α -токоферола выражали в $\text{мкг} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$; для диеновых конъюгатов — в $\Delta D_{233} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$; для шиффовых оснований — в $I_{\text{ФЛ}} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$; где г — вес ткани печени, мг — содержание общих липидов в 1 мл гексанового экстракта, ΔD_{233} — изменение оптической плотности при 233 нм; $I_{\text{ФЛ}}$ — интенсивность флуоресценции в условных единицах.

Результаты обрабатывали методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента [2].

Результаты и обсуждение

Из рисунка, а видно, что у животных с инфарктом миокарда, содержание диеновых конъюгатов в печени достоверно увеличивалось по сравнению с показателями интактных животных в 2 раза. Уровень диеновых конъюгатов при операции без перевязки коронарной артерии существенно не менялся. Под влиянием дибунола содержание диеновых конъюгатов в печени животных с инфарктом миокарда снижалось (в 2,4 раза) по сравнению с их уровнем у животных, которым дибунол не вводили. Следовательно, введение дибунола снижает содержание диеновых



Содержание диеновых конъюгатов (а), шиффовых оснований (б) и α -токоферола (в) в печени крыс при инфаркте миокарда.

1—4 — соответственно 1—4-й группы животных.

контюгатов в печени до уровня интактных животных.

Сходные изменения обнаружены и для шиффовых оснований. Так инфаркт миокарда вызывал увеличение содержания шиффовых оснований в печени в 2,5 раза, а при контрольной операции их уровень существенно не отличался от такового у животных интактной группы (см. рисунок, б). При введении дибунола животным с инфарктом миокарда увеличение шиффовых оснований в печени не наблюдалось и их уровень был таким же, как у интактных животных (см. рисунок, б).

Содержание α -токоферола в печени животных с инфарктом миокарда достоверно снижалось (в 1,7 раза) по сравнению с показателями интактной группы (см. рисунок, в). Контрольная операция не приводила к изменению уровня α -токоферола в печени. Введение дибунола животным с инфарктом миокарда предотвращало снижение содержания α -токоферола в печени и оно не отличалось от такового у интактных животных (см. рисунок, в).

Таким образом, при инфаркте миокарда в печени подопытных животных происходят усиление ПОЛ и снижение содержания α -токоферола, а введение дибунола предотвращает активацию ПОЛ и снижает уровень α -токоферола.

Усиление ПОЛ в печени при инфаркте миокарда может быть вызвано несколькими причинами. Показано, что при различных видах стресса происходит активация ПОЛ в печени [1, 19]. Инфаркт миокарда также сопровождается выраженной стрессорной реакцией, проявляющейся в значительном увеличении в крови концентрации катехоламинов [24]. Катехоламины при их высоком уровне в крови обладают повреждающим действием на органы и ткани организма, особенно на миокард [27]. Предполагается, что образование активных форм кислорода, которые образуются при окислении адреналина в адренохром, может быть одним из механизмов такого повреждающего действия [22]. Активные формы кислорода могут активировать ПОЛ [3]. Наряду с этим катехоламины способствуют липолизу, при котором увеличивается в крови содержание полиеновых жирных

кислот, стимулирующих окисление адреналина в адренохром [23].

Кроме того, при инфаркте миокарда наблюдается гипоксемия [11]. При этом доставка кислорода к ряду органов и тканей снижается как за счет нарушения сократительной функции сердца, так и за счет централизации кровообращения [10]. Это приводит к ухудшению кровообращения в печени [5] и изменению в ней уровней субстратов и коферментов энергетического метаболизма, как и при гипоксии [16].

Гипоксия относится к одним из важнейших факторов, активирующих ПОЛ [6]. Следовательно, гипоксический компонент также может быть одной из причин усиления ПОЛ в печени при инфаркте миокарда.

Усиление ПОЛ приводит к увеличению проницаемости мембран клеток [3]. Именно с увеличением проницаемости мембран клеток печени при инфаркте миокарда связывается значительное возрастание в крови индикаторных печеночных ферментов [16, 17].

Обнаруженное снижение уровня α -токоферола в печени можно объяснить участием антиоксиданта в реакциях ингибирования ПОЛ, так как при усилении ПОЛ происходит расходование α -токоферола [3].

Стрессорные и ишемические повреждения органов и тканей организма уменьшаются при профилактическом введении дибунола [13]. Предполагается, что этот эффект обусловлен, во-первых, способностью дибунола ингибировать ПОЛ путем взаимодействия со свободными радикалами ненасыщенных жирных кислот, т. е. со свойствами дибунола как истинного антиоксиданта [18], во-вторых, способностью дибунола ограничивать стресс-реакцию, благодаря воздействию на обмен катехоламинов [14].

Результаты нашего исследования показывают, что при экспериментальном инфаркте миокарда усиление ПОЛ и снижение уровня α -токоферола в печени предотвращается введением дибунола даже после начала развития инфаркта миокарда, что очень важно для клинической практики. Механизм такого выраженного лечебного эффекта дибунола на печень, по-видимому, связан не только с указанными свойствами антиоксиданта, но и с особенностями его накопления и распределе-

ния в организме. Установлено, что дибунол при введении в организм накапливается в печени и его концентрация в ней к 1—2-му часу после введения превышает таковую в плазме в 15 раз [12].

Таким образом, при экспериментальном инфаркте миокарда значительно усиливается ПОЛ в печени, проявляющееся в накоплении диеновых конъюгатов и шиффовых оснований, снижении уровня α -токоферола. Синтетический антиоксидант дибунол предотвращает накопление продуктов ПОЛ и снижение содержания α -токоферола в печени. По-видимому, в нарушении метаболизма, наблюдаемом при инфаркте миокарда, важную роль играет повреждение печеночной ткани, одним из механизмов которого является активация ПОЛ.

Использование антиоксиданта дибунола может быть эффективным патогенетическим методом коррекции нарушений метаболизма в организме при инфаркте миокарда.

ЛИТЕРАТУРА

- Бречко В. В. // Пат. физиол. — 1983. — № 5. — С. 56—59.
- Венчиков А. И., Венчиков В. А. Основные приемы статистической обработки результатов наблюдений в области физиологии. — М., 1974.
- Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М., 1972.
- Голиков А. П., Полумисков В. Ю., Берестов А. А., Рябинин В. А. // Кардиология. — 1984. — № 1. — С. 15—18.
- Гузеева В. А. // Там же. — 1977. — № 1. — С. 119—122.
- Дудник Л. Б., Биленко М. В., Алесенко А. В. и др. // Вопр. мед. химии. — 1981. — № 3. — С. 380—382.
- Коган А. Х. // Пат. физиол. — 1979. — № 3. — С. 79—82.
- Колб В. Г., Камышников В. С. Клиническая биохимия. — Минск, 1982.
- Костюк В. А., Потанович А. И., Лунец Е. Ф. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 4. — С. 125—127.
- Малая Л. Т., Власенко М. А., Микляев И. Ю. Инфаркт миокарда. — М., 1981.
- Матвеев С. Б., Голиков П. П., Марченко В. В. и др. // Кардиология. — 1983. — № 7. — С. 39—43.
- Матвеева С. А., Барсель В. А., Дронова Л. М. // Изв. АН СССР. Сер. биол. — 1977. — № 1. — С. 59—64.
- Меерсон Ф. З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. — М., 1984.
- Меерсон Ф. З., Малышев В. В., Петрова В. А., Лифантьев В. И. // Кардиология. — 1982. — № 9. — С. 85—88.
- Попов В. Г., Сумраков А. В., Таранов А. М. // Тер. арх. — 1983. — № 11. — С. 15—20.
- Прашкявичюс А. К., Лукошявичюс А. Ю., Григалионенс В. И., Шатинскенс Р. Р. // Вопр. мед. химии. — 1983. — № 5. — С. 58—62.
- Рысмедиев А. Ж., Туленов М. Т., Исаков К. М., Тукешева Б. Ш. // Кардиология. — 1984. — № 11. — С. 108—111.
- Храпова Н. Г. // Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. — М., 1982. — С. 59—73.
- Шорин Ю. П., Селятицкая В. Г., Колосова Н. Г., Куликов В. Ю. // Бюл. экспер. биол. — 1985. — № 6. — С. 669—671.
- Csallay A. S., Ayaz K. L. // Lipids. — 1976. — Vol. 11. — P. 412—417.
- Duggan D. E. // Arch. Biochem. — 1959. — Vol. 84. — P. 116—122.
- Gudbjarnason S. // J. molec. cell Cardiol. — 1981. — Vol. 13. — Suppl. — P. 35—40.
- Gudbjarnason S., Doell B., Oskardottir G. // Tocopherol, Oxygen and Biomembranes. — Amsterdam, 1978. — P. 297—310.
- Little R. A., Frayn K., Randall P., Yates D. // Lancet. — 1985. — Vol. 2. — P. 509—510.
- Nororha-Dutra A. A., Steen E. M. // Lab. Invest. — 1982. — Vol. 47. — P. 346—353.
- Rao P. S., Cohen M. V., Mueller H. S. // J. molec. cell Cardiol. — 1983. — Vol. 15. — P. 713—716.
- Rona G. // Ibid. — 1985. — Vol. 17. — P. 291—306.

Поступила 27.02.86

EFFECT OF IONOL ON LIPID PEROXIDATION AND CONTENT OF α -TOCOPHEROL IN LIVER TISSUE OF RATS WITH MYOCARDIUM INFARCTION

B. V. Davydov, P. P. Golikov

Clinico-Biochemical Laboratory of Express Analyses, N. V. Sklifasovsky Institute of Urgent Medicine, Moscow

Lipid peroxidation in rat liver tissue homogenate was studied by evaluation of diene conjugates and Schiff bases content within 24 hrs after myocardium infarction. Tocopherol was estimated using spectrofluorimetric procedure. Ionol was administered intraperitoneally at a dose of 120 mg/kg within 15 min after the left coronary artery ligation. In the myocardium infarction content of diene conjugates was increased 2-fold and of Schiff bases—2.5-fold in liver tissue, while content of tocopherol was decreased 1.7-fold. Ionol prevented the increase of lipid peroxidation products and the tocopherol content decrease. This antioxidant proved to be effective drug at the initial steps of myocardium infarction as well as it exhibited the distinctly protective effect on liver tissue. The protective effect of ionol appears to occur not only due to its antioxidant properties and the ability to restrict

stress reactions but also in response to rapid accumulation in liver tissue. The data obtained suggest that lipid peroxidation in liver tissue may be one of mechanisms responsible for me-

tabolism impairment in myocardium infarction; treatment with the antioxidant ionol is the effective pathogenetic mean for correction of these disorders.

УДК 616.71-001.5-003.9-07:616.71-008.931:577.152.111]-074

В. М. Мирошников, Т. В. Габукова

ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТОВ ГЛИКОЛИЗА ПРИ БИОСТИМУЛЯЦИИ РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗА

Центральная научно-исследовательская лаборатория Астраханского медицинского института им. А. В. Луначарского

Изучение механизмов репаративного остеогенеза актуально в связи с практической необходимостью поиска путей ускорения консолидации переломов [1, 5, 8]. Одними из ведущих факторов в развитии воспаления, регенерации и регуляции метаболизма при раневом процессе являются изменения ферментных систем [4, 11]. Вместе с тем при повреждении длинных трубчатых костей эти изменения изучены недостаточно полно [2, 6]. Не известны особенности их функционирования и в условиях биостимуляции репаративного остеогенеза.

В связи с тем что гликолиз является единственным в анаэробных условиях процессом, поставляющим энергию и обеспечивающим биосинтез во многих тканях, значительный интерес представляет исследование его ключевых ферментов, особенно гексокиназы (КФ 2.7.1.1), регулирующей скорость гликолиза в пролиферирующих клетках. Значение этого фермента велико на начальных стадиях репарации, так как он участвует также в обеспечении пентозофосфатного пути, биосинтезе гликогена и, следовательно, в осуществлении пластических функций.

Реакции, протекающие с участием промежуточного — пируваткиназы (КФ 2.7.1.40) и конечного — лактатдегидрогеназы (ЛДГ; КФ 1.1.1.27) ферментов гликолиза, особенно важны в процессах тканевой пролиферации и дифференцировки. Вместе с тем нами не найдено источников литературы, характеризующих состояние основных ферментов гликолиза в регенерирующих тканях. Поэтому была предпринята попытка изучить активность гексо-

киназы, пируваткиназы и ЛДГ в формирующейся костной мозоли в условиях биостимуляции репаративного остеогенеза.

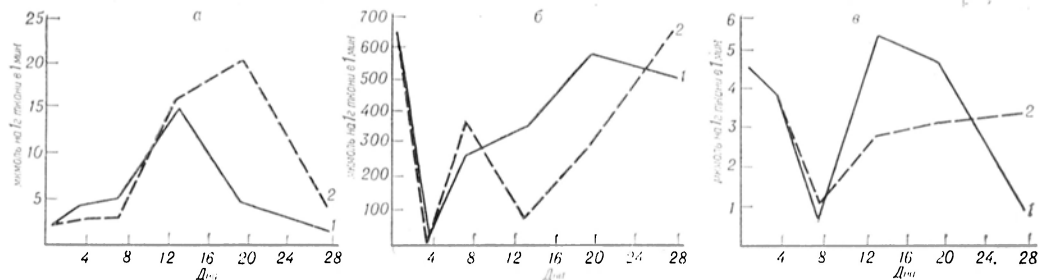
Методика

В работе использовано 50 белых беспородных крыс-самок массой 200—250 г, содержавшихся в виварии Центральной научно-исследовательской лаборатории.

Экспериментальной моделью послужил закрытый диафизарный перелом правой плечевой кости, наносившийся под эфирным наркозом с помощью хирургического зажима. Иммобилизацию не использовали, поэтому подвергавшаяся исследованию костная мозоль имела значительно большие размеры, чем при фиксированных костных переломах, и была более удобна для изучения.

В целях биостимуляции заживления подопытным животным через день парентерально вводили промышленный препарат плацентарного альбумина (ПА) из расчета 2,5 мл на 1 кг массы, контрольным — в тех же дозах коммерческий донорский альбумин (ДА). При этом были использованы 10 % растворы плацентарного альбумина, выпускаемые Горьковским НИИ эпидемиологии и микробиологии серий № 150884, 180984 и 191084, а также 10 % растворы донорского альбумина Куйбышевской областной станции переливания крови серий № 500484, 980884 и 1231184. Выбор ПА для биостимуляции репаративного остеогенеза был сделан на основании установленного факта содержания в нем эмбриональных белков — α -фетопротенна (АФП) и плацентарной щелочной фосфатазы (ПЩФ). Концентрация АФП и ПЩФ в промышленных препаратах ПА составила $8,0 \pm 2,0$ мкг/мл. Как было показано ранее, АФП является физиологически активным веществом, способным стимулировать процессы клеточной пролиферации и ускорять репаративную регенерацию ряда тканей [8, 9].

Животных декапитировали на 3, 7, 13, 19 и 27-й дни. Ткань костной мозоли (300 мг) гомогенизировали при температуре от -2 до -5°C в 1,5 мл 0,001 М калий-фосфатного буфера pH 7,2, содержавшего 5 мМ 2-меркаптоэтанол и 5 мМ ЭДТА, центрифугировали 20 мин при 12 000 g и надосадочную жидкость



Влияние плацентарного (1) и донорского (2) альбумина на активность гексокиназы (а), пируваткиназы (б) и ЛДГ (в) в костной мозоли крыс на различных этапах заживления.

По оси абсцисс — время опыта (в днях): по оси ординат — активность фермента (в ммоль на 1 г ткани в 1 мин).

использовали для определения общей активности гексокиназы (по Sheer с соавт.), пируваткиназы (по Кочетову Г. А.) и ЛДГ (по Sevel, Tovarek).

Из части препаратов готовили гистологические срезы, окрашиваемые по ван-Гизону, Маллори, а также толундиновым и алциановым синим для выявления гликозаминогликана.

Результаты и обсуждение

Общая активность гексокиназы в костной мозоли уже на 3-и сутки после перелома как в опыте, так и в контроле была несколько выше, чем в интактной кости (см. рисунок, а). Плавное повышение этого показателя наблюдалось до 7-го дня. Со 2-й недели опыта, когда зона репарации гистологически ограничивалась формирующейся из соединительнотканых клеток надкостницей, активность гексокиназы резко возрастала, продолжая увеличиваться до 13-го дня у животных, получавших ПА, и до 19-го дня у крыс, которым вводили ДА.

Этот период сопровождался накоплением в созревающей мозоли кислых мукополисахаридов, проявляющихся яркой γ - и β -метахромазией. Резорбция хряща с параллельными процессами минерализации происходила одновременно со снижением активности гексокиназы. Следует полагать, что этот фермент, имея прямое отношение к метаболизму гликозаминогликанов, принимает активное участие в созревании молодой соединительной ткани зоны репарации. Поэтому в связи с тем, что после травмы чрезвычайно рано начинаются пролиферативные процессы, общая активность гексокиназы не падает, а постепенно растет вплоть до появления костной структуры регенерата.

Более раннее достижение максимальной активности гексокиназы под влиянием ПА, ее меньшая величина по сравнению с ДА в этот период и быстрое возвращение к исходным цифрам говорят о заметном стимулирующем действии ПА на процессы остеогенеза. С другой стороны, общая активность гексокиназы в костной мозоли может свидетельствовать о степени ее зрелости.

В отличие от гексокиназы общая активность промежуточного фермента гликолиза — пируваткиназы — на 3-и сутки после перелома оказывается более чем в 25 раз ниже исходного уровня (см. рисунок, б). К концу 1-й недели эксперимента этот показатель увеличивается под влиянием как ПА, так и ДА. У подопытных животных общая активность ПК прогрессивно повышается, сопровождая все основные этапы формирования и перестройки гистоструктуры зоны перелома. К концу месяца этот показатель достигал исходных величин. В костном регенерате контрольных крыс на 2-й неделе опыта вновь отмечено снижение активности пируваткиназы с последующим ее повышением к периоду консолидации перелома.

Общая активность ЛДГ после перелома длинных трубчатых костей постепенно снижается в течение 7 дней как у подопытных, так и у контрольных животных (см. рисунок, в). После этого активность ЛДГ, как и гексокиназы, резко возрастает, значительно превалируя над исходными цифрами у животных, получавших ПА. По-видимому, это связано со снижением уровня митохондриального энергетического обеспечения клеток и усилением гликолитического расщепления глюкозы.

Под влиянием ПА общая активность ЛДГ с конца 2-й недели эксперимента постепенно снижалась, в то время как под действием ДА возрастала с уменьшением интенсивности этого процесса.

Полученные данные позволяют считать, что активность изученных ферментов гликолиза находится в тесной зависимости от морфофункционального состояния клеточных структур зоны репарации и определяется степенью их зрелости. Наиболее выраженные изменения активности ферментов гликолиза, локализованных в цитоплазме клеток, происходят в период максимальной пролиферативной активности.

Следует заметить, что в злокачественных опухолях величина общей активности трех изученных ферментов также значительно выше нормы [3]. В связи с этим можно полагать, что принципиально аналогичное повышение ферментативной активности гексокиназы, пируваткиназы и ЛДГ при репаративном и опухолевом гистогенезе является общебиологической закономерностью процессов клеточной пролиферации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белоус А. М., Годин В. П., Панков Е. Я. Экзогенные нуклеиновые кислоты и восстановительные процессы. — М., 1974.
2. Власов Б. Я. // *Вопр. мед. химии.* — 1984. — № 4. — С. 46—47.
3. Габуква Т. В. Общая активность и изоферменты гексокиназы, пируваткиназы и лактатдегидрогеназы в дифференциальной

диагностике рака легкого человека: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 1985.

4. Громашевская Л. А. // *Лаб. дело.* — 1975. — № 6. — С. 323—329.
5. Илизаров Г. А. // *Проблемы чрескостного остеосинтеза в ортопедии и травматологии.* — Курган, 1982. — С. 5—18.
6. Илизаров Г. А., Хелимский А. М. // *Современные проблемы регенерации.* — Йошкар-Ола, 1980. — С. 28—55.
7. Мирошников В. М. // *Ортопед., травматол.* — 1977. — № 7. — С. 28—31.
8. Мирошников В. М. // *Арх. пат.* — 1978. — № 7. — С. 57—63.
9. Мирошников В. М., Афанасьева А. В. // *Бюл. экспер. биол.* — 1978. — № 3. — С. 363—365.
10. Тамаркина А. Д., Анненков Г. А., Кулиев А. М., Гринберг Е. Н. // *Генетика.* — 1975. — № 4. — С. 142—145.

Поступила 03.10.86

CHARACTERIZATION OF GLYCOLYTIC ENZYMES IN BIOSTIMULATION OF REPARATIVE OSTEOGENESIS

V. M. Miroshnikov, T. V. Gabukova

Central Research Laboratory, Medical School, Astrakhan

Content of hexokinase, pyruvate kinase and lactate dehydrogenase was studied in rat callus, formed in presence of commercially available preparations of placental and normal serum albumin. Total activity of all these enzymes was not similar at different stages of healing; the enzymatic activity was closely related to morpho-functional state of cellular structures in repairing zone and was dependent on their maturation. Especially pronounced changes in glycolytic enzymes activity occurred at the period of maximal proliferative activity of osteogenic cells. Placental albumin was shown to exhibit the greater stimulating effect on reparative osteogenesis as compared with the protein from blood serum.

УДК 612.351.11:577.152.1]-06:612.766.2

А. С. Комарин, Ш. А. Азимова

СОСТОЯНИЕ МОНООКСИГЕНАЗНОЙ ФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ГИПОКИНЕЗИИ

ЦНИЛ Ташкентского медицинского института

Метаболические расстройства, наблюдаемые при гипокинезии, обусловлены сочетанным влиянием двух факторов — собственно обездвиживания и хронического стресса [15]. Причем в ранние сроки ограничения двигательной активности преобладают явления, характерные для острого стресса и проявляющиеся увеличением содержания в организме АКТГ, кортикостероидов и катехоламинов [8, 14]. Преобладают процессы катаболизма, веду-

щие к накоплению в крови и тканях недоокисленных и токсических продуктов метаболизма, которые могут вызывать дезорганизацию клеточных мембран [3, 4]. Известно, что процессы детоксикации осуществляются всеми органами, но в основном протекают в печени при участии монооксигеназной ферментной системы [10]. В то же время работ, посвященных изучению детоксикационной функции печени в условиях гипокинезии, имеется очень

немного [16]. Целью настоящего исследования явилось изучение механизмов, лежащих в основе изменения активности микросомальной ферментной системы гепатоцитов в динамике ограничения двигательной активности.

Методика

В экспериментах использованы белые крысы-самцы смешанной популяции с исходной массой 200—240 г. Для создания гипокинезии крыс помещали в индивидуальные тесные клетки-пеналы из оргстекла (конструкции Д. А. Сигалевича, Г. Ф. Шумакова), резко ограничивающие их двигательную активность [13]. Как контрольные, так и подопытные животные находились в одинаковых условиях вивария на обычном лабораторном рационе. Всего было проведено 5 серий опытов. В I серии животные находились в условиях гипокинезии, во II серии у крыс под эфирным масочным наркозом производили адrenaлэктомию и затем помещали их в клетки-пеналы. В III серии у животных производили адrenaлэктомию, после которой они находились в условиях свободного передвижения. В IV серии экспериментов у животных под эфирным наркозом производили ложную операцию и затем помещали их в гипокинетические клетки. В V серии опытов крысы после ложной операции находились в условиях свободного передвижения. Через 1, 3, 7, 10, 20 и 30 сут от начала эксперимента крыс декапитировали в холодной комнате при 2—4 °С. У животных выделяли микросомальную фракцию печени методом дифференциального центрифугирования, в которой определяли активность деметилазы амидопиринна [12], гидроксилазы анилина [2], НАДФ·Н — цитохром с-редуктазы [21], содержание цитохромов Р-450 и b_5 [22], а также микросомального белка [20]. Результаты экспериментов обрабатывали статистически на микрокалькуляторе БЗ-34 по специальной программе [19].

Результаты и обсуждение

Результаты исследования показали, что при гипокинезии наблюдаются фазные изменения активности микросомальных ферментов и содержания цитохромов (табл. 1). Так, через сутки после ограничения двигательной активности содержание цитохромов Р-450 и b_5 увеличивается, а активность деметилазы амидопиринна, гидроксилазы анилина и НАДФ·Н-цитохром с-редуктазы возрастает. На 3-и сутки исследования существенных различий в активности ферментов и содержании цитохромов не наблюдалось, а в последующие сроки отмечалось значительное угнетение монооксигеназной ферментной системы печени. Адrenaлэктомию уже через сутки приводила к значительному снижению активности микросомальных ферментов и цитохромов. В последующие сроки наблюдения эти явления прогрессировали вплоть до 30-х суток после адrenaлэктомии (см. табл. 1). Сочетание гипокинезии с адrenaлэктомией через 1 и 3 сут не вызывало значительных различий в содержании цитохромов Р-450 и b_5 и в активности микросомальных ферментов по сравнению с показателями адrenaлэктомированных крыс в те же сроки исследования. В дальнейшем, начиная с 7-х суток, имело место более значительное угнетение монооксигеназной ферментной системы печени у животных этой группы, наиболее четко выраженное на 20-е и 30-е сутки экспери-

Таблица 1
Активность микросомальных ферментов и содержание цитохромов Р-450 и b_5 в печени крыс в различные сроки гипокинезии и адrenaлэктомии

Группа обследуемых	Сроки исследования, сут	Содержание цитохромов, нмоль на 1 мг белка		N-деметилаза амидопиринна, нмоль НСОН на 1 мг в 1 мин	Гидроксилаза анилина, нмоль п-аминофенола на 1 мг в 1 мин	НАДФ·Н-цитохром с-редуктаза, нмоль на 1 мг в 1 мин
		Р-450	b_5			
Контроль		1,02 ± 0,021	0,930 ± 0,037	0,547 ± 0,047	0,586 ± 0,075	39,42 ± 2,98
Гипокинезия	1-е	1,32 ± 0,043*	0,865 ± 0,095	0,857 ± 0,059*	0,830 ± 0,056*	49,96 ± 4,77
	3-и	0,990 ± 0,044	0,803 ± 0,036	0,498 ± 0,037	0,677 ± 0,048	36,85 ± 1,39
	7-е	0,791 ± 0,046*	0,680 ± 0,039*	0,403 ± 0,029*	0,648 ± 0,027	33,50 ± 2,80
	10-е	0,763 ± 0,058*	0,564 ± 0,038*	0,342 ± 0,018*	0,605 ± 0,026	31,25 ± 2,11
	20-е	0,513 ± 0,041*	0,581 ± 0,052*	0,288 ± 0,029*	0,493 ± 0,016*	19,93 ± 2,95*
	30-е	0,531 ± 0,022*	0,459 ± 0,023*	0,297 ± 0,035*	0,405 ± 0,038*	17,12 ± 2,94*
Адrenaлэкто-мия	1-е	0,750 ± 0,033*	0,780 ± 0,030*	0,338 ± 0,019*	0,501 ± 0,043	26,54 ± 2,51*
	3-и	0,547 ± 0,049*	0,672 ± 0,036*	0,237 ± 0,035*	0,432 ± 0,034	18,02 ± 2,47*
	7-е	0,489 ± 0,017*	0,572 ± 0,020*	0,210 ± 0,027*	0,389 ± 0,031*	22,81 ± 1,59*
	10-е	0,397 ± 0,035*	0,352 ± 0,026*	0,228 ± 0,029*	0,429 ± 0,036*	17,87 ± 2,97*
	20-е	0,328 ± 0,037*	0,288 ± 0,018*	0,233 ± 0,022*	0,376 ± 0,015*	19,70 ± 1,13*
	30-е	0,275 ± 0,028*	0,311 ± 0,017*	0,195 ± 0,026*	0,355 ± 0,021*	15,32 ± 1,25*

* $P < 0,05$.

Таблица 2

Активность микросомальных ферментов и содержание цитохромов Р-450 и b_5 в печени крыс при сочетании гипокинезии с адреналэктомией и ложной операцией

Группа обследуемых	Сроки исследования, сут	Содержание цитохромов, нмоль на 1 мг белка		N-деметилаза амидопирин, нмоль/НСОН на 1 мг в 1 мин	Гидроксилаза анилина, нмоль/п-амино-фенола на 1 мг в 1 мин	НАДФ·Н-цитохром с-редуктаза, нмоль на 1 мг в 1 мин
		Р-450	b_5			
Контроль		1.21 ± 0.019	0.810 ± 0.026	0.570 ± 0.042	0.680 ± 0.038	44.12 ± 3.65
Гипокинезия + адреналэктомия	1-е	$0.680 \pm 0.046^*$	$0.650 \pm 0.030^*$	$0.265 \pm 0.031^*$	0.540 ± 0.058	$32.10 \pm 2.39^*$
	3-е	$0.510 \pm 0.028^*$	$0.600 \pm 0.029^*$	$0.195 \pm 0.021^*$	$0.407 \pm 0.034^*$	$20.74 \pm 5.64^*$
	7-е	$0.375 \pm 0.017^*$	$0.332 \pm 0.020^*$	$0.240 \pm 0.021^*$	$0.388 \pm 0.013^*$	$17.34 \pm 2.43^*$
	10-е	$0.286 \pm 0.019^*$	$0.328 \pm 0.015^*$	$0.178 \pm 0.017^*$	$0.298 \pm 0.017^*$	$19.64 \pm 2.85^*$
	20-е	$0.243 \pm 0.032^*$	$0.204 \pm 0.008^*$	$0.195 \pm 0.013^*$	$0.200 \pm 0.027^*$	$15.68 \pm 2.36^*$
	30-е	$0.162 \pm 0.017^*$	$0.206 \pm 0.032^*$	$0.157 \pm 0.019^*$	$0.214 \pm 0.018^*$	$16.11 \pm 2.70^*$
Гипокинезия + ложная операция	1-е	0.995 ± 0.081	0.740 ± 0.086	0.528 ± 0.040	0.720 ± 0.055	41.23 ± 1.76
	3-е	$0.840 \pm 0.044^*$	0.690 ± 0.073	$0.412 \pm 0.034^*$	0.691 ± 0.026	37.25 ± 2.31
	7-е	$0.662 \pm 0.018^*$	$0.473 \pm 0.014^*$	$0.421 \pm 0.022^*$	0.609 ± 0.013	35.69 ± 4.38
	10-е	$0.605 \pm 0.030^*$	$0.481 \pm 0.033^*$	$0.327 \pm 0.038^*$	$0.560 \pm 0.019^*$	$29.85 \pm 3.72^*$
	20-е	$0.569 \pm 0.026^*$	$0.443 \pm 0.025^*$	$0.307 \pm 0.021^*$	$0.510 \pm 0.013^*$	$24.18 \pm 2.15^*$
	30-е	$0.538 \pm 0.021^*$	$0.462 \pm 0.016^*$	$0.278 \pm 0.023^*$	$0.414 \pm 0.019^*$	$18.24 \pm 2.43^*$

* $P < 0.05$.

мента (см. табл. 1 и 2). Сочетание гипокинезии с ложной операцией сопровождалось лишь незначительным уменьшением содержания цитохрома Р-450 в печени по сравнению с показателями животных, находившихся в условиях «чистой» гипокинезии в первые 3 сут после ложной операции, а в дальнейшем каких-либо различий в показателях этих групп не было обнаружено. Сама по себе ложная операция к существенным изменениям активности микросомальных ферментов не приводила.

Следовательно, при гипокинезии, адреналэктомии и их сочетании происходит значительное угнетение активности основных микросомальных ферментов в печени, наиболее выраженное через 10 сут после ограничения двигательной активности.

Известно, что гипокинезия является сильным стресс-фактором, приводящим в начальном периоде к активации гипоталамо-надпочечниковой системы. В последующем наступает ее истощение [9, 17]. При длительной гипокинезии снижается уровень катехоламинов в крови и тканях, а содержание биогенных аминов, напротив, возрастает [7, 15]. Поскольку стероидные гормоны являются индукторами микросомальных ферментов печени, становится понятным некоторое увеличение их активности в ранние сроки гипокинезии, когда их содержание в организме возрастает. Это подтверждается и тем фактом, что адреналэктомия в ранние

сроки гипокинезии нивелирует увеличение активности монооксигеназной ферментной системы. Одним из проявлений стрессовой ситуации в начальном периоде гипокинезии является активизация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в биомембранах микросом и митохондрий [4, 11], что было также подтверждено и нашими исследованиями [1]. В случае кратковременной стрессовой ситуации процесс образования липидных перекисей через определенное время блокируется, что предотвращает повреждающее действие продуктов ПОЛ, как это было показано в работе Т. Е. Шидловской [18]. В то же время существует мнение, что длительное ограничение двигательной активности вызывает изменения в биохимических процессах уже не вследствие стресса, а из-за действия собственно гипокинезии [8]. Об этом же свидетельствуют и результаты наших исследований, в которых у крыс при длительной гипокинезии происходят, несмотря на отсутствие надпочечников, прогрессирующее угнетение активности основных микросомальных ферментов и снижение содержания цитохромов Р-450 и b_5 вплоть до 30-го дня эксперимента. До настоящего времени остается неясным, с чем связаны изменения в биохимических процессах, протекающих в различных органах и тканях при гипокинезии: собственно обездвиживанием или влиянием хронического стресса, причем, по мнению И. В. Фе-

дорова [15], вычленив действие каждого из них в отдельности весьма трудно. Считают, что первичный ответ на действие гипокинезии обусловлен гормональными реакциями. Действительно, это имеет место в отношении монооксигеназной ферментной системы печени, однако лишь в 1-е сутки ограничения двигательной активности. В последующем основную роль играет, вероятно, уменьшение проприоцептивной импульсации, поступающей от мышц в ЦНС, на что указывают многие исследователи [4, 8, 11]. Немаловажное значение в патогенезе угнетения детоксицирующей функции печени имеет также нарушение процессов микроциркуляции с развивающейся гипоксией, активизацией процессов ПОЛ, угнетением энергетических реакций, снижением синтеза АТФ и белка, приводящими в конечном итоге к уменьшению пула функционирующих митохондриальных ферментов гепатоцитов [5, 6, 8, 15]. В поздние сроки гипокинезии роль стресса нивелируется, что подтверждается более значительным снижением содержания цитохромов P-450 и b_5 , а также активности митохондриальных ферментов у крыс на 20-е и 30-е сутки исследования при сочетании воздействия гипокинезии и адреналэктомии по сравнению с таковым при «чистой» адреналэктомии.

Таким образом, в патогенезе нарушения детоксикационной функции печени при гипокинезии играют роль два основных фактора: стресс-реакция и собственно ограничение двигательной активности. Причем стресс-реакция оказывает свое действие лишь в ранние сроки гипокинезии, в дальнейшем же основную патогенетическую роль играет само ограничение двигательной активности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Азимова Ш. // Использование иммунологических и токсикологических методов при изучении патологических состояний. — Ташкент, 1983. — С. 125.
2. Арчаков А. И., Карузина И. И., Тверитинов В. И. и др. // Биохимия. — 1975. — Т. 40, № 1. — С. 32—39.
3. Бричко В. В. // Пат. физиол. — 1983. — № 5. — С. 56—59.
4. Голотин В. Г., Гоненко В. А., Добрякова А. И. // Физиологические и клинические проблемы адаптации человека и животного к гипотермии, гипоксии и гиподинамии. — М., 1975. — С. 153—154.

5. Гринберг Л. Н. // Вопр. мед. химии. — 1970. — № 4. — С. 387—390.
6. Дроздова Л. В. // Арх. анат. — 1971. — № 11. — С. 100—104.
7. Киричек Л. Т. // Косм. биол. — 1980. — № 1. — С. 72—74.
8. Коваленко Е. А., Гуровский Н. Н. Гипокинезия. — М., 1980.
9. Коркач В. И. // Врач. дело. — 1980. — № 2. — С. 11—16.
10. Метелица Д. И. Активация кислорода ферментными системами. — М., 1982.
11. Микаелян Э. М., Меликонян М. М., Мелик-Агаева Е. А. // Журн. экспер. и клин. мед. — 1979. — № 5. — С. 11—18.
12. Попов П. // Экспер. мед. и морфол. — 1973. — Т. 12, № 3. — С. 130—135.
13. Сигалевич Д. А., Шумаков Г. Ф. // Арх. анат. — 1976. — № 9. — С. 96—98.
14. Тигранян Р. А., Белякова М. И., Давидова Н. А. и др. // Авиакосмическая медицина. — Москва—Калуга, 1975. — Т. 2. — С. 187—190.
15. Федоров И. В. // Изменения метаболизма у животных при гипокинезии. — Ярославль, 1984. — С. 81—88.
16. Хакимов З. З., Комарин А. С., Наджимудинов К. И., Рузубакиев Р. М. // Мед. журн. Узбекистана. — 1982. — № 1. — С. 38—40.
17. Цветов Е. П., Разин С. И., Рычко А. В. // Врач. дело. — 1975. — № 9. — С. 9—14.
18. Шидловская Т. Е. // Изменения метаболизма у животных при гипокинезии. — Ярославль, 1984. — С. 44—55.
19. Юрах Е. М., Зозуляк В. И., Пицк Р. Л., Герзанич И. И. // Врач. дело. — 1985. — № 11. — С. 114—117.
20. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
21. Masters B. S. S., Williams C. H., Kamin H. // Meth. Enzymol. — 1967. — Vol. 10. — P. 565.
22. Omura T., Sato R. // J. biol. Chem. — 1964. — Vol. 7. — P. 2370—2378.

Поступила 10.10.86

THE STATE OF MONOOXYGENASE ENZY-MATIC SYSTEM IN LIVER TISSUE OF RATS WITH HYPOKINESIA

A. S. Komarin, Sh. A. Azimova

Central Research Laboratory, Medical School, Tashkent

Activities of amidopyrine N-demethylase, aniline hydroxylase, NADPH, cytochrome c reductase as well as content of cytochromes P-450 and b_5 were studied in liver tissue of rats within 1, 3, 7, 10, 20 and 30 days of hypokinesia caused by maintaining of the animals in individual cell-cages. Both the hypokinesia and its combination with adrenalectomy were accompanied by inhibition of microsomal oxidation especially during the later steps of the experiment. At the same time, activity of microsomal enzymes was slightly increased within 1-3 days of the hypokinesia; this effect was not observed after combination of hypokinesia with adrenalectomy. Stress factor appears to be of importance within early periods of hypokinesia, whereas the hypokinesia itself acquires the major role in prolonged deprivation of free motions.

В. С. Чайковский, О. Б. Башарина, И. В. Шалыпина, В. А. Рогозкин

ВЛИЯНИЕ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ НА СОДЕРЖАНИЕ МИОГЛОБИНА И ТРОПОМИОЗИНА В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ И МИОГЛОБИНА В КРОВИ КРЫС

НИИ физической культуры, Ленинград

Исследование содержания тканеспецифических белков скелетных мышц в биологических жидкостях человека приобретает в клинической биохимии в последние годы все возрастающее значение. Если определение активности ферментов в диагностических целях распространено достаточно широко [3], то измерение содержания белков скелетных мышц в крови стало возможным лишь с развитием в последнее 10-летие высокочувствительных и специфичных радиоиммунологических методов. Наиболее широкое применение в клинической практике нашло измерение концентрации в крови миоглобина. Проведенные исследования создали методические и теоретические предпосылки для изучения влияния физических нагрузок на содержание тканеспецифических белков скелетных мышц в крови [7, 9]. Показано, что нагрузки приводят к увеличению содержания миоглобина в крови и это увеличение зависит как от тренированности испытуемых, так и от тяжести нагрузки. Полученные данные позволили предположить, что физическая нагрузка может служить моделью для изучения механизмов и причин появления белков скелетных мышц в крови. В то же время влияние физической нагрузки на содержание регуляторных белков в скелетных мышцах изучено недостаточно: исследовалось, как правило, содержание одного белка — миоглобина [12].

Одновременные исследования содержания миоглобина и тропониозина в крови и мышцах при выполнении физической нагрузки позволяют уточнить характер и закономерности изменений внутриклеточного метаболизма, выявить причины появления мышечных белков в крови и оценить функциональное состояние мышц в различные периоды отдыха после нагрузки.

Методика

Эксперименты проводили на белых крысах-самцах массой 230—240 г, подвергавшихся

физической нагрузке в виде плавания с грузом (12 % от массы тела для нетренированных и 20 % — для предварительно тренированных животных) [4, 5]. В I и II сериях экспериментов определяли концентрацию миоглобина в крови и содержание миоглобина и тропониозина в пяточной и четырехглавой мышцах. В III серии экспериментов изучали полупериод жизни миоглобина в мышцах тренированных и нетренированных животных. Исследование проводили через 2, 4, 12, 24, 48, 72, 96, 100 и 144 ч после нагрузки (6—7 1-минутных интервалов плавания с 1,5 мин отдыха между ними). Предварительная тренировка проводилась в течение 4 нед от 5 дней в неделю с увеличением груза от 12 до 18 % от массы тела.

Концентрацию миоглобина в крови измеряли радиоиммунологическим методом (РИМ). Препарат миоглобина выделяли из мышц крыс по модифицированному методу Люгинбухла [2]. Гомогенность полученного белка определяли с помощью диск-электрофореза в 10 % ПААГ. Иммунизируя кроликов породы шиншилла массой 2—2,5 кг гомогенным препаратом миоглобина, получали специфическую антисыворотку с титром 1:300, не дающую перекрестных реакций с гемоглобином, сывороточным альбумином, иммуноглобулином G, миоглобином лошади и человека. Меченный ^{125}I миоглобин крысы с удельной радиоактивностью 40 мкКи на 1 мкг белка был получен по методу Болтона и Хантера [9]. В работе применяли стандартные растворы миоглобина крысы (1,5—400 нг/мл), 0,05 М Na-фосфатный буфер, содержащий 0,08 М NaCl, 0,01 М ЭДТА, 0,5 % бычий сывороточный альбумин (БСА) и 0,01 % азид натрия. Радиоиммунологическое определение миоглобина проводили в полистироловых пробирках (11X75 мм) по следующей схеме: к 100 мкл стандартного раствора миоглобина или 25 мкл исследуемой сыворотки крови добавляли 100 мкл антисыворотки (в разведении 1:150) и 100 мкл ^{125}I -миоглобина ($18\text{—}20 \cdot 10^3 \text{имп} \cdot \text{мин}^{-1}$). Реакционную смесь тщательно встряхивали и инкубировали при 4°C в течение ночи. Затем добавляли 200 мкл 5 % раствора БСА и 500 мкл 22 % раствора полиэтиленгликоля (мол. масса 6000), перемешивали и центрифугировали 15 мин при 2000 об/мин и 4°C. Надосадочную жидкость сливали и измеряли радиоактивность осадка на счетчике «Гамма-1» (СССР) с эффективностью счета 56 %. Стандартная кривая для радиоиммунологического определения миоглобина в логит-лог-координатах носит линейный характер от 2 до 400 нг/мл (рис. 1). Чувствительность — $3,7 \pm 0,8$ нг/мл. Эффективность открытия для всех использованных доз миоглобина составила 100 ± 3 %. Зависимость со-

¹ Авторы выражают благодарность канд. хим. наук В. И. Мишину (Институт прикладной химии) за синтез ^{125}I -миоглобина.

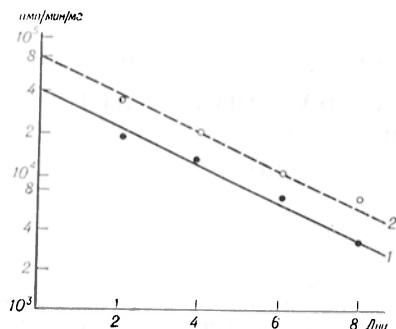


Рис. 1. Стандартная кривая радиоиммунного определения миоглобина крыс.

держания миоглобина от объема исследуемой сыворотки носит линейный характер в пределах от 5 до 50 мкл. Коэффициенты вариации составили: внутри опыта — $6,0 \pm 1,5\%$, между опытами — $12,3 \pm 1,8\%$.

Для определения содержания миоглобина в мышцах крыс извлекали пятую и четырехглавую мышцы бедра, готовили 1,3 % гомогенат в 0,05 М фосфатном буфере pH 8,0, центрифугировали 30 мин при 28 000 g и определяли концентрацию миоглобина в надосадочной жидкости спектрофотометрически [6].

Для определения содержания тропомиозина в мышцах крыс 100 мг измельченной четырехглавой мышцы гомогенизировали в 5 мл трис-буфера pH 7,5 (50 mM KCl; 10 mM трис-HCl; 0,5 mM ЭДТА). Белки экстрагировали 1 мл буфера pH 7,0, содержащего 1 M KCl, 25 mM трис-HCl и 0,5 mM ЭДТА. 100 мкл экстракта подвергали электрофоретическому разделению в 10 % ПААГ. Содержание тропомиозина устанавливали расчетным методом по площади пика на денситограмме. Для построения стандартной кривой использовали гомогенный стандарт тропомиозина, выделенный из мышц крыс [10]. Гели сканировали на спектрофотометре М-35 («Бекман», США).

Полупериод жизни миоглобина в скелетных мышцах определяли методом «импульсной» метки [12] с использованием D, L-лейцина- $^{14}\text{C}_1$ (8,5 ТБК на 1 г).

Результаты и обсуждение

У нетренированных животных содержание миоглобина и тропомиозина в мышцах значительно снижается в первые часы после физической нагрузки (рис. 2, б). Максимальное снижение концентрации миоглобина отмечено через 2 ч, когда она уменьшается в пяточной красной мышце в 2 раза, а в смешанной четырехглавой — в 1,2 раза. Содержание тропомиозина снижается в 1,6 раза через 4—12 ч после нагрузки. Различия в сроках максимального снижения этих двух белков, вероятно, связаны с их различной массой, размером и внутренней локализацией в мышечной клетке. Высокое содержание миоглобина и тропомиозина

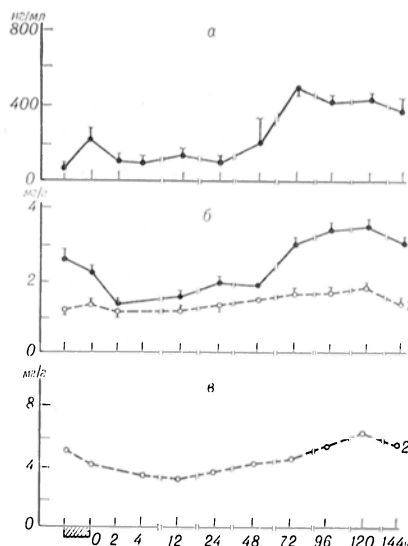


Рис. 2. Влияние однократной физической нагрузки на содержание миоглобина в крови (а), скелетных мышцах (б) и тропомиозина в скелетных мышцах (в) нетренированных крыс. Здесь и на рис. 3: 1 — пятичная мышца; 2 — четырехглавая мышца бедра. Заштрихованная область — фон.

в мышцах дает основание предполагать, что снижение их концентрации обусловлено не только выходом в кровяное русло, но и деградацией белков в первые часы отдыха после нагрузки [1, 14]. Биологический смысл интенсификации деградации мышечных белков после физической нагрузки в целом понятен. Эти процессы способствуют обновлению сократительных и регуляторных белков, что ведет к повышению функциональных возможностей и сократительной способности мышцы. Одновременно обновляется и создается дополнительный пул низкомолекулярных веществ, являющихся субстратом для адаптивного синтеза структурных и ферментативных белков мышц.

В дальнейшем, в более отдаленные периоды отдыха после нагрузки, содержание исследуемых белков в мышцах начинает возрастать. Концентрация миоглобина увеличивается на 25—30 % через 72—120 ч и приближается к исходному уровню через 144 ч. Содержание тропомиозина увеличивается на 22 % через 120 ч и остается повышенным через 144 ч после нагрузки (рис. 2, в). Обнаруженное нами увеличение концентрации регуляторных белков мышц в отдаленные периоды отдыха соответствует общебиологическому закону суперкомпенсации. Наличие

Влияние систематической мышечной деятельности на содержание миоглобина и тропомиозина в мышцах (в мг/г, $M \pm m$)

Условия опыта	Пяточная мышца	Четырехглавая мышца	
	миоглобин	миоглобин	тропомиозин
Контроль	2,61 \pm 0,19	1,23 \pm 0,08	4,90 \pm 0,12
Тренировка	3,44 \pm 0,08	2,61 \pm 0,12	5,54 \pm 0,12

Примечание. $n=10$, $p<0,01$.

тесных корреляционных связей между изменениями содержания этих белков ($r=0,72$, $p<0,01$) свидетельствует об общем механизме, регулирующем этот процесс.

Предварительная тренировка животных приводит к увеличению содержания миоглобина в мышцах в 1,3—2,1 раза и тропомиозина на 13 % (см. таблицу). Изменения содержания исследуемых белков в мышцах у тренированных и нетренированных животных при физической нагрузке носят в целом сходный характер (рис. 3). Вместе с тем снижение концентрации миоглобина и тропомиозина в мышцах тренированных животных в ближайшие сроки после нагрузки выражено в значительно меньшей степени (на 25 и 15 % соответственно). В отдаленной анаболической фазе адаптации увеличение со-

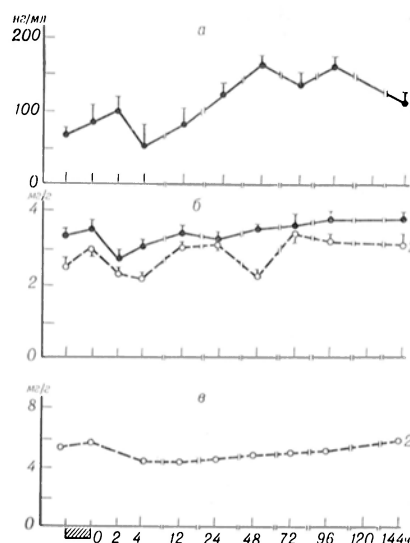


Рис. 3. Влияние однократной физической нагрузки на содержание миоглобина в крови (а), скелетных мышцах (б) и тропомиозина в скелетных мышцах (в) тренированных крыс.

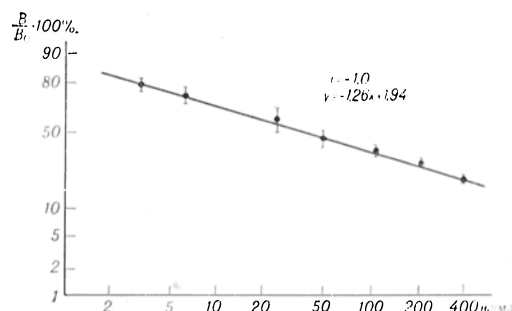


Рис. 4. Влияние систематической мышечной деятельности на полупериод жизни миоглобина в мышцах.

1 — нетренированные животные, $T_{1/2}=2,52 \pm 0,10$ дня;
2 — тренированные животные, $T_{1/2}=2,54 \pm 0,03$ дня.

держания этих белков у тренированных животных также выражено в 1,5—2 раза меньше, чем у нетренированных, но сохраняется более длительное время.

Обращают на себя внимание существенные различия эффектов физической нагрузки на концентрацию миоглобина в мышцах разного функционального профиля, что согласуется с данными, полученными при выполнении других видов физической работы [12, 13]. Полупериод жизни миоглобина в мышцах контрольных и тренированных животных одинаков и равен 2,5 дня (рис. 4). Вместе с тем интенсивность включения ^{14}C -лейцина в миоглобин мышц тренированных животных в 1,7 раза выше, чем у нетренированных. Эти данные дают основание считать, что увеличение содержания миоглобина в мышцах тренированных животных обусловлено интенсификацией его синтеза. Повышенный уровень биосинтеза миоглобина сохраняется и через 8—10 дней после окончания систематических физических нагрузок. Изменение уровня миоглобина в крови в целом соответствует изменениям, происходящим в мышцах. Содержание миоглобина в крови увеличивается сразу после физической нагрузки в 3 раза и через 2 ч отдыха возвращается к исходному уровню. В отдаленный период отдыха (через 72 ч) содержание миоглобина в крови возрастает в значительно большей степени (в 9 раз), чем непосредственно после нагрузки, и остается повышенным через 144 ч (рис. 2, а). Изменения содержания миоглобина в крови тренированных животных после однократной интенсивной нагрузки

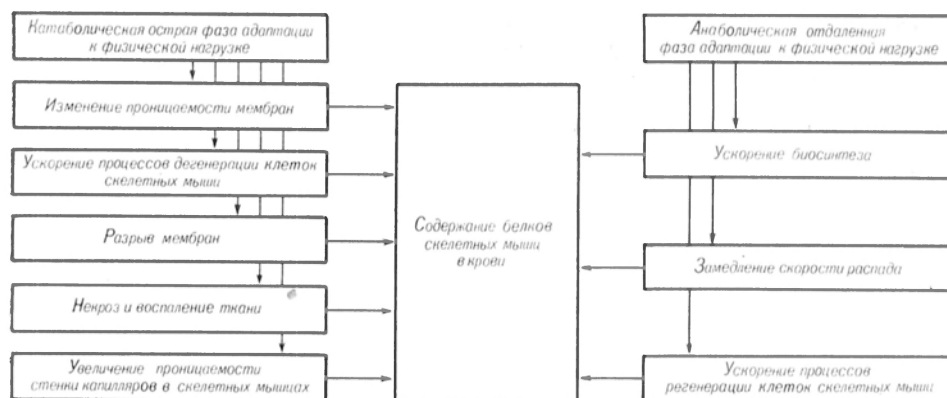


Рис 5

также носят фазовый характер с пиком в ближайший и отдаленный периоды отдыха. Максимальное возрастание концентрации миоглобина в крови в ближайшие периоды отдыха отмечается через 2 ч и выражено в меньшей степени (в 1,5 раза), чем у нетренированных животных. В отдаленные периоды отдыха повышение содержания миоглобина в крови тренированных животных значительно ниже (в 2,4 раза) по сравнению с таковым у нетренированных (см. рис. 3, а). Результаты этих исследований дают основание полагать, что по изменению концентрации мышечных белков в крови можно судить о функциональном состоянии мышц и их подготовленности к предлагаемой физической нагрузке.

Механизмы поступления мышечных белков в кровяное русло остаются во многом неизученными, особенно это относится к отдаленным периодам отдыха при интенсивных процессах синтеза белков в мышечных клетках. На основании литературных данных и результатов наших экспериментов были обобщены причины, влияющие на уровень мышечных белков в сыворотке крови после физической нагрузки (см. рис. 5 схему).

Таким образом, в результате проведенных исследований получено экспериментальное подтверждение взаимосвязи, между выполнением физической нагрузки и появлением в крови белков скелетных мышц. Выявлены 2 фазы адаптации скелетных мышц к нагрузке: катаболическая, протекающая в первые часы после окончания мышечной деятельности, и анаболическая, происходящая в отдаленный период отдыха после нагрузки. Изменения содержания миоглобина и тропомиозина

в мышцах после физической нагрузки носят фазовый характер и зависят от степени адаптации организма к мышечной деятельности. Содержание миоглобина в крови отражает реакцию мышечной системы на нагрузку и может служить критерием оценки различных фаз адаптации к физической нагрузке и функционального состояния скелетной мускулатуры.

ЛИТЕРАТУРА

1. Виру А. А., Варрик Э. В., Ээпик В. Э. и др. // Физиол. журн. СССР. — 1984. — Т. 70, № 12. — С. 1624—1628.
2. Домбровский В. И., Поверенный А. М. // Вопр. мед. химии. — 1981. — № 4. — С. 566—568.
3. Коровкин Б. Ф. // Вестн. АМН СССР. — 1985. — № 1. — С. 12—21.
4. Чайковский В. С., Евтинова И. В., Башарина О. Б. // Вопр. мед. химии. — 1985. — № 6. — С. 80—86.
5. Чайковский В. С., Иванова Е. М., Рогозкин В. А. // Укр. биохим. журн. — 1986. — № 2. — С. 54—58.
6. Bayer S. H., Fainer D. C. // Science. — 1963. — Vol. 140. — P. 1228—1231.
7. Besson C., Bourdonnee C., de Place C. et al. // Ann. Cardiol. — 1982. — Vol. 31. — P. 447—452.
8. Bolton A. E., Hunter W. M. // Biochem. J. — 1973. — Vol. 133. — P. 529—539.
9. Borsotti A. E., Chiavacci G., Tozzi P. // Quad. Sclavo diagn. clin. — 1982. — Vol. 18. — P. 188—194.
10. Cummins P., Perry S. // Biochem. J. — 1973. — Vol. 133. — P. 765—777.
11. Ganchow R. E., Schimke R. T. // J. biol. Chem. — 1969. — Vol. 244. — P. 4649.
12. Hickson P. C., Overland S. M., Dougherty K. A. // J. appl. Physiol. — 1984. — Vol. 57. — P. 1834—1841.
13. Roxin L., Venge P., Friman G. // Europ. J. appl. Physiol. — 1984. — Vol. 53. — P. 43—47.
14. Yaund V. R., Munro H. N. // Fed. Proc. — 1978. — Vol. 37. — P. 2291—1300.

Поступила 22.04.86

EFFECT OF PHYSICAL EXERCISES ON CONTENT OF MYOGLOBIN AND TROPOMYOSIN IN RAT SKELETAL MUSCLES AND OF MYOGLOBIN IN BLOOD

V. S. Tchaikovsky, O. B. Basharina, I. V. Shaly-pina, V. A. Rogozkin

Research Institute of Physical Culture, Lenin-grad

Single intensive physical exercise caused phase alterations in content of myoglobin and tropomyosin in rat skeletal muscles. Within the first 2-4 hrs of rest concentration of myoglobin and tropomyosin was decreased in muscles by 40-50 % (catabolic, urgent step of adaptation). Within the later period of rest (72-120 hrs) content of myoglobin and tropomyosin was in-

creased by 25-30 % (anabolic, later step of adaptation) as compared with the control level. Similar phase alterations of these proteins in skeletal muscles were detected in trained animals but they were less distinct. Training of the animals led to elevation in content of the proteins in *musculus quadriceps*. The content of myoglobin increased from 1.2 ± 0.1 mg/kg up to 2.6 ± 0.1 mg/kg and that of tropomyosin from 4.9 ± 0.1 mg/kg up to 5.5 ± 0.1 mg/kg as a result of an increase in protein biosynthesis. Incorporation of ^{14}C -leucine into myoglobin was increased 1.7-fold. Concentration of myoglobin in blood of untrained rats was increased 3-fold immediately after physical exercises and — 9-fold within 72 hrs of the rest. Content of muscular proteins in blood reflected the response of muscle system to physical exercises and may serve as a criterion in evaluation of various steps of adaptation to physical loading.

УДК 616-002.5-085.281.873.21-036.8:616.36-018.1-008.1

Т. А. Сокирко

ВЛИЯНИЕ ТУБЕРКУЛОСТАТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ И СУКЦИНАТА НАТРИЯ НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ

Киевский НИИ туберкулеза, пульмонологии и грудной хирургии им. акад. Ф. Г. Яновского

При туберкулезе наблюдаются нарушения окислительно-восстановительных процессов, обусловленные специфической интоксикацией, гипоксическими нарушениями, а также токсическим действием некоторых лекарственных препаратов [7, 9, 11, 12, 17]. Так, изониазид, один из основных туберкулостатических препаратов, нарушает метаболизм ряда витаминов и функцию дыхательной цепи, вызывает ухудшение функционального состояния печени [4, 12].

Метаболит цикла трикарбоновых кислот сукцинат натрия может быть успешно использован при лечении ряда патологических состояний, в том числе эндо- и экзогенных интоксикаций [3, 6, 10]. В последнее время успешно разрабатывается вопрос о возможности направленного воздействия на энергетический обмен с помощью указанного патогенетического средства при туберкулезе и применении туберкулостатических средств [1, 5, 7, 13].

В настоящей работе приведены результаты изучения влияния на окислительное фосфорилирование в митохондриях печени туберкулезного процесса, изониазида и нового туберкулостатического препарата полизида,

оказывающего пролонгированное действие. Препарат синтезирован в Киевском НИИ фармакологии и токсикологии [15], проявляет высокую лечебную активность [14]. Изучена возможность коррекции метаболических изменений с помощью сукцината натрия.

Методика

Опыт проводили на самцах морских свинок массой 300—350 г. Часть животных были заражены микобактериями туберкулеза (подкожное введение 0,001 мг штамма H_3RV). Введение препаратов начали через 7 нед после заражения на фоне развившегося генерализованного туберкулеза. Животные были разделены на следующие 5 групп: в 1-ю вошли морские свинки, не получавшие препаратов, во 2-ю — получавшие изониазид, в 3-ю — получавшие полизид, в 4-ю и 5-ю — получавшие дополнительно к туберкулостатикам сукцинат натрия. Параллельно проводили аналогичные исследования незараженных животных.

Препараты в виде водных растворов вводили внутримышечно в следующих дозах: изониазид — 2 мг/кг и сукцинат натрия — 200 мг/кг ежедневно; полизид — 10 мг/кг (по изониазиду) 1 раз в неделю. Животных декапитировали через 6 нед после начала введения препаратов. Митохондрии получали из печени [16], используя в качестве среды выделения 0,25 М сахарозу с 0,01 М ЭДТА, pH 7,45. Дыхание митохондрий регистрировали полярографически [2] с помощью вращающегося платинового электрода при 25 °C в инкубационной

Показатели окислительного фосфорилирования в митохондриях печени морских свинок при введении туберкулостатических препаратов и сукцината натрия ($M \pm m$)

Условия опыта	Параметр окислительного фосфорилирования					
	V_3	V_4	ДК	АДФ/О	V_{Φ}	$V_{\text{ДНФ}}$
Незараженные животные						
Контроль	$0,139 \pm 0,007$	$0,049 \pm 0,003$	$2,62 \pm 0,03$	$1,82 \pm 0,13$	$0,219 \pm 0,033$	$0,215 \pm 0,007$
Изониазид	$0,160 \pm 0,016$	$0,071 \pm 0,008^*$	$2,37 \pm 0,13$	$2,07 \pm 0,15$	$0,329 \pm 0,051$	$0,301 \pm 0,007^*$
Сукцинат натрия	$0,170 \pm 0,011^*$	$0,060 \pm 0,012$	$2,83 \pm 0,23$	$1,90 \pm 0,09$	$0,318 \pm 0,033$	$0,284 \pm 0,009^*$
Полизид	$0,153 \pm 0,005$	$0,057 \pm 0,009$	$2,67 \pm 0,09$	$1,77 \pm 0,28$	$0,298 \pm 0,032$	$0,240 \pm 0,032^*$
Изониазид и сукцинат	$0,127 \pm 0,009$	$0,059 \pm 0,006$	$2,15 \pm 0,14$	$1,89 \pm 0,26$	$0,220 \pm 0,064$	$0,221 \pm 0,009^b$
Полизид и сукцинат	$0,130 \pm 0,004$	$0,048 \pm 0,006$	$2,95 \pm 0,09$	$1,78 \pm 0,22$	$0,234 \pm 0,030$	$0,209 \pm 0,007^b$
Зараженные животные						
Условный контроль (нелеченые)	$0,28 \pm 0,007$	$0,095 \pm 0,008^*$	$1,14 \pm 0,015^*$	$2,80 \pm 0,13^*$	$0,430 \pm 0,005^*$	$0,189 \pm 0,009^*$
Изониазид	$0,132 \pm 0,008$	$0,084 \pm 0,004$	$1,60 \pm 0,23$	$2,5 \pm 0,09$	$0,365 \pm 0,04^*$	$0,234 \pm 0,007^a$
Полизид	$0,141 \pm 0,012$	$0,078 \pm 0,007$	$1,95 \pm 0,13^{ac}$	$2,41 \pm 0,09$	$0,399 \pm 0,05$	$0,220 \pm 0,008^a$
Изониазид и сукцинат	$0,138 \pm 0,009$	$0,079 \pm 0,066$	$1,68 \pm 0,27^a$	$2,02 \pm 0,11^a$	$0,287 \pm 0,03$	$0,231 \pm 0,007^a$
Полизид и сукцинат	$0,121 \pm 0,008$	$0,056 \pm 0,009^a$	$2,16 \pm 0,09^{ac}$	$1,99 \pm 0,06^a$	$0,238 \pm 0,05^a$	$0,230 \pm 0,007^a$

Примечание. Звездочка — достоверность различий по сравнению с интактными животными; а — по сравнению с зараженным контролем; в — между группами с введением сукцината натрия и без него; с — между зараженными и незараженными группами, которые получали одинаковые препараты.

V_3 , V_4 , $V_{\text{ДНФ}}$ даны в мкатамах O_2 на 1 мг белка митохондрий в 1 мин; ДК, АДФ/О — в отн. ед.; V_{Φ} — в мкмоль АДФ на 1 г белка митохондрий в 1 мин.

среде следующего состава (в М): сахара — 0,15; KCl — 0,075; $MgCl_2$ — 0,0025; KH_2PO_4 — 0,005, рН 7,45. Субстратом окисления служил сукцинат — 10 мМ, акцептором фосфата — АДФ — 200 мкМ, разбавителем — 2,4-динитрофенол (ДНФ) — $1 \cdot 10^{-4}$ М. Скорость дыхания митохондрий измеряли в разных метаболических состояниях [18]: V_3 — в присутствии АДФ, V_4 — после истощения АДФ, $V_{\text{ДНФ}}$ — при разбавленном окислении. Определяли также дыхательный контроль (ДК) и термодинамический коэффициент АДФ/О. Результаты обрабатывали статистически с использованием t -критерия Стьюдента. Опытные группы включали по 7—9 животных.

Результаты и обсуждение

В связи с тем что воздействие на состояние окислительного фосфорилирования оказывают как введение химиопрепаратов, так и сам туберкулезный процесс, исследовали функциональное состояние митохондрий, выделенных из печени животных, получавших различные препараты, — как не зараженных туберкулезом, так и с генерализованной формой туберкулезного процесса. Результаты исследования параметров окислительного фосфорилирования приведены в таблице.

У интактных животных изониазид, полизид и сукцинат натрия вызывали активацию митохондриального окисления. Так, указанные препараты стимулировали разбавленное ДНФ дыхание на 40, 11,1 и 32 % соответствен-

но. При этом изониазид повышал потребление кислорода в состоянии 4 на 44,9 %, а сукцинат увеличивал дыхание в состоянии 3 на 22,5 %. Следует отметить, что при введении изониазида активация дыхания сопровождалась тенденцией к уменьшению величины дыхательного контроля, тогда как сукцинат вызывал противоположное изменение в направлении увеличения сопряженности.

Учитывая данные [7] о том, что изониазид изменяет жирнокислотный состав митохондрий печени в сторону увеличения относительного содержания ненасыщенных жирных кислот, активирующее влияние изониазида на дыхание можно объяснить увеличением проницаемости митохондриальной мембраны. При введении сукцината натрия мы имеем дело с субстратной стимуляцией, не уменьшающей степень сопряженности. Поскольку сукцинат натрия оказывает выраженное антиоксическое и мембраностабилизирующее действие [7, 8], его применение в сочетании с туберкулостатическими препаратами значительно уменьшает изменения в митохондриальном окислении. Так, снижается скорость дыхания в состояниях 3 и 4 до соответствующих показателей контрольной группы, нормализуется разбавленное дыхание.

Генерализованный туберкулезный процесс вызывает ряд резких изменений в функциональном состоянии митохондрий печени. У животных, зараженных туберкулезом и не получавших лечения, по сравнению с контрольными незараженными животными потребление кислорода было несколько понижено в состоянии 3 и значительно (на 85 %) повышено в состоянии 4. В результате дыхательный контроль был на 56,2 % снижен, что свидетельствует о нарушении сопряженности процессов окислительного фосфорилирования и дыхания при генерализованном туберкулезном процессе. Увеличение $V_{\text{ф}}$ и коэффициента АДФ/О (на 96 и 35,4 % соответственно) может свидетельствовать о компенсаторной реакции системы окислительного фосфорилирования. На 12 % снижалась скорость ДНФ-стимулируемого окисления.

Группы животных, зараженных туберкулезом и получавших химиопрепараты, отличаются от условного контроля (зараженных нелеченых животных) некоторым увеличением скорости дыхания в состоянии 3 и ее уменьшением в состоянии 4. Последний показатель особенно значительно (на 67,9 %) уменьшен в группе, получавшей полизид в сочетании с сукцинатом натрия, и практически равен таковому у интактных животных.

Степень сопряжения у зараженных животных, получавших лечение, значительно выше, чем у свинок зараженной нелеченой группы: дыхательный контроль у зараженных животных, получавших лечение полизидом, полизидом и сукцинатом, изониазидом и сукцинатом, был выше такового у нелеченых на 71,1, 89,5 и 47,4 % соответственно. В группах, получавших сукцинат натрия, дыхательный контроль был несколько выше, чем в группах, леченных только туберкулостатическими препаратами. При лечении экспериментального туберкулеза полизидом и сочетанием полизида с сукцинатом натрия это различие было особенно значительным. Более выражена нормализация коэффициента АДФ/О оказалась у животных зараженных групп, получавших, кроме туберкулостатиков, сукцинат натрия. Этот показатель был снижен по сравнению с таковым в зараженной нелеченой группе на 38,6 % (4-я группа)

и 40,7 % (5-я группа) и по величине был близок к коэффициенту у незараженных животных. В этих же группах соответственно на 49,6 и 80,9 % по сравнению с зараженными нелечеными животными была снижена скорость фосфорилирования, которая приближалась к таковой у незараженных животных. Во всех группах зараженных животных, получавших лечение химиопрепаратами, скорость ДНФ-зависимого дыхания находилась практически на уровне контроля, т. е. была повышена по сравнению с зараженной группой, не получавшей лечения.

Таким образом, необходимо отметить значительное влияние специфического инфекционного процесса на функциональное состояние митохондрий печени, выразившееся в основном в снижении степени сопряжения и адаптационной активации фосфорилирования. Установлена активация митохондриального окисления туберкулостатическими препаратами, причем в случае применения полизида это влияние было менее выраженным, по-видимому, из-за отсутствия резких пиков концентрации активной фракции гидразида изоникотиновой кислоты в крови и органах подопытных животных.

Сочетанное применение туберкулостатических препаратов и сукцината натрия оказывает нормализующее действие на ряд показателей окислительного фосфорилирования. Это справедливо и при терапии экспериментального туберкулеза, так как сукцинат натрия, не обладая специфической бактериостатической активностью, дает, помимо мембраностабилизирующего, и общеукрепляющий эффект, корректируя изменения в функциональном состоянии митохондрий печени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иванюта О. М., Малюк В. И., Сокирко Т. А., Деркач В. С. // Съезд фтизиатров и пульмонологов Молдавии, 1-й: Тезисы докладов. Кишинев. — 1984. — С. 118—119.
2. Кондрашева М. Н., Николаева Л. В. и др. // Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. — М., 1973. — С. 50—58.
3. Кондрашева М. Н. // Терапевтическое действие янтарной кислоты. — Пушкино, 1976. — С. 137—140.
4. Коржов В. И. // Укр. биохим. журн. — 1980. — Т. 52. — С. 593—596.

5. Малюк В. И., Коржов В. И., Туманова Т. А. // Терапевтическое действие янтарной кислоты. — Пушино, 1976. — С. 127—129.
6. Малюк В. И. Энергетический обмен миокарда при пороках сердца и метаболическая коррекция его нарушений: Дис. ... д-ра мед. наук. — Киев, 1977.
7. Малюк В. И., Коржов В. И., Максимова А. В., Туманова Т. А. // Актуальные проблемы современной патофизиологии. — Киев, 1981. — С. 231—232.
8. Малюк В. И., Коржов В. И., Максимова А. В. и др. // Украинский биохимический съезд, 4-й: Тезисы. — Киев, 1982. — С. 93—94.
9. Мамолат А. С., Чернушенко Е. Ф. Побочные реакции при антибактериальной терапии больных туберкулезом. — Киев, 1975.
10. Попова Э. М., Сокирко Т. А., Малюк В. И., Шапочкина О. Н. // Фармакологическая коррекция кислородзависимых патологических состояний. — М., 1984. — С. 77—78.
11. Рабухин А. Е. Химиотерапия больных туберкулезом. — М., 1970.
12. Содиков Э. С., Казаков К. С., Гапонько Л. А. // Пробл. туб. — 1975. — № 8. — С. 58—61.
13. Сокирко Т. А., Деркач В. С. // Актуальные вопросы фтизиопульмонологии. — Киев, 1983. — С. 81—82.
14. Сокирко Т. А., Туманова Т. А. // Туберкулез. — Киев, 1985. — Вып. 17. — С. 91—94.
15. Тринус Ф. П., Котенко С. И., Мохорт Н. А. и др. // А. с. 909955 СССР.
16. Allfrey V. // The Cell. Biochemistry, Physiology, Morphology. — New York, 1959, vol. 1. — P. 254.
17. Kato M. // Amer. Rev. resp. Dis., 1967. — Vol. 96, N 5. — P. 998—1008.
18. Chance B., Williams C. R. // Advanc. Enzymol. — 1956. — Vol. 17. — P. 65.

Поступила 10.03.86

EFFECTS OF TUBERCULOSTATIC DRUGS AND SODIUM SUCCINATE ON FUNCTIONAL STATE OF LIVER MITOCHONDRIA IN EXPERIMENTAL TUBERCULOSIS

T. A. Sokirko

Institute of Tuberculosis, Pulmonology and Thoracic Surgery, Kiev

Effects of isoniazide and of new tuberculostatic drug of long-term action on functions of guinea pig liver mitochondria were studied in experimental tuberculosis. Significant changes in oxidative phosphorylation were found. The combination of sodium succinate with tuberculostatic drugs improved the bioenergetic functions of liver mitochondria under the conditions of antibacterial therapy of experimental tuberculosis.

УДК 578.832.1: [578.76:577.214.3

Н. Ф. Правдина, Р. Я. Подчерняева, В. В. Сковородка, Г. А. Галегов,
В. М. Жданов

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ У НЕПАТОГЕННЫХ И ПАТОГЕННЫХ ВИРУСОВ ГРИППА А И В

Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского АМН СССР, Москва

Механизмы формирования патогенности у вируса гриппа продолжают привлекать к себе пристальное внимание ученых. Исследования в этом направлении осуществляются по линии изучения взаимосвязи признака патогенности у вируса гриппа с его генным составом. Установлена зависимость проявления патогенности от наличия либо только Р-генов (генов полимеразного комплекса) [4, 5, 8, 14], либо Р-генов в сочетании с генами НА [14], НА и М [13], NP [6, 12], NP и М [9]. Взаимосвязь между патогенностью и генами полимеразного комплекса (Р1, Р2, Р3) навела на мысль о возможной зависимости между патогенными свойствами и активностью РНК-полимеразы вируса гриппа, осуществляющей транскрипцию вирусного генома.

Настоящая работа посвящена срав-

нительному изучению активности РНК-полимеразы у исходных непатогенных вирусов гриппа А и В и их патогенных для мышей вариантов.

Методика

Вирусы. Штамм А/PR/8/34 (H1N1) получен из музея вирусов Института вирусологии им. Д. И. Ивановского АМН СССР, штаммы А/СССР/05/81 (H3N2) — антигенный аналог эталонного штамма А/Bangkok 2/79, А/Philippines 2/82 (H3N2) и В/Singapore 222/79 переданы нам из лаборатории гриппа Института вирусологии, штамм А/seal/Massachusetts 1/80 (H7N7) изолирован из тюленей [7] и любезно предоставлен нам для работы доктором Вебстером.

Патогенные варианты (Р⁺_m) штаммов А/seal/Mass 1/80 и В/Singapore 222/79 селекционированы нами после 20 серийных пассажей через легкие белых мышей; патогенные варианты штаммов А/СССР/05/81 и А/Philippines 2/82 получены после 26 и 36 пассажей соответственно.

Таблица 1
Активность РНК-полимеразы у исходных вирусов гриппа А и В и их патогенных вариантов

Штамм	Число пассажей	Патогенность lg LD ₅₀	Удельная активность РНК-полимеразы, ед.
A/seal Massachusetts 1/80			
исходный		—	10,0±0,5
патогенный	20	4,5	14,7±0,5
A/СССР/05/81			
исходный		—	9,9±0,6
патогенный	26	4,5	28,9±0,8
A/Philippines 2/82			
исходный		—	10,0±0,2
патогенный	36	3,5	22,6±0,5
B/Singapore 222/79			
исходный		—	3,3±0,2
патогенный	20	3,0	5,8±0,4

Примечание. Прочерк — непатогенный для мышей.

Патогенные свойства определяли путем интраназального заражения белых мышей массой 10—12 г различными (от 10^{-1} до 10^{-5}) разведениями вирусов по 0,05 мл на мыш. Гибель мышей учитывали в течение 14 дней, LD₅₀ высчитывали по Риду и Менчу.

Очистку вирусов проводили по методу [10] в нашей модификации [2] из алантоисной жидкости зараженных эмбрионов.

Активность вирионной РНК-полимеразы определяли по [3, 11]. Реакционная смесь содержала в 0,2 мл: трис-НСl pH 8,0—65 мМ, [11] — УТФ (уд. акт. 925 ГБк/ммоль; СССР) — 185 кБк, АТФ, ЦТФ и ГТФ («Serva», ФРГ) —

по 1,5 мМ, КСl — 100 мМ, NaCl — 10 мМ, MgCl₂ — 5 мМ, дитиотреитол («Calbiochem», США) — 2,5 мМ, ApG («Sigma», США) — 0,1 мМ, неионный детергент NP-40 (ВДН, Англия) — 0,2 %. В качестве источника фермента использовали суспензию очищенного вируса (20—60 мкг белка в пробе). За единицу удельной активности принято включение в РНК 1 нмоль УМФ в течение 1 ч, рассчитанное на 1 мг белка.

Результаты и обсуждение

Проведено определение транскриптазной активности у 4 групп исходных вирусов гриппа А и В непатогенных для мышей и их патогенных вариантов.

Определение активности вирионной РНК-полимеразы у исходных вирусов гриппа А (штаммы A/seal/Massachusetts 1/80, A/СССР/05/81 и A/Philippines 2/82) выявило их относительно низкую способность к транскрипции в системе in vitro (удельная активность ~10 ед.). Патогенные для мышей варианты этих вирусов характеризуются более высокой транскриптазной активностью (табл. 1). Так, у патогенного варианта тюленьего вируса гриппа фермент в 1,5 раза активнее (удельная активность 14,7 ед.), чем у исходного. Активность РНК-полимеразы патогенного варианта штамма A/Philippines 2/82 (удельная активность 22,6 ед.) в 1,3 раза выше исходного штамма. Патогенный вари-

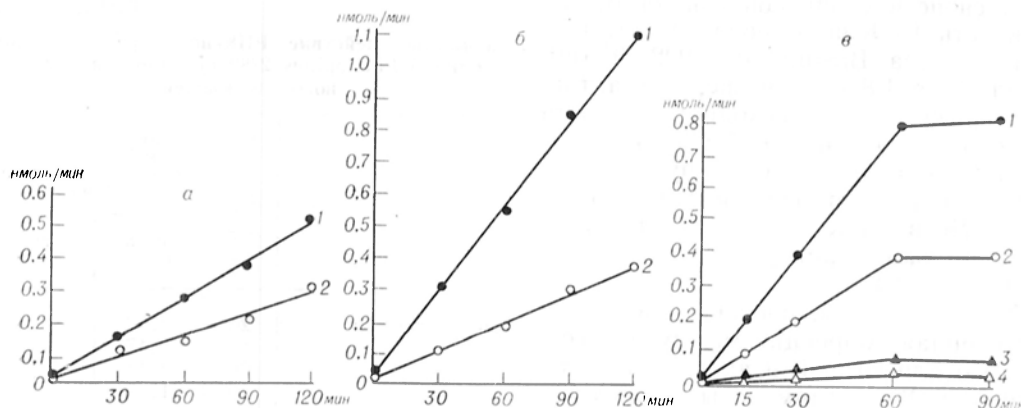


Рис. 1. Кинетика активности РНК-полимеразы патогенных и непатогенных вирусов гриппа А.

а — вирус гриппа A/seal Massachusetts 1/80; б — вирус гриппа A/СССР/05/81; в — вирус гриппа A/Philippines 2/82. 1 и 2 — соответственно патогенный и непатогенный вирусы в присутствии 0,1 мМ ApG; 3 и 4 — патогенный и непатогенный вирусы в отсутствие ApG; по оси абсцисс — время инкубации (в мин); по оси ординат — включение $[^3\text{H}]$ — УМФ (в нмоль/мин). В пробах содержится по 40 мкг белка.

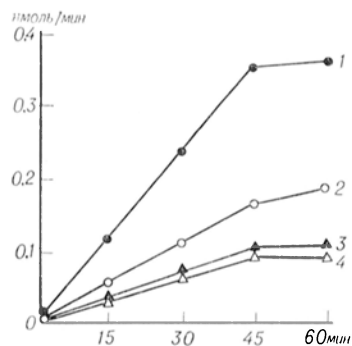


Рис. 2. Кинетика активности РНК-полимеразы исходного и патогенного вариантов вируса гриппа B/Singapore 222/79. Обозначения те же, что и на рис. 1.

ант штамма A/СССР/05/81 обладает еще более высокой ферментативной активностью (удельная активность 28,9 ед.), превышающей исходную не менее чем в 3 раза.

На рис. 1 представлена кинетика синтеза РНК в присутствии исходных и патогенных вариантов вирусов гриппа А, где можно видеть, что независимо от срока инкубации активность фермента у патогенных вариантов выше, чем у исходных вирусов. Наблюдаемое различие в степени активности фермента у патогенных и непатогенных вариантов вирусов гриппа А проявляется как в отсутствие, так и в присутствии различных концентраций праймера АрG (см. рис. 1, в).

Аналогичные данные были получены при сравнении транскрипционных свойств у вирусов гриппа В. Активность РНК-полимеразы у патогенного вируса B/Singapore 222/79 (см. табл. 1) в 1,8 раза выше, чем активность фермента у исходного штамма (удельная активность 5,8 и 3,3 ед.). Однако в отличие от вирусов гриппа А различие в способности к синтезу РНК в системе *in vitro* проявлялось только в присутствии праймера АрG (рис. 2).

Таким образом, прослеживается определенная коррекция между патогенностью для мышей и активностью вирионной РНК-полимеразы у изученных штаммов вирусов гриппа А и В. Как можно видеть, в результате серийного пассирования через организм белых мышей вирусы приобретают наряду с патогенными свойствами и более высокую транскриптазную активность.

Одной из причин низкой активности РНК-полимеразы у непатогенных вирусов гриппа может быть ингибирование активности этого фермента под влиянием других вирусных белков. Возможно, в процессе адаптации вирусов к клеткам респираторного тракта мышей происходят изменения в структуре некоторых белков, которые приводят к снятию предполагаемого ингибиторного эффекта. Для того чтобы выяснить, влияют ли какие-либо из структурных вирусных белков непатогенных штаммов вирусов гриппа на активность РНК-полимеразы, были поставлены опыты по совместному действию ферментов из исходного и патогенного вируса A/Philippines 2/82. Результаты, представленные в табл. 2, показывают аддитивное действие ферментов из различных источников. В связи с этим можно предположить, что низкая активность исходных штаммов не обусловливается наличием в них белков, ингибирующих РНК-полимеразу.

Опыты по совместному действию ферментов штамма A/PR8/34 и A/seal/Massachusetts 1/80 также показали абсолютную аддитивность действия двух ферментов. Эти данные свидетельствуют об отсутствии влияния вирусных белков на активность РНК-полимеразы вируса гриппа А.

Из наших результатов следует, что патогенные варианты вируса гриппа характеризуются большей активно-

Таблица 2
Совместное действие РНК-полимеразы вирусов гриппа A/Philippines 2/82 исходного и патогенного для мышей

Вариант	Количество белка, мкг	Активность РНК-полимеразы, нмоль [³ H]—УМФ в пробе в 1 мин	
		наблюдаемая	теоретическая
Непатогенный	20	0,72	—
	40	1,47	
	60	2,14	
Патогенный	20	1,28	—
	40	3,15	
	60	4,50	
Непатогенный+патогенный	20	2,16	2,00
Непатогенный+патогенный	20	4,10	3,87
Непатогенный+патогенный	40	2,74	2,75

стью процесса транскрипции (синтеза вирусспецифических РНК) по сравнению с патогенными вирусами.

Анализируя полученные данные, можно заключить, что в процессе пассирования вирусов гриппа А и В в организме мышей происходит селективный отбор популяции, обладающей наиболее высокой активностью РНК-полимеразы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Подчерняева Р. Я., Соколов М. И., Блинова В. К. и др. // *Вопр. вирусол.* — 1972. — № 5. — С. 559—564.
2. Правдина Н. Ф., Веселовская Т. В., Пушкарская Н. Л. и др. // *Вопр. мед. химии.* — 1972. — № 2. — С. 158—161.
3. Правдина Н. Ф., Подчерняева Р. Я., Сквородка В. В. и др. // *Вопр. вирусол.* — 1984. — № 2. — С. 152—154.
4. Сквородка В. В., Фарамян В. Р., Подчерняева Р. Я. и др. // *Там же.* — 1983. — № 6. — С. 719—723.
5. Almond J. W., Barry R. D. // *Negative Strand Viruses and the Host Cell.* — London, 1978. — P. 675—684.
6. Bean W. J., Webster R. G. // *Ibid.* — P. 685—692.
7. Hinshaw V. S., Bean W. J., Webster R. G. // *Genetic Variation Among Influenza Viruses.* — New York, 1981. — P. 672.
8. Israel A. // *J. gen. Virol.* — 1980. — Vol. 51. — P. 33—44.
9. Kendal A. P., Galphin J. C., Palmer E. // *Virology.* — 1977. — Vol. 76. — P. 186—196.

10. Kingsbury D. W. // *J. molec. Biol.* — 1966. — Vol. 18. — P. 195—203.
11. Krug R. M., Broni B., La Fiandra A. J. et al. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.* — 1980. — Vol. 77. — P. 5874—5878.
12. Oxford J. S., McGeoch P. J., Schild G. J., Beare A. S. // *Nature.* — 1978. — Vol. 273. — P. 778—779.
13. Rott B., Scholtissek C., Klenc H. P., Orlich M. // *Negative Strand Viruses and the Host Cell.* — London, 1978. — P. 653—662.
14. Scholtissek C., Vallbracht A., Flemig B. et al. // *Virology.* — 1979. — Vol. 95. — P. 492—500.
15. Ulmanen I., Broni B., Krug R. M. // *J. Virol.* — 1983. — Vol. 45. — P. 27—35.

Поступила 10.03.86

ACTIVITY OF RNA POLYMERASE IN PATHOGENIC AND NON-PATHOGENIC INFLUENZA VIRUSES A AND B

N. F. Pravdina, R. Ya. Podchernyaeva, V. V. Skvorodka, G. A. Galegov, V. M. Zhdanov

D. I. Ivanovsky Institute of Virology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Activity of RNA polymerase was studied in original non-pathogenic for mice viruses of influenza A and B (A/seal/Massachusetts 1/80, A/USSR 05/81, A/Philippines 2/82 and B/Singapore 227/79) and of their pathogenic derivatives. All the non-pathogenic viruses studied exhibited the low rate of transcriptase activity. Pathogenic derivatives of these strains exhibited higher activity of RNA polymerase, which was 1.5-3-fold higher as compared with the original strain. During passage of influenza viruses A and B in mice organism selection of the population appears to occur, which had the highest transcriptase activity.

УДК 616.89-008.441.13-092.9-07:[616.36+616.831]-008.939.15:616-008.934.55]-073.916

М. И. Селевич, Ю. М. Островский

ВКЛЮЧЕНИЕ 1-6-¹⁴С-ГЛЮКОЗЫ В ЛИПИДНЫЕ ФРАКЦИИ ПЕЧЕНИ И ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС С РАЗЛИЧНОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ МОТИВАЦИЕЙ

Институт биохимии АН БССР, Гродно

Животные с различной алкогольной мотивацией различаются по ряду особенностей метаболизма липидов в тканях [14]. Показано, что в печени крыс, предпочтительно потребляющих этанол (КПЭ), по сравнению с предпочитающими воду (КПВ) снижена активность пируватдегидрогеназы [7], т. е. фермента, играющего роль основного поставщика ацетил-КоА, необходимого для синтеза жирных кислот и холестерина, и повышена активность α -глицерофосфатдегидрогеназы [8], ответственной за наработку α -глицерофосфата, который в свою очередь является предшественником в биосин-

тезе триацилглицеринов и фосфолипидных фракций. КПЭ характеризуются более низкой интенсивностью гликолиза [2] в печени, что подтверждается сниженным уровнем гексозомонофосфатов [6].

Все сказанное подтверждает ранее высказанную гипотезу о том, что предпочтение этанола предопределяется своеобразным метаболическим фоном [24].

Поскольку связи углеводного обмена с липидным достаточно очевидны, можно рассматривать изучение включения 1-6-¹⁴С-глюкозы в липиды печени и головного мозга КПВ и КПЭ вполне обоснованным.

Удельная радиоактивность фракций липидов (общие фосфолипиды, холестерин, триацилглицерины; в имп/мг/мин), фосфолипидных фракций (в имп/мин/г-атом Р·10³) печени и головного мозга КПВ и КПЭ после введения 1-6-¹⁴С-глюкозы

Исследуемый показатель	Печень		Мозг	
	КПВ	КПЭ	КПВ	КПЭ
Общие фосфолипиды	1108±84	730±62***	608±41	564±41
Холестерин	225±16	148±21**	131±18	164±12
Триацилглицерины	1354±127	1579±199	752±105	1554±172***
Лизофосфатидилхолин	688±27	545±43*	—	—
Сфингомиелин	601±47	696±102	427±53	497±33
Фосфатидилхолин	870±49	750±78	854±106	891±107
Фосфатидилэтаноламин	749±54	668±41	456±34	414±33
Кардиолипин	190±33	265±23	64±7	35±8*

* $p < 0,02$.

** $p < 0,01$.

*** $p < 0,001$.

Методика

В опыте использовали крыс-самок массой 180—200 г, отобранных по признаку предпочтительного потребления воды или раствора этанола по ранее описанной методике [5]. В каждой группе эксперимента было по 8 животных. За сутки до декапитации животных лишали пищи, но оставляли доступ к воде. 1-6-¹⁴С-глюкозу вводили подкожно за 3 ч до декапитации в дозе 0,2 мкКи на 1 г массы тела. Получение липидного экстракта и его очистку проводили по методу Фолча [17]. Разделение нейтральных липидов осуществляли методом тонкослойной хроматографии в системе растворителей гексан — диэтиловый эфир — ледяная уксусная кислота (73 : 25 : 2), сульфатидов и цереброзидов хлороформ — метанол — концентрированный NH_4OH (80 : 20 : 0,4), фракций фосфолипидов — с помощью системы хлороформ — метанол — вода (65 : 25 : 4) [9].

Удельную радиоактивность фракций липидов (общие фосфолипиды, холестерин, триацилглицерины), цереброзидов и сульфатидов измеряли на газопроточном счетчике «Протока» и выражали в импульсах на 1 мг за 1 мин, фракций фосфолипидов — в жидкостном сцинтилляционном спектрометре «Mark-2» фирмы «Nuclear Chicago» и выражали в импульсах на 1 г-атом фосфора фосфолипида в 1 мин.

Результаты и обсуждение

Данные, полученные для печени и головного мозга (табл. 1), свидетельствуют об имеющихся различиях по включению меченой глюкозы в липидные фракции КПВ и КПЭ. Так, в печени КПЭ снижено включение метки из 1-6-¹⁴С-глюкозы в общие фосфолипиды, холестерин и лизофосфатидилхолин.

Известно, что включение 2-¹⁴С-ацетата за 3 ч во все исследуемые фосфолипидные фракции печени КПЭ

было увеличено по сравнению с КПВ, причем метка предпочтительнее распределялась в глицериновую часть фосфолипидов [12]. Аналогичные изменения выявлены и по включению 2-¹⁴С-пирувата в названные фосфолипидные фракции [13]. Полученные данные можно рассматривать как результат активации глюконеогенеза у КПЭ, что подтверждается известными данными об усилении соответствующих реакций углеводного обмена у крыс этой группы [2] и тем, что у КПЭ снижено количество пирувата в печени [4], увеличена активность глюкозо-6-фосфатазы, снижено количество глюкозо-6-фосфата [2] и увеличено содержание глюкозы [1]. В связи с этим снижение удельной радиоактивности лизофосфатидилхолина связано, по-видимому, с уменьшением включения метки из 1-6-¹⁴С-глюкозы в глицериновый компонент и происходит на этапе превращения глюкозы в ее фосфорилированную форму, что согласуется с литературными данными о снижении уровня гликолиза у КПЭ в связи с уменьшением активности глюкокиназы [2].

Известно, что основным предшественником в биосинтезе холестерина является ацетил-КоА [3], а для того чтобы меченая глюкоза включилась в холестерин, ей необходимо пройти реакции гликолиза до образования пирувата и ацетил-КоА. Учитывая, что реакции гликолиза в печени КПЭ угнетены на начальной его стадии [2], и принимая во внимание, что активность пируватдегидрогеназы снижена

[7], вполне понятным становится снижение удельной радиоактивности холестерина печени у крыс опытной группы.

При рассмотрении включения метки из 1-6-¹⁴C-глюкозы в исследуемые липидные фракции печени КПВ и КПЭ необходимо учитывать, что различия в удельной радиоактивности липидов у крыс этих групп могли возникнуть в связи с большим разведением метки в печени КПЭ, так как исходный уровень глюкозы в этой ткани выше по сравнению с таковым у КПВ [1].

Следовательно, снижение включения меченого предшественника в липидные фракции печени КПЭ может не быть связано с обменом собственно липидов.

Обращают на себя внимание разнонаправленные изменения в использовании меченой глюкозы для биосинтеза кардиолипина в печени и головном мозге КПВ и КПЭ. Если в печени КПЭ наблюдается увеличение (хотя и недостоверное) удельной радиоактивности кардиолипина, то в головном мозге, наоборот, происходит снижение включения метки из 1-6-¹⁴C-глюкозы в данный фосфолипид (см. табл. 1).

Известно, что при введении 2-¹⁴C-пирувата не выявлено различий в удельной радиоактивности кардиолипина головного мозга у животных исследуемых групп, что свидетельствует о нормальном течении реакций глюконеогенеза в этой ткани [13]. В связи с этим остается допустить, что снижение включения метки из меченой глюкозы происходит в гидрофильный компонент фосфолипида. Известно, что для синтеза глицериновой части не только кардиолипина, но фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина используется один и тот же предшественник — цитидиндифосфоглицерид [22]. Принимая во внимание тот факт, что удельная радиоактивность фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина после введения глюкозы у КПЭ не отличается от таковой КПВ (см. табл. 1), следует предположить, что снижение включения меченой глюкозы в кардиолипин головного мозга КПЭ происходит путем ингибирования реакции синтеза на этапе образования его из фосфатидилглицерина и цитидиндифосфоглицерина, тем более что данная реакция лимитирует

Таблица 2

Удельная радиоактивность сульфатидов и цереброзидов головного мозга КПВ и КПЭ после введения 1-6-¹⁴C-глюкозы (в имп/мг/мин; $M \pm m$)

Исследуемый показатель	КПВ	КПЭ
Сульфатиды:		
I	43±5	63±12
II	54±7	93±11*
Цереброзиды:		
I	30±3	76±10**
II	39±2	42±7

* $p < 0,02$.

** $p < 0,01$.

весь процесс биосинтеза данного фосфолипида [19]. О снижении синтеза кардиолипина в головном мозге КПЭ свидетельствует и пониженный уровень его в этой ткани [12].

И, наконец, в головном мозге КПЭ увеличено включение 1-6-¹⁴C-глюкозы во фракции сульфатидов и цереброзидов (табл. 2).

Известно, что основным углеводным компонентом в цереброзидах и сульфатидах является галактоза, синтез которой происходит из глюкозы. Последняя, согласно экспериментальным данным, полученным в опытах как *in vitro*, так и *in vivo*, является основным источником углеродных единиц для биосинтеза липидов головного мозга, так же как и ее метаболиты (ацетат, пируват, α -глицерофосфат) [15, 16, 18]. Кроме того, результаты многочисленных исследований показали, что глюкоза включается в гликолипиды как в неизмененном виде, так и (главным образом) после различных метаболических превращений, в частности после расщепления ее до ацетил-КоА [11].

Сравнительно невысокая удельная радиоактивность сульфатидов и цереброзидов головного мозга после введения глюкозы (см. табл. 2) указывает на их медленную обновляемость, что вполне обоснованно, так как наряду с фосфолипидами и холестерином они являются главными пластическими или структурными липидами миелиновых мембран [21]. Период полураспада галактозы в цереброзидах составляет 13—15 дней [23].

Глюкоза может включаться в указанные фракции липидов двумя путя-

ми. Первый из них — превращение глюкозы через ряд ферментных реакций в УДФ-галактозу, которая соединяется с церамидом с образованием цереброзидов [10]. Показано, что в мозге КПЭ активность гексокиназы не отличается от таковой у КПВ, т. е. фосфорилирование глюкозы до глюкозо-6-фосфата не нарушено [4]. В связи с этим можно заключить, что увеличение удельной радиоактивности цереброзидов связано с галактозной частью липида, так как известно, что после введения животным равномерно меченной глюкозы около 80 % метки в молекуле гликолипида обнаруживается в углеводном компоненте [20], и происходит, по-видимому, в связи с активацией у КПЭ реакций превращения на одном из этапов: глюкозо-6-фосфат → глюкозо-1-фосфат → УДФ-глюкоза → УДФ-галактоза → цереброзид.

Возможен и второй путь включения глюкозы в цереброзиды — посредством превращения ее до пирувата, преобразованием последнего в пируватдегидрогеназной реакции до ацетил-КоА с последующим включением в жирнокислотную часть молекулы цереброзида. Предпочтительнее, на наш взгляд, первый метаболический путь.

Увеличение удельной радиоактивности сульфатидов в головном мозге КПЭ происходит, вероятно, по механизмам, рассмотренным выше для фракции цереброзидов.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о наличии существенных биохимических различий между КПВ и КПЭ в использовании глюкозы для синтеза различных липидных фракций в их тканях. По ряду новых показателей подтверждена ранее сформулированная концепция о биохимической индивидуальности крыс с различной алкогольной мотивацией [4].

ЛИТЕРАТУРА

1. Бородинский А. Н. // Биохимия алкоголизма. — Минск, 1980. — С. 30.
2. Лелевич В. В., Островский Ю. М., Лукашик Н. К. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 4. — С. 32—36.
3. Маркелова В. Ф., Тацеевский В. А. // Там же. — 1966. — № 6. — С. 646—649.
4. Островский Ю. М. // Этанол и обмен веществ. — Минск, 1982. — С. 9—25.
5. Островский Ю. М., Садовник М. Н., Вели-

ко М. Г. и др. // Изв. АН БССР, серия биол. — 1976. — № 5. — С. 96—99.

6. Островский Ю. М., Садовник М. Н., Петушок В. Г. // Пентозофосфатный путь превращения углеводов и его регуляция. — Гродно, 1978. — С. 94.
7. Островский Ю. М., Садовник М. Н., Сатановская В. И. и др. // Химия, биохимические функции и применение пантотеновой кислоты. — Минск, 1977. — С. 101—102.
8. Петушок В. Г. // Биохимия алкоголизма. — Минск, 1980. — С. 113.
9. Прохорова М. И. // Методы биохимических исследований. — Л., 1982. — С. 73—85.
10. Промыслов М. Ш., Попова Г. М. // Вопр. мед. химии. — 1972. — № 3. — С. 227—241.
11. Путилина Ф. Е. Источники липогенеза и механизмы, регулирующие его интенсивность в головном мозгу: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — Л., 1983.
12. Селевич М. И., Островский Ю. М. // Вопр. мед. химии. — 1983. — № 2. — С. 13—17.
13. Селевич М. И., Островский Ю. М. // Укр. биохим. журн. — 1984. — № 6. — С. 674—677.
14. Селевич М. И., Павленя А. К., Островский С. Ю., Бегер А. И. // Всесоюзный биохимический съезд: 4-й. Тезисы науч. сообщений. — М., 1979. — Т. 3. — С. 71.
15. Barakai A., Rappoport M. M. // J. Neurochem. — 1975. — Vol. 25, N 1. — P. 55—60.
16. Dhopeshwarkar G. A., Subramanian C. // Lipids. — 1977. — Vol. 12, N 2. — P. 762—764.
17. Folch J. B., Lees M., Stanley G. H. // J. biol. Chem. — 1957. — Vol. 226. — P. 497—499.
18. Hotherhall J. S., Bauger N. Z., Greenbaum A. Z. et al. // Arch. Biochem. — 1950. — Vol. 198, N 2. — P. 478—492.
19. Hostteller K. Y., van den Besch H., van Deenen L. L. // Biochim. biophys. Acta. — 1971. — Vol. 239, N 1. — P. 113—119.
20. Maccioni H. J., Arce A., Caputto R. // Biochem. J. — 1971. — Vol. 125, N 4. — P. 1131—1137.
21. Nonako G., Kishimoto Y. // Biochim. biophys. Acta. — 1979. — Vol. 572, N 3. — P. 432—441.
22. Poorthuis B. J., Hostteller K. Y. // Ibid. — 1976. — Vol. 431, N 3. — P. 408—415.
23. Radin N. S., Martin F. B., Brown J. P. // J. biol. Chem. — 1957. — Vol. 224. — P. 499.
24. Williams R. J., Berry Z. J., Beerstecher E. // Tex. Rep. Biol. Med. — 1950. — Vol. 8. — P. 238—256.

Поступила 10.09.86

INCORPORATION OF 1-6-¹⁴C-GLUCOSE INTO LIPID FRACTION OF LIVER AND BRAIN TISSUES OF RATS WITH VARIOUS ALCOHOL MOTIVATION

M. I. Selevich, Yu. M. Ostrovsky

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

Specific radioactivity of total phospholipids, cholesterol and lysophosphatidyl choline was decreased in liver tissue of rats consuming ethanol as compared with the animals preferring water. In brain of rats with alcohol motivation incorporation of 1-6-¹⁴C-glucose into cardiolipin was decreased, while the label incorporated into triacylglycerols, sulfatides II and cerebrosides I at the increased rate.

М. И. Бушма, Л. Ф. Легонькова, П. И. Лукиенко

ВЛИЯНИЕ ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ НА АКТИВНОСТЬ МОНООКСИГЕНАЗНОЙ СИСТЕМЫ, УДФ-ГЛЮКУРОНИЛ- И ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗ НОРМАЛЬНОЙ И РЕГЕНЕРИРУЮЩЕЙ ПЕЧЕНИ КРЫС

Институт биохимии АН БССР, Гродно

Исследование влияния витаминов на активность ферментов, метаболизирующих чужеродные вещества, привлекает внимание исследователей в связи с разработкой средств фармакологической регуляции функции систем защиты внутренней среды организма от повреждающего действия ксенобиотиков. Среди витаминов в этом плане представляет интерес фолиевая кислота, коферментные формы которой играют важную функциональную роль не только в биосинтезе предшественников ДНК и РНК, но и в синтезе фосфолипидов и гема [1, 2, 4], в частности цитохрома Р-450 — ключевого фермента системы гидроксилирования ксенобиотиков.

Целью данной работы является исследование влияния фолиевой кислоты на активность цитохром Р-450-зависимой монооксигеназной системы, УДФ-глюкуронил- и глутатион-S-трансфераз нормальной и регенерирующей печени крыс. Выяснение влияния фолиевой кислоты на функцию ферментов при регенерации печени представляет особый интерес, поскольку в этих условиях обнаружено значительное снижение ее уровня в клетках [15].

Методика

Проведено 2 серии опытов. В I серии (16 крыс-самцов массой 180—200 г) животным в течение 14 дней вводили фолиевую кислоту в желудок 1 раз в день в дозе 25 мг/кг. Контрольным крысам назначали аналогичный объем слизи крахмала. Через 24 ч после последнего введения животных декапитировали.

Во II серии (65 крыс-самцов массой 200—250 г) также назначали витамины. На 15-й день под эфирным наркозом проводили частичную гепатэктомию (удаление 70 % массы печени) [8]. Введение продолжали и в послеоперационном периоде. Крыс декапитировали через 2 и 8 дней после операции — соответственно в период высокой и нормализующейся митотической активности гепатоцитов [3].

Содержание цитохромов b_5 и Р-450 [17], скорость окисления НАДФ·Н и НАД·Н [6], активность оксидоредуктаз и связывание субстратов с цитохромом Р-450 определяли спек-

трофотометрически на «Specord uv vis» (ГДР). Электронтранспортную активность НАДФ·Н- и НАД·Н-специфических флавопротеинов (НАДФ·Н-цитохром Р-450-редуктаза, НАД·Н-цитохром b_5 -редуктаза) оценивали по НАДФ·Н-, НАД·Н-цитохром с- или НАДФ·Н-, НАД·Н-феррицианидредуктазным реакциям [5].

Способность цитохрома Р-450 связываться с субстратами устанавливали по величине спектральных изменений комплекса фермент — субстрат [13]. Определяли активность реакции N-деметилирования по [16]. Инкубационная смесь (37 °С), объемом 1 мл, содержала: 100 мМ трис-НСI буфер pH 7,4, 5 мМ $MgCl_2$, 1 мМ этилморфин и ~2 мг белка микросом. Реакцию начинали добавлением 3 мМ НАДФ·Н₂. Активность фермента рассчитывали по количеству образовавшегося формальдегида, регистрируемого при 412 нм. Скорость п-гидроксилирования определяли по [12]. Инкубационная смесь (37 °С), объемом 1 мл, содержала 100 мМ трис-НСI буфер pH 7,4, 16 мМ $MgCl_2$, 3 мМ анилин и ~4 мг белка микросом. Реакцию начинали добавлением 3 мМ НАДФ·Н₂. Активность фермента рассчитывали по количеству образовавшегося п-аминофенола, регистрируемого при 630 нм. Время инкубации 5 мин для этилморфина и 10 мин для анилина выбрано экспериментально с учетом линейности накопления продуктов реакции. По отношению скорости окисления субстратов к содержанию цитохрома Р-450 рассчитывали его общую каталитическую активность [13]. Активность микросомальной и цитозольной глутатион-S-трансферазы определяли по [7]. При определении активности микросомальной глутатион-S-трансферазы инкубационная смесь (37 °С), объемом 2 мл, содержала 100 мМ К-фосфатный буфер pH 6,5, 1 мМ 1-хлор-2,4-динитробензол, 1 мМ восстановленный глутатион. Реакцию начинали добавлением 0,01 мг микросомального белка. Об активности фермента судили по количеству образовавшегося конъюгата, измеряемого кинетически при 340 нм. При определении активности цитозольной глутатион-S-трансферазы составляли инкубационную смесь (37 °С) из 100 мМ К-фосфатного буфера pH 7,5, 0,03 мМ бромсульфопталеина и ~0,2 мг белка цитозоля. Реакцию начинали добавлением 2 мМ восстановленного глутатиона. Активность фермента рассчитывали по количеству образовавшегося конъюгата, регистрируемого кинетически при 330 нм. Активность микросомальной УДФ-глюкуронилтрансферазы определяли по [10]. Инкубационная смесь, объемом 1 мл, содержала 100 мМ трис-НСI буфер pH 7,4, 0,1 мкмоль п-нитрофенола и ~0,1 мг микросомального белка. Реакцию начинали с добавления 0,4 мкмоль УДФ-глюкуроновой кислоты и проводили кинетически при 37 °С. Активность фермента рассчитывали по убыли п-нитрофе-

Влияние фолиевой кислоты (ФК) на активность монооксигеназной системы, УДФ-глюкуронил- и глутатион-S-трансфераз нормальной и регенерирующей печени крыс

Показатель	Контроль	Частичная гепатэктомия	
		2 дни	8 дней
НАДФ·Н-цитохром Р-450-редуктаза:			
нмоль цитохрома с на 1 мг в 1 мин	—	$\frac{169 \pm 3}{169 \pm 6}$	—
нмоль феррицианида на 1 мг в 1 мин	$\frac{157 \pm 12}{175 \pm 7^*}$	—	$\frac{686 \pm 68}{809 \pm 41}$
НАД·Н-цитохром b ₅ -редуктаза:			
нмоль цитохрома с на 1 мг в 1 мин	—	$\frac{953 \pm 78}{954 \pm 44}$	—
нмоль феррицианида на 1 мг в 1 мин	$\frac{3227 \pm 183}{3733 \pm 96^*}$	—	$\frac{7506 \pm 551}{7293 \pm 297}$
Цитохром Р-450, нмоль/мг	$\frac{0,81 \pm 0,06}{0,98 \pm 0,06^*}$	$\frac{0,48 \pm 0,04}{0,53 \pm 0,11}$	$\frac{0,51 \pm 0,04}{0,61 \pm 0,04}$
Цитохром b ₅ , нмоль/мг	$\frac{0,62 \pm 0,03}{0,72 \pm 0,04^*}$	$\frac{0,47 \pm 0,02}{0,46 \pm 0,02}$	$\frac{0,48 \pm 0,04}{0,59 \pm 0,03^*}$
Окисление НАДФ·Н, нмоль/мин/мг	$\frac{2,33 \pm 0,18}{3,19 \pm 0,25^*}$	$\frac{2,11 \pm 0,25}{2,51 \pm 0,15}$	$\frac{2,23 \pm 0,52}{2,89 \pm 0,47}$
Окисление НАД·Н, нмоль/мин/мг	$\frac{2,17 \pm 0,09}{3,01 \pm 0,27^*}$	$\frac{1,67 \pm 0,11}{1,95 \pm 0,16}$	$\frac{2,28 \pm 0,15}{2,37 \pm 0,19}$
Р-450-этилморфин, (ΔОП/мг) · 10 ³	$\frac{7,70 \pm 0,79}{9,77 \pm 1,29}$	$\frac{5,85 \pm 0,37}{5,35 \pm 0,67}$	$\frac{5,61 \pm 0,63}{6,96 \pm 0,52}$
Р-450-анилин, (ΔОП/мг) · 10 ³	$\frac{14,29 \pm 1,63}{17,20 \pm 1,7}$	$\frac{6,25 \pm 0,34}{6,67 \pm 0,43}$	$\frac{7,36 \pm 0,56}{9,50 \pm 0,81^*}$
Н-деметилирование этилморфина:			
нмоль/мин/мг	$\frac{9,08 \pm 1,06}{10,70 \pm 0,96}$	$\frac{3,74 \pm 0,38}{3,56 \pm 0,26}$	$\frac{3,52 \pm 0,40}{5,01 \pm 0,56^*}$
нмоль/мин/нмоль Р-450	$\frac{11,19 \pm 1,06}{10,89 \pm 0,83}$	$\frac{7,98 \pm 0,96}{7,10 \pm 0,64}$	$\frac{6,27 \pm 0,56}{8,49 \pm 0,72^*}$
нмоль/мин/ΔОП · 10 ³	$\frac{1,18 \pm 0,1}{1,09 \pm 0,18}$	$\frac{0,68 \pm 0,04}{0,56 \pm 0,02^*}$	$\frac{0,50 \pm 0,07}{0,73 \pm 0,08^*}$
п-Гидроксилирование анилина:			
нмоль/мин/мг	$\frac{0,41 \pm 0,05}{0,43 \pm 0,06}$	$\frac{0,53 \pm 0,02}{0,55 \pm 0,02}$	$\frac{0,54 \pm 0,07}{0,64 \pm 0,08}$
нмоль/мин/нмоль Р-450	$\frac{0,5 \pm 0,05}{0,45 \pm 0,06}$	$\frac{1,10 \pm 0,05}{1,09 \pm 0,06}$	$\frac{1,08 \pm 0,13}{0,98 \pm 0,08}$
нмоль/мин/ΔОП · 10 ³	$\frac{0,029 \pm 0,004}{0,023 \pm 0,003}$	$\frac{0,08 \pm 0,007}{0,07 \pm 0,004}$	$\frac{0,07 \pm 0,008}{0,08 \pm 0,001}$
УДФ-глюкуронилтрансфераза, нмоль/мин/мг	—	$\frac{12,20 \pm 1,21}{15,05 \pm 0,95}$	$\frac{11,12 \pm 1,07}{15,74 \pm 1,28^*}$
Микросомальная глутатион-S-трансфераза, нмоль/мин/мг	—	—	$\frac{129,78 \pm 8,07}{173,33 \pm 4,13^*}$
Цитозольная глутатион-S-трансфераза, нмоль/мин/мг	—	$\frac{11,20 \pm 0,45}{10,82 \pm 0,69}$	$\frac{17,86 \pm 2,39}{24,99 \pm 2,02^*}$

Примечание. В числителе — без ФК, в знаменателе — опыт с добавлением ФК. Звездочка $p < 0,05$.

пола ($\lambda = 400$ нм). Содержание белка в микросомах и цитозоле определяли по [14].

Результаты и обсуждение

Введение здоровым крысам фолиевой кислоты в дозе 25 мг/кг в желудок в течение 14 дней приводит к повышению активности НАДФ·Н-цитохром Р-450- и НАД·Н-цитохром b₅-

редуктаз (на 11,5 и 15,7 %), увеличению содержания цитохромов Р-450 и b₅ (на 21,0 и 16,5 %) и скорости окисления НАДФ·Н и НАД·Н (на 36,9 и 39,0 %) (см. таблицу).

В условиях регенерации печени, после частичной гепатэктомии, сопровождающейся значительным снижением в микросомах содержания цитохромов b₅ и Р-450, скорости N-деме-

тирования этилморфина и окисления НАД·Н, действие фолиевой кислоты неоднотипно и зависит от сроков регенерации.

Через 2 дня после операции у контрольных и подопытных животных на фоне высокой митотической активности гепатоцитов [3] не наблюдается существенных различий в активности ферментов. Стимулирующее действие витамина проявляется лишь на 8-е сутки после операции, когда процесс регенерации в печени ослабевает [3]. Содержание цитохрома b_5 и связывание цитохрома Р-450 с анилином, N-деметилирование этилморфина при расчете на белок, цитохром Р-450 и комплекс цитохром Р-450 — этилморфин, а также активность УДФ-глюкуронил- и глутатион-S-трансфераз при этом возрастают соответственно на 22,9; 29,1; 42,3; 35,4; 46,0; 41,6; 33,6 и 39,9 %. Активности НАДФ·Н-цитохром Р-450- и НАД·Н-цитохром b_5 -редуктаз, содержание цитохрома Р-450 и связывание его с этилморфином, окисление НАДФ·Н и НАД·Н, а также п-гидроксилирование анилина при этом остаются без изменений (см. таблицу).

Таким образом, результаты экспериментов показывают, что фолиевая кислота оказывает стимулирующее действие на активность ферментов микросомального окисления как нормальной печени, так и в поздние сроки ее регенерации после частичной гепатэктомии.

В механизме действия витамина первостепенное значение имеет, по-видимому, стимуляция биосинтеза нуклеиновых кислот и гема цитохромов монооксигеназной системы. Отсутствие стимулирующего действия фолата на активность ферментов в 1-е сутки регенерации пока не объяснено. Можно предположить, что в условиях интенсивной пролиферации печени клеточные субстраты, в том числе и фолат, прежде всего используются для обеспечения процессов роста и деления клеток [18].

Подобное запаздывание стимулирующего действия на активность монооксигеназ при регенерации печени показано также и для таких индукторов микросомальных ферментов, как фенobarбитал [9] и спиронолактон [11].

ЛИТЕРАТУРА

1. Крю Ж. Биохимия: Пер. с франц. — 1979.
2. Мецлер Д. Биохимия: Пер. с англ. — М., 1980.
3. Сидорова В. Ф., Рябина З. А., Лейкина Е. М. Регенерация печени у млекопитающих. — Л., 1966.
4. Степанова Е. Н. // Витамины. — М., 1974. — С. 308—320.
5. Dallner G. // Acta path. microbiol. scand. — 1963. — Suppl. 166. — P. 94.
6. Gillette J. B., Brodie B. B., La Du B. N. // J. Pharmacol. exp. Ther. — 1957. — Vol. 119. — P. 532—540.
7. Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B. // J. biol. Chem. — 1974. — Vol. 249. — P. 7130—7139.
8. Higgins G. M., Anderson R. M. // Arch. Path. — 1931. — Vol. 12. — P. 186—202.
9. Hilton J., Sartorelli A. C. // J. biol. Chem. — 1970. — Vol. 245. — P. 4187—4192.
10. Isselbacher K. J. // Recent Progr. Horm. Res. — 1956. — Vol. 12. — P. 134—143.
11. Japundžić J., Japundžić M., Szabo S. // Europ. J. Biochem. — 1974. — Vol. 43. — P. 79—86.
12. Kato R., Gillette J. // J. Pharmacol. exp. Ther. — 1965. — Vol. 150. — P. 279—281.
13. Kato R., Takanaka A., Tachahashi A. // J. Biochem. (Tokyo). — 1970. — Vol. 68. — P. 613—623.
14. Lowry O. N., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
15. Marchetti M., Bovina C., Formiggini G., Tolomelli B. // Acta vitaminol. enzymol. — 1982. — Vol. 4. — P. 197—205.
16. Nash T. // Biochem. Pharmacol. — 1973. — Vol. 22. — P. 1573—1580.
17. Omura T., Sato R. // J. biol. Chem. — 1964. — Vol. 239. — P. 2370—2378.
18. Wilson J. T., Spelsbel T. S. // Biochem. J. — 1976. — Vol. 154. — P. 433—438.

Поступила 03.09.86.

EFFECT OF FOLIC ACID ON ACTIVITY OF THE MONOOXYGENASE SYSTEM, UDP-GLUCURONYL- AND GLUTATHIONE-S-TRANSFERASES IN NORMAL AND REGENERATING RAT LIVER TISSUE

M. I. Bushma, L. F. Legon'kova, P. I. Lukienko
Institute of Biochemistry, Academy of Sciences
of the Byelorussian SSR, Grodno

After administration into rats of folic acid at a dose of 25 mg/kg within 14 days activities of NADPH-cytochrome P-450 and NADH-cytochrome b_5 reductases, content of cytochromes P-450 and b_5 as well as the rates of NADPH and NADH oxidation were increased in liver microsomes. The stimulating action of the vitamin was also observed within later periods of liver tissue regeneration during 8 days after partial hepatectomy. Content of cytochrome b_5 , binding of cytochrome P-450 with aniline, N-demethylation of ethylmorphine as well as activities of UDP-glucuronyl- and glutathione-S-transferases were increased by 23-46 % after the treatment as compared with control partially hepatectomized animals. At the period of high mitotic activity of hepatocytes, within 2 days after the operation, the vitamin did not affect the parameters studied.

Т. К. Гаскина, А. В. Долгов, С. А. Курилович

АКТИВНОСТЬ ЛЕЦИТИН-ХОЛЕСТЕРОЛ-АЦИЛТРАНСФЕРАЗЫ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ПЕЧЕНИ

Институт терапии СО АМН СССР, Новосибирск

Печень участвует в синтезе и катаболизме многих липидов и липопротеидов. Снижение концентрации общего холестерина (особенно его эфи́ров) и уменьшение коэффициента эстерификации холестерина в сыворотке крови считаются характерными показателями нарушения функции печеночных клеток [1].

Основная масса эфиров холестерина сыворотки крови синтезируется при участии лецитин-холестерол-ацилтрансферазы (ЛХАТ; КФ 2.3.1.43). Доказано, что в организме человека ЛХАТ синтезируется печенью [13] и секретируется в кровь, где фермент катализирует перенос жирных кислот с лецитина на свободный холестерин липопротеинов сыворотки крови (преимущественно α -липопротеинов) с образованием эфиров холестерина и лизолецитина [7]. Сведения об изменении активности ЛХАТ при различных видах патологии печени немногочисленны и разноречивы [4, 10, 11, 15].

Цель настоящего исследования — изучение активности ЛХАТ при хронических паренхиматозных заболеваниях печени и ее изменение в процессе лечения.

Методика

Обследовано 22 больных (12 мужчин и 10 женщин) с хроническими паренхиматозными заболеваниями печени в возрасте от 23 до 55 лет (в среднем $42 \pm 2,5$ года). Цирроз печени (ЦП) диагностирован у 5 больных, хронический гепатит (ХГ) — у 12, из которых 9 страдали хроническим активным гепатитом (ХАГ), 3 — хроническим персистирующим гепатитом (ХПГ). В 2 случаях наблюдали метастатическое поражение печени и в 1 случае — гепатоцеллюлярный рак. У 2 обследованных женщин был реактивный гепатит. Выраженные признаки внутрипеченочного холестаза имелись у 2 больных ЦП и у 2 больных ХАГ. Диагноз верифицирован клиническими и биохимическими данными, результатами пункционной биопсии печени и радионуклидных исследований. У 3 больных диагноз подтвержден на аутопсии. В сыворотке крови указанных больных (за исключением лиц с опухолью печени и реактивным гепатитом, где исследование проводили однократно) определяли активность ЛХАТ дважды — до и после 2-недельного курса лечения эссенциале форте

в суточной дозе 1,8 г в пересчете на эссенциальные фосфолипиды. Все больные получали стандартную диету № 5, часть из них принимали препарат на фоне терапии преднизолоном (в среднем 20—40 мг) и делагилом (250 мг).

Активность ЛХАТ определяли методом [7] в модификации А. В. Долгова и А. В. Морозова [7]. Субстратом служила сыворотка крови донора с нормолипидемией, предварительно инкубированная в течении 1 ч при температуре 56°C на водяной бане и затем меченная [^3H] холестерином (радиоактивность 0,2 мКи на 0,1 мл сыворотки). Субстрат хранили при температуре -20°C не более 2 нед. 0,1 мл субстрата добавляли к 0,3 мл исследуемой сыворотки и инкубировали при температуре 37°C в течение 4 ч на водяной бане. Реакцию останавливали добавлением 20-кратного объема метанол-хлороформной смеси (1:2), затем экстрагировали липиды по методу [6]. Фракции свободного холестерина и его эфиров разделяли на силикагеле Н («Сметарол», Чехословакия) в системе, содержащей гексан, эфир и уксусную кислоту в соотношении 90:10:1. После высушивания холестерин и эфиры холестерина соскребали в сцинтилляционные стеклянные сосуды. Подсчет радиоактивности производили в 10 мл диоксанового сцинтиллятора с повышенной эффективностью счета [2] в β -счетчике «Mark-III» фирмы «TracorAnalytic» (США) по программе 2. Эффективность счета составляла 97,34 %. Активность ЛХАТ выражали в наномолях эстерифицированного холестерина (ЭХ) на 1 л сыворотки за 1 ч (моль).

Концентрацию общего холестерина, триглицеридов, холестерина α -ЛП (ЛПВП) определяли на автоанализаторе фирмы «Technicon» (США).

В качестве контроля была использована активность ЛХАТ сыворотки крови 18 доноров (10 женщин и 8 мужчин) в возрасте от 22 до 49 лет, не имевших заболеваний печени.

Результаты и обсуждение

В результате проведенного обследования получено достоверное снижение активности ЛХАТ сыворотки крови при хронических заболеваниях печени по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$; табл. 1). Активность фермента у больных циррозами печени и хроническими гепатитами существенно различалась: при циррозе печени получены более низкие значения ($p < 0,05$). У больных хроническим гепатитом эстерифицирующая способность плазмы крови оказалась выше, чем у больных циррозом пече-

Таблица 1
Активность ЛХАТ сыворотки крови при хронических заболеваниях печени ($\bar{x} \pm m$)

Исследуемые лица	ЛХАТ, нмоль ЭХ на 1 л в 1 ч	<i>p</i>
Здоровые	154,8 ± 7,8	
Больные	88,5 ± 8,5	<0,001
ЦП	64,6 ± 8,5	<0,001
ХГ	102,8 ± 13,3	<0,01
ХПГ	124,7 ± 22,2	>0,05
ХАГ	95,6 ± 16,0	<0,01

ни, но ниже, чем у лиц контрольной группы ($p < 0,01$). При хроническом персистирующем гепатите активность ЛХАТ была несколько выше, чем при хроническом активном гепатите, но различие это было статистически недостоверно ($p > 0,05$), что, вероятно, обусловлено небольшим числом наблюдений.

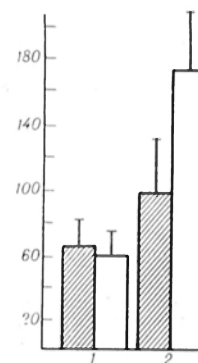
Самая низкая активность ЛХАТ (38 нмоль ЭХ на 1 л в 1 ч) наблюдалась при гепатоцеллюлярном раке печени. Больной в дальнейшем погиб при нарастании печеночно-клеточной недостаточности. При аутопсии у него обнаружено обширное поражение обеих долей печени.

После 2-недельного курса лечения активность ЛХАТ возрасла у 15 больных (88,6 % обследованных) в среднем на $77 \pm 14,4$ %. В разных группах больных увеличение активности было неодинаковым. При циррозе печени активность ЛХАТ оставалась в среднем низкой ($58,2 \pm 8,1$ нмоль ЭХ на 1 л в 1 ч) и почти не отличалась от исходной, а у 2 больных произошло даже снижение активности ЛХАТ (с 85 и 86 до 32 и 48 нмоль ЭХ на 1 л в 1 ч при повторном обследовании). Оба больных вскоре умерли. В группе хронического гепатита активность ЛХАТ возросла существенно ($p < 0,001$) и в среднем достигла значения, характерного для здоровых лиц. Увеличение активности фермента получено как при хроническом активном гепатите ($171,9 \pm 14,9$ нмоль ЭХ на 1 л в 1 ч; $p < 0,01$), так и при хроническом персистирующем гепатите ($190,7 \pm 46,2$ нмоль ЭХ на 1 л в 1 ч; $p < 0,05$), и она стала у больных этих двух групп близкой по значению (см. рисунок).

Не обнаружено различия между активностью ЛХАТ у больных хрониче-

Динамика активности ЛХАТ у больных ЦП (1) и ХАГ (2) под влиянием лечения эссенциале форте.

По оси ординат — активность ЛХАТ, нмоль ЭХ на 1 л в 1 ч; заштрихованные столбики — до лечения, светлые — после лечения.



скими гепатитами, получавших и не получавших преднизолон. Хотя исходно у больных, получавших преднизолон, активность ЛХАТ была ниже ($92,7 \pm 20,2$ нмоль ЭХ на 1 л в 1 ч; $p < 0,05$), чем в случаях хронического гепатита, когда глюкокортикоиды не назначали ($117,0 \pm 15,0$ нмоль ЭХ на 1 л в 1 ч). Эстерифицирующая активность сыворотки через 2 нед лечения эссенциальными фосфолипидами у этих больных стала значительно выше ($p < 0,05$) и близка по значению — $178,7 \pm 16,6$ и $173,6 \pm 29,9$ нмоль ЭХ на 1 л в 1 ч соответственно.

У 4 больных циррозом печени и хроническим активным гепатитом с выраженным холестазом активность ЛХАТ составила в среднем $75,0 \pm 9,0$ нмоль ЭХ на 1 л в 1 ч, при повторном обследовании она существенно не изменилась — $88,0 \pm 24,3$ нмоль ЭХ на 1 л в 1 ч ($p > 0,05$).

Активность ЛХАТ у больных с патологией печени коррелировала с содержанием альбуминов, γ -глобулинов и тимоловой пробой. Корреляционные связи с содержанием общего холестерина и триглицеридов оказались малодостоверными в связи с небольшим числом наблюдений, а с уровнем холестерина ЛПВП — вообще малозначимыми (табл. 2).

Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что хронические паренхиматозные заболевания печени сопровождаются снижением активности ЛХАТ. Уровень активности фермента зависит от степени поражения органа.

Вероятно, значительное и стойкое уменьшение активности ЛХАТ при циррозе печени обусловлено снижением синтеза гепатоцитами самого фермента [13] и его активатора — апо-липопротеина А (апо-А) [3, 17]. Кро-

Таблица 2
Корреляционные связи активности ЛХАТ с другими биохимическими показателями сыворотки крови у больных ХГ и ЦП

Показатель	r	p
АЛТ, ммоль/ч.л	-0,228	>0,05
АСТ, ммоль/ч.л	-0,346	>0,05
Альбумины, г/л	+0,924	<0,0001
γ-Глобулины, г/л	-0,691	<0,05
Тимоловая проба, ед.	-0,552	<0,001
Общий холестерин, мг/дл	-0,434	>0,05
Триглицериды, мг/дл	-0,401	>0,05
Холестерин ЛПВП, мг/дл	+0,017	>0,05

ме этого, вероятно, немалую роль играет снижение в сыворотке крови количества альбуминов, необходимых для связывания продукта эстерификации холестерина — лизолецитина [5]. В нашей работе получена высокая корреляция между активностью ЛХАТ и содержанием альбуминов сыворотки крови, что согласуется с данными ряда авторов [4, 11].

В случаях хронического активного гепатита и хронического персистирующего гепатита снижение активности ЛХАТ обратимо и изменяется в процессе лечения. Нормализация активности ЛХАТ, по-видимому, является следствием улучшения синтетической функции органа и непосредственного влияния эссенциале форте. Установлено, что ненасыщенные фосфолипиды, входящие в состав данного медикаментозного препарата, стимулируют перенос ацильной группы с лецитина на свободный холестерин и поддерживают в экспериментах *in vitro* первоначальную скорость эстерификации холестерина [12, 14].

Кроме того, при заболеваниях печени уже на ранних стадиях повышается содержание в сыворотке крови желчных кислот [16], которые являются ингибиторами ЛХАТ [8]. Улучшение их билиарной экскреции, наступающее под влиянием лечения, вероятно, также способствует нормализации активности ЛХАТ при хронических гепатитах.

Следовательно, определение активности ЛХАТ может служить показателем глубины поражения паренхимы печени, тяжести заболевания, а также критерием эффективности проводимо-

го лечения. Применение препарата эссенциале уже при 2-недельном курсе лечения в дозе 1,8 г/сут ведет к улучшению функционального состояния печени, но только при хронических гепатитах.

Необходимо дальнейшее изучение полученных закономерностей в более однородных и более многочисленных группах больных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бондарь З. А. Клиническая гепатология. — М., 1970. — С. 55—56.
2. Остерман Л. А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радионуклидными методами. — М., 1983. — С. 204—205.
3. Akanuma Y., Yokoma S. et al. // Scand. J. clin. Lab. Invest. — 1978. — Vol. 38. — P. 40—47.
4. Blomhoff J., Skrede S., Rittland S. // Clin. chim. Acta. — 1973. — Vol. 53. — P. 197—207.
5. Chen C. H., Abbers J. // Biochem. Med. — 1981. — Vol. 25. — P. 215—226.
6. Folch J. et al. // J. biol. Chem. — 1957. — Vol. 266. — P. 497—507.
7. Glomset J. A. // J. Lipid Res. — 1968. — Vol. 9. — P. 155—167.
8. Glomset J. A., Wright J. L. // Biochim. biophys. Acta. — 1964. — Vol. 89. — P. 266—276.
9. Gjon E., Norum K. // Acta med. scand. — 1970. — Vol. 187. — P. 153—161.
10. Harry D., Day R., Owen J. et al. // Scand. J. clin. Lab. Invest. — 1978. — Vol. 38. — P. 223—227.
11. Lautz H., Schmidt E. et al. // Ibid. — P. 183—186.
12. Salvion V., Ligli R., Salati R. // Scand. J. Gastroent. — 1977. — Vol. 12. — P. 841—847.
13. Simon J., Boyer J. // Biochim. biophys. Acta. — 1970. — Vol. 218. — P. 549—551.
14. Schauer U., Schauer J. // Dtsch. Gesundh. — Wes. — 1983. — Vol. 38. — P. 1343—1344.
15. Takata., Kajiyama J., Miyochi A. // Scand. J. Gastroent. — 1982. — Vol. 17. — P. 486.
16. Vlahcevic J. R. et al. // Gastroenterology. — 1972. — Vol. 62. — P. 1174—1181.
17. Yamamoto K. // Fukuoka Acta med. — 1980. — Vol. 10. — P. 574—582.

Поступила 18.03.86

ACTIVITY OF LECITHIN-CHOLESTEROL-ACYL TRANSFERASE IN CHRONIC IMPAIRMENTS OF LIVER TISSUE

T. K. Gaskina, A. V. Dolgov, S. A. Kurilovich

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

Activity of lecithin-cholesterol-acyl transferase (LCAT) was distinctly decreased in chronic impairments of liver tissue, especially under conditions of liver cirrhosis and hepatocellular cancer. After treatment with "essentiale forte"

the enzymatic activity was elevated only in the patients with chronic hepatites. The LCAT activity correlated with content of albumins, γ -glo-

bulins and the data of thymol test. Estimation of the LCAT activity might serve as a diagnostic test in chronic liver tissue diseases.

УДК 618.33-008.934.556.24-055.5/.7-07:618.344-008.9-076

Н. А. Петушкова, И. В. Цветкова, М. А. Фукс, Г. Л. Доронин,
Д. В. Якубович

ПРЕНАТАЛЬНЫЙ ДИАГНОЗ МАННОЗИДОЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВОРСИН ХОРИОНА

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Обычный дородовой (пренатальный) диагноз лизосомных болезней до настоящего времени основывался на определении недостаточности соответствующего фермента в культуре клеток амниотической жидкости во II триместре беременности. Основным недостатком данного метода является то, что амниоцентез проводят только на 16—18-й неделе беременности и, кроме того, необходимо еще 2—4 нед для культивирования клеток. Таким образом, определить болезнь плода можно не ранее чем на 20-й неделе беременности, когда ее прерывание уже нежелательно.

Недавно был предложен новый метод пренатальной диагностики наследственных болезней с использованием ворсин хориона, которые можно получить с помощью биопсии на 8—10-й неделе беременности, что позволяет в случае болезни плода прервать беременность в оптимальные сроки [2, 3, 7, 10].

Мы исследовали биоптаты хориона для пренатального исключения метахроматической лейкодистрофии [2] и других наследственных гликолипидозов в семьях с риском рождения ребенка с одним из этих заболеваний. Во всех случаях болезнь плода нами была исключена и беременность закончилась рождением здоровых детей. В данной работе представлен случай пренатального диагноза маннозидоза, когда анализ активности кислой α -маннозидазы в ворсинах хориона позволил констатировать наличие больного плода. Накопление данных по выявлению болезни плода на основании анализа соответствующих ферментов в ворсинах хориона особенно важно для широкого внедрения хориона в качестве диагностического объекта в практическую медицину.

Методика

Биоптат хориона (~1 мг) получали методом прицельной трансцервикальной биопсии без расширения канала шейки матки под контролем УЗ-сканирования на 8—9-й неделе беременности у здоровой женщины, у которой не было наследственных заболеваний в семье, а также у матери ребенка, страдающего маннозидозом (семья П.) [11]. Беременность у матери П. была прервана через 3 дня путем медицинского аборта. Биоптат хориона, плацента и ткани плода сразу использовали для определения активности α -маннозидазы, β -галактозидазы и общей β -гексозаминидазы.

Для выявления активности лизосомных гидролаз использовали водные гомогенаты тканей, полученных при биопсии и после аборта. Для приготовления гомогенатов биоптат хориона и плаценту тщательно отделяли от децидуальной оболочки. Все ткани отмывали от материнской крови смесью, состоящей из 0,9 % NaCl и 0,1 М фосфатного буфера pH 7,0 в соотношении 9:1.

Активность α -маннозидазы, β -галактозидазы и общей β -гексозаминидазы определяли по расщеплению соответствующих 4-метилумбеллиферилгликозидов (фирма «Koch-Light», Англия), как описано ранее [1]. Содержание белка устанавливали по методу Лоури [6].

Результаты и их обсуждение

В табл. 1 представлены результаты определения активности α -маннозидазы в биоптате матери П. и в контрольном биоптате. Из таблицы видно, что активность α -маннозидазы в биоптате П. отсутствует, в то время как активность других лизосомных гидро-

Таблица 1
Активность лизосомных гидролаз (в нмоль на 1 мг белка в 1 ч) в биоптатах хориона

Фермент	Исследуемый объект	
	контроль	случай П.
α -Маннозидаза	50,4	0
β -Галактозидаза	119,3	173,6
β -Гексозаминидаза	1393,9	4296,3

Таблица 2

Активность лизосомных гидролаз (в имоль на 1 мг белка в 1 ч) в плаценте и в тканях мозга плода

Фермент	Исследуемый объект	
	контроль	случай П.
α -Маннозидаза	142,1	6,0
	45,2	2,8
β -Галактозидаза	227,1	236,5
	123,5	372,2
β -Гексозаминидаза	2111,3	2714,9
	254,3	1117,0

Примечание. В числителе — в плаценте, в знаменателе — в тканях мозга плода.

лаз (β -галактозидазы и β -гексозаминидазы) соответствует нормальной. На основании полученных результатов и в связи с тем, что хорион является тканью плодного происхождения, был сделан вывод о том, что плод П. болен маннозидозом. С согласия матери П. ей был сделан медицинский аборт, и диагноз был подтвержден при исследовании плаценты и плода.

В табл. 2 представлены результаты определения активности лизосомных гидролаз в плаценте и мозге плода случая П. и контроля. Из таблицы следует, что активность α -маннозидазы в плаценте матери П. резко снижена и составила менее 4 % от контроля, активность β -галактозидазы и β -гексозаминидазы находилась в пределах нормальных величин. Из тканей плода нам удалось идентифицировать только мозг, так как на таком раннем сроке беременности (9 нед) получить плод целиком при аборте крайне затруднительно. Как свидетельствуют данные табл. 2, активность α -маннозидазы в мозге плода П. также очень низкая (6 % от нормы), активность других гидролаз соответствует контрольным величинам.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что отсутствие активности лизосомного фермента, в данном случае α -маннозидазы, в биоптате хориона отражает наличие болезни плода. Пренатальный диагноз наследственных болезней накопления с использованием биоптатов хориона является перспективным методом, который приобретает все большее приме-

нение и распространение [4, 5, 8, 9]. Он чрезвычайно важен для профилактики наследственных заболеваний и детской смертности. Тем не менее следует помнить о трудностях, которые могут возникать в интерпретации результатов пренатального анализа и, в частности, могли быть в описанном случае. При обследовании данной семьи ранее [11] было установлено, что активность α -маннозидазы в лейкоцитах матери П. составила только 25 % от нормы, что значительно меньше активности, характерной для классических гетерозигот (50 %). Кроме того, при резком снижении активности α -маннозидазы в лейкоцитах ребенка (менее 1 % от нормы) в культуре его кожных фибробластов имела высокая остаточная активность фермента, которая составила 25 % от нормы. Таким образом, если в хорионе была бы обнаружена относительно высокая остаточная активность α -маннозидазы, то нельзя было бы исключить возможность ни того, что он болен, ни того, что ребенок будет гетерозиготой, подобно матери, и, следовательно, клинически здоровым. Потребовались бы дополнительные исследования, которые невозможно провести на нативном хорионе ввиду чрезвычайно малого количества материала. В этом случае очень важно иметь культуру клеток хориона, которая позволяет накопить материал для подобных исследований и, кроме того, подтвердить результаты анализа биоптата.

Описанный нами случай еще раз подтверждает, что отсутствие или резкое снижение активности лизосомных гидролаз в биоптате хориона свидетельствует о поражении плода соответствующим наследственным заболеванием. Это является прямым показанием для прерывания беременности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Цветкова И. В., Золотухина Т. В., Розенфельд Е. Л., Розовский И. С. // Вопр. мед. химии. — 1979. — № 2. — С. 214—218.
2. Цветкова И. В., Бахарев В. А., Казн З. и др. // Там же. — 1980. — № 4. — С. 461—465.
3. Цветкова И. В., Мальцева Н. А., Золотухина Т. В. и др. // Там же. — 1982. — № 3. — С. 41—45.
4. Besancon A. M., Castelnau L., Nicolesco H. et al. // Clin. Genet. — 1985. — Vol. 27. — P. 479—485.

5. Eugene E. G., Laird G. J. // Prenatal Diagn. — 1985. — Vol. 5. — P. 313—320.
6. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
7. Kazy Z., Rosovsky I. S., Bakharev V. A. // Prenatal Diagn. — 1982. — Vol. 2. — P. 39—44.
8. Poenaru L., Kaplan L., Dumez J., Dreyfus J. C. // Pediat. Res. — 1984. — Vol. 18. — P. 1032—1034.
9. Rodeck C. H., Morsman J. M. // Brit. med. Bull. — 1983. — Vol. 39. — P. 338—340.
10. Simoni G., Brambati B., Danesino C. et al. // Hum. Genet. — 1983. — Vol. 63. — P. 349—357.
11. Tsvetkova I. V., Rosenfeld E. L., Prigozina I. G. // Clin. chim. Acta. — 1980. — Vol. 107. — P. 37—42.

Поступила 21.03.86

PRENATAL DIAGNOSIS OF MANNOSIDOSIS BY THE ANALYSIS OF CHORIONIC VILLI

N. A. Petushkova, I. V. Tsvetkova, M. A. Fuks, G. L. Doronin, D. V. Yakhubovich

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

The prenatal diagnosis of mannosidosis was carried out in one at-risk fetus by the analysis of chorionic villi obtained after 9 weeks of pregnancy. The diagnosis was based on the absence of acid α -mannosidase activity as determined by specific enzyme assay. The activity of two other lysosomal hydrolases (β -galactosidase and β -hexosaminidase) in chorion biopsy specimen was similar to the control values. The enzymatic diagnosis was confirmed after studies of fetal tissue.

УДК 616.72-008.83:577.112.853]-07

А. Р. Абдуллин, Р. И. Литвинов, О. Д. Зинкевич, Д. М. Зубаиров, И. Г. Салихов, А. Ф. Панасюк

КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ С ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТОЙ КАК ПРИЧИНА ГЕТЕРОГЕННОСТИ ФИБРОНЕКТИНА В СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ

Кафедра биохимии и кафедра внутренних болезней лечебного факультета Казанского медицинского института, Лаборатория препаратов крови Казанского НИИ эпидемиологии и микробиологии

Выраженное сходство белкового состава синовиальной жидкости (СЖ) и плазмы крови свидетельствует о том, что большинство белков СЖ происходит из крови [10]. Среди них фибронектин является единственным белком, содержание которого в СЖ в норме мало отличается от такового в плазме и составляет в СЖ в среднем 172 ± 69 мкг/мл [3], в плазме — около 300 мкг/мл [7]. При различных поражениях суставов (прежде всего при ревматоидном артрите) концентрация фибронектина в СЖ существенно возрастает и может достигать 865 ± 44 мкг/мл [5], значительно превышая уровень этого белка в плазме крови. Это косвенно указывает на возможность местного синтеза фибронектина клетками, образующими синовиальную оболочку и (или) находящимися в полости сустава. В пользу такого предположения свидетельствует и структурное различие между плазменным и синовиальным фибронектином, заключающееся в отсутствии ацетилнейраминовой кислоты в желатинсвязывающей области синовиального фибронектина, хотя по основным характеристикам (антигенные

свойства, молекулярная масса, полипептидный состав) они не обнаруживают различий [3]. Существование нескольких возможных источников может обусловить молекулярную гетерогенность фибронектина в СЖ, что послужило предпосылкой для настоящей работы.

Методика

Характеристика образцов СЖ. Всего исследовали 25 образцов СЖ, полученных у больных с ревматоидным артритом [12], посттравматическим синовитом [7], подагрой [2], синдромом Рейтера, ювенильным ревматоидным артритом, болезнью Бехтерева и псориатической артропатией [1]. Кроме того, исследовали 2 образца СЖ, полученной сразу после травмы здоровых суставов. СЖ отсасывали в стерильных условиях из коленного сустава и стабилизировали добавлением ЭДТА до конечной концентрации 0,01 М. Образцы центрифугировали при 6000 об/мин (ЦЛР-1) в течение 30 мин при комнатной температуре, после чего замораживали и хранили при -20°C . Перед исследованием образцы прогревали при 37°C в течение 20 мин во избежание образования криопреципитата.

В части наблюдений [11] каждый образец СЖ исследовали параллельно до и после обработки гиалуронидазой. Гиалуронидазу из бычьих семенников («Reanal», ВНР) растворяли в 0,15 М NaCl и добавляли к исследуемому образцу до конечной концентрации

1500 ЕД/мл с последующей инкубацией при 37 °С в течение 30 мин.

Перекрестный иммуноэлектрофорез. Гетерогенность фибронектина в СЖ изучали методом перекрестного иммуноэлектрофореза по Лореллу, вводя в 1 % гель агарозы (medium ЕЕО, «Sigma», США) аффинные антитела к фибронектину человека. Электрофорез проводили при 4 °С в 0,01 М веронал-мединаловом буфере рН 8,6 ($\mu=0,01$) в течение 30 мин при градиенте напряжения 9,5 В/см в первом направлении и в течение 16 ч при градиенте напряжения 2 В/см — во втором. Объем наносимого образца составлял 14 мкл, концентрация антител в геле агарозы — 0,5 мг/мл. После отмывания и высушивания иммуноэлектрофореграммы окрашивали амидо черным 10В.

Выделение и очистка фибронектина. Фибронектин для иммунизации и выделения антител получали из свежей объединенной цитратной плазмы крови человека аффинной хроматографией на желатин-сефарозе с последующей доочисткой ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе (DEAE-SS, «Serva», ФРГ) или аффинной хроматографией на аргинин-сефарозе. Сефарозу 4В («Pharmacia», Швеция) активировали бромцианом, после чего иммобилизовывали на ней желатин (тип I, «Sigma», США). После пропускания плазмы колонку с желатин-сефарозой отмывали 1 М NaCl с рН 7,3 под контролем поглощения при 280 нм и элюировали фибронектин 6 М мочевиной на 0,01 М трис-HCl буфере рН 8,1, содержащем 0,05 М NaCl. Полученный элюат наносили на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой в Cl⁻-форме, уравновешенную 0,01 М трис-HCl — 0,05 М NaCl рН 8,1. Фибронектин элюировали 0,01 М трис-HCl буфером рН 7,0, содержащим 1 М NaCl, и использовали в дальнейшем для иммунизации животных. Для выделения антител фибронектин доочищали аффинной хроматографией на аргинин-сефарозе по описанному ранее методу [9]. Во всех случаях выделенный фибронектин был гомогенным по данным электрофореза в присутствии додецилсульфата Na и линейного иммуноэлектрофореза с поливалентной антисывороткой.

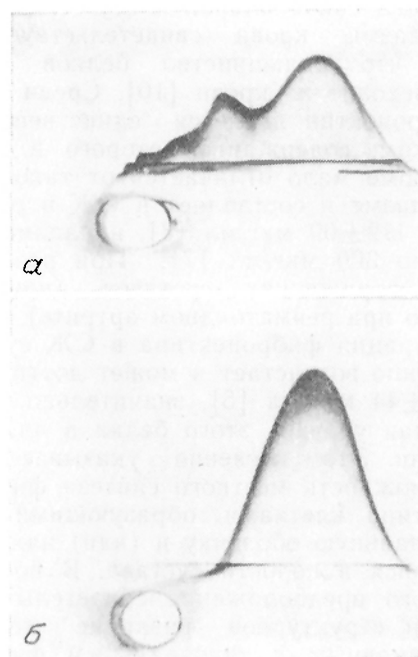
Получение антисыворотки к фибронектину. Кроликов массой 2,5—3,0 кг иммунизировали еженедельными подкожными инъекциями очищенного фибронектина в 4 места: 1-я и 2-я инъекции — по 1 мг в полном адъюванте Фрейнда, 3-я инъекция — по 0,5 мг в полном адъюванте, 4-я — по 0,5 мг в неполном адъюванте Фрейнда. Через 1 нед после 4-й инъекции определяли титр антител, под тионенталовым наркозом обескровливали животных и получали иммунную сыворотку, которую хранили при —20 °С.

Выделение антител к фибронектину. Очищенный фибронектин связывали с BrCN-активированной сефарозой 4В («Pharmacia», Швеция) и использовали для аффинного выделения антител. Фибронектин-сефарозу уравновешивали 10⁻⁴ М раствором фенилметилсульфонилфторида (PMSF, «Merck», ФРГ), пропускали через нее кроличью иммунную сыворотку и промывали последовательно 0,15 М NaCl и 1 М NaCl под контролем поглощения при 280 нм. Антитела к фибронектину элюировали смесью 8 М мочевины и 1 М NaCl с последующим диализом против забуференного фосфатами физиологического раствора NaCl рН 7,4. После концентрирования до 4,5 мг/мл

раствор антител хранили при —20 °С в присутствии 0,02 % азиды натрия.

Результаты и обсуждение

Гетерогенность фибронектина, по данным перекрестного иммуноэлектрофореза, обнаружена во всех без исключения образцах СЖ, что позволяет считать физико-химическую неоднородность характерной особенностью этого белка в СЖ, которая отличает его от фибронектина плазмы крови, где гетерогенность выявляется редко и, как правило, сопутствует патологии [8]. Сравнительный анализ иммуноэлектрофореграмм обнаруживает закономерный характер гетерогенности, который проявляется в существовании 3 основных постоянных фракций и нескольких (от 1 до 3) дополнительных непостоянных микрофракций. Соотношение основных пиков по величине, т. е. относительное содержание фракций фибронектина, варьирует в различных образцах СЖ. На рисунке представлена типичная иммуноэлектрофореграмма, на которой видны 4 пика. Один из них с максимальной подвижностью составляет более половины всего фибронектина.



Перекрестный иммуноэлектрофорез с антителами к фибронектину синовиальной жидкости, полученной у больных с ревматоидным артритом до (а) и после обработки (б) гиалуронидазой.

Учитывая высокое сродство фибронектина к гликозаминогликанам и, в частности, к гиалуроновой кислоте [1, 6], логично предположить, что обнаруженная гетерогенность может отражать комплексообразование этого белка с фракциями гиалуроновой кислоты, которая содержится в СЖ в концентрации 1,7—2,2 мг/мл [2], превышающей уровень фибронектина. В целях проверки этого предположения часть исследованных образцов СЖ подвергли перекрестному иммуноэлектрофорезу до и после обработки гиалуронидазой, которая расщепляет гиалуроновую кислоту до тетрасахаридов. Как видно на рисунке, обработка СЖ гиалуронидазой приводит к исчезновению гетерогенности и появлению одного симметричного пика, который по подвижности совпадает с основной фракцией фибронектина, обнаруживаемой в исходном образце (см. рисунок). Исчезновение гетерогенности фибронектина под действием гиалуронидазы подтвердилось во всех 11 образцах СЖ, полученных у больных с разнообразными поражениями суставов. Этот результат убедительно свидетельствует о том, что гетерогенность фибронектина, обнаруженная в наших опытах, обусловлена комплексообразованием с фракциями гиалуроновой кислоты, а не является истинной молекулярной гетерогенностью.

Следует отметить, что в работе Clemmensen и Andersen [4], посвященной изучению молекулярных вариантов фибронектина в СЖ у больных ревматоидным артритом, тем же методом была выявлена гетерогенность этого белка после обработки СЖ гиалуронидазой, что не подтвердилось нашими исследованиями. Во всех случаях после действия гиалуронидазы в СЖ, в том числе полученной у больных ревматоидным артритом, в наших опытах появлялся один симметричный пик, указывающий на отсутствие молекулярных вариантов фибронектина, которые различались бы по электрофоретической подвижности. Не исключено, что истинная молекулярная гетерогенность фибронектина в СЖ появляется только при определенных формах ревматоидного артрита или в определенной стадии заболевания, не исследованных нами. Физико-химическая неоднородность фиб-

ронектина может возникнуть также в результате взаимодействия со стабилизатором, расщепления под действием протеаз и других причин, связанных с особенностями взятия образца СЖ, его обработки и хранения.

Поскольку в исходном образце СЖ один из постоянных пиков по электрофоретической подвижности совпадает с подвижностью фибронектина, высвобождаемого из комплексов с гиалуроновой кислотой (см. рисунок), можно считать, что не весь фибронектин в СЖ входит в состав протеогликановых агрегатов. Значительная, хотя и переменная часть молекул этого белка, по нашим данным, находится в свободном состоянии и может участвовать в клиренсе иммунных комплексов, продуктов деструкции тканей сустава и выполнять другие функции, отличные от функций фибронектина в составе протеогликановых агрегатов. Иными словами, физико-химическая гетерогенность фибронектина в СЖ может обусловить и его функциональную неоднородность. Следует признать, что полученные данные не подтверждают исходного предположения о существовании молекулярных вариантов фибронектина в СЖ, имеющих разное происхождение.

В целом полученные данные могут быть резюмированы следующим образом.

Фибронектин, входящий в состав СЖ, является неоднородным по физико-химическим свойствам, обуславливающим его электрофоретическую подвижность.

Одной из причин гетерогенности фибронектина в составе СЖ является комплексообразование части молекул этого белка с фракциями гиалуроновой кислоты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бычков С. М. // *Вопр. мед. химии.* — 1983. — № 6. — С. 2—15.
2. Слуцкий Л. И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани. — Л., 1969.
3. Carnemolla B., Cutolo M., Castellani P. et al. // *Arthr. a. Rheum.* — 1984. Vol. 27. — P. 767—770.
4. Clemmensen I., Andersen R. B. // *Ibid.* — 1982. — Vol. 25. — P. 25—31.
5. Goebel K. M., Storck U., Krüger K., Schaltenkirchner M. // *Klin. Wschr.* — 1984. — Bd 62. — S. 768—772.

6. Isemura M., Yosizawa Z., Koide T., Ono T. // J. Biochem. (Tokyo). — 1982. — Vol. 91. — P. 731—734.
7. Mosesson M. W., Umfleet R. A. // J. biol. Chem. — 1970. — Vol. 245. — P. 5728—5736.
8. Reilly J. T., Mackie M. J., McVerry B. A. // Thrombos. Res. — 1984. — Vol. 33. — P. 289—295.
9. Vuento M., Vaheri A. // Biochem. J. — 1979. — Vol. 183. — P. 331—337.
10. Zvaifler N. J. // Advanc. Immunol. — 1973. — Vol. 16. — P. 265—270.

Поступила 24.03.86

COMPLEX FORMATION BETWEEN FIBRONECTIN AND HYALURONIC ACID AS A CAUSE OF FIBRONECTIN HETEROGENEITY IN SYNOVIAL FLUID

A. R. Abdullin, R. I. Litvinov, O. D. Zinkevich, D. M. Zubairov, I. G. Salikhov, A. F. Panasyuk

Departments of Biochemistry and of Internal Diseases, Medical School, Laboratory of Blood Preparations, Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan

Heterogeneity of synovial fluid fibronectin was studied by means of Laurell cross-immuno-electrophoresis in patients with rheumatoid arthritis, posttraumatic synovitis and other arthropathies. Prior to hyaluronidase treatment all the synovial fluid samples exhibited the fibronectin heterogeneity, which disappeared after the action of hyaluronidase. The data obtained suggest that complexes of fibronectin and hyaluronic acid are responsible for physico-chemical heterogeneity of fibronectin in synovial fluid.

УДК 616.33+616.342]-002.44-07:[616.153.1:577.152.39+616.154:577.175.85

В. Л. Доценко, Н. Б. Серова, А. И. Логунов, Н. П. Лебкова,
Г. А. Яровая

О МЕХАНИЗМЕ АКТИВИРОВАНИЯ КАЛЛИКРЕИН-КИНИНОВОЙ СИСТЕМЫ ПЛАЗМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНИ ЖЕЛУДКА И ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ

ЦОЛИУВ, Москва

Грозным осложнением язвенной болезни является кровотечение из язвы желудка или двенадцатиперстной кишки. Кровотечение возникает не только из-за нарушения целостности стенки артериального сосуда в области язвы и в области значительной эрозии слизистой оболочки. Иногда геморрагия происходит вследствие эритропедеза непосредственно через слизистую оболочку, создавая картину кровоточащей ткани, окружающей язву. Клинические данные об активности свертывающей системы плазмы крови и системы фибринолиза у больных язвенной болезнью, осложненной и не осложненной кровотечением, противоречивы [4, 7]. Однако большинство исследователей склоняются думать, что с активацией фибринолиза при геморрагиях свертываемость крови повышается [2, 6—8, 11].

Вазодилатация, нарушение проницаемости капилляров и эритропедез, изменение тонуса венозных сфинктеров и болевая импульсация из зоны язвы или непосредственного ее окружения позволяют предполагать локаль-

ное участие вазоактивных пептидов — кининов в формировании типичной картины язвы. Об изменении активности калликреин-кининовой системы (ККС) как регулятора активности протеолитических систем плазмы крови могут свидетельствовать и нарушения свертываемости крови в зоне язвы и на периферии. Действительно, группой авторов было показано активирование кининообразующей системы плазмы крови, сопровождающееся увеличением концентрации свободных кининов и уменьшением содержания их предшественника — кининогена [1, 3, 9, 10]. Однако вопрос о причинах активирования ККС и о возможных факторах активации при язвенной болезни практически остается неизученным. Решение этого вопроса могло бы пролить свет и на причины нарушений агрегатного состояния крови, поскольку ККС занимает центральное место в регуляции активности протеолитических систем плазмы крови.

Задачей данной работы являлись оценка активности ККС плазмы кро-

ви больных язвенной болезнью, осложненной и не осложненной кровотечением, и выяснение возможного влияния тканевых факторов в районе язвенного дефекта на активность ключевых ферментов этой системы.

Методика

Характеристика клинического материала. Исследование активности некоторых ферментов плазмы крови, лейкоцитов и слизистой оболочки желудка проводили у больных, находящихся на лечении по поводу язвенной болезни гастродуоденальной области, осложненной и не осложненной кровотечением. Всего обследовано 84 больных, из них 41 без геморрагических осложнений и 43 с острыми гастродуоденальными кровотечениями. Активность ферментов исследовали в период острого кровотечения, в первые дни и через 3—4 нед после кровотечения, в период рубцевания и эпителизации язвы. У больных с неосложненной формой болезни исследование проводили при обострении заболевания, при стихании процесса в период рубцевания и эпителизации язвы. Биоптаты сосудистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки для исследования брали из двух зон — околоязвенной и отдаленной от язвенного дефекта на 6—8 см.

Определение активности калликреина и содержания прекалликреина в сыворотке крови больных язвенной болезнью. Активность калликреина и прекалликреина определяли хроматографическим методом в неадсорбированной на ДЭАЭ-сефадексе фракции белков сыворотки крови, свободной от других протеиназ. Активность калликреина рассчитывали по скорости расщепления синтетического субстрата — БАЭЭ (этилового эфира N-бензоил-L-аргинина); прекалликреин активировали трипсином и измеряли активность получившегося калликреина после подавления трипсина ономуконом [5].

Получение препаратов прекалликреина и фактора Хагемана (XI фактора системы свертывания крови). Прекалликреин и фактор Хагемана выделяли из сыворотки крови, взятой от одного донора. Сыворотку крови пропускали через колонку, заполненную QAE-сефадексом, уравновешенным 0,1 M трис-буфером pH 8,0 и содержащим полибрен (гексацимидринбромид), азид натрия и ЭДТА. Из неадсорбированной фракции белков выделяли прекалликреин на КМ-сефадексе, уравновешенном 0,025 M фосфатным буфером pH 6,5 с 0,1 M NaCl и 0,02 % азидом натрия. Полученный препарат прекалликреина имел активность 0,4—0,8 Е/мг и был функционально однороден, основная примесь в препарате — IgG. Адсорбированную на анионообменнике фракцию белков использовали для получения фактора Хагемана в 3 стадии: рехроматографии на QAE-сефадексе А-50, гель-хроматографии на сефадексе G-150 и концентрировании на QAE-сефадексе. Полученный препарат с удельной активностью 73 мЕ в мл гомогенен при электрофорезе с додецилсульфатом натрия, обладает подвижностью, соответствующей мол. массе 80 000 D. При изоэлектрофокусировании в геле при градиенте pH 3,5—10 препарат дает основную полосу при pH 6,0.

Получение экстрактов из гомогенатов лейкоцитарной массы и биоптатов. Лейкоциты выделяли из периферической гепаринизированной крови с добавлением 3 % раствора желатины. Форменные элементы крови разделяли дифференциальным центрифугированием. Общую фракцию лейкоцитов отмывали физиологическим раствором и хранили при -20°C . Перед опытом лейкоцитарную массу гомогенизировали. Биоптаты слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки, взятые как из зоны язвы, так и вне ее, замораживали в жидком азоте и измельчали до порошкообразного состояния.

Экстракцию гомогенатов проводили в 2 мл 0,3 M сахарозы при pH 7,4, содержащей 1 M ЭДТА и 0,5 % тритон X-100. Полученную смесь центрифугировали при 12 000 об/мин. Количество белка в надосадочной жидкости оценивали в оптических единицах при 280 нм и по Лоури.

Определение активности катепсинов В и С в экстрактах лейкоцитов и биоптатов. Активность катепсинов В и С определяли модифицированным методом с использованием α -N-бенз-арг- β -нафтиламида [12] и гли-фен- β -нафтиламида [13] в качестве субстратов соответственно. Количество отщепляемого β -нафтиламида оценивали после конденсации с п-диметиламинобензальдегидом при 450 нм. Удельную активность ферментов выражали в миллиединицах на 1 мг белка.

Действие экстрактов лейкоцитов и биоптатов слизистой оболочки гастродуоденальной зоны на прекалликреин. К 0,5 мл экстракта добавляли 0,5 мл препарата прекалликреина и 0,4 мл 0,2 M трис-буфера pH 8,2. Смесь инкубировали при 37°C , отбирая аликвотные порции объемом 0,3 мл через определенные промежутки времени (20 мин — 3 ч). К аликвотным порциям добавляли 1,7 мл 0,05 M трис буфера pH 8,0 и 1 мл $1,5 \cdot 10^{-3}$ M БАЭЭ, после чего измеряли их БАЭЭ-эстеразную активность.

Действие экстрактов лейкоцитов и биоптатов слизистой оболочки гастродуоденальной зоны на фактор Хагемана. В пробу, содержащую 0,5 мл экстракта, добавляли 0,2 мл препарата фактора Хагемана и 0,4 мл 0,2 M трис-буфера pH 8,2. Смесь инкубировали при 37°C в течение нескольких часов, отбирая аликвотные порции по 0,2 мл. К аликвотным порциям добавляли 0,1 мл прекалликреина, 0,1 мл 0,2 M трис-буфера pH 8,2 и инкубировали 5—30 мин. Затем к смеси добавляли 1,6 мл 0,05 M трис-буфера pH 8,0, 1 мл раствора БАЭЭ указанной ранее концентрации и измеряли БАЭЭ-эстеразную активность образовавшегося калликреина.

Результаты и обсуждение

Активирование ККС сыворотки крови при гастродуоденальной язве. Хроматографический метод анализа активности калликреина и содержания прекалликреина в одном и том же образце сыворотки крови, взятой у больных язвенной болезнью, как при наличии кровотечения из зоны гастродуоденальной язвы, так и без кровотечения, выявил значительное активирова-

Обследуемая группа	Калликреин, МЕ/мл			Прекалликреин, МЕ/мл		
	n	M±m	P	n	M±m	P
Доноры	16	13,8±0,5	—	16	334,0±10,8	
Больные с кровотечением:						
первые дни после кровотечения	2	36,8±9,1	<0,05	3	145,3±35,7	<0,001
3—4 нед после кровотечения	9	34,2±7,7	<0,05	8	134,5±44,2	<0,001
зажившая язва после кровотечения	5	7,28±4,51	>0,05	5	90,6±7,0	<0,001
Больные без кровотечения:						
обострение	3	16,0±4,1	>0,05	3	124,6±12,2	<0,001
стихающее обострение	5	24,8±4,2	<0,05	6	115,3±22,6	<0,001
рубцевание язвы	1	16,4±0	—	2	119,1±33,9	<0,001

ние ККС. В таблице приведены данные, характеризующие уровень активности системы у двух групп больных.

Как видно из таблицы, содержание прекалликреина в сыворотке крови больных обеих групп в 2—3 раза ниже нормы. Активность калликреина значительно превышает норму у больных язвенной болезнью, осложненной кровотечением. Активность калликреина у больных язвенной болезнью, не осложненной кровотечением, несколько ниже, хотя достоверно выше нормальных значений. Эти данные свидетельствуют об активировании системы у больных обеих групп.

Действие экстракта из гомогената биоптата на препараты прекалликреина и фактора Хагемана. Инкубация экстрактов биоптатов, взятых как из зоны язвы, так и из отдаленных от язвенного дефекта областей слизистой оболочки, проведенная в течение не-

скольких часов с препаратами прекалликреина, выявила их активирующее действие на прекалликреин.

На рис. 1 представлены результаты указанного исследования. Как видно из рисунка, имеется зависимость степени активирования калликреина от времени инкубации с экстрактом биоптата, взятого из зоны язвы (см. рис. 1, а), но абсолютные значения активности препаратов калликреина, измеренные в ходе инкубации, не превышают в среднем 14 % от потенциально возможной активности препарата.

Экстракты биоптатов из отдаленных от язвы зон слизистой оболочки также обладают активирующей способностью, но достоверно менее выраженной, чем биоптаты из зоны изъязвления (см. рис. 1, б).

Препарат фактора Хагемана, инкубированный с экстрактами биоптатов, активировался в разной степени в зависимости от слизистой оболочки в момент взятия биоптата. На рис. 2 представлены результаты анализа биоптатов слизистой оболочки больного с геморрагией и без геморрагических осложнений в различные периоды болезни: обострение (а), стихающее обострение (б), заживление (в). Из рисунка видно, что биоптат, взятый из слизистой оболочки кровоточащей язвы в момент кровотечения (см. рис. 2, а, кривая 2), по прошествии нескольких недель после кровотечения (см. рис. 2, б, кривая 2) и из уже зажившей язвы (см. рис. 2, в, кривая 2), оказывал меньшее активирующее фактора Хагемана действие, чем биоптат, полученный из некровоточащей язвы (кривые

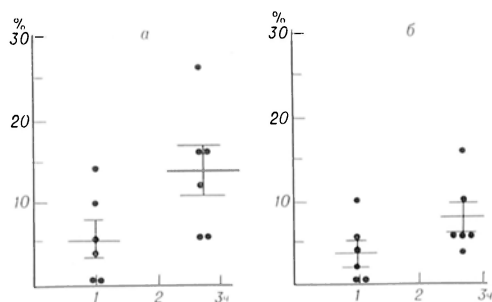


Рис. 1. Активирование прекалликреина (в %) экстрактами гомогенатов биоптатов из зоны язвы (а) и зоны, отдаленной от язвенного дефекта (б).

За 100 % принят уровень активирования прекалликреина тринсином.

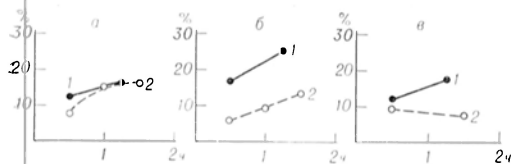


Рис. 2. Активирование фактора Хагемана (в %) экстрактами гомогенатов биоптатов из зоны язвы в различные периоды болезни. а — период обострения (1) или кровотечения (2); б — период стихающего обострения (1) или через 2—3 нед после кровотечения (2); в — период заживления язвы без осложнения (1) и после кровотечения (2). За 100 % принято активирование фактора Хагемана триссином.

1). Важно отметить, что эта закономерность отмечалась и для биоптатов из отдаленных от язвенного дефекта областей слизистой оболочки.

Гистологические и электронно-микроскопические исследования биоптатов слизистой оболочки из зоны язвы или зоны, от нее отдаленной, выявили значительную инфильтрацию слизистой оболочки полиморфноядерными лейкоцитами с ярко выраженными признаками их дегрануляции. Максимальная дегрануляция нейтрофилов, отмеченная в момент обострения язвенной болезни и кровотечения, постепенно уменьшалась к моменту стихания обострения и заживления язвы. В последний период спадали до минимума и явления лейкоцитарной инфильтрации слизистой оболочки. Принимая во внимание динамику дегрануляционных изменений лейкоцитов в биоптатах, совпадающую со степенью активирования изучаемых протенназ, мы пришли к выводу о необходимости изучения воздействия лейкоцитов непосредственно на прекалликреин и фактор Хагемана.

Действие экстракта из гомогената лейкоцитной массы на препараты прекалликреина и фактора Хагемана. Экстракты из лейкоцитной массы, полученной из крови больных гастродуо-

денальной язвой, осложненной кровотечением, в меньшей степени активировали препараты прекалликреина и фактора Хагемана, чем экстракты лейкоцитов из крови больных с неосложненной язвой. На рис. 3 приведены результаты активирующего воздействия упомянутых экстрактов на прекалликреин.

Как видно из рисунка, у больных с кровоточащей язвой в период обострения активация прекалликреина экстрактами лейкоцитов проходила в среднем лишь на 2—3 %, в то время как у больных без кровотечения — на 10—20 %. При стихании обострения и через 2—3 нед после прекращения кровотечения степень активации выравнивалась. При активации фактора Хагемана (рис. 4) наблюдалась та же тенденция: лейкоцитарный экстракт больных с геморрагией активировал препарат фактора Хагемана в меньшей степени, чем экстракт клеток из крови больных без осложнений.

Активность катепсинов В и С в гомогенатах лейкоцитов на разных стадиях язвенной болезни. Определение активности катепсинов В и С в экстрактах лейкоцитной массы, полученной у больных язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки, показало, что обострение болезни приводит к резкому уменьшению активности этих ферментов. На рис. 5 показаны изменения активности катепсинов при язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки. Как свидетельствуют результаты, уменьшение активности ферментов в период обострения болезни, сопровождающейся кровотечением, значительно более выражено, чем при неосложненной форме болезни. Изменение активности исследуемых ферментов может быть связано с процессами дегрануляции лейкоцитов и истощением запасов фер-

Рис. 3. Активирование прекалликреина (в %) экстрактами гомогенатов лейкоцитов больных язвенной болезнью, осложненной кровотечением (а) и без кровотечения (б), в разные периоды болезни.

а: 1 — первые дни после кровотечения, 2 — 1—3 нед после кровотечения; б: 1 — в период обострения, 2 — в период стихания обострения.

Рис. 4. Активирование фактора Хагемана экстрактами гомогенатов лейкоцитов больных язвенной болезнью, осложненной (кружки) и не осложненной (треугольники) кровотечением.

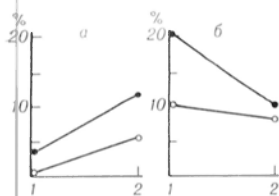


Рис. 3

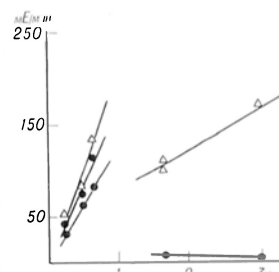


Рис. 4

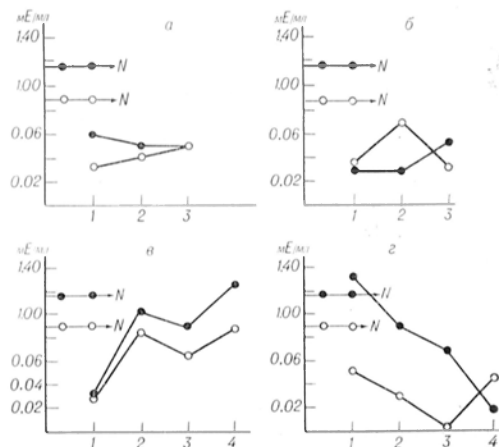


Рис. 5. Изменение активности катепсинов (в мЕ/мл) В (светлые кружки) и С (темные кружки) в лейкоцитах больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки (а и б), желудка (в и г), не осложненными (а и б) и осложненными кровотечением (в и г).

По оси абсцисс — периоды болезни. Форма без кровотечения: 1 — обострение, 2 — стихающее обострение, 3 — рубцевание. Форма с кровотечением: 1 — острое кровотечение; 2 — первые дни после кровотечения; 3 — 3—4 нед после кровотечения; 4 — рубцевание.

ментов в клетках. При язвенной болезни двенадцатиперстной кишки активность ферментов в период заживления язвенного дефекта быстро приближается к нормальному уровню (см. рис. 5, в). При язве желудка, напротив, процессы дегрануляционного истощения клеток продолжаются гораздо дольше и не прекращаются даже во время эпителизации язвенного дефекта.

Результаты изучения активности катепсинов В и С как показателя процессов дегрануляционного истощения лейкоцитарной фракции в различные фазы болезни совпадают с результатами изучения активирующего действия лейкоцитарных экстрактов на препараты прекалликреина и фактора Хагемана. Уменьшение активирующего действия экстрактов на предшественники ключевых ферментов фактор XII-зависимых протеолитических систем в фазу обострения болезни свидетельствует об истощении активаторов этих ферментов в гранулах полиморфноядерных лейкоцитов в связи с высокой интенсивностью дегрануляционных процессов в крови и в районе дефекта слизистой оболочки. Повышенная активность калликреина у больных язвенной болезнью, являющаяся следствием активирования прекалликреина,

подтверждает вывод о «лейкоцитарных факторах» как возможных активаторах фактор XII-зависимых протеолитических систем плазмы крови человека.

Более высокая степень активирования ККС сыворотки крови больных с осложненной формой болезни может явиться следствием двух причин: 1) более интенсивного освобождения возможных активаторов из гранул и более полного их истощения как в области язвы, так и на периферии, 2) декомпенсации антикалликреинового потенциала плазмы крови. Последнее положение требует дополнительного и более глубокого исследования в связи с тем, что калликреин играет центральную роль в регуляции активности протеолитических систем плазмы крови, ответственных за поддержание нормального агрегатного состояния крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабалич А. К., Фесенко В. П. // Всесоюзный съезд терапевтов, 18-й: Тезисы. — М., 1981. — Ч. 2. — С. 199—201.
2. Белоусов А. С. Дифференциальная диагностика болезней органов пищеварения. — М., 1984.
3. Геллер Л. И., Кобзев В. С. // Клини. мед. — 1975. — № 10. — С. 56—59.
4. Голыщенко С. П., Скипетров В. П., Аширов Р. С. // Там же. — 1983. — № 7. — С. 53—57.
5. Пасхина Т. С., Доценко В. Л., Блинникова Е. М. // Биохимия. — 1973. — Т. 38, № 2. — С. 420—427.
6. Кальченко И. И., Лыс П. В., Рябый П. А. // Вестн. хир. — 1973. — № 4. — С. 3—8.
7. Кальченко И. И., Лыс П. В., Рябый П. А. Нарушение гемостаза при раке и язве желудка и двенадцатиперстной кишки. — Киев, 1974.
8. Старухин А. М. // Тер. арх. — 1972. — № 11. — С. 82—85.
9. Степанова И. В. // Врач. дело. — 1978. — № 10. — С. 72—75.
10. Степанова И. В. // Там же. — 1979. — № 7. — С. 8—11.
11. Фишер А. А., Кононова В. П., Шефтелович Т. К. // Тер. арх. — 1982. — № 2. — С. 28—32.
12. Lärvinen M., Hopsu-Havva V. K. // Acta chem. scand. — 1975. — Vol. 29. — B. — P. 671—676.
13. McDonald J. K., Reilly T. J., Zeitman B. B., Ellis S. // J. biol. Chem. — 1968. — Vol. 243. — P. 2028—2032.

Поступила 21.05.86

ON THE ACTIVATION OF KALLIKREIN-KININ SYSTEM IN HUMAN BLOOD PLASMA UNDER CONDITIONS OF GASTRODUODENAL ULCER

V. L. Dotsenko, N. Yu. Serova, A. I. Logunov,
N. P. Lebkova, G. A. Yarovaya

Central Institute for Postgraduate Training of
Physicians, Moscow

Activity of kallikrein and content of prekallikrein were studied in blood serum of patients

with gastroduodenal ulcer accompanied (or not accompanied) by hemorrhage. The rate of the kallikrein-kinin system activation was higher under conditions of the disease complicated by hemorrhage. Extracts of biptic samples obtained from ulcerous zones as well as the extracts of leukocytes were shown to activate prekallikrein and Hageman factor in human blood plasma. At the same time, the activating effect of these extracts was distinctly lowered in the ulcer accompanied by hemorrhage. The phenomenon observed might occur due to high intensity of polymorphonuclear leukocytes degranulation during hemorrhage in the ulcer area.

УДК 612.397.2-06:613.863].014.46:615.356:577.161.3

Э. М. Микаелян, С. С. Овакимян, К. Г. Карагезян

МЕМБРАНОСТАБИЛИЗИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ α -ТОКОФЕРОЛА ПРИ ОСТРОМ СТРЕССЕ

Ереванский медицинский институт, Институт биохимии АН Армянской ССР, Ереван

В ранее проведенных исследованиях показано влияние иммобилизационного стресса [5] на процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) в ферментативной и неферментативной системах перекисления, а также на динамику содержания эндогенного α -токоферола и некоторые компоненты системы антирадикальной защиты клетки (супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза и др.).

Целью данного исследования явилось изучение закономерностей развития изменений в качественном и количественном составе спектра фосфолипидов (ФЛ), отдельных фракций холестерина (ХС), неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК) и выраженности суммарной пероксидазной активности (СПА) плазмы, а также глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) в мембранах эритроцитов белых крыс при 30-минутном иммобилизационном стрессе на фоне предварительных введений α -токоферола.

Методика

Исследования проводили на 90 безлинейных белых крысах-самцах массой 100—150 г, содержавшихся на обычном пищевом рационе.

Моделирование иммобилизационного стресса производили по методу [12]. Животных забивали под легким эфирным наркозом. Кровь для исследования стабилизировали оксалатом, эритроциты отделяли центрифугированием, эритроцитарные мембраны получали по [13]. Содержание общего ХС и его фракций определяли по унифицированной методике [8] и

выражали в микрограммах на 1 мг мембранного белка эритроцитов.

Уровень НЭЖК в плазме крови (в мкмоль/л) измеряли микроколориметрически [7]. Активность Г-6-ФДГ (в наномолях НАД \cdot Н на 1 мл плазмы в 1 мин) определяли в плазме крови спектрофотометрически [1]. Определение СПА производили спектрофотометрически в единицах оптической плотности на 1 мл плазмы крови [6], белка — по Lowry [14], α -токоферола — флуорометрически по [10], его содержание в плазме крови выражали в миллиграммах на 100 мл, в мембранах эритроцитов — в микрограммах на 1 мг белка, ФЛ — в суммарном липидном экстракте, полученном по [11] с последующим фракционированием методом одномерной восходящей хроматографии на бумаге Filtrak-FN-11 (ГДР) по [15] в модификации [9] и [2].

Внутрибрюшинное введение α -токоферола производили за 24 ч до моделирования иммобилизационного стресса из расчета 1 мг на 1 кг массы животного.

Результаты и обсуждение

Острый стресс характеризуется заметным увеличением уровня суммарных ФЛ в мембранах эритроцитов, обусловленным закономерным возрастанием содержания индивидуальных представителей этих соединений (табл. 1). Отмеченный сдвиг обуславливается нарастанием содержания как нейтральных ФЛ (НФЛ), так и кислых (КФЛ). Приведенные данные свидетельствуют об имеющем место изменении соотношений ФЛ в мембранах эритроцитов, что, согласно соответствующим представлениям [3, 4], играет решающую роль в нарушениях ряда жизненно важных физиологических функций организма. Та-

Таблица 1

Динамика изменений содержания ФЛ (в мкг липидного фосфора на 1 г сухого остатка мембран эритроцитов) и НЭЖК в плазме крови (в мкмольях на 1 л плазмы) белых крыс при остром стрессе без введения и с предварительным введением α -токоферола ($M \pm m$)

Показатель	Контроль (1)	Острый стресс (2)	Острый стресс + витамины Е (3)	Разница, %		
				2 от 1	3 от 1	3 от 2
ЛФХ	187,3 \pm 0,9	421,63 \pm 7,3*	184,18 \pm 0,93**	+125	-1,7	-56
Монофосфоинозитид	223,35 \pm 5,95	369,78 \pm 4,58*	232,89 \pm 3,04**	+65,6	+4	-37
Сфингомиелин	143,18 \pm 2,2	576,77 \pm 1,98*	412,14 \pm 3,76*,**	+302,8	+187,8	-28,5
Фосфатидилхолин	336,33 \pm 6,7	927,01 \pm 3,19*	349,69 \pm 5,34**	+175	+4	-62,3
Фосфатидилсерин	77,05 \pm 2,33	263,32 \pm 1,83*	129,47 \pm 3,7*,**	+241	+68	-51
НФЛ	666,82 \pm 9,9	1925,5 \pm 12,4*	946,02 \pm 3,05*,**	+188,7	+42	-51
КФЛ	300,41 \pm 8,29	633,1 \pm 6,4*	362,36 \pm 2,55*,**	+110,7	+20	-43
Соотношение НФЛ/КФЛ	2,2	3	2,6	+36	+18	-13,4
Сумма липидов	967,23 \pm 7,23	2558,53 \pm 8,27*	1308,38 \pm 2,8*,**	+164,5	+35	-49
НЭЖК плазмы	584,68 \pm 16,68	716,12 \pm 40,8*	468,46 \pm 34,18*,**	+22,5	-20	-34,6

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 одна звездочка — различие достоверно в сравнении с графой 1, две — достоверно в сравнении с графой 2.

ким образом, повышение уровня суммарных ФЛ осуществляется при более активном участии НФЛ, среди которых особенно примечательны сдвиги содержания лизофосфатидилхолинов (ЛФХ). Параллельно описанным изменениям имеет место и возрастание содержания НЭЖК в плазме крови, которые в сочетании с ЛФХ оказывают выраженное мембранолитическое действие. В объяснении этого феномена важное значение придается увеличению СПА и активности Г-6-ФДГ, которое отчетливо проявляется при изученном экстремальном состоянии организма (табл. 2).

Полученные результаты являются свидетельством, с одной стороны, увеличения количества ФЛ в исследованной биологической системе, что, на наш взгляд, можно объяснить как освобождением их из соответствующих липид-белковых комплексов, так и биосинтезом *de novo*, и с другой стороны — активирования процессов липолиза, которое обусловле-

но повышением активности фосфолипазы A_2 , катализирующей процесс деацилирования в положении 2 глицерина с освобождением жирных кислот и образованием ЛФЛ. Можно допустить, что увеличение уровня суммарных ФЛ при стрессе является результатом доминирования процессов освобождения этих соединений из их белковых комплексов и активацией процессов биосинтеза над реакциями деградации молекул ФЛ. Отмеченная интенсификация процессов освобождения жирных кислот из ФЛ и увеличение пула ЛФХ оказывают мембранолитическое действие, в реализации которого значительная роль принадлежит интенсификации вовлечения НЭЖК в реакции ПОЛ с увеличением выхода малонового диальдегида [5] в обеих системах перекисления липидов. В стабилизации структурно-функциональной полноценности биологической мембраны важное значение придается общему ХС и его фракциям. По нашим данным

Таблица 2

Активность Г-6-ФДГ (в нмольх НАДФ·Н на 1 мл плазмы в 1 мин), СПА (в ед. опт. пл. на 1 мл плазмы) плазмы при остром стрессе и на фоне введения витамина Е ($M \pm m$)

Показатель	Контроль (1)	Острый стресс (2)	Острый стресс + витамины Е (3)	Разница, %		
				2 от 1	3 от 1	3 от 2
СПА	10,59 \pm 1,098	41,16 \pm 3,03*	14,86 \pm 1,8*,**	+288	+40	-64
Г-6-ФДГ	3,4 \pm 0,07	18 \pm 1,34*	Не определяется	+429		

Содержание суммарных ФЛ (в мкг липидного фосфора на 1 г сухого остатка мембран эритроцитов), ХС (в мкг на 1 мг белка эритроцитарных мембран), витамина Е в плазме крови и эритроцитарных мембранах (в мг на 100 мл плазмы; мкг на 1 мг белка) белых крыс при остром стрессе и на фоне введения α -токоферола ($M \pm m$)

Показатель	Контроль (1)	Острый стресс (2)	Острый стресс + витамин Е (3)	Разница, %		
				2 от 1	3 от 1	3 от 2
Сумма ФЛ эритроцитарных мембран	967,23 \pm 7,23	2558,53 \pm 8,27*	1308,38 \pm 2,8*,**	+164,5	+35	-49
ХС мембран эритроцитов:						
общий	50,65 \pm 1,38	55,32 \pm 0,19*	63,93 \pm 1,87*,**	+9,2	+26	+15
свободный	27,09 \pm 0,9	21,48 \pm 0,19*	27,06 \pm 0,7**	-20,7	-0,12	+26
эстерифицированный	23,56 \pm 0,96	33,83 \pm 0,76*	36,87 \pm 0,9*,**	+43,6	+56,5	+9
Соотношение ФЛ/ХС	19	46	20	+142	+5	-56,5
Витамин Е:						
плазмы крови	3,58 \pm 0,059	2,8 \pm 0,11*	2,67 \pm 0,1*	-21,8	-25,4	-4,65
эритроцитарных мембран	2,98 \pm 0,083	3,58 \pm 0,15*	2,7 \pm 0,1*,**	+20	-9,4	-24,6

(табл. 3), при остром стрессе имеет место повышение коэффициента ФЛ/ХС приблизительно в 2,4 раза. Очевидно, перераспределение эндогенного α -токоферола в плазме крови и мембранах эритроцитов при остром стрессе (см. табл. 3) проявляется в статистически достоверном повышении содержания указанного антиоксиданта в мембранах эритроцитов (примерно на 20 %) и соответствующем снижении его в плазме крови (примерно на 22 %). Увеличение содержания α -токоферола в мембранах эритроцитов можно расценивать как проявление компенсаторной перестройки систем антиоксидантной защиты клетки.

Мы специально исследовали действие экзогенного α -токоферола на фоне 30-минутного иммобилизационного стресса (см. табл. 1). В этих условиях наблюдалась нормализация качественного и количественного состава ФЛ в эритроцитарной мембране (в особенности ЛФХ, фосфатидилхолин, монофосфоинозитид), а также содержания НЭЖК в плазме крови. Изменения в составе ФЛ под действием α -токоферола сопровождаются также параллельными сдвигами в сторону увеличения и содержания общего ХС. Однако на фоне возрастания содержания ФЛ и ХС имеет место сохранение их соотношений,

что расценивается как позитивное явление в формирующихся при стрессе компенсаторно-приспособительных процессах.

ЛИТЕРАТУРА

- Захарьин Ю. Л. // Лаб. дело. — 1976. — № 6. — С. 327.
- Карагезян К. Г. // Там же. — 1969. — № 1. — С. 23—25.
- Крепс Е. М. Фосфолипиды клеточных мембран нервной системы в развитии животного мира. — Л., 1967.
- Крепс Е. М. Липиды клеточных мембран. Эволюция липидов мозга: Адаптационная функция липидов. — Л., 1981.
- Микаелян Э. М., Мхитарян В. Г. // Биол. журн. Армении. — 1985. — Т. 38, № 5. — С. 393—398.
- Покровский А. А. // Биохимические методы исследования в клинике. — М., 1969. — С. 349.
- Прохорова М. Ю., Тиунов М. П., Шакалис Д. А. // Лаб. дело. — 1977. — № 9. — С. 335.
- Сентебова Г. А. // Там же. — № 6. — С. 375.
- Смирнов А. А., Чирковская Е. В., Манукян К. Г. // Биохимия. — 1961. — № 6. — С. 1023—1027.
- Duggan D. D. // Arch. Biochem. — 1954. — Vol. 84, N 1. — P. 116—125.
- Folch J. // J. biol. Chem. — 1949. — Vol. 177, N 2. — P. 497—501.
- Kvelnansky R., Mikulaj L. // Endocrinology. — 1970. — Vol. 87. — P. 738—743.
- Limber G. R., Davie R. F., Bacer A. M. S. // Blood. — 1970. — Vol. 36, N 2. — P. 111—118.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.

Поступила 26.05.86

Р. Т. Тогузов, Ю. В. Тихонов, А. М. Пименов, Л. И. Маркушева

МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ФОНД ПУРИНОВЫХ И ПИРИМИДИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ТКАНИ НЕБНЫХ МИНДАЛИН У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ТОНЗИЛЛИТОМ

Отдел биохимии межфакультетского лабораторного комплекса II ММИ им. Н. И. Пирогова, МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского

Одним из перспективных направлений в исследовании патогенеза хронического тонзиллита, особенно протекающего сопряженно с другими заболеваниями, является изучение обмена веществ в тканях, вовлеченных в патологический процесс [1]. Развитие и течение патологического процесса в миндалинах связано с понижением содержания нуклеиновых кислот (особенно РНК) и белка [2, 4]. Эти данные свидетельствуют о возможности изменения пула предшественников нуклеиновых кислот и их метаболитов в ткани миндалин больных хроническим тонзиллитом. Изучение содержания нуклеозидов и азотистых оснований в ткани миндалин до сих пор не проводили, хотя такое исследование может выявить неизвестные ранее стороны патогенеза хронического тонзиллита, а также послужить теоретическим обоснованием для поисков комплексной терапии и профилактики осложнений, наблюдающихся при данном заболевании. Это тем более важно, что при деструкции ткани миндалин, являющихся постоянно пролиферирующим органом, может происходить нарушение пролиферативной активности клеток и, следовательно, активности ферментных систем метаболизма пуриновых и пиримидиновых соединений (в первую очередь путей реутилизации нуклеозидов и азотистых оснований).

Наиболее распространенным методом анализа пула пуриновых и пиримидиновых метаболитов в органах и тканях в настоящее время является высокоэффективная жидкостная хроматография [5, 8]. В настоящем сообщении представлены данные исследования пуриновых и пиримидиновых азотистых оснований и нуклеозидов в зависимости от степени морфологической деструкции ткани миндалин больных хроническим тонзиллитом.

Методика

Исследование ткани небных миндалин проводили у 10 больных с декомпенсированной формой хронического тонзиллита в возрасте от 18 до 40 лет (3 мужчин и 7 женщин). Больные были разделены на 2 группы. У 4 пациентов 1-й группы были диагностированы хронический тонзиллит, декомпенсированная форма, ревматические тонзиллогенные заболевания сердца, у 1 больного — хронический тонзиллит, декомпенсированная форма, ревматизм I стадии в неактивной фазе, длительность заболевания 1—3 года.

У больных 2-й группы был диагностирован хронический тонзиллит, декомпенсированная форма — рецидивы ангины; длительность заболевания более 10 лет. В основу такого разделения легли классификация хронического тонзиллита И. Б. Солдатова [3] и постановление пленума Всесоюзного ревматологического общества (1971 г.).

Материал для анализа получали следующим образом: только что удаленную миндалину рассекали бритвой по большому диаметру от медиальной (выстланной эпителием) к латеральной (ограниченной плотной соединительной тканью) поверхности. Одну половину миндалины фиксировали в смеси Лилли, а затем готовили гистологические срезы, которые окрашивали азуран-эозином по Романовскому.

Для хроматографического исследования вторую половину миндалины замораживали жидким азотом, взвешивали, измельчали в фарфоровой ступке и гомогенизировали в гомогенизаторе 5-кратным объемом 0,6 н. HClO_4 . После центрифугирования при 5000 об/мин в течение 10 мин (K-23) отбирали надосадочную жидкость, а осадок обрабатывали 2,5-кратным объемом 0,3 н. HClO_4 и снова центрифугировали при тех же условиях. Надосадочные жидкости объединяли, нейтрализовали раствором КОН и выпавший осадок (KClO_4) отделяли центрифугированием.

Хроматографический анализ полученной кислоторастворимой фракции небных миндалин проводили на хроматографической системе «Waters» (США) по методике [6].

Результаты и обсуждение

У больных 1-й группы гистологически выявляли незначительные деструктивные изменения покровного эпителия при отсутствии патологических изменений в лимфоидной ткани, у пациентов 2-й группы имели место значительные деструктивные процессы в ткани небных миндалин. У боль-

Содержание (в мкмоль на 100 г) пуриновых и пиримидиновых компонентов КРФ небных миндалин у больных хроническим тонзиллитом

Пациент	Инозин	Гипоксантин	Ксантин	Мочевая кислота	Аденозин	Аденин	Гуаноин	Гуанин	Урацил	Уридин	Цитозин	Цитидин
С.ов	13,3	1,4	0	0	0,25	31,3	1,9	21,6	0,3	4,6	15,0	0
Фир-а	7,03	0	0	0	0,8	57,6	1,1	31,9	0	2,01	0	0
Г.ов	12,67	0,9	1,6	0	0,97	48,6	1,5	24,7	0	3,94	2,2	0
Ф-ва	7,57	0,4	0	3,27	2,3	27,1	1,34	16,48	0,2	2,9	1,2	1,7
К-о	12,2	2,0	0,4	0,16	1,42	12,8	1,9	10,9	0,2	3,84	0	0
$M \pm m$	$10,55 \pm 1,3$	$0,94 \pm 0,35$	$0,4 \pm 0,3$	$0,69 \pm 0,65$	$1,2 \pm 0,3$	$35,5 \pm 8$	$1,6 \pm 0,2$	$21,1 \pm 3,6$	$0,14 \pm 0,06$	$3,5 \pm 0,5$	$3,7 \pm 2,9$	$0,34 \pm 0,34$
С.а	13,87	0,9	0	8,2	2,65	33,4	2,3	20,43	0,07	13,89	1,7	0,67
Х-а	18,2	3,8	1,14	2,5	1,07	65,5	1,4	36,13	0,3	6,7	0	0
Г-а	28,26	8,9	2,81	9,07	1,95	42,03	4,6	31,72	0,43	12,6	12,5	0
Б-н	42,80	3,6	2,9	10,06	3,01	113,6	6,7	68,87	0,85	14,21	9,6	0
С-ва	11,9	3,4	2,3	2,14	2,73	51,4	1,95	34,31	0,89	6,62	0	5,0
$M \pm m$	$23,0 \pm 5,74$	$4,1 \pm 1,3$	$1,8 \pm 0,6$	$6,4 \pm 1,7$	$2,3 \pm 0,4$	$61,2 \pm 14$	$3,4 \pm 1,0$	$38,3 \pm 8$	$0,51 \pm 0,2$	$10,8 \pm 1,7$	$4,8 \pm 2,6$	$1,1 \pm 1$
В	>0,9	>0,95	>0,95	>0,99	>0,95	<0,9	>0,9	>0,9	>0,9	>0,99	—	—

ных 2-й группы были глубокие разрушения и инфильтрация нейтрофилами покровного эпителия и значительная деструкция паренхимы миндалин, в которой встречались скопления дегенеративно измененных лимфоцитов и очаги некроза.

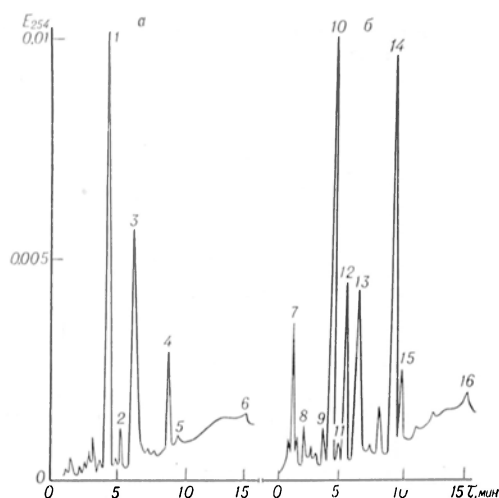
В таблице представлены данные о содержании пуриновых и пиримидиновых компонентов кислоторастворимых фракций (КРФ) небных миндалин у больных хроническим тонзиллитом. У всех обследуемых 1-й группы отмечены значительные количества аденина и гуанина ($36,5 \pm 8,0$ и $21,1 \pm 3,6$ мкмоль на 100 г ткани соответственно). Выявленное высокое содержание аденина и гуанина согласуется с данными литературы по обмену пуриновых соединений в лимфоцитах. По этим данным, в лимфоцитах отсутствует активность адениндезаминазы (КФ 3.5.4.2), гуаниндезаминазы (КФ 3.5.4.3) и ксантиноксидазы (КФ 1.2.3.2) [7].

У больных 1-й группы идентифицировали, кроме того, инозин ($10,6 \pm 1,3$ мкмоль на 100 г) и гипоксантин, который в среднем составлял $0,94 \pm 0,35$ мкмоль на 100 г. Накопле-

ние в составе КРФ небных миндалин таких веществ, как инозин и гипоксантин, может свидетельствовать об активации процессов катаболизма нуклеотидов пуринового ряда.

У всех обследованных больных 1-й группы были идентифицированы аденозин и гуаноин (см. таблицу).

Поскольку в лимфоцитах не было обнаружено активности ксантиноксидазы [7], следовало ожидать отсутствия в составе КРФ небных миндалин ксантина и мочевой кислоты — конечных продуктов катаболизма пуринов. По нашим данным, среди лиц 1-й группы ксантин удалось идентифицировать в низких концентрациях у 2 больных, а мочевую кислоту — у 1 больного в низкой концентрации ($0,16$ мкмоль на 100 г), а у 1 больной в высокой концентрации ($3,27$ мкмоль на 100 г). Однако дополнительное изучение амбулаторной карты этой больной показало, что данная больная около 10 лет находится на диспансерном учете у оториноларинголога, а указания на заболевание сердца были выявлены за 1 мес до тонзиллэктомии. По-видимому, этот признак — наличие в



Хроматограммы азотистых оснований и нуклеозидов кислоторастворимой фракции гомогената небной миндалины у больных хроническим тонзиллитом.

По оси абсцисс — время (в мин); по оси ординат — оптическая плотность при 254 нм. а — больная Ф-ва (1-я группа); б — больной Г-в (2-я группа). 1 — гуанин; 2 — уридин; 3 — аденин; 4 — инозин; 5 — гуанозин; 6 — аденозин; 7 — цитидин; 8 — урацил; 9 — мочевая кислота; 10 — гипоксантин+гуанин; 11 — ксантин; 12 — уридин; 13 — аденин; 14 — инозин; 15 — гуанозин; 16 — аденозин. Хроматографические условия разделения: колонка — пластиковый патрон «Новарак С18», 5 мкм (система с радиальным уплотнением «Z-module»). Подвижная фаза линейный градиент (15 мин) от 0 (0,02 М KH_2PO_4 , pH 5,5) до 30 % (60/40 $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$). Скорость потока 2 мл/мин.

КРФ небных миндалин мочевой кислоты в значительных концентрациях — может служить критерием тяжести и длительности протекания хронического тонзиллита.

У обследованных больных 2-й группы наблюдали возрастание содержания аденина и гуанина в составе КРФ небных миндалин (в среднем в 1,5 раза) по сравнению с показателями 1-й группы, что может отражать более выраженный процесс катаболизма аденилатов и гуанилатов в данной группе больных. Подтверждением этому положению может служить тот факт, что у больного Б-а, небные миндалины которого характеризовались наибольшей клеточной деструкцией (крипты были заполнены некротическим содержимым, паренхима содержала участки некроза), были зарегистрированы наиболее высокие показатели аденина (113,6 мкмоль на 100 г) и гуанина (68,9 мкмоль на 100 г).

Кроме того, у больных 2-й группы наблюдали достоверное увеличение содержания аденозина и гуанозина

по сравнению с таковым в 1-й группе. У всех больных идентифицировали инозин и гипоксантин. Причем накопление инозина происходило в 2 раза, а гипоксантина — в 4 раза более интенсивно, чем у обследованных 1-й группы. Эти данные также свидетельствуют о наличии катаболических процессов.

Наиболее важным отличительным признаком КРФ ткани небных миндалин у больных 2-й группы следует считать значительные концентрации мочевой кислоты (идентифицированы у всех больных данной группы) и ксантина (выявлены у 4 больных). Поскольку наиболее выраженные воспалительные изменения в ткани миндалин сопровождаются значительной инфильтрацией нейтрофилами эпителия миндалин и более глубоким поражением паренхимы, появление ксантина и мочевой кислоты в составе КРФ небных миндалин может быть обусловлено привнесением этих веществ другими клеточными элементами (нейтрофилами) либо нарушением обмена клеток паренхимы миндалин, что в обоих случаях является патогенетической характеристикой протекания хронического тонзиллита.

На рисунке представлены хроматограммы КРФ небных миндалин больных 1-й и 2-й групп.

Анализ содержания пиримидиновых производных выявил у всех больных 1-й группы уридин, у 3 пациентов — урацил и цитозин. Цитидин был идентифицирован у 1 больного. У больных 2-й группы содержание урацила и уридина достоверно ($p < 0,05$) превышало содержание этих веществ у лиц 1-й группы, а различия в концентрации цитозина и цитидина не были статистически значимыми.

У больных 2-й группы регистрировали высокие уровни урацила и уридина, что может отражать особенности метаболизма пиримидинов в ткани небных миндалин, в которых активность дезоксицитидинкиназы (КФ 2.7.1.74) в несколько раз превышала таковую тимидинкиназы [9].

Таким образом, деструкция ткани миндалин сопровождается морфологическими проявлениями (деструкцией эпителия, гиперплазией лимфоидных фолликулов) и повышением уровня пуриновых и пиримидиновых

азотистых оснований и нуклеозидов. Наличие ксантина и мочевой кислоты в КРФ небных миндалин может служить критерием наибольшего клеточного распада небных миндалин у больных хроническим тонзиллитом.

et al. // Immunol. Lett. — 1983. — Vol. 6. — P. 137—142.

Поступила 13.11.86

METABOLIC POOL OF PURINE AND PYRIMIDINE DERIVATIVES IN FAUCIAL TONSIL TISSUE OF PATIENTS WITH CHRONIC TONSILLITIS

R. T. Toguzov, Yu. V. Tikhonov, A. M. Pimenov, L. I. Markusheva

II Medical School; Regional Research Clinical Institute Moscow

Tonsils from 10 patients (18-40 years old) with chronic tonsillitis were studied by means of histological methods as well as by high pressure liquid chromatography. In 5 patients with decompensated forms of the disease, accompanied by heart impairments during 1-3 years, only slight alterations in epithelial and follicular parts of tonsils were observed, while pronounced destruction of tonsil cells was detected in other 5 patients suffering from repeated anginas. The following purine and pyrimidine derivatives were identified in faucial tonsil tissue of all the patients with chronic tonsillitis studied: adenine, guanine, adenosine, guanosine, inosine and uridine. Distinct increase in content of these derivatives as well as occurrence of xanthine and uric acid (non-identified in the first group of patients with chronic tonsillitis) was noted in the patients with maximal destruction of faucial tonsil cells.

ЛИТЕРАТУРА

1. Веремеенко К. Н. Ферменты в оториноларингологии. — Киев, 1980.
2. Гладкий Н. И., Киселев Р. И., Залобовская Н. П., Шевченко А. И. // Съезд оториноларингологов СССР, 7-й: Тезисы докладов. — М., 1975. — С. 91—92.
3. Солдатов И. Б. // Там же. — С. 60—66.
4. Шевченко А. М., Гладкий Н. И., Киселев Р. И., Залобовская Н. П. // Современные аспекты оториноларингологии. — Рига, 1978. — С. 208—209.
5. Brown P. R., Krstulovic A. M. // Analyt. Biochem. — 1979. — Vol. 99. — P. 1—21.
6. Krstulovic A. M., Brown P. R., Rosie D. M. // Analyt. Chem. — 1977. — Vol. 49. — P. 2237—2241.
7. Scholar E. M., Calabresi P. // Cancer Res. — 1973. — Vol. 33. — P. 94—103.
8. Schweisberg P. D., Loo T. L. // J. Chromatogr. Biomed. Appl. — 1980. — Vol. 7. — P. 103—107.
9. Staub M., Spasokukotskaja T., Taljanidisz I.

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 616-008.939.52-055.5/7-072.7

В. С. Ахунов, К. Д. Краснопольская

ИДЕНТИФИКАЦИЯ G_{M2}-ГАНГЛИОЗИДОВ С ПОМОЩЬЮ НАГРУЗОЧНОГО ТЕСТА IN VITRO

Институт медицинской генетики АМН СССР, Москва

G_{M2}-ганглиозидозы относятся к классу наследственных лизосомных болезней накопления, для которых характерны выраженная генетическая гетерогенность и клинический полиморфизм [1, 17]. Энзимодиагностика этих заболеваний с помощью обычно применяемых искусственных субстратов (производных п-нитрофенола и 4-метилумбеллиферона) вследствие недостаточной специфичности эффективна далеко не для всех форм [1, 13, 25]. Для преодоления этой трудности используют естественный мече-

ный субстрат, выделяют и добавляют в инкубационную смесь белок-активатор [7, 11].

В настоящей работе представлены данные о возможности применения нагрузочного теста ганглиозидами в культурах кожных фибробластов для выявления различий в метаболизме ганглиозидов у здоровых и больных G_{M2}-ганглиозидозами. Аналогичная тест-система была разработана для исследования генетической гетерогенности метахроматической лейкодиетрофии и с успехом использована в

пре- и постнатальной диагностике этой лизосомной болезни [8, 9, 14, 19].

Методика

Фибробласты от больных и здоровых получены из клеточного банка ИМГ АМН СССР от ст. научн. сотр. Кухаренко В. И. Разморозку и культивирование фибробластов осуществляли стандартными методами [2]. Сыворотки для культивирования использовали после 2-часовой инкубации при 52°C для терминактивации гексоаминадазы А.

Для выделения немеченых общих ганглиозидов (ОГМ) мозг быка (полученный с мяскокомбината сразу после забоя животного и быстро замороженный на сухом льду до использования) гомогенизировали в 5 объемах ацетона в размельчителе тканей РТ-2 дважды по 5 мин, гомогенат фильтровали на воронке Бюхнера, осадок повторно экстрагировали ацетоном и высушивали в роторном испарителе при 40°C. Тонко измельченный ацетоновый порошок использовали для выделения ОГМ методом Сузуки [20] и дополнительно очищали на колонке с активированным силикагелем [22]. Ганглиозиды из мышинной печени и мозга, мозгового вещества бычьих надпочечников, человеческого мозга и печени и крысиного мозга выделяли аналогичными методами.

Для выделения меченых ОГМ 10 13—14-дневным белым беспородным крысам, после помещения на 1 ч в герметично закрытую камеру, продуваемую смесью 93 % N₂ и 7 % O₂ (2 л/мин), вводили внутривенно ³H-глюкозамин (по 20 мкКи) или ³H-аланин (по 100 мкКи) в 0,9 % NaCl. Через 24 ч животных забивали в атмосфере CO₂. После промывания в физиологическом растворе извлеченный мозг хранили до использования при -20°C. В другой серии экспериментов 10 животным вводили аналогичную метку без предварительного помещения их в газовую среду с пониженным содержанием кислорода.

ОГМ разделяли тонкослойной хроматографией (ТСХ) на пластинках силикагеля («Merck», ФРГ) в системе хлороформ — метанол — H₂O (50 : 45 : 10) с добавлением 0,02 % CaCl₂·2H₂O [3]. После окрашивания пластин резорциновым реагентом [23] фиолетово-коричневые пятна индивидуальных ганглиозидов [идентифицированных с помощью свидетелей (G_{M1}, G_{D1a} и G_{D1b}), любезно предоставленных доктором биол. наук И. В. Цветковой] соскребали, сорбент тщательно размельчали и заливали 0,5 мл метанола. Суспензию инкубировали 30 мин при 37°C с эпизодическим перемешиванием и вносили в сцинтилляционный флакон с 10 мл смеси Брея. Радиоактивность измеряли на счетчике «Mark-III» (Фирма «Тракор Аналитик», Голландия).

Препараты ОГМ стерильно растворяли в средах для нагрузочного теста (НС). Последние состояли из простой среды Игла, содержащей 5 % сыворотки человеческой пуповиной, 5 % сыворотки крупного рогатого скота и 0,2 мг/мл ОГМ, полученных из мозга крыс, которым вводили ³H-глюкозамин (НС-1) или ³H-аланин (НС-2), или немеченых ОГМ быка (НС-3). Фибробласты высевали в 24-луночные культуральные платы (фирма «Flow», Англия) по 2·10⁵ клеток на лунку в ростовой среде.

Через 24 ч после посева клеток среду меняли на НС-1 или НС-2. На 1, 4 и 8-й дни клетки анализировали на включение радиоактивного материала. Среду с лунок отсасывали, клетки 5 раз промывали холодным раствором Эрла, добавляли 1 мл 0,25 % раствора трипсина. Через 15 мин инкубации при 37°C клетки суспендировали пипетированием и осаждали при 1000 g, 3 мин. Надосадочную жидкость отбрасывали, клетки в капле оставшегося раствора разрушали 3-кратным замораживанием и оттаиванием, добавляли 1 мл метанола, встряхивали и инкубировали при 37°C с эпизодическим перемешиванием; полученную суспензию сливали в сцинтилляционный флакон с 10 мл смеси Брея.

При проведении нагрузочного теста с немечеными ОГМ фибробласты пересевали в 100 мм чашки Петри в ростовой среде и выращивали до образования плотного монослоя, после чего среду меняли на НС-3 и клетки инкубировали в тех же условиях еще 8 дней. На 8-й день среду отсасывали, клетки несколько раз промывали раствором Эрла и 1 раз быстро водой, механически снимали в минимальном количестве воды, лиофилизировали. Лиофилизат, полученный с каждой чашки Петри, гомогенизировали в 0,5 мл смеси хлороформ — метанол (2:1) в системе тефлон — стекло (2—3 мин), гомогенат инкубировали 30 мин при 40°C и эпизодическом встряхивании в закрытой пластиковой пробирке на 1,5 мл, центрифугировали 10 мин при 8000 g. 0,45 мл надосадочной фракции отбирали и высушивали при 40°C струей азота. К осадку приливали 20 мкл воды и тщательно размешивали [5]. Пробирку закрывали, инкубировали 5 мин при 70°C и центрифугировали 10 мин при 8000 g. 15 мкл надосадочной жидкости наносили полосой длиной 1 см на стартовую линию пластины со слоем силикагеля и фракционировали ганглиозиды, как описано выше, но в качестве свидетелей использовали ОГМ быка, а также ганглиозиды из мышинной печени и мозгового вещества бычьих надпочечников. Ганглиозиды из других источников (от 5 до 50 мг ткани) разделяли методом ТСХ, описанным для фибробластов. Содержание ганглиозидов в предварительно окрашенных пятнах на хроматограмме оценивали по содержанию сиаловой кислоты с помощью резорцинового метода [21] с модификациями [12, 24].

В работе использовали следующие изотопы: L-(1-³H)-глюкозамин гидрохлорид; 3,8 Ки/ммоль («Amersham», Англия) и D,L-³H-2,3-аланин, 53 Ки/ммоль («Изотоп», СССР).

Результаты и обсуждение

Разработка нагрузочных тестов для биохимической диагностики *in vitro* атипичных форм G_{M2}-ганглиозидов требует выделения и точной идентификации клеточных и тканевых ганглиозидов. В табл. 1 представлены данные о содержании ганглиозидов в различных тканевых источниках, использованных нами для их выделения и идентифицированных методом ТСХ (рис. 1, см. вклейку). Первич-

Таблица 1
Содержание основных ганглиозидов в исследованных тканях ($n=3$)

Ткань	Ганглиозиды	Содержание, мкмоль/г влажной ткани
Человеческий мозг	G _{M1}	0,30±0,06
	G _{D1a}	0,48±0,08
	G _{D1b}	0,21±0,04
Мышинный мозг	G _{M1}	0,28±0,05
	G _{D1a}	0,45±0,05
	G _{D1b}	0,22±0,04
Крысиный мозг	G _{T1b}	0,12±0,06
	G _{M1}	0,25±0,03
	G _{D1a}	0,44±0,06
	G _{D1b}	0,19±0,04
	G _{T1b}	0,11±0,06
Мышечная печень	G _{M2}	0,57±0,10
	G _{M3}	0,16±0,06
Человеческая печень	G _{M3}	0,21±0,03
Бычий надпочечники (мозговое вещество)	G _{M3} с АНК	0,45±0,07
	G _{M3} с ГНК	0,27±0,06

Примечание. АНК—N-ацетилнейраминовая кислота, ГНК—N-гликолилнейраминовая кислота.

ная идентификация осуществлялась с помощью стандартов, любезно предоставленных доктором биол. наук И. В. Цветковой. В дальнейшем в качестве стандартов использовали выделенные из различных тканей ганглиозиды. Относительная подвижность на хроматограмме и оценка содержания ганглиозидов в тканях по содержанию нейраминовой кислоты в окрашенных пятнах индивидуальных ганглиозидов находятся в соответствии с данными литературы [6, 10, 15, 16, 18].

Возможность поглощения фибробластами ганглиозидов исследовали с немечеными препаратами ОГМ быка. Для этой цели были использованы 2 линии фибробластов — контрольная и от больного болезнью Тея — Сакса, диагностированной методами энзимодиагностики. Результаты приведены в табл. 2 и на рис. 2 (см. вклейку). Ганглиозиды из препарата ОГМ быка включаются в состав фибробластов, которые содержат один основной ганглиозид — G_{M3} в составе своей мембраны (см. рис. 2). Содержание G_{M2}, который, очевидно, являлся продуктом деградации всех ОГМ в лизосомах клетки, оценивалось количественно. Наличие в фибробластах (как в нор-

ме, так и при болезни Тея — Сакса) лизосомных ферментов β-D-галактозидазы и нейраминидазы приводит при длительной инкубации с ОГМ быка к деградации последних до G_{M2}. В нормальных фибробластах имеется также гексозаминидаза А, участвующая в деградации G_{M2}, тогда как у больных болезнью Тея — Сакса этот фермент отсутствует. Результаты этого эксперимента доказывают не только эффективность поглощения ганглиозидов фибробластами, но и возможность идентификации с помощью нагрузочного теста генетического дефекта при болезни Тея — Сакса по накоплению G_{M2}.

Поскольку исследование генетической гетерогенности G_{M2}-ганглиозидов требует строго количественной оценки результатов нагрузочного теста, на следующем этапе получали меченые ОГМ из мозга крысы. С этой целью для внутрибрюшинного введения животным использовали два изотопа: а) ³H-глюкозамин, стандартно применяемый для получения ганглиозидов, меченных по N-ацетилнейраминовой кислоте, и N-ацетилгалактозамину [4]; б) ³H-аланин, пути метаболизма которого должны были привести к включению метки в липидную (через пируват и ацетил-КоА) и углеводную (через пируват, моносахара и сиаловые кислоты) части ганглиозидов. Характеристика полученных препаратов представлена в табл. 3. Фракционирование выделенных из мозга меченых препаратов ОГМ с помощью ТСХ соответствовало представленному на рис. 1. Следует подчеркнуть, что интенсивность

Таблица 2
Содержание основных ганглиозидов в фибробластах до и после нагрузки ОГМ быка ($n=3$)

Клетки	Ганглиозиды	Содержание, мкмоль/г лиофилизированных клеток
Нормальные фибробласты	G _{M3} G _{M2}	5,4±1,0 0
Фибробласты больного болезнью Тея — Сакса (до нагрузки)	G _{M3} G _{M2}	5,1±0,8 0
Фибробласты больного болезнью Тея — Сакса (после нагрузки ОГМ)	G _{M3} G _{M2}	4,8±0,8 3,1±0,7

Таблица 3
Характеристика препаратов меченых ОГМ из
мозга крысы ($n = 3$)

Меченый пред- шественник	Удельная активность препарата, имп/мин/мг ОГМ	Состав препара- та	Распределение метки в ганг- лиозид- азах, %
^3H -глюкозамин	$16\,700 \pm 1100$	G_{M1} G_{D1a} G_{D1b} G_{T1b}	10 ± 2 41 ± 5 20 ± 5 29 ± 4
^3H -аланин	$37\,100 \pm 1500$	G_{M1} G_{D1a} G_{D1b} G_{T1b}	24 ± 6 37 ± 5 28 ± 9 11 ± 7

включения метки во фракцию ганглиозидов мозга крысы в условиях гипоксии была выше в 1,6 и 1,3 раза при использовании ^3H -аланина и ^3H -глюкозамина соответственно. Оба препарата были использованы для проведения нагрузочного теста, который апробировали на 2 штаммах нормальных фибробластов, 1 штамме от больного болезнью Тея — Сакса, 1 штамме от больного болезнью Зандхоффа и 1 штамме с неидентифицированной формой лейкодистрофии. Диагноз болезни Зандхоффа так же, как и болезни Тея — Сакса, установлен методами энзимодиагностики [2]. У одной больной с неидентифицированной формой лейкодистрофии первые признаки заболевания в виде снижения зрения отмечены в возрасте 8 лет с последующим прогрессивным нарастанием неврологической симптоматики и снижением интеллекта к 18-летнему возрасту. Определение активности гексозаминидаз выявило у пробында в плазме гетерозиготные уровни гексозаминида-

зы А (около 35 %), тогда как в лейкоцитах активности были в пределах нормы. Клинико-биохимическая картина заболевания позволяла заподозрить у больной атипичную форму G_{M2} -ганглиозидоза. Результаты нагрузочного теста двумя мечеными препаратами ОГМ на 5 штаммах фибробластов представлены на рис. 3. Оба меченых препарата дают четкую дискриминацию в уровнях внутриклеточного накопления ганглиозидов в норме и при G_{M2} -ганглиозидозах, хотя формы кривых для разных препаратов различны. Различий между болезнями Тея — Сакса и Зандхоффа с помощью данного теста не выявлено, что можно было ожидать, исходя из природы метаболического дефекта, так как оба заболевания характеризуются мутационной блокадой синтеза гексозаминидазы А. Кинетика внутриклеточного накопления меченых ганглиозидов у больной с неидентифицированной формой лейкодистрофии не отличается практически от нормы.

Таким образом, в данной работе получены меченые препараты ганглиозидов, применение которых для нагрузочного теста *in vitro* позволяет количественно дискриминировать фибробласты больных с G_{M2} -ганглиозидозами от нормы. Следует ожидать, что данная тест-система по аналогии с тест-системой для исследования генетической гетерогенности метахроматической лейкодистрофии [9, 14, 19] позволит проводить локусную и аллельную дифференциацию G_{M2} -ганглиозидозов по уровню остаточной функциональной активности мутантной системы гексозаминидаз. Доказательство этого положения требует исследования большого числа мутантных штаммов.

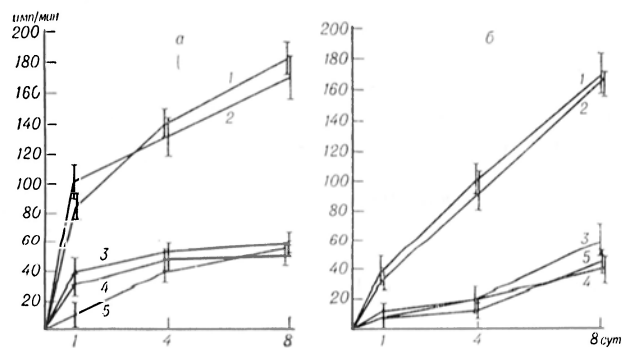


Рис. 3. Результаты нагрузочных тестов при использовании в качестве предшественников меченых ОГМ ^3H -аланина (а) и ^3H -глюкозамина (б).

По оси абсцисс — срок инкубации фибробластов в среде с меткой (в сут); по оси ординат — количество включившейся в фибробласты метки (в имп/мин на лунку). 1 — фибробласты нормального больного Тея — Сакса; 2 — фибробласты больного болезнью Зандхоффа; 3 — фибробласты больной с неидентифицированной формой лейкодистрофии; 4, 5 — нормальные фибробласты.

1. Видершайн Г. Я. Биохимические основы гликозидозов. — М., 1980.
2. Краснополяскан К. Д., Аронович Е. Л., Терехов С. М. // Вопр. мед. химии. — 1982. — № 3. — С. 50—55.
3. Ando S., Chang N., Yu R. K. // *Analyt. Biochem.* — 1978. — Vol. 89, N 2. — P. 437—450.
4. Burton N. M., Garsia-Bunuel L., Golden M., Balfour Y. // *Biochemistry (Wash.)*. — 1963. — Vol. 2, N 3. — P. 580—585.
5. Cridland J. S., White N. J. // *Clin. Chem.* — 1983. — Vol. 29, N 2. — P. 403—404.
6. Ghidoni R., Sonnino S., Chigorno V. et al. // *Biochem. J.* — 1983. — Vol. 209, N 3. — P. 885—888.
7. Hechtman P. // *Ibid.*, 1977. — Vol. 167, N 3. — P. 693—701.
8. Kihara H., Ho C.-K., Fluharty A. L. et al. // *Pediat. Res.* — 1980. — Vol. 14, N 3. — P. 224—227.
9. Kihara H., Tsay K. K., Fluharty A. L. // *Biochem. Med.* — 1983. — Vol. 29, N 3. — P. 278—284.
10. Ledeen R., Salsman K., Cabrere M. // *Biochemistry (Wash.)*. — 1968. — Vol. 7, N 6. — P. 2287—2295.
11. Li Su-Chen, Li Yu-The // *Meth. Enzymol.* — 1982. — Vol. 83. — P. 588—595.
12. MacMillan V. H., Wherrett J. R. // *J. Neurochem.* — 1969. — Vol. 16, N 12. — P. 1621—1624.
13. O'Brien J. S. // *Amer. J. hum. Genet.* — 1978. — Vol. 30, N 6. — P. 602—608.
14. Porter M. T., Fluharty A. L., Harris S. E., Kihara H. // *Arch. Biochem.* — 1970. — Vol. 138, N 2. — P. 646—652.
15. Pullarcat R. K., Reha H., Beratis N. G. // *Biochem. biophys. Res. Commun.* — 1980. — Vol. 92, N 1. — P. 149—154.
16. Rahmann H., Hilbig R. // *J. comp. Physiol.* — 1983. — Vol. 151, N 2. — P. 215—224.
17. Sandhoff K., Christomanou E. // *Hum. Genet.* — 1979. — Vol. 50, N 2. — P. 107—143.
18. Seyfried K. L. // *J. Lipid Res.* — 1978. — Vol. 19, N 5. — P. 538—543.
19. Stevens R. L., Fluharty A. L., Kihara H. et al. // *Amer. J. hum. Genet.* — 1981. — Vol. 33, N 6. — P. 900—906.
20. Suzuki K. // *J. Neurochem.* — 1965. — Vol. 12, N 7. — P. 629—638.
21. Suzuki K., Korey S. R. // *Life Sci.* — 1964. — Vol. 3, N 11. — P. 1227—1233.
22. Svennerholm L. // *Acta chem. scand.* — 1963. — Vol. 17, N 1. — P. 239—250.
23. Svennerholm L., Fredman P. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1980. — Vol. 617. — P. 97—109.
24. Yales A. J., Thompson D. // *J. Lipid Res.* — 1977. — Vol. 18, N 5. — P. 660—663.
25. Zlotogora F. // *Amer. J. hum. Genet.* — 1983. — Vol. 14, N 1. — P. 73—80.

Поступила 10.01.86

IDENTIFICATION OF G_{M2}-GANGLIOSIDOSSES BY MEANS OF LOADING TEST IN VITRO

V. S. Akhunov, K. D. Krasnopol'skaya

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

A test system was developed for identification of conventional and atypical forms of G_{M2}-gangliosidoses. The test system was based on a loading test using a culture of the patients skin fibroblasts. Gangliosides, isolated from small samples (several mg) of various tissues, were identified by means of thin-layer chromatography on silica gel plates. In the loading test both unlabelled and ³H-total gangliosides from bovine and rat brain were used. Skin fibroblasts from patients with Tay-Sachs disease, with Sandhoff disease and with unidentified form of leukodystrophy were cultivated. The fibroblasts were found to metabolize the gangliosides administered into the cultivation medium. The cells from patients with G_{M2}-gangliosidoses accumulated G_{M2} during incubation within 8 days.

УДК 616.633.1:577.152.344]-008.64-02:616.633.96

О. Г. Оглоблина, Л. А. Белова, В. Н. Малахов

ЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ КИСЛОТОСТАБИЛЬНОГО ИНГИБИТОРА ПРОТЕИНАЗ ИЗ МОЧИ ЧЕЛОВЕКА

Институт профилактической кардиологии Всесоюзного кардиологического научного центра АМН СССР, Москва

В настоящее время интенсивно ведутся поиски белков — ингибиторов протеиназ, которые могут быть использованы в заместительной ингибиторной терапии при заболеваниях, сопровождающихся избыточной активацией протеолитических систем в организме больного (панкреатит, сепсис различного происхождения, пародонтит и др.) [4]. До сих пор известен единственный белок-ингибитор, основной панкреатический ингибитор трипсина и калликрейна (типа Кунит-

ца) из органов крупного рогатого скота (ОПИТ), являющийся основой таких известных лекарственных препаратов, как трасилол, гордокс, контрикал и апротинин, производимых различными фирмами за рубежом и широко используемых в клинической практике. Существуют ограничения к широкому применению ОПИТ. Во-первых, ингибитор эффективен лишь в высоких дозах, в связи с чем он, будучи чужеродным белком для человека, нередко вызывает аллергиче-

ские осложнения [1, 9]. Во-вторых, ОПИТ, являясь слабым ингибитором протеиназ гранулоцитов [8], при многих воспалительных заболеваниях малоэффективен.

Свойство белка-ингибитора активно тормозить протеиназы гранулоцитов определяет пригодность его при использовании в качестве противовоспалительного средства. Примером ингибитора, оказывающего выраженное тормозящее действие на трипсин и эластазу гранулоцитов, может служить триэлин (белок из околоушной и подчелюстной желез кошек и собак), промышленное производство которого налажено на Одесском производственном химико-фармацевтическом объединении «Биостимулятор».

Перспективным в плане создания противовоспалительного препарата является кислотостабильный ингибитор (КСИ) из мочи человека, имеющий свойство инактивировать эластазу и активатор плазминогена (кининогеназу) гранулоцитов [6], являющиеся деструктивными и провоспалительными факторами соответственно [4]. Для КСИ мочи человека в эксперименте на животных продемонстрированы лечебное действие при бронхиальной патологии [19], а также противошоковый и противовирусный эффекты [20, 21].

Ранее были предложены методики выделения КСИ из мочи человека, позволяющие получать с небольшими выходами препараты ингибитора с видоизмененными третичными структурами одного из доменов, не имеющих высокого сродства к эластазе гранулоцитов [5, 14]. Цель настоящей работы — разработка высокоэффективного метода выделения КСИ из мочи человека и получение препарата ингибитора, обладающего выраженным свойством тормозить эластазу гранулоцитов человека.

М е т о д и к а

Использовали трипсин быка фирмы «Srofa» (ЧССР), α -химотрипсин быка Олайнского завода химреактивов (СССР), трилон Б, этиловый эфир N-бензоил-L-аргинина (BzArgOEt) фирмы «Реахим» (СССР), этиловый эфир N-бензоил-L-тирозина (BzTyrOEt), дитиотрейтол, трис-(гидроксиметил)-аминометан фирмы «Serva» (ФРГ), молселект Г-25 фирмы «Reapal» (ВНР), сефарозу 4В, сефакрил S-300, QAE-сефадекс А-25, калибровочный набор низкомолекулярных белков (M_r 14 400—94 000) для электрофореза фирмы «Pharmacia» (Шве-

ция), полиамид фирмы «Woelm» (ФРГ), агарозу и кумасси ярко-синий R-250 фирмы «Sigma» (США), *n*-нитроанилид N-метоксисукцинил-L-аланил-L-аланил-L-пролил-L-валина (MeOSucAlaAlaProValNA), синтезированный, как указано в методике [7], BtCN фирмы «Merck» (ФРГ). Остальные реактивы — отечественного производства, квалификации не ниже х. ч.

Мочу больных с различными нарушениями функции почек получали от стационарных больных из клиники ВКНЦ АМН СССР; мочу обрабатывали, как указано ранее [5].

Химотрипсин-сефарозу 4В получали согласно методике [15]. Емкость полученного сорбента оценивали по гидролизу BzTyrOEt, она составила 10 мкмоль гидролизованного субстрата на 1 мл отжатой сефарозы в 1 мин в стандартных условиях [22].

Выделение КСИ из мочи больных нефритами проводили по методике [5, 14], модифицированной нами. В мочу (2,6 л) добавляли NaN₃, дитиотрейтол и трилон Б до конечной концентрации 0,02 %, 0,5 и 5 мМ соответственно. Мочу подщелачивали 5 М NaOH до pH 7,5, выдерживали 1 ч при 4°C. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием при 2000 g в течение 20 мин, к надосадочной жидкости добавляли 50 г сухого QAE-сефадекса А-25, перемешивали при 40°C, фильтровали на воронке Бюхнера. Сорбированные на ионообменнике белки элюировали 1 М NaCl (570 мл) порциями по 150—200 мл. Суммарное время контакта QAE-сефадекса А-25 с элюирующим раствором составило 1,5 ч. Элюаты, обладающие антириптической активностью, объединяли и диализовали в течение ночи против водопроводной воды, после чего упаривали на ротормном испарителе при 25°C до 250 мл. На этом этапе очистки потерь активности при диализе не наблюдали, по-видимому, по причине существования в элюате комплексов КСИ с протеиназами. Концентрированный элюат с добавленной HClO₄ до концентрации 3 % выдерживали 1 ч при 20°C и центрифугировали 20 мин при 5000 об/мин и 10°C. Полученный 3 % HClO₄-экстракт нейтрализовали 5 М NaOH, упаривали на ротормном испарителе до 110 мл и обессоливали в колонке с молселектом Г-25 (3,6×120 см), уравновешенным дистиллированной водой. Обессоленные белковые фракции объединяли, к ним добавляли сухой трис до конечной концентрации 0,05 М, pH раствора доводили до 8,1. Полученный раствор вносили в колонку (5,6×11 см) с химотрипсин-сефарозой 4В, уравновешенной 0,05 М трис-HCl-буфером pH 8,1, со скоростью 10 мл/ч. Колонку последовательно промывали уравновешивающим буфером до исчезновения поглощения элюата при 280 нм, 100 мл дистиллированной воды (30 мл/ч) и 0,4 л 0,01 М HCl, содержащей 1 М NaCl и 15 % изопропанола (по объему) (скорость элюции 15 мл/ч). Фракции, содержащие ингибитор, нейтрализовали 1 М NaOH и концентрировали на ротормном испарителе. Полученный раствор обессоливали в колонке (3,6×120 см) с молселектом Г-25, уравновешенным дистиллированной водой. Депигментацию в случае получения слабоокрашенных растворов КСИ проводили в колонке (3,0×8,8 см) с полиамидом, уравновешенным дистиллированной водой; полученный раствор упаривали на ротормном испарителе до 10 мл и лиофилизировали.

Препарат КСИ подвергали гель-фильтрации в колонке (1,8×25 см) с сефакрилом S-300, уравновешенным 0,05 М трис-НСI-буфером рН 7,5, содержащим 0,5 М NaCl. На профиле элюции получали 2 белковых пика, место выхода которых с колонки соответствовало молекулярным формам КСИ с M_r , равными, как установлено впоследствии методом электрофореза в ПААГ в присутствии додецилсульфата Na, 44 000 и 22 000. Фракции объединяли по пикам и лиофилизировали.

Антитриптическую активность КСИ мочи измеряли по торможению гидролиза BzArgOEt трипсином [2]. Активность КСИ выражали в ингибиторных единицах (ИЕ) на 1 мг препарата. 1 ИЕ соответствует количеству ингибитора, тормозящему гидролиз 1 мкмоль субстрата ферментом за 1 мин в стандартных условиях при 25 °С. КСИ с M_r 22 000 (КСИ_{22 000}) имел удельную активность 49 ИЕ на 1 мг, КСИ с M_r 44 000 (КСИ_{44 000}) — 35 ИЕ на 1 мг.

Эластазу гранулоцитов человека выделяли, как указано в работе [3]. 0,1 мл полного лизата гранулоцитов человека (постгранульный супернатант и лизат гранулярной фракции) имел активность 100 нмоль/мин.

MeOSucAlaAlaProValNA-амидазную активность эластазы измеряли спектрофотометрически при 410 нм, 37 °С, рН 7,5 в соответствии с работой [17].

Содержание белка в моче и очищенных препаратах форм КСИ_{22 000} и КСИ_{44 000} определяли методом Лоури и соавт. [16]. Концентрацию очищенных форм КСИ мочи в растворах после гель-фильтрации на сефакриле S-300 устанавливали по поглощению при 280 нм с учетом оптических факторов ($E_{280}^{0.1\%}$ обеих форм ингибитора (см. раздел «Результаты и обсуждение»)).

M_r двух форм КСИ из мочи определяли электрофорезом в 15 % ПААГ в присутствии ДДС Na при рН 8,6 [23] с общепринятыми стандартами.

Моноспецифическая антисыворотка к препарату КСИ из мочи (анти-КСИ-сыворотка) была получена В. В. Карнищим (Ялтинский НИИ физических методов лечения и медицинской климатологии им. И. М. Сеченова) иммунизацией кроликов породы шиншилла [5]. 1 мл анти-КСИ сыворотки содержал 743 мкг антител. Зона эквивалентности — 99 мкг КСИ на 1 мл антисыворотки.

Иммуноэлектрофорез проводили методом Грабара и Уильямса [12] в 1 % агарозном геле толщиной 1,5 мм, приготовленном на 0,02 М барбиталовом буфере рН 8,6, содержащем 0,02 % Na_2S_3 . В лунки вносили 1 и 1,5 мкг препарата КСИ в 5 мкл электродного буфера (0,09 М трис-барбиталовый буфер, содержащий 0,01 % Na_2S_3). 0,09 М трис-барбиталовый буфер готовили, исходя из соотношения 22,15 г триса, 11,2 г веронала, 0,266 г лактата кальция на 1 л буфера.

Электрофорез проводили при напряжении 10 В/см, температуре 8–10 °С в течение 1 ч. После электрофореза в траншеи геля вносили 100 мкл цельной анти-КСИ-сыворотки; гели инкубировали во влажной камере при 20 °С в течение 48 ч. Непреципитировавшие белки отщипывали 0,1 М NaCl в течение 64 ч. Белки преципитатов окрашивали 0,5 % кумасси ярк-синим R-250 в смеси вода—этиловый спирт—уксусная кислота (9 : 9 : 2).

Константу скорости ингибирования эласта-

зы (k_i) под действием КСИ определяли описанным ранее методом [10] для псевдонесобратимого ингибирования ферментов. 0,1 мл полного лизата гранулоцитов человека преинкубировали с КСИ ($1,8 \cdot 10^{-6}$ — $6,0 \cdot 10^{-5}$ М) 30 мин при 37 °С. Объем преинкубируемой пробы 0,3 мл. Остаточную активность эластазы гранулоцитов измеряли по гидролизу MeOSucAlaAlaProValNA, как указано в работе [17].

Результаты и обсуждение

В настоящей работе предложен метод выделения КСИ из мочи больных нефритами, характеристика основных этапов которого представлена в таблице. Из подщелаченной (рН 7,5) мочи, в которую предварительно добавляли консервант и низкомолекулярные ингибиторы протеиназ в целях предотвращения протеолиза ингибитора, КСИ очищали сорбцией на QAE-сефадексе А-25 с выходом, близким к 100 %. При экстракции КСИ из элюата (см. таблицу, этап 2) 3 % $HClO_4$ наблюдали некоторое увеличение общей антитриптической активности КСИ, по-видимому, за счет разобщения комплексов с протеиназами. В дальнейшем выход ингибитора рассчитывали относительно этой стадии (см. таблицу, этап 3). Обессоливание белковых фракций после этапа 3 и других проводили практически без потерь с помощью гель-фильтрации через колонку с молселектом Г-25 при скорости элюции 80 мл/ч. Использование гель-фильтрации (рис. 1) существенно повысило выход ингибитора по сравнению с ранее используемой нами стадией диализа через

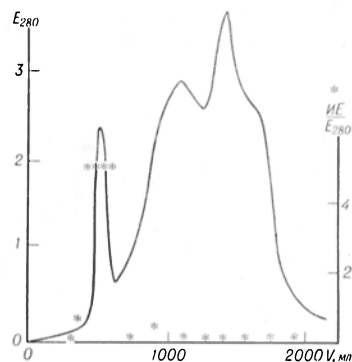


Рис. 1. Обессоливание $HClO_4$ -экстракта КСИ мочи человека в колонке (3,6×120 см) с молселектом Г=25, уравновешенным дистиллированной водой.

Звездочками на графике отмечены величины отношения $ИЕ/E_{280}$.

Выделение и очистка КСИ из мочи больных нефритами

Этап очистки	$E_{280} \times V$	Антитриптическая активность КСИ		Выход, % (по активности)	Степень очистки
		удельная, ИЕ/ E_{280}	общая, ИЕ		
1. Моча (2,5 л); 0.02 % NaN_3 , 5 мМ трилона Б, 0.5 мМ дитиотрейтола, pH 7,5	$1,2 \times 10^5$	$7,3 \times 10^{-3}$	860	—	1
2. QAE-сефадекс А-25, 1М NaCl (концентрирование на ротонном испарителе)	$1,2 \times 10^4$	0,07	860	—	10
3. 3 % HClO_4 -экстракт (нейтрализация 5 М NaOH)	$1,8 \times 10^3$	0,55	1000	100	75
4. Обессоливание на молселекте Г-25	$2,1 \times 10^2$	4,6	980	98	630
5. Химотрипсин-сефароза 4В (pH 8,1) элюция 0,01М HCl, содержащей 1М NaCl и 15 % изопропанола	22,3	42,7	950	95	5850
6. Обессоливание на молселекте Г-25	18,0	42,7	770	77	—
7. Полиамид, лиофилизация	16,1	47,8	760	76	6600

целлофан [5], на которой могла происходить потеря низкомолекулярных форм ингибитора (M_r 22 000) см. таблицу, этапы 4 и 6). Кроме того, на этом этапе происходила существенная денигментация обессоливаемого раствора.

В целях получения препарата КСИ мочи человека, имеющего высокосродство к эластазе гранулоцитов, на этапе 5 очистки мы использовали аффинную хроматографию на химотрипсин-сефарозе 4В, приводящую к увеличению удельной активности КСИ за 1 прием в 9,3 раза. Замена ранее используемой нами трипсин-сефарозы 4В [5] на химотрипсин-сефарозу было произведено на основании работы Ионссона и соавт., из которой следует, что при контакте КСИ мочи

человека с иммобилизованным химотрипсином (в отличие от иммобилизованного трипсина) не повреждается реактивный центр ингибитора, ответственный за связывание с эластазой гранулоцитов [14].

Если после обессоливания на молселекте Г-25 фракции, содержащие КСИ, сохраняли светло-желтую окраску, они подвергались этапу 7 очистки — хроматографии на полиамиде. Эта стадия позволяла избавиться от следов пигмента, присутствующего в препарате, без потерь активности (см. таблицу, этап 7).

Гель-фильтрация на сефакриле S-300 в 0,05 М трис-HCl-буфере pH 7,5, содержащем 0,5 М NaCl, позволяла добиться четкого разделения двух молекулярных форм КСИ мочи



Рис. 2. Иммунофореграмма для взаимодействия КСИ мочи человека с анти-КСИ-сывороткой.

В траншеях — 100 мкл анти-КСИ-сыворотки, в лунках 1 и 2 — 1 и 1,5 мкг КСИ (см. таблицу, этап 7) соответственно.

(пик 1 — КСИ_{44 000} и пик 2 — КСИ_{22 000}). Наличие двух молекулярных форм ингибитора, различающихся по электрофоретической подвижности, подтверждена иммунофорграммой, полученной для нефракционированного препарата ингибитора после этапа 7 (см. таблицу, рис. 2). Как следует из рис. 2, в препарате КСИ мочи присутствуют два антигенно-родственных белка, различающихся по электрофоретической подвижности, что полностью согласуется с данными наших более ранних исследований [5].

Измерения оптической плотности при 280 нм растворов точных навесок препаратов пиков 1 и 2 КСИ позволили вычислить оптические факторы, соответствующие поглощению 1 мг ингибитора в 1 мл ($E_{280}^{0,1\%}$) и составившие 0,61 и 0,75 соответственно. Как показал электрофорез пиков 1 и 2 в 15 % ПААГ (рис. 3), M_r изоформ КСИ равны 22 000 и 44 000 соответственно. Получение на электрофорграммах в 15 % ПААГ в присутствии додецилсульфата Na единственной полосы соответственно для пиков 1 и 2 свидетельствует об однородности данных препаратов по M_r . Изоформы КСИ с подобными M_r получали ранее и другие исследователи [14].

Как следует из работы [5], достигнутая нами очистка КСИ мочи (50 ИЕ на 1 мг препарата) соответствует максимально возможной. Таким образом, используемый в данной работе метод позволил получить 23 мг высокоочищенного препарата ингибитора из 2,5 л мочи больных нефритами с выходом по активности 75 %. Полученный в данной работе выход КСИ мочи человека превышает лучшие достижения других авторов на 15—20 % [11, 13, 14].

Сродство полученных препаратов КСИ_{22 000} и КСИ_{44 000} к эластазе гранулоцитов человека оценивали по величине константы скорости ингибирования k_i [10]. Эта величина для препаратов КСИ_{22 000} и КСИ_{44 000}, полученных в данном исследовании с использованием хроматографии на хитотрипсин-сефарозе 4В, составила соответственно $6,8 \cdot 10^3$ и $5,5 \cdot 10^3 M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$, а для изоформ КСИ, полученных ранее методом, включающим хроматографию на трипсин-сефарозе

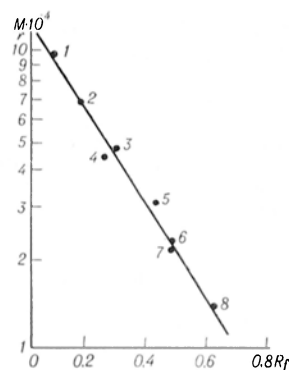


Рис. 3. Калибровочная прямая для оценки M_r 2 изоформ КСИ мочи человека.

15 % ПААГ, 0,1 % додецилсульфат Na, pH 8,6; 1 — фосфоорилаза В; 2 — альбумин; 3 — КСИ_{22 000}; 4 — овальбумин; 5 — карбоангидраза; 6 — КСИ_{44 000}; 7 — соевый ингибитор трипсина; 8 — α -лактальбумин.

4В, — $2,3 \cdot 10^2$ и $7,6 \cdot 10^2 M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ [5]. Таким образом, метод выделения КСИ мочи, изложенный в данной работе, приводит к получению препарата ингибитора, сродство которого к эластазе гранулоцитов в 10 раз превышает таковое препаратов, полученных ранее.

Таким образом, в настоящей работе предложен высокоэффективный метод получения препарата КСИ мочи, являющегося белком человека и имеющего высокое сродство к эластазе гранулоцитов. Эти свойства белка-ингибитора из мочи человека и дешевизна источника его выделения делают, на наш взгляд, этот ингибитор перспективным для создания на его основе противовоспалительного лечебного препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лагунчик Б. П., Лакомов В. В. // Клини. мед. — 1984. — № 2. — С. 127—128.
2. Нартикова В. Ф., Пасхина Т. С. // Биохимия. — 1969. — Т. 34, № 2. — С. 282—292.
3. Оглоблина О. Г., Платонова Л. В., Пасхина Т. С. // Там же. — 1979. — Т. 44, № 4. — С. 672—682.
4. Оглоблина О. Г. // Там же. — 1982. — Т. 47, № 10. — С. 1587—1600.
5. Оглоблина О. Г., Галстян Н. А., Карпицкий В. В. и др. // Вопр. мед. химии. — 1982. — № 4. — С. 86—93.
6. Оглоблина О. Г., Платонова Л. В., Пасхина Т. С. // Докл. АН СССР. — 1982. — Т. 265, № 4. — С. 982—985.
7. Оглоблина О. Г., Платонова Л. В., Мартынов В. Ф. и др. // Укр. биохим. журн. — 1983. — Т. 55, № 3. — С. 285—294.
8. Сыновец А. С., Левицкий А. П. Ингибиторы протеолитических ферментов в медицине. — Киев, 1979.
9. Шанин С. С., Караськов В. А. // Вестн. хир. — 1980. — № 1. — С. 130.

10. Яковлев В. А. Кинетика ферментативного катализа. — М., 1965. — С. 115—122.
11. Barthlemy-Clavey V., Yapo E. A., Vanhoutte G. et al. // Biochim. biophys. Acta. — 1979. — Vol. 580, N 1. — P. 154—165.
12. Grabar P. W., Williams C. A. // Ibid. — 1953. — Vol. 10, N 1. — P. 193—194.
13. Hochstrasser K., Wachter E. // Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. — 1979. — Bd 360, N 9. — S. 1285—1296.
14. Jönsson B. M., Löffler G., Ohlsson K. // Ibid. — 1982. — Bd 363, N 10. — S. 1167—1175.
15. Kohn J., Wilchek M. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1982. — Vol. 107, N 3. — P. 878—884.
16. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.
17. Nakajima K., Powers J. C., Asche B. M., Zimmerman M. // Ibid. — 1979. — Vol. 254, N 10. — P. 4027—4032.
18. Ohnishi H., Kosuzyme H., Ashida T. et al. // Dig. Dis. Sci. — 1984. — Vol. 29, N 1. — P. 24—32.
19. Patent. Derwent (unexam.), 1981, N 8, MOCH, BO4, p. 3, JP 5160724.
20. Patent. Derwent (unexam.), 1982, N 40, MOCH, BO4, p. 12, JP 57140728.
21. Patent. EP 0073251, A 61 K 37/64, JP 2965081.
22. Starkey P. M., Barrett A. J. // Biochem. J. — 1976. — Vol. 155, N 1. — P. 273—278.

23. Weber K., Osborn M. // J. biol. Chem. — 1969. — Vol. 224, N 6. — P. 4406—4412.

Поступила 12.02.86

HIGHLY EFFECTIVE PROCEDURE FOR ISOLATION OF ACID STABLE PROTEINASE INHIBITOR FROM HUMAN URINE

O. G. Ogloblina, L. A. Belova, V. N. Malakhov
Institute of Prophylactic Cardiology, All-Union

Cardiological Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

A modification is described of the previously developed procedure for isolation of acid stable proteinase inhibitor (ASI) from urine of patients with nephritis. The modified procedure enabled to increase the yield of the inhibitor and to obtain its highly purified preparations. These preparations possessed a property to inhibit effectively the activity of human granulocyte elastase ($k_i=10^4 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$). The modified procedure is based on affinity chromatography on chymotrypsin-Sepharose 4B, substitution of dialysis by gel filtration on Sephadex G-25, use of alternative methods for concentration of protein fractions instead of membrane ultrafiltration and chromatography on polyamide for ASI depigmentation. The inhibitor yield amounted up to 75 % of the initial activity in urine. The possibilities of the human urine ASI use in medical practice are discussed.

УДК 616.152.11+616.153.962.3]-074:543.545

Г. Ю. Ажицкий, Г. В. Загорулько, Г. В. Троицкий

МЕТОДИКА ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ФОКУСИРОВАНИЯ В БОРАТ-ПОЛИОЛЬНОЙ СИСТЕМЕ В ГРАДИЕНТЕ pH ОТ 4,0 ДО 5,6 В ТОНКОМ СЛОЕ ПААГ

Крымский медицинский институт, Симферополь

Метод изоэлектрического фокусирования (ИЭФ) нашел широкое применение при фракционировании высокомолекулярных веществ. Высокая разрешающая сила и чувствительность ИЭФ позволяют отделять модифицированные формы белков, имеющих близкие изоэлектрические точки, в узких диапазонах pH. Известны работы зарубежных авторов [4], где приведены данные по разделению сывороточных белков человека методом ИЭФ с использованием «иммобилинов». С помощью этого метода исследована генетическая вариабельность трансферрина, α_1 -антитрипсина и белка крови, связывающего витамин D. Методом ИЭФ в амфолинах классифицированы подтипы генетических вариант α_1 -антитрипсина [6]. Однако известно появление различных артефактов при работе с амфо-

линами [5]. Учитывая выраженное комплексобразование сывороточного альбумина с амфолинами и известную дороговизну реактивов, мы провели ИЭФ в трис-боратной системе.

Ранее методом ИЭФ в трис-боратной системе полиакриламидного геля (ПААГ) были обнаружены минорные кислые и щелочные фракции альбумина сыворотки крови при некоторых патологических состояниях [1]. В целях дальнейшего изучения фракций кислой зоны pH был разработан метод ИЭФ в узком диапазоне pH (4,0—5,6) с использованием трис-борат-полиольной системы в тонком слое ПААГ.

Методика

В работе использовали альбумин сыворотки крови людей, больных диабетом, сыворот-

№ фракции	pH	Количество буферного раствора 1, pH 5,6, мл	Количество 30 % глицерина на буферном растворе 1, pH 4,0, мл	Коэффициент рефракции	Удельная электропроводность, $\times 10^{-3}$ Ом $^{-1}$
1	4,0	0	10	1,374	0,6
2	4,12	1	9	1,370	0,75
3	4,22	2	8	1,366	0,85
4	4,32	3	7	1,362	0,95
5	4,47	4	6	1,357	1,06
6	4,58	5	5	1,354	1,15
7	4,75	6	4	1,350	1,30
8	4,95	7	3	1,346	1,40
9	5,10	8	2	1,342	1,50
10	5,45	9	1	1,336	1,52
11	5,60	10	0	1,333	1,50

ку крови человека, глицерин квалификации ч. д. а. («Реахим»), H_3BO_3 — х. ч., трис-(оксиметил)аминометан-ч («Реахим»). Полиакриламидный гель готовили на реактивах фирмы «Reanal» (ВНР).

Изоэлектрическое фокусирование образцов проводили в аппарате для электрофореза в пластинчатом геле [2], используя трис-боратную систему. В качестве электродного буфера использовали 0,5 М раствор борной кислоты, оттитрованный трис до pH 5,6. Для приготовления градиентного ряда pH готовили следующие растворы: раствор 1—0,5 М H_3BO_3 + 0,0036 М трис + 0,24 мл темеда + 2 мг рибофлавина на 1000 мл H_2O , pH 5,6; раствор 2—30 % глицерин на растворе 1, pH 4,0. Раствор 2 закисляется до pH, равного 4,0, так как при добавлении глицерина к раствору 1 образуется борат-глицериновая кислота.

При смешивании растворов 1 и 2 в соответствующих концентрациях (см. таблицу) был получен градиентный ряд pH от 4,0 до 5,6. Во все 11 фракций градиентного ряда был внесен 7 % цианогум-41 «Serva» (ФРГ). Растворы градиентного ряда насливали с помощью перистальтического насоса начиная с самого кислого. После часовой фотополимеризации (УФ-лампа) стандартные стеклянные пластинки (120×120 мм и толщиной ПЛАГ 1 мм) помещали в аппарат для электрофореза. В лунки геля, образованные штампом, вносили от 50 до 100 мкг образца, предварительно смешанного с 20 % сахарозой. ИЭФ вели при двух режимах—100 В/см в течение 6 ч и 11 В/см в течение 24 ч. После ИЭФ гель извлекали, белки фиксировали сутки в растворе 10 % ТХУ—25 % этанол—4 % сульфосалициловая кислота. Белки окрашивали 0,1 % кумасси R-250 в 40 % этаноле и 9 % уксусной кислоте в течение 4 ч; избыток красителя отмывали 6 % уксусной кислотой. Контроль за устойчивостью градиента pH осуществляли путем внесения белков-маркеров (стандартная смесь белков «Serva», ФРГ и овальбумин), а также измерением pH в контрольном продольном срезе ПЛАГ после его извлечения.

На рис. 1 представлен борат-полиольный градиент pH в интервале 4,0—5,6 до полимеризации, после полимеризации и после ИЭФ. Во всех случаях pH-градиент стабилен и практически аналогичен исходному. В ходе ИЭФ градиент претерпевает незначительные изменения, защелачиваясь на 0,1—0,2 ед. pH. Причиной такого защелачивания является выработка электродного буфера. Поэтому необходимо следить за pH электродного буфера и производить его одноразовую замену в течение ИЭФ или увеличивать емкость буферных сосудов.

В качестве примера фракционирования в градиенте pH 4,0—5,6 в тонком слое ПААГ приведены фотографии изоэлектрофореграмм (рис. 2) сыворотки крови человека (а) и альбуминов, выделенных из сыворотки крови больных диабетом (б, в, г). При ИЭФ сыворотки крови (высоковольтный режим ИЭФ) в кислой зоне pH 4,2—4,7, соответствующей α_1 -анти трипсину, обнаруживается до 8 дискретных белковых полос и диффузно расположенные белковые зоны между ними. При ИЭФ сывороточного альбумина больных диабетом обнаружены дополнительные полосы в диапазоне pH 4,3—4,6, которые являются минорными фракциями альбумина, характерными для патологического состояния. Иммунохимический анализ этих фракций показал их полную идентичность нормальному альбумину, а их электрофоретическая подвижность не отличается от обычной подвижности альбумина. По име-

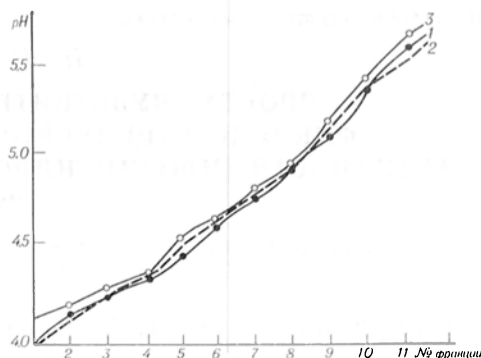


Рис. 1. Борат-полиольный pH-градиент 4,0—5,6. 1 — исходный, 2 — после полимеризации; 3 — после ИЭФ (высоковольтный режим).

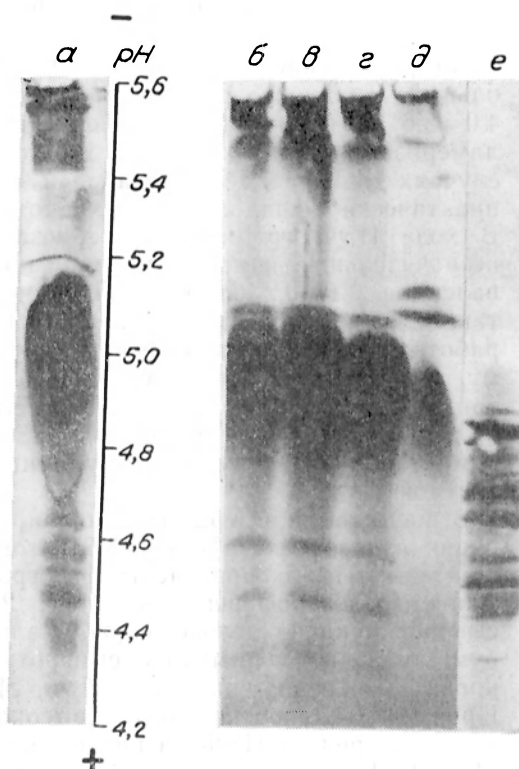


Рис. 2. Изофореграммы в градиенте pH 4,0—5,6.

а — сыворотка крови человека; б — г — альбумин, выделенный из сыворотки крови у больных диабетом; д — альбумин быка; е — овалбумин с pH от 4,4 до 5,0.

ющимся в литературе данным, эти формы принадлежат гликозилированному альбумину, выделенному при диабете [3] и других заболеваниях [1].

Полученные нами данные позволяют считать метод ИЭФ в борат-полиольном градиенте pH 4,0—5,6 перспективным для исследований гене-

тической variability белков кислой зоны pH и позволяют рекомендовать его для биохимических лабораторий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ажицкий Г. Ю., Троицкий Г. В., Шараева Т. К. и др. // *Вопр. мед. химии*. — 1984. — № 5. — С. 50—55.
2. Полакйнен А. П., Евдокимова В. А. // *Лаб. дело*. — 1982. — № 5. — С. 294—296.
3. Candiano G., Ghisleri G. M., Delfino G. et al. // *Electrophoresis*. — 1984. — Vol. 5. — P. 217—222.
4. Cleve H., Patulschick W., Weidinger S. et al. — *Electrophor'83: Advanced Methods Biochemical and Clinical Applications*. — Berlin, 1984. — P. 559—562.
5. Kaplan L., Foster S. D. // *Biochemistry (Wash.)*. — 1971. — Vol. 10. — P. 630—636.
6. Weidinger S., Cleve H. // *Electrophoresis*. — 1984. — Vol. 5. — P. 223—226.

Поступила 19.02.86

THIN-LAYER POLYACRYLAMIDE GEL ISO-ELECTRIC FOCUSING IN BORATE-POLYOL SYSTEM CONTAINING GRADIENT pH 4.0-5.6

G. Yu. Azhitsky, G. V. Zagorulko, G. V. Troitsky

Crimean Medical School, Simferopol

A procedure is described for thin-layer polyacrylamide gel isoelectric focusing involving borate-polyol system with gradient pH 4.0-5.6, where 0.5 M H_3BO_3 -Tris was used as an electrode buffer. Riboflavin, TEMED, Tris-borate buffer and glycerol were used in preparation of gradient pH, which was stable and did not alter during the electrophoresis. Blood serum proteins, particularly blood serum albumin, from patients with diabetes were studied using the isoelectric focusing procedure. After isoelectrofocusing of blood serum albumin from patients with diabetes additional minor acid fractions of the protein were detected at pH 4.3-4.6. The procedure of electrophoresis in gradient pH 4.0-5.6 was highly effective and might be used in biochemical laboratories.

УДК 612.822.1.015.12:577.152.31-088.1:543.426

Н. Н. Дыгало

ПРОСТАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ФЛЮОРИМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ТИРОЗИНГИДРОКСИЛАЗЫ В ТКАНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Лаборатория генетических основ нейроэндокринной регуляции Института цитологии и генетики СО АН СССР, Новосибирск

Тирозингидроксилаза (КФ 1. 14. 16. 2) катализирует гидроксилирование L-тирозина в L-диоксифенилаланин (ДОФА). Эта реакция — лимитирующее звено, определяющее ин-

тенсивность биосинтеза катехоламинов [5]. Как известно, катехоламины являются важными медиаторами нервной системы, поэтому процессы их метаболизма привлекают определен-

ное внимание исследователей [4].

Ввиду того что активность тирозингидроксилазы очень низкая, для ее определения требуются высокочувствительные методы. Наиболее чувствительными из них являются радиоизотопные с выделением радиоактивного ДОФА, образующегося при гидроксилировании меченого субстрата, а также входящие в последнее время в практику методы, основанные на жидкостной хроматографии высокого давления с электрохимической детекцией [4]. Однако эти методы, обладая высокой чувствительностью, не всегда удобны и доступны. Они требуют дорогостоящего оборудования, трудоемки и поэтому малоприменимы для исследований, связанных с проведением большого числа анализов. Широко распространены менее чувствительные методы, основанные на учете количества радиоактивной воды, образующейся при гидроксилировании меченого тритием тирозина, обладающие большей производительностью и впервые предложенные еще в 1964 г. [6]. Чувствительность этих методов составляет около 10^{-10} М продукта и снижается вследствие высокой величины контроля при работе на насыщающих концентрациях субстрата. Этого недостатка лишен имеющийся сопоставимую чувствительность флюориметрический метод, предложенный для определения активности тирозингидроксилазы, выделенной из ткани надпочечников [7]. Однако рекомендованная авторами предварительная очистка тирозингидроксилазы существенно снижает его производительность. Кроме того, этот метод не позволяет анализировать активность тирозингидроксилазы в малых образцах ткани.

В настоящей работе описана модификация флюориметрического метода, позволяющая анализировать активность тирозингидроксилазы в надосадочной фракции грубых гомогенатов малых (до 10 мг) образцов ткани головного мозга.

Методика

В работе использованы следующие реактивы: MES — [2-(N-морфолино)-этансульфоновая кислота], N-этилмаленимид, тритон X-100, каталаза печени быка, 6,7-диметил-5,6,7,8-тетрагидроптеридин (ДМПН₄) фирмы «Calbiochem», L-ДОФА фирмы «Reanal». Остальные реактивы — трис, L-тирозин, 2-меркаптоэтанол,

этилендиамин, ЭДТА, ТХУ, уксусная, аскорбиновая и соляная кислоты, $K_3Fe(CN)_6$, K_2HPO_4 , NaOH и Al_2O_3 (активированная кипячением в течение 30 мин в 2 н. HCl, промытая водой и прокаленная 2 ч при 200 °C) — отечественного производства. Все реактивы разводили на дважды дистиллированной воде.

Подготовка биологического материала.

В опытах использовали ткань головного мозга мышей и крыс, выделенную на холоду после декапитации животных. Ткань мозга гомогенизировали в стеклянных гомогенизаторах на холоду в 3—10 объемах (по отношению к массе) 0,05 М трис-ацетатного буфера pH 6,0, содержащего 0,2 % тритон X-100. Гомогенаты центрифугировали 30 мин при 20 000 g. Активность фермента определяли в надосадочной жидкости.

Ход определения. В конические пробирки объемом 10—15 мл наливали инкубационную среду, содержащую следующие компоненты: MES-буфер pH 6,0 — 0,1 М, ДМПН₄ — $0,8 \cdot 10^{-3}$ М, каталазу — 50 мкг на пробу, 2-меркаптоэтанол — 0,08 М; L-тирозин — от $0,05 \cdot 10^{-3}$ до $0,8 \cdot 10^{-3}$ М, надосадочную фракцию гомогената ткани мозга, содержащую 0,125—2 мг белка. Реакцию запускали, добавляя к остальным компонентам среды надосадочную фракцию гомогената ткани мозга. Конечный объем пробы 0,25 мл. Инкубацию проводили 10 мин при 30 °C и покачивании. В контрольные пробы и стандарты ($200 \cdot 10^{-12}$ М ДОФА), содержащие все компоненты инкубационной среды, добавляли инактивированную нагреванием надосадочную фракцию гомогенатов ткани мозга и проводили через все этапы методики. Реакцию останавливали, помещая пробирку на лед и добавляя 0,25 мл 6 % ТХУ. После добавления в пробы 0,05 мл 10 % ЭДТА белок отделяли центрифугированием в течение 20 мин при 2000 g.

Надосадочную жидкость пипеткой переносили во флаконы диаметром 14 мм, высотой 40 мм, имеющие горлышко с диаметром 9 мм и высотой 10 мм. Во флаконы быстро добавляли 0,2 мл 1 М трис, 0,05 мл 0,2 М N-этилмаленимида и 40 мг Al_2O_3 (pH смеси 8,4) и энергично встряхивали 20 с в вертикальном положении на механическом встряхивателе. Конструкция флакона предотвращает распыливание содержимого. После осаждения Al_2O_3 жидкость быстро удаляли водоструйным насосом. Al_2O_3 промывали встряхиванием в течение 10 с с 1 мл воды. Воду удаляли водоструйным насосом. ДОФА экстрагировали, встряхивая Al_2O_3 с 0,8 мл 0,1 н. HCl в течение 20 с. Экстракт пипеткой переносили в чистые конические пробирки объемом 10—15 мл, нейтрализовали 0,25 мл 0,5 М K_2HPO_4 и добавляли 0,05 мл 0,25 % раствора $K_3Fe(CN)_6$. Через 3 мин в пробирки приливали 0,5 мл смеси (9 объемов 9 н. NaOH; 1—2,2 % аскорбиновой кислоты; 0,2 — этилендиамина). Через 10 мин регистрировали флюоресценцию на волне 490 нм при длине волны возбуждающего света 360 нм. Концентрацию белка определяли по Лоури [2].

Активность фермента выражали в молях ДОФА на 1 мг белка в 1 мин.

Результаты и обсуждение

Присутствие инактивированной нагреванием надосадочной фракции го-

могенатов ткани мозга (2 мг белка в пробе) незначительно (менее чем на 10 %) повышает значение флюоресценции контроля по сравнению со свечением пробы, не содержащей белка. Это повышение, вызванное присутствием инактивированного белка, составляет лишь 2 % прироста флюоресценции, которую дает проба, содержащая ту же, но не инактивированную фракцию гомогената ткани мозга. При добавлении в инкубационную среду надосадочной фракции, содержащей меньшее количество белка, флюоресценция контрольных проб с надосадочной фракцией и без нее практически не различается. Таким образом, надосадочная фракция гомогенатов ткани мозга, приготовленная описанным выше способом, практически не содержит веществ, мешающих анализу. Следовательно, предварительной очистки фермента при анализе активности тирозингидроксилазы ткани головного мозга флуориметрическим методом не требуется.

Применение при выделении ДОФА на Al_2O_3 специальных флаконов, удаление компонентов инкубационной среды, а также промывочной воды водоструйным насосом позволило в 2 раза по сравнению с исходным методом [7] уменьшить объем инкубационной среды и открыло возможность работы с малыми образцами ткани мозга.

Отсасывание с помощью насоса (а не декантирование) компонентов инкубационной среды и промывочной воды является принципиальным. Декантирование малых объемов сложно стандартизовать, но и при инкубации в больших объемах (0,5 мл) с использованием декантирования флюоресценция контрольных проб в 1,5, а их вариабельность в 2—3 раза выше, чем при более полном и стандартном удалении компонентов инку-

бационной среды и промывочной воды путем отсасывания. Выход ДОФА с Al_2O_3 и применением декантирования и отсасывания одинаков и составляет примерно 70 %. Однако при отсасывании вариабельность стандартов также снижается в 1,5—2 раза.

Соотношение $200 \cdot 10^{-12}M$ ДОФА/контрольная проба составляет в предложенном методе примерно 4:1. Чувствительность метода — $(60-70) \cdot 10^{-12}M$ продукта, что в 1,5 раза превышает таковую наиболее распространенных методов определения активности тирозингидроксилазы. При использовании в ходе анализа автоматических микроинъектор вариабельность флюоресценции контрольных проб составляет 5—8 %, стандартов — 4—6 %, параллельных определений активности фермента — 6—10 %.

Предложенная модификация, как и исходный метод [7], характеризуется линейной зависимостью количества ДОФА в пробе от времени инкубации в течение 20 мин и количества белка в пробе. Следует отметить сохранение линейной зависимости и при количествах неочищенного белка в пробе, меньших 0,5 мг (рис. 1). Описанный метод позволяет исследовать кинетические характеристики фермента из структуры мозга одной крысы (рис. 2), а также активность тирозингидроксилазы в малых структурах мозга мыши (рис. 3). Константа Михаэлиса для тирозингидроксилазы мозга крысы и распределение активности фермента по структурам мозга мыши, полученные предложенным методом, соответствуют литературным данным [1, 3].

Достоинствами данного метода являются возможность работы на насыщающих концентрациях субстрата с малыми (10 мг сырой массы) образцами ткани мозга, а также его высо-

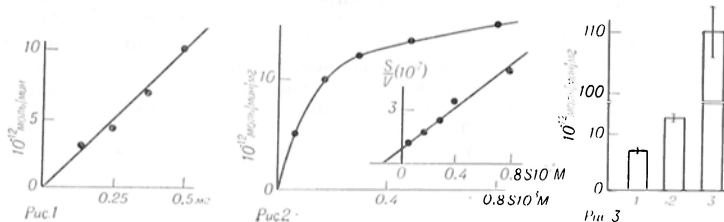


Рис. 3. Активность тирозин-гидроксилазы в стволе (1), гипоталамусе (2) и полосатом теле (3) головного мозга мышей линии СЗН/Не ($M \pm m$; $n=8$).

Рис. 1. Зависимость скорости образования ДОФА от количества белка, добавленного в пробу.

Рис. 2. Зависимость активности тирозингидроксилазы ствола мозга 1 крысы от концентрации тирозина.

кая производительность, позволяющая анализировать до 75 проб в день.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cicero T. J., Sharpe L. G., Robins E., Grote S. S. // J. Neurochem. — 1972. — Vol. 19. — P. 2241—2243.
2. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 194. — P. 265—275.
3. Moor K. E., Dominic J. A. // Fed. Proc. — 1971. — Vol. 30. — P. 859—870.
4. Nagatsu T. // Methods in Biogenic Amine Research. — Amsterdam, 1983. — P. 329—357.
5. Nagatsu T., Levitt M., Udenfrend S. // J. biol. Chem. — 1964. — Vol. 239. — P. 2910—2917.
6. Nagatsu T., Levitt M., Udenfrend S. // Ana-

lyt. Biochem. — 1964. — Vol. 9. — P. 122—126.

7. Yamauchi T., Fujisawa H. // Ibid. — 1978. — Vol. 89. — P. 143—150.

Поступила 27.02.86

A SIMPLE AND SENSITIVE MODIFICATION OF FLUORIMETRIC METHOD FOR DETERMINATION OF TYROSINE HYDROXYLASE ACTIVITY IN BRAIN TISSUE

N. N. Dygalo

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

A simple and sensitive modification of fluorimetric method for determination of tyrosine hydroxylase activity in the small samples of brain tissue is described.

РЕЦЕНЗИИ

УДК 616-008.9+616-008.931]-055.5/7:577.2](082)(049.32)

Молекулярные основы лизосомных болезней накопления (Molecular Basis of Lysosomal Storage Disorders. Ed. by J. A. Barranger, R. O. Brady. Orlando, Academic Press. Inc., 1984, 502 p.)

Книга представляет собой сборник материалов одноименной международной конференции, состоявшейся в сентябре 1983 г. в Национальном институте здоровья (Бетезда, США). Книга состоит из 6 тематических разделов, включающих в себя 29 статей, написанных крупнейшими специалистами в области изучения лизосом и лизосомных болезней накопления.

Раздел 1 книги посвящен методам очистки и характеристике некоторых лизосомных ферментов, их белковым активаторам и стабилизаторам.

В статье D. Robinson подчеркивается, что получение лизосомных ферментов человека методами биотехнологии пока остается проблематичным и поэтому по-прежнему актуально использование для очистки этой группы ферментов таких классических методов, как аффинная, ионообменная и высокоэффективная жидкостная хроматография, различные виды электрофореза, специфическая экстракция с помощью полиэтиленгликоля, декстрана и др.

Статья K. Sandhoff посвящена роли белковых активаторов в деградации гликолипидов. Автор подчеркивает, что открытие и исследование белковых активаторов являются сравнительно новым направлением, позволяющим понять, как происходит функционирование в клетке лизосомных гидролаз, расщепляющих гликофинголипиды. Белковые активаторы по современным представлениям рассматриваются как своего рода биологические детергенты, способные связываться с липидной частью

субстратов, с одной стороны, и с соответствующим ферментом — с другой. Именно при такой организации комплекса активатор—субстрат—фермент углеводная часть гликофинголипидов эффективно расщепляется тем или иным ферментом. Установлено существование специфических белковых активаторов, повышающих расщепление различных гликофинголипидов под действием арилсульфатазы А (сульфатиды), β-галактозидазы (См₁-ганглиозид и G_{AL}-гликолипид), α-галактозидазы А (глоботриозилцерамид), β-гексозаминидазы А (G_{M2}-ганглиозид и G_{AL2}-гликолипид), β-глюкозидазы (глюкозилцерамид). Автор подразделяет известные к настоящему времени активаторы на два типа. К первому типу отнесены активаторы водорастворимых лизосомных гидролаз, ко второму — активаторы мембраносвязанных ферментов. Первые характеризуются как гликопротеиды с изоэлектрическими точками в диапазоне рН 4,0—5,0 и молекулярной массой от 20 до 27 кД. Для некоторых из них показана лизосомная локализация. Большинство из этих активаторов повышает расщепление природных гликолипидов под действием соответствующих гидролаз и не влияет на ферментативный гидролиз синтетических гликозидов. Активаторы же второго типа, наиболее изученным из которых является активатор глюкоцеребброзидазы, повышают эффективность расщепления не только природных субстратов, например глюкоцереброзида, но и синтетических водорастворимых гликозидов, в частности 4-метилумбеллиферил-β-глюкозида. Кроме того, у активаторов этого типа отсутствует сродство к гликолипидным субстратам и их активирующее действие проявляется только на уровне фермента.

В заключительной части статьи рассмотрена роль белковых активаторов в развитии лизосомных болезней накопления. Показано, что некоторые типы G_{M2}-ганглиозидозов (напри-

мер, АВ-вариант) развиваются при наследственной недостаточности белка, активирующего расщепление G_{M2} -ганглиозида. Отсутствие активаторов установлено при определенных формах метахроматической лейкодистрофии, болезни Нимана—Пика (тип С) и при некоторых других лизосомных болезнях накопления.

В статье А. Fluharty, Н. Kihara приведены данные по недостаточности активатора цереброзидсульфатазы (арилсульфатазы А). Отсутствие активатора приводит к развитию атипичной формы метахроматической лейкодистрофии, которая характеризуется менее выраженной недостаточностью арилсульфатазы А, с сохранением многих клинических признаков классической формы болезни. Культура фибробластов от таких больных поглощает экзогенные цереброзидсульфаты примерно в таких же количествах, как и клетки от здоровых людей, однако распад этих соединений в фибробластах больных существенно снижен. Добавление к фибробластам больных очищенных препаратов активатора повышало ферментативное расщепление цереброзидсульфатов. Анализируя данные литературы, авторы предполагают, что природа известных активаторов для расщепления цереброзидсульфатов, G_{M1} -ганглиозида и глобо-триаозилцерамида может быть очень сходной или идентичной.

В статье D. Wenger и K. Inui приведены результаты изучения механизма действия и специфичности к субстратам и ферментам белкового активатора ферментативного гидролиза G_{M1} -ганглиозида и сульфатида. Активатор был очищен до гомогенного состояния из печени здорового человека и больного с G_{M1} -ганглиозидозом; он оказался гликопротеидом с выраженными гидрофобными свойствами и молекулярной массой около 30 000. Оба препарата были иммунологически идентичны, но различались по степени сиаилирования. В дальнейших экспериментах использовали препарат активатора, полученный от больного, так как его выход после очистки оказался довольно высоким. Показано, что активатор под действием соответственно G_{M1} -ганглиозидазы и сульфатидсульфатазы повышает расщепление G_{M1} -ганглиозида. Ферментативный гидролиз G_{M2} -ганглиозида не стимулировался исследуемым белковым активатором. В тоже время активатор образовывал комплекс с G_{M1} -, G_{M2} - и G_{M3} -ганглиозидами, сульфатидом и сфингомиелином. Авторы считают, что белковый активатор может связываться с рядом гликолипидов, однако активирование катализа этих гликолипидов не происходит, так как образующийся комплекс не всегда способен связываться с соответствующей гликолипидгидролазой.

Распространение и физиологическое значение активаторных белков для ферментативного расщепления G_{M1} - и G_{M2} -ганглиозидов обсуждаются в статье Y.-T. Li и S.-C. Li.

Активаторы принципиально другого типа, действующие непосредственно на связанные с мембранами ферменты, в частности на β -глюкозидазу, и называемые поэтому когидролазами, рассмотрены в статье N. Radin. В качестве когидролаз для β -глюкозидазы могут выступать кислые фосфолипиды типа фосфатидилсерина, или низкомолекулярные факторы гликопротеидной природы. Когидролазы, кро-

ме глюкоцереброзидазы, активируют галактоцереброзидазу и сфингомиелиназу.

В статье Galjaard и соавт. рассматривается сравнительно недавно открытая наследственная патология, при которой имеется недостаточность белка, стабилизирующего 2 лизосомных фермента: β -галактозидазу и сиалидазу. В литературе это заболевание известно как комбинированная недостаточность β -галактозидазы и сиалидазы, или галактосиалидоз. В последние годы были расшифрованы молекулярные механизмы, обуславливающие это заболевание. Установлено, что в лизосомах нормальных клеток прошедший процессинг мономер β -галактозидазы (64 кД) существует в виде мультимерного комплекса с молекулярной массой 600—700 кД, который через стабилизирующий белок — гликопротеид (32 кД) связан с сиалидазой лизосомных мембран. При галактосиалидозе стабилизирующий белок отсутствует, мономер β -галактозидазы не организуется в мультимерный комплекс и быстро разрушается внутрилизосомными тиоловыми протеиназами. Активность сиалидазы вне комплекса существенно снижается. Несмотря на то что молекулярные механизмы при галактосиалидозе в основном расшифрованы, причины гетерогенности этого заболевания остаются невыясненными.

Нестабильности дефектных ферментов при лизосомных болезнях накопления посвящена статья K. Figura и соавт. Согласно авторам, все лизосомные болезни могут быть подразделены на следующие 6 групп в зависимости от вариантов недостаточности лизосомных ферментов: 1. Заболевания, при которых дефектный фермент не обнаруживается иммунологическими методами в результате мутации структурного гена. 2. Заболевания, при которых ферментативно неактивный полипептид синтезируется, но изменяются его стабильность или транспорт. 3. Заболевания, при которых синтезируемый активный полипептид не попадает в лизосомы. 4. Заболевания, при которых синтезируется ферментативно активный полипептид, быстро разрушающийся в пре/ или лизосомах. 5. Нарушения, при которых отсутствуют активаторные белки, необходимые для гидролиза гидрофобных субстратов липидной природы. 6. Болезни, при которых активность фермента подавляется ингибиторами. В качестве примеров лизосомных болезней, развивающихся при нестабильности структурно измененных ферментов, приведены некоторые поздние формы болезни Помпе, галактосиалидоза и метахроматической лейкодистрофии.

Раздел II книги посвящен вопросам, связанным с транспортом молекул в лизосомы. Он открывается статьей J. Harford и соавт., в которой рассматривается распад асиалогликопротеидов в гепатоцитах. Как известно, опосредованный специфическим рецептором эндоцитоз многих сывороточных асиалогликопротеидов в гепатоцитах является одним из наиболее изученных сейчас механизмов прохождения биополимеров через плазматические мембраны, их внутриклеточного транспорта до лизосом, где эти молекулы подвергаются ферментативному расщеплению. Все эти этапы подробно разбираются в статье, в том числе стадии диссоциации комплекса рецептор—лиганд, в результате которой освобожденный рецептор снова появляется на плазматической мембране, а лиганды (асиалогликопротеиды) попадают в лизосомы.

В статье W. Sly и J. Grubb обсуждается значение кислой среды для транспорта кислых гидролаз в лизосомы. По мнению авторов, кислая среда в лизосомах является одним из определяющих факторов диссоциации комплекса маннозо-6-фосфатный рецептор — гидролаза и возмещения рецептора в мембраны комплекса Гольджи и на плазматическую мембрану. На примере мутантных клеток из яичника китайского хомячка, устойчивых к действию дифтерийного токсина и некоторых вирусов и дефектных в АТФ-зависимом подкислении среды внутриклеточных везикул, показано нарушение транспорта лизосомных гидролаз. В мутантных клетках наблюдали обеднение лизосом гидролитическими ферментами и повышение внутрилизосомного pH, которое отмечается, если нормальные клетки обрабатывают лизосомотропными аминами.

Последующие 3 статьи раздела посвящены роли специфических рецепторов, с помощью которых лизосомные гидролазы транспортируются в лизосомы. Среди этих работ привлекают внимание данные C. Gabel и соавт., согласно которым в некоторых типах клеток млекопитающих внутриклеточный транспорт лизосомных гидролаз осуществляется не рецептором, специфичным к маннозо-6-фосфатным группировкам, а с помощью какой-то другой, пока неидентифицированной рецепторной системы.

В заключительной части раздела имеется работа F. Furbish и соавт. о взаимодействии глюкоцереброзидазы из плаценты человека с лектинами печени крысы. По мнению авторов, нагивная форма фермента при введении в кровотоки поглощается клетками печени с помощью жидкостного эндоцитоза. При последовательном отщеплении от гликопротеидной молекулы фермента остатков сиаловых кислот, галактозы и N-ацетилгексозамина характер поглощения глюкоцереброзидазы клетками печени изменяется, и оно приобретает характер процесса, зависящего от функционирования рецептора на маннозные остатки. Предполагается, что при болезни Гоше наиболее эффективное включение экзогенного фермента в клетки ретикулоэндотелиальной системы, в частности в купферовы клетки, можно будет достигнуть частичным дегликозилированием глюкоцереброзидазы.

Раздел III книги посвящен биосинтезу лизосомных ферментов. В статье A. Erickson и соавт. на примере нескольких типичных лизосомных ферментов (катепсина D, β -глюкуронидазы) проанализированы два основных типа посттрансляционной модификации: дегликозилирование и частичный протеолиз. К сожалению, данные по гликозилированию синтезирующихся на рибосомах гликопротеидных молекул лизосомных гидролаз практически не рассмотрены. В последующих 3 статьях раздела представлены сведения об искаженном синтезе α -цепей β -гексозаминидазы при различных формах болезни Тея—Сакса, о промежуточных формах этого фермента из плаценты и о процессе лизосомной α -гликозидазы человека.

В IV разделе книги рассматриваются молекулярно-генетические аспекты лизосомных ферментов. В статье A. Reuser представлены данные об исследовании гетерогенности лизосомных болезней накопления с помощью метода генетической комплементации. В основе этого метода лежит гибридизация соматиче-

ских клеток, полученных от больных с различными клиническими проявлениями той или иной наследственной патологии. С помощью метода генетической комплементации в последние годы была показана гетерогенность некоторых типов ганглиозидозов, гликогенозов, мукополисахаридозов и муколипидозов. В этот же раздел включены статьи о генетической гетерогенности болезни Гоше (J. Barranger и соавт.), хромосомной локализации структурных генов, кодирующих лизосомные гидролазы, их активаторы и стабилизаторы (A. Astrin, R. Desnick). Заключительные статьи раздела посвящены стратегии молекулярного клонирования генов лизосомных ферментов в целях создания библиотеки генов, которая даст возможность установить первичный генетический дефект при лизосомных болезнях.

В V разделе книги приведены данные по коррекции некоторых лизосомных болезней с помощью трансплантации больным костного мозга и при заместительной энзимотерапии. Первый подход с успехом использовали при лечении некоторых типов мукополисахаридозов и при болезни Гоше, второй — при сфинголипидозах.

Заключительный, VI раздел книги состоит из одной статьи R. Brady и J. Barranger, в которой авторы резюмируют основные достижения в изучении молекулярных механизмов лизосомных болезней, намечают пути решения новых проблем в исследовании и коррекции этих патологий.

Книга в целом заслуживает, без сомнения, высокой оценки. Обширная библиография к каждой из статей и предметный указатель в конце книги дают возможность читателю более глубоко понять обсуждаемые вопросы и быстро найти интересующую его информацию.

Несмотря на то что ряд материалов книги уже опубликован в некоторых зарубежных периодических изданиях, книга представляет собой пособие для биохимиков, молекулярных биологов, генетиков и других специалистов, интересующихся проблемами наследственной патологии.

Г. Я. Видершайн (Москва)

УДК 577.1(075.8)(049.32)

Е. А. Строев. Биологическая химия. — М.: Высшая школа, 1986, 479 с.

В связи с введением нового учебного плана и новых учебных программ по специальности «фармация» возникла необходимость в создании новых учебников и практических руководств. Недавно вышел в свет учебник «Биологическая химия», предназначенный для фармацевтических институтов и фармацевтических факультетов медицинских институтов. Он написан Е. А. Строевым — видным специалистом в области регуляции метаболизма, энтузиастом в деле совершенствования и оптимизации преподавания биохимии в медицинских вузах. Учебник полностью соответствует программе по биохимии для студентов фармацевтических институтов и фармацевтических факультетов медицинских институтов, поскольку его автор являлся также одним из первых, кто разрабатывал эту программу.

В объяснительной записке к программе указано, что «биохимия служит базовой ме-

дико-биологической наукой в вузе, которая ставит цель научить студента (провизора) применять при изучении последующих дисциплин и при профессиональной деятельности сведения о химическом составе и молекулярных процессах жизнедеятельности человека для характеристики нормы и патологии, действия лекарств и ядов и принципов фармакотерапии». В связи с этим нельзя было создавать обычный учебник по биохимии, модернизированный самыми последними достижениями физико-химической биологии, а необходимо было написать принципиально новый учебник, основным содержанием которого явилась бы ориентация фундаментальных биохимических знаний в прикладном фармацевтическом направлении. При этом следовало учитывать, что изучение биохимии базируется на современных представлениях и терминах биофизической и органической химии. В свою очередь знание основ биохимии необходимо для изучения фармакологии, патологии, фармацевтической химии и других дисциплин. Можно согласиться с мнением автора учебника, что «главным для биохимии является выяснение функционального (биологического) назначения всех химических веществ и физико-химических процессов в живом организме, а также механизма нарушения этих функций при разных заболеваниях». Функциональная направленность учебника важна и потому, что будущие провизоры согласно номенклатуре специальностей, утвержденной Минздравом СССР, могут выполнять функции врача-лаборанта клинико-биохимических лабораторий. Учитывая, что основная масса выпускников фармацевтических вузов и фармацевтических факультетов медицинских институтов будет работать в аптечной сети и лечебно-профилактических учреждениях, необходимы глубокие и систематизированные знания химической природы и физико-химических свойств биополимеров и низкомолекулярных биорегуляторов, их превращений в организме не только для понимания их функциональной роли, но и для оценки назначаемых дозировок, совместимости, времени инактивации, особенностей приготовления лекарственных форм, их хранения, транспортировки и т. д. Для клинического фармацевта необходимо понимание механизмов превращения природных и чужеродных лекарственных препаратов и ядов (биотрансформация), биохимических основ фармакокинетики, способов биологической детоксикации соединений и выведения их из организма. Все изложенное выше показывает особенности профилизации курса биохимии в подготовке провизоров.

Учебник написан по функциональному принципу и состоит из введения и четырех частей. Во введении изложены предмет и задачи, а также методы биохимии, дан краткий очерк истории развития биохимии, подчеркнут вклад отечественных ученых и приведены основные признаки живой материи. В этом разделе показана роль биохимии в фармацевтической практике на примерах генной инженерии, биотехнологии, специфичных энзиматических методов анализа лекарств, их биотрансформации в организме.

Первая часть учебника «Молекулярные основы структурной организации клеток» посвящена изложению основного признака живой материи — высокого уровня структурной организации. Рассмотрены основные химические компоненты организма. По количественному

содержанию все элементы организма разделены на четыре группы: макробиогенные, олигобиогенные, микробиогенные и ультрамикробиогенные. Дан краткий обзор свойств и биологической роли воды и неорганических ионов. Центральное место в первой части учебника отведено химии белков. Материал изложен в традиционной последовательности, лаконично, но очень понятно. Весьма ценными для изучения материала являются оригинальные таблицы, в которых приведены схема выделения и очистки белков, методы изучения разных уровней структурной организации белка, биологические функции белков и их характеристика. Следовало сделать больший акцент на классификации аминокислот по полярности радикалов, что позволило бы более четко представить связи и взаимодействия, стабилизирующие третичную структуру белка. Кроме того, при описании особенностей альфа-спирали указано, что для ее стабилизации служит «образование водородных связей между пептидными группами каждого первого и четвертого аминокислотных остатков». Более точно это определение приведено Н. А. Тюкавкиной и Ю. И. Бауковым (Биоорганическая химия. — М.: Медицина, 1985): «Основную роль... играют водородные связи, которые в альфа-спирали образуются между карбонильным атомом кислорода каждого первого альфа-аминокислотного остатка и атомом водорода NH-группы каждого пятого остатка». Химия углеводов, нуклеиновых кислот и липидов описана кратко, но вполне достаточно для понимания их биологических функций. Завершается первая часть учебника описанием смешанных макромолекул — гликопротеидов, липопротеидов, фосфопротеидов, кофакторпротеидов, металлопротеидов, небелковых смешанных макромолекул и надмолекулярных структур: мембран, органоидов клетки.

Самой большой по объему является вторая часть учебника — «Молекулярные основы жизнедеятельности и патологии», в которой весь материал изложен в пяти логично следующих один за другим разделах. В первом разделе («Общая характеристика обмена веществ и энергии») даны вводные понятия об обмене веществ и энергии, приведены сведения о ферментах, транспорте веществ в организме, биохимии питания и пищеварения. Подчеркнуто, что АТФ — ключевой энергетический посредник в обмене веществ — не является веществом, наиболее «богатым» энергией, а находится в середине энергетической шкалы. В связи со специальной направленностью учебника вполне оправдано более подробное изложение данных о коферментах. Недостаточно изложена кинетика ферментативных реакций, не указано, что уравнение Бриггса — Холдейна является модификацией уравнения Михаэлиса — Ментен. Однако следует приветствовать, что вводный раздел второй части учебника завершается описанием «суммы биохимических процессов, связанных с поступлением и превращением пищевых веществ в организме для обеспечения энергией и структурными веществами любой физиологической функции».

Второй раздел этой части учебника посвящен биоэнергетике: изложены физические основы окислительно-восстановительных процессов, механизмы аэробного образования энергии в митохондриях, анаэробное образование энергии из углеводов, образование энергии в

фотосинтезирующих организмах. При описании путей потребления кислорода в реакциях биологического окисления приведены современные представления о роли супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы в регуляции свободнорадикального окисления в клетках, дан перечень прооксидантов и антиоксидантов. При характеристике переносчиков дыхательной цепи автор допускает неточность, когда указывает, что железосерные белки участвуют в переносе электронов и протонов в этой цепи. Особое значение имеет глава, посвященная взаимоотношениям и регуляции различных путей образования энергии: энергетическим посредникам в клетках, переносу энергии внутри клеток, путям потребления энергии, веществам, влияющим на энергетический обмен в клетках.

В третьем разделе второй части учебника содержится описание обмена углеводов, липидов, аминокислот и белков, гемопротендов, пуриновых и пиримидиновых мононуклеотидов. Вначале изложен пентозофосфатный путь обмена углеводов. К сожалению, использованы самые разные названия этого пути превращения углеводов и излишне детально описана энергетическая ценность превращения глюкозо-6-фосфата через этот путь. Весьма наглядно продемонстрирована взаимосвязь пентозофосфатного пути с гликолизом и биологическая роль этого пути превращения углеводов. Большое внимание уделено биосинтезу углеводов в тканях и регуляции обмена углеводов в организме. По всей видимости, не следовало подчеркивать, что переход гликогенсинтетазы в неактивную форму катализируется ее киназой. Основные сведения, касающиеся обмена липидов и аминокислот, изложены четко, с привлечением убедительных примеров. Например, показано, что скорость окисления ненасыщенных жирных кислот выше, чем насыщенных: олеиновой кислоты в 11 раз, линолевой — в 114, линоленовой — в 170 и арахидоновой — в 200 раз выше по сравнению со стеариновой кислотой. Можно приветствовать стремление автора учебника показать связь метаболизма и процессов регуляции, патологии и применения тех или иных рассматриваемых метаболитов в качестве лекарственных препаратов. Этому служат краткие и точные характеристики гиперлипотеидемий, описание использования аминокислот в образовании важнейших небелковых азотсодержащих соединений (креатин, медиаторы, биогенные амины, витамины, коферменты), вполне уместно изложение понятий азотистого баланса организма. Рассматривая смешанные макромолекулы, автор учебника детально описал обмен гемопротеидов. Удачно показаны механизмы образования, транспорта и выведения билирубина и особенности нарушения этих процессов при различных видах желтух. На первый взгляд, обмен пуриновых и пиримидиновых мононуклеотидов изложен слишком кратко. Однако приведенной информации вполне достаточно для понимания патогенеза подагры и ее патогенетической терапии аллопуринолом, антураном и другими препаратами. Описание обмена важнейших структурных мономеров живых систем (аминокислот, глюкозы, жирных кислот, мононуклеотидов) завершается схемой взаимосвязи основных путей обмена веществ. На примере питания убедительно доказано, что границы взаимозаменяемости пищевых белков, углеводов и липидов

определяются наличием незаменимых компонентов пищи.

В четвертом разделе второй части учебника представлены сведения о переносе генетической информации и его значении для жизнедеятельности клеток: виды переноса генетической информации, молекулярные основы репликации, транскрипции, посттрансляционные изменения РНК, молекулярные основы трансляции. Дано краткое и точное описание генетического кода и его свойств, методов генной инженерии. При рассмотрении регуляции биосинтеза белков на примере лактозного оперона бактерий механизмы индукции и репрессии белкового синтеза проиллюстрированы с помощью взаимодействий цАМФ с белком — активатором катаболитного гена. В то же время отмечено, что биосинтез белков у эукариотов изучен недостаточно и регулируется более сложными механизмами. Показана роль некоторых регуляторов активности генов (гистоны, негистоновые белки, векторная РНК), дана схема регуляции белкового синтеза и представлены препараты, усиливающие или ингибирующие синтез белков. Этот раздел логично завершается главой «Молекулярная патология», в которой дана оригинальная схема развития молекулярных болезней, описаны различные ферментопатии, а также приведены принципы лечения и профилактики молекулярных болезней (9 принципов).

Пятый раздел этой части учебника посвящен регуляции и адаптации обмена веществ. Справедливо положение о том, что для управления метаболизмом существуют биорегуляторы, отвечающие по крайней мере двум требованиям: служить индикатором изменений в обмене веществ и включать механизмы, регулирующие скорость и направленность химических превращений. Дана удачная классификация биорегуляторов по продолжительности эффекта (срочная, долговременная регуляция), по месту действия (внутриклеточные, внеклеточные и смешанные регуляторы); рассматривается гуморальная, эндокринная и нервная регуляция. В отличие от многих руководств в рецензируемом учебнике сведения о витаминах и гормонах изложены после описания метаболических путей. В этом заключен глубокий смысл, поскольку провизор в своей профессиональной деятельности будет постоянно сталкиваться с готовыми лекарственными формами этих биорегуляторов. Поэтому все предшествующее изложение должно подготовить студента к пониманию биологической и медицинской роли витаминов и гормонов, их взаимодействия, совместимости, метаболизма и обезвреживания. Кроме того, для провизора чрезвычайно важными являются сведения об антивитаминах и антигормонах. Особенно хорошо представлен раздел, посвященный гормонам. Механизмы их действия рассматриваются в тесной связи с регулирующими функциями организма. Так, например, женские половые гормоны описаны в рамках овариального и маточного циклов. Лаконично дано изложение нарушений функции желез внутренней секреции и подчеркнута биомедицинское значение гормональных препаратов. При описании механизмов действия гормонов следовало упомянуть о продуктах обмена полифосфоинозитидов как вторичных мессенджерах, а в схеме регуляции метаболизма глюкокортикоидами желательнее было бы указать, что эти гормоны уменьшают переход глюкозы из

крови в мышцы. Завершается пятый раздел изложением современных сведений о простагладинах (дана схема биосинтеза простагландинов, лейкотриенов, тромбоксанов и простагглинов) и общими положениями о «биохимической адаптации».

Третья часть учебника посвящена функциональной биохимии: биохимии крови (с указанием лекарственных препаратов из крови), биохимии печени и почек. Подчеркнуто, что специализация биохимических функций зависит от состава белков, главным образом ферментов, обмен которых предопределяется особенностями реализации генетической информации в процессе развития и дифференцировки клеток, тканей и органов. Биохимические особенности тканей рассмотрены в рамках их основных функций, что обеспечивает теоретическую подготовку провизора для работы в лечебно-профилактических учреждениях.

В четвертой части учебника «Прикладная биохимия» суммированы биохимические знания, которые необходимы будущему провизору в его практической деятельности в лечебно-профилактических учреждениях (врач-лаборант) или различных областях фармации — биотехнологии лекарств, биофармации, анализе, контроле качества и стандартизации лекарственных препаратов. В доступной форме описаны принципы биохимической диагностики заболеваний и приведены примеры их использования в практике, дана краткая характеристика клинко-биохимических лабораторий. Завершается учебник оригинальной главой, посвященной фармацевтической биохимии, т. е. «совокупности биохимических знаний, используемых в решении задач фармации». Впервые излагаются биохимические методы, используемые при стандартизации и контроле качества лекарств, ферменты как аналитические реагенты, биотехнология лекар-

ственных препаратов, биохимические основы технологии лекарственных форм. Подробно рассмотрены метаболизм и обезвреживание лекарств и ядов. При этом подчеркнуто, что если биогенные вещества включаются в обычный ход метаболизма, то ксенобиотики при своем превращении проходят две основные фазы: модификации и конъюгации. Детально описаны микросомальный и немикросомальный пути метаболизма ксенобиотиков и условия, определяющие метаболизм лекарств.

Характеризуя учебник в целом, следует отметить, что во всех главах даны оригинальные определения, схемы, таблицы, которые соответствуют современному уровню развития биохимии. В учебнике удачно использовано выделение другим цветом основных положений, выводов, классификаций. Учебник завершается кратким списком доступной литературы и предметным указателем, что облегчает ориентацию читателя в излагаемом материале. В качестве недостатка можно указать на излишнюю детализацию описываемых вопросов.

Итак, в системе фармацевтического образования появился оригинальный учебник, полностью соответствующий действующей программе и имеющий специальную фармацевтическую направленность в изложении биохимических знаний. Несомненно, он займет видное место в химической подготовке провизоров. Как показывает первый опыт, этот учебник полезен при изучении биохимии и студентам других факультетов медицинских вузов. При его переиздании следует дополнить четвертую часть и провести более тщательную авторскую и редакторскую правку, чтобы устранить некоторые неточности и досадные опечатки.

А. А. Чиркин (Витебск)

НЕКРОЛОГ

УДК 54:61+612.398.13.015.6+616-008.939.629]:92 (Мазуров)

ВЛАДИМИР ИЛЬИЧ МАЗУРОВ

(1928—1987)



24 февраля 1987 г. скоропостижно скончался заместитель директора по научной работе, руководитель лабораторий биохимии и патохимии коллагеновых белков Института биологической и медицинской химии АМН СССР, заместитель главного редактора журнала «Вопросы медицинской химии», член редколлегии журнала «Биохимия», доктор биологических наук Владимир Ильич Мазуров.

В. И. Мазуров родился в 1928 г. в Москве в семье рабочего. После окончания в 1953 г. И Московского медицинского института им. Н. И. Пирогова и работы в течение 2 лет в Институте экспериментальной биологии АМН СССР он был зачислен в 1956 г. в аспирантуру Института биологической и медицинской химии АМН СССР, которую успешно закончил, защитив в 1961 г. кандидатскую диссертацию. Научные изыскания В. И. Мазурова были сосредоточены на важнейшей проблеме

биохимии — изучении молекулярных механизмов биосинтеза белков.

На примере белков соединительной ткани, прежде всего коллагена, В. И. Мазуров и его сотрудники целеустремленно разрабатывали как вопросы, связанные с общей проблемой биосинтеза белков (свойства информационных РНК, синтез белков в бесклеточной системе, синтез аномальных белков в присутствии антиметаболитов), так и вопросы, имеющие непосредственное практическое значение (биосинтез белков соединительной ткани при различных патологических состояниях).

Результаты этих исследований были обобщены В. И. Мазуровым в монографии «Биохимия коллагеновых белков», получившей высокую оценку научной общественности.

В качестве заместителя председателя Научного совета по биологической и медицинской химии при АМН СССР, заместителя главного редактора журнала «Вопросы медицинской химии», члена редколлегии журнала «Биохимия» В. И. Мазуров на протяжении многих лет вел большую научно-организационную работу.

В. И. Мазуров был членом КПСС с 1965 г. Он активно участвовал в общественной жизни. Был председателем местного комитета профсоюза, секретарем партбюро института, пропагандистом, председателем окружной избирательной комиссии по выборам в Верховный Совет РСФСР.

Все, кому довелось лично знать Владимира Ильича, никогда не забудут его. Он был обаятельным, скромным, исключительно доброжелательным человеком. В. И. Мазуров умел сочетать высокую требовательность к себе, к результатам своей работы, к коллегам с уважительным, демократичным и равным отношением ко всем окружающим вне зависимости от занимаемого ими положения.

Многолетняя деятельность В. И. Мазурова в редколлегии журнала «Вопросы медицинской химии» сначала как научного редактора, а затем как заместителя главного редактора немало способствовала созданию высокого научного уровня журнала.

СОДЕРЖАНИЕ

- Шпикитер В. О.* Роль модификаций липопротеидов в атерогенезе (Обзор) 2
Белицер В. А., Мусялковская А. А., Платонова Т. Н., Ена Я. М. Антитромбин III. Функциональная роль и методы определения (Обзор) 8

CONTENTS

- Shpikiter, V. O.* Role of lipoprotein modifications in atherogenesis 2
Belitser, V. A., Musjalkovskaya, A. A., Platonova, T. N., Ena, Yu. M. Antithrombin III. Functional role and methods of estimation 8

- Филановская Л. И., Того А. В., Цвейбах А. С., Блинов М. П., Алексеев Н. А., Ушакова Е. А. Аденозиндеаминаза, пури́н-нуклеозидфосфорилаза и экто-5'-нуклеотидаза — маркеры вариантов острого лейкоза
- 16 Крылов В. И., Петрушина А. Д., Морева Г. В., Гранник Г. К., Дурыгин А. Н., Журавлева Т. Д., Портнягина Г. В. Роль нарушений структуры клеточных мембран в формировании гормонорезистентных вариантов заболеваний почек у детей
- 22 Володина Т. В., Колоскова Е. Е., Шишкин С. С., Козельцев В. Л. Изучение белков митохондрий печени крыс методом двумерного электрофореза
- 25 Кузнецов В. А., Мелконян С. Г., Лисовская И. Л., Волкова Р. И. Изменение микровязкости плазматической мембраны и чувствительности к ПГЕ₁ тромбоцитов, хранящихся при 22 и 4°C
- 28 Зорькина Т. А., Казуева Т. В., Ассур М. В. Состояние энергетического обмена в печени крыс при острой однократной кровопотере
- 31 Рогачева Е. А., Перова Н. В., Александров А. А., Оганов Р. Г., Лопина О. Д., Болдырев А. А. Существует ли связь между присутствием в сыворотке крови больных артериальной гипертензией белкового компонента с M_r 15 кД и ингибирующим действием сыворотки на Na⁺, K⁺-АТФазу?
- 34 Казуева Т. В., Коврижных Э. Е., Кузьмина Р. И., Ассур М. В. Энергетический обмен в скелетной мышце при экспериментальном травматическом шоке
- 40 Ермолаев А. В., Гукасян И. А., Огарков В. И. Выделение поверхностных антигенов *Candida maltosa*, ответственных за кандидосенсибилизацию, и их иммунохимическая характеристика
- 42 Комар С. И., Коробейникова Э. Н. Динамика α₁-антитрипсина и α₂-макроглобулина у больных остротекучей и затяжной пневмонией
- 46 Соркин В. М., Борисенко С. Н., Касимова Г. А. Фукозилирование белков сыворотки крови при раке желудка
- 49 Пушкина Н. В., Цыбульский И. Е., Лукаш А. И. Амидированность белков крови в условиях гипергликемии при экспериментальном сахарном диабете
- 52 Болдырев А. А., Орлов С. Н., Свинухова И. А., Стецюк Н. У. Na⁺, K⁺-АТФаза наружной медуллы почки спонтанно гипертензивных крыс в онтогенезе
- 56 Петрович Ю. А., Терехина Н. А., Гольдфельд Н. Г. Активность оксидоредуктаз лимфоцитов периферической крови больных герпетическим кератитом
- 59 Горошинская И. А., Ананян А. А., Могильницкая Л. В., Шугалей В. С. Биохимические показатели дифференцировки холодового стресса и адаптации
- 62 Добротина Н. А., Казацкая Ж. А., Емельянова Г. Ю. Лизоцим как модулятор иммунологических реакций
- 66 Давыдов Б. В., Голиков П. П. Влияние дибунола на перекисное окисление липидов и уровень α-токоферола в печени крыс при инфаркте миокарда
- 70 Мирошников В. М., Габукова Т. В. Характеристика ферментов гликолиза при биостимуляции репаративного остеогенеза
- 73 Комарин А. С., Азимова Ш. А. Состояние
- Filanovskaya, L. I., Togo, A. V., Tsveybakh, A. S., Blinov, M. N., Alexeev, N. A., Ushakova, E. A. Adenosine deaminase, purine nucleoside phosphorylase and ecto-5'-nucleotidase — markers of acute leukoses
- Krylov, V. I., Petrushina, A. D., Moreva, G. V., Grannik, G. K., Durygin, A. N., Portnyagina, G. V. Role of cell membranes destruction in development of hormone-resistant forms of kidney diseases in children
- Volodina, T. V., Koloskov, E. E., Shishkin, S. S., Kozel'tsev V. L. Two-dimensional electrophoresis in studies of rat liver mitochondrial proteins
- Kuznetsov, V. A., Melkonyan, S. G., Lisovskaya, I. L., Volkova, R. I. Changes of platelet membrane microviscosity and PGE₁-sensitivity of platelets stored at 22° and 4°
- Zor'kina, T. A., Kazueva, T. V., Assur, M. V. The state of energy metabolism in liver tissue of rats with acute single hemorrhage
- Rogaeva, E. A., Perova, N. V., Alexandrov, A. A., Oganov, R. G., Lopina, O. D., Boldyrev, A. A. Are there any correlations between the presence of a 15 kDa protein component in blood sera of the patients with arterial hypertension and its inhibitory activity towards Na⁺, K⁺-ATPase?
- Kazueva, T. V., Kovrizhnyk, E. E., Kuz'mina, R. I., Assur, M. V. Energy metabolism in skeletal muscles during experimental traumatic shock
- Ermolaev, A. V., Gukasyan, I. A., Ogarkov, V. I. Isolation of surface antigens from *Candida maltosa* responsible for candidosensitization and their immunochemical properties
- Komar, S. I., Korobeynikova, E. N. Dynamics of α₁-antitrypsin and α₂-macroglobulin in patients with acute and chronic pneumonia
- Sorkin, V. M., Borisenko, S. N., Kasymova, G. A. Fucosylation of blood serum proteins in stomach cancer
- Pushkina, N. V., Tsybulsky, I. E., Lukash, A. I. The rate of blood proteins amidation in hyperglycemia caused by alloxan diabetes
- Boldyrev, A. A., Orlov, S. N., Svinukhova, I. A., Stetsyuk, N. U. Na⁺, K⁺-ATPase from outer kidney medulla of spontaneously hypertensive rats in ontogenesis
- Petrovich, Yu. A., Teryokhina, N. A., Goldfeld, N. G. Activity of oxidoreductases in lymphocytes of peripheric blood of patients with herpetic keratitis
- Goroshinskaya, I. A., Ananyan, A. A., Mogilnitskaya, L. V., Shugaley, V. S. Biochemical characteristics of cold stress and adaptation
- Dobrolina, N. A., Kazalskaya, Zh. A., Emel'yanova, G. Yu. Lysozyme as a modulator of immunological reactions
- Davydov, B. V., Golikov, P. P. Effect of ionol on lipid peroxidation and content of α-tocopherol in liver tissue of rats with myocardium infarction
- Miroshnikov, V. M., Gabukova, T. V. Characterization of glycolytic enzymes in biostimulation of reparative osteogenesis
- Komarin, A. S., Azimova, Sh. A. The state

- монооксигеназной ферментной системы печени крыс при гипокинезии
- 75 *Тайковский В. С., Башарина О. Б., Шалыпина И. В., Rogozkin V. A.* Влияние физической нагрузки на содержание миоглобина и тропомиозина в скелетных мышцах и миоглобина в крови крыс
- 79 *Сокирко Т. А.* Влияние туберкулостатических препаратов и сукцината натрия на функциональное состояние митохондрий печени при туберкулезе
- 83 *Правдина Н. Ф., Подчерняева Р. Я., Сквородка В. В., Галегов Г. А., Жданов В. М.* Сравнительное исследование активности РНК-полимеразы у непатогенных и патогенных вирусов гриппа А и В
- 86 *Селевич М. И., Островский Ю. М.* Включение 1-6-¹⁴C-глюкозы в липидные фракции печени и головного мозга крыс с различной алкогольной мотивацией
- 89 *Бушма М. И., Легонькова Л. Ф., Лукиенко П. И.* Влияние фолиевой кислоты на активность монооксигеназной системы, УДФ-глюкуронил- и глутатион-S-трансфераз нормальной и регенерирующей печени крыс
- 93 *Гаскина Т. К., Долгов А. В., Курилович С. А.* Активность лецитин-холестеролацилтрансферазы при хронических заболеваниях печени
- 96 *Петушкова Н. А., Цветкова И. В., Фукс М. А., Доронин Г. Л., Якубович Д. В.* Пренатальный диагноз маннозидоза с использованием ворсин хориона
- 99 *Абдуллин А. Р., Литвинов Р. И., Зинкевич О. Д., Зубаиров Д. М., Салихов И. Г., Панасюк А. Ф.* Комплексообразование с гиалуроновой кислотой как причина гетерогенности фибронектина в синовиальной жидкости
- 101 *Доценко В. Л., Серова Н. Б., Логунов А. И., Лебкова Н. П., Яровая Г. А.* О механизме активирования калликреин-кининовой системы плазмы крови человека при язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки
- 104 *Микаелян Э. М., Овакимян С. С., Карагезян К. Г.* Мембраностабилизирующий эффект α-токоферола при остром стрессе
- 109 *Тогузов Р. Т., Тихонов Ю. В., Пименов А. М., Маркушева Л. И.* Метаболический фонд пуриновых и пиримидиновых производных ткани небных миндалин у больных хроническим тонзиллитом
- 112
- Методы биохимических исследований**
- Ахунув В. С., Краснопольская К. Д.* Идентификация G_{M2}-ганглиозидозов с помощью нагрузочного теста in vitro
- 115 *Оглоблина О. Г., Белова Л. А., Малахов В. Н.* Эффективный метод выделения кислотостабильного ингибитора протеиназ из мочи человека
- 119 *Ажицкий Г. Ю., Загоруйко Г. В., Троцкий Г. В.* Методика изoeлектрического фокусирования в борат-полиольной системе в градиенте pH от 4,0 до 5,6 в тонком слое ПААГ
- 124 *Дыгало Н. Н.* Простая чувствительная модификация флуориметрического метода определения активности тирозингидроксилазы в ткани головного мозга
- 126
- 129
- 135
- Рецензии**
Некролог
- of monoxygenase enzymatic system in liver tissue of rats with hypokinesia
- Tchaikovsky, V. S., Basharina, O. B., Shalyapina, I. V., Rogozkin, V. A.* Effect of physical exercises on content of myoglobin and tropomyosin in rat skeletal muscles and of myoglobin in blood
- Sokirko, T. A.* Effects of tuberculostatic drugs and sodium succinate on functional state of liver mitochondria in experimental tuberculosis
- Pravdina, N. F., Podchernyaeva, R. Ya., Skvorodka, V. V., Galegov, G. A., Zhdanov, V. M.* Activity of RNA polymerase in pathogenic and non-pathogenic influenza viruses A and B
- Selevich, M. I., Ostrovsky, Yu. M.* Incorporation of 1-6-¹⁴C-glucose into lipid fraction of liver and brain tissues of rats with various alcohol motivation
- Bushma, M. I., Legon'kova, L. F., Lukienko, P. I.* Effect of folic acid on activity of the monoxygenase system, UDP-glucuronyl- and glutathione-S-transferases in normal and regenerating rat liver tissue
- Gaskina, T. K., Dolgov, A. V., Kurilovich, S. A.* Activity of lecithin-cholesterol-acyl transferase in chronic impairments of liver tissue
- Petushkova, N. A., Tsvetkova, I. V., Fuks, M. A., Doronin, G. L., Yakhubovich, D. V.* Prenatal diagnosis of mannosidosis by the analysis of chorionic villi
- Abdullin, A. R., Litvinov, R. I., Zinkevich, O. D., Zubairov, D. M., Salikhov, I. G., Panasyuk, A. F.* Complex formation between fibronectin and hyaluronic acid as a cause of fibronectin heterogeneity in synovial fluid
- Dolsenko, V. L., Serova, N. Yu., Logunov, A. I., Lebkova, N. P., Yarovaya, G. A.* On the activation of kallikrein-kinin system in human blood plasma under conditions of gastroduodenal ulcer
- Mikaelyan, E. M., Ovakimyan, S. S., Karagezyan, K. G.* Membrane-stabilizing effect of α-tocopherol in acute stress
- Toguzov, R. T., Tikhonov, Yu. V., Pimenov, A. M., Markusheva, L. I.* Metabolic pool of purine and pyrimidine derivatives in faucial tonsil tissue of patients with chronic tonsillitis
- Methods of Biochemical Investigations**
- Akhunov, V. S., Krasnopol'skaya, K. D.* Identification of G_{M2}-gangliosidoses by means of loading test in vitro
- Ogloblina, O. G., Belova, L. A., Malakhov, V. N.* Highly effective procedure for isolation of acid stable proteinase inhibitor from human urine
- Azhitsky, G. Yu., Zagorulko, G. V., Troitsky, G. V.* Thin-layer polyacrylamide gel isoelectric focusing in borate-polyol system containing gradient pH 4.0-5.6
- Dygalo, N. N.* A simple and sensitive modification of fluorimetric method for determination of tyrosine hydroxylase activity in brain tissue
- Book Reviews**
Obituary

Адрес редакции журнала:

Москва 109801, Солянка, 14

АМН СССР

Тел. 297-16-44

Зав. редакцией *Л. А. Фирсова*

Техн. редактор *И. А. Савостьянова*

Корректор *С. Р. Даничева*

Сдано в набор 22.05.87.	Подписано в печать 18.06.87.	Формат 70×108 ¹ / ₁₆ .	Бумага тип. № 1.
Гарнитура литературная.	Печать высокая.	Печ. л. 9,00 + печ. л. вкл. 0,13.	Усл. печ. л. 12,78.
Усл. кр.-отт. 13,30.	Уч.-изд. л. 14,92.	Тираж 1562.	Цена 1 р. 30 к. Заказ 1439.

Ордена Трудового Красного Знамени
Издательство «Медицина», Москва 101838, Петроверигский пер., 6/8.
Ордена Трудового Красного Знамени
Чеховский полиграфический комбинат
ВО «Союзполиграфпром» Государственного комитета СССР
по делам издательств, полиграфии и книжной торговли
142300, г. Чехов Московской области