



же самое происходит и с НА, выделившимся в эктоплазму из везикул, например под действием резерпина. ДОМА быстро восстанавливается в ДОФЭГ, который легко проникает в экстранейрональные ткани и О-метируется в МОФЭГ. С другой стороны, АД могут окислить ДОМА до 3,4-диоксиминдальной кислоты (ДОМК), а она в свою очередь под действием КОМТ превращается в ВМК. Часть активного НА после высвобождения достигает экстранейрональных тканей и циркулирующей крови и подвергается О-метилрованию в НМН, с которого начинаются альтернативные пути образования МОФЭГ и ВМК через 3-метокси-4-оксиминдальный альдегид — продукт дезаминирования НМН под действием МАО.

Вскоре после открытия МОФЭГ [12] было показано, что он является основным метаболитом НА в мозге человека и животных [24, 29, 48], а ВМК образуется там в значительно меньших количествах: отношение концентраций МОФЭГ-сульфат и ВМК, определенных методами газовой хроматографии и масс-спектрометрии в мозге крыс, оказалось равным 50:1 [37]. Показано [6], что электролитическое повреждение голубого пятна (*locus coeruleus*) — ядра головного мозга, содержащего преимущественно норадренергические нейроны, — вызывает у крыс параллельное снижение общего содержания НА и МОФЭГ в мозге, не изменяя уровня ВМК. Распределение НА и МОФЭГ в разных отделах головного мозга крыс отличается от такового ВМК: уровень НА и МОФЭГ наиболее высок в гипоталамусе, а ВМК сконцентрирована в полосатом теле [38]. ДОМК, промежуточный продукт одного из путей, ведущих к ВМК, обнаруживается в мозге лишь в следовых количествах [24]. Следовательно, можно сделать вывод, что реакции, конечным продуктом которых является ВМК, не играют значительной роли в центральном метаболизме НА.

#### *Биохимические пути образования свободного и связанного МОФЭГ*

В норме как в ткани мозга, так и в симпатических первах большая часть МОФЭГ образуется в результате первоначального окислительного деза-

мирования НА в ДОФЭГ и дальнейшего его О-метилирования (I путь) и в значительно меньшей степени — через НМН, продукт О-метилирования НА (II путь; см. рисунок).

Справедливость этого утверждения для ткани мозга была показана в многочисленных работах, выполненных на животных. Исследовано [26] соотношение ДОФЭГ/МОФЭГ после внутрижелудочкового введения  $[^{35}\text{S}] \text{Na}_2\text{SO}_4$ . Скорость образования сульфоконъюгатов ДОФЭГ и МОФЭГ в мозге крыс достаточно высока, поэтому распределение  $[^{35}\text{S}]$  между ними может отражать относительное количество образующихся гликолей. В этих условиях метка поровну разделилась между МОФЭГ-сульфат и ДОФЭГ-сульфат. Эти результаты нашли подтверждение в близких к единице соотношениях ДОФЭГ/МОФЭГ, определенных методами газовой хроматографии и масс-спектрометрии в гипоталамусе кроликов, мышей и кошек [72]. Эти результаты рассматривают как доказательство того, что большая часть МОФЭГ образуется по I пути (через ДОФЭГ).

Анализ субклеточной локализации ферментов, участвующих в катаболизме НА [8], позволил выделить 2 формы АР из мозга крыс. Одна форма, связанная главным образом с митохондриями, имела высокое сродство к НАД и НАДФ и практически не ингибировалась пентобарбиталом и 5-оксидолуксусной кислотой (5-ОИУК). Вторая форма локализована в основном в цитозоле, имеет низкое сродство к НАД и более высокое — к НАДФ, ингибируется пентобарбиталом и 5-ОИУК. Изучали образование МОФЭГ *in vitro* в гомогенатах мозга в присутствии этих кофакторов и ингибиторов в различных комбинациях. Около 70 % АР, участвовавших в синтезе МОФЭГ, было митохондриального происхождения, что также можно рассматривать как косвенное свидетельство в пользу I пути, который начинается с окислительного дезаминирования под действием МАО, также связанной с митохондриями.

Однако в определенных условиях образование МОФЭГ может протекать преимущественно по II пути, который начинается с реакции О-метилирования НА, выделившегося в синаптическую щель, до НМН, дезаминирующегося затем в МОФЭГ. Этот сдвиг на-

блюдали после применения различных препаратов, влияющих на обратный захват. Так, [ $^3\text{H}$ ] тирозин вводили крысам, хронически получавшим блокатор обратного захвата — дезипрамин [63]. Длительное применение дезипрамина значительно понижало уровень образующегося в мозге [ $^3\text{H}$ ] ДОФЭГ, практически не влияя на уровень [ $^3\text{H}$ ] МОФЭГ, т. е. в условиях блокады обратного захвата большая часть МОФЭГ образовывалась по II пути через НМН, а не через ДОФЭГ. В более ранней работе [18] [ $^3\text{H}$ ] НА вводили животным, получавшим предварительно 6-оксидофамин, вызывающий разрушение нервных окончаний. В этом случае образование [ $^3\text{H}$ ] МОФЭГ вдвое превышало таковое [ $^3\text{H}$ ] ДОФЭГ, т. е. катаболизм экзогенного НА протекал в основном по II пути. Само по себе введение [ $^{14}\text{C}$ ] НА в мозг кошек и крыс в отсутствие каких бы то ни было фармакологических агентов вызывало аналогичный сдвиг: соотношение [ $^{14}\text{C}$ ] ДОФЭГ / [ $^{14}\text{C}$ ] МОФЭГ было значительно меньше единицы [24]. Причиной этого могло быть насыщение систем обратного захвата экзогенным НА, в результате чего большая его часть метаболизировалась по II пути, т. е. подвергалась сначала О-метилированию, а затем окислительному дезаминированию. Отмечены [43] снижение образования ДОФЭГ и усиление оттока НА в окружающие ткани и кровь в присутствии дезипрамина или кокаина, блокирующих обратный захват; при этом повышался уровень НА и НМН в крови.

Внутрижелудочковое введение [ $^3\text{H}$ ] НА крысам, получавшим другой блокатор обратного захвата — d-амфетамин, вызывало накопление в мозге [ $^3\text{H}$ ] МОФЭГ и [ $^3\text{H}$ ] НМН, причем уровень последнего возрастал более значительно [64]. Метаболизм экзогенного НА в этих условиях протекал в основном по II пути. Преимущественную аккумуляцию [ $^3\text{H}$ ] НМН, а не [ $^3\text{H}$ ] МОФЭГ при применении d-амфетамина можно объяснить эффективным ингибирующим действием этого блокатора на захват как НА, так и НМН. При нормальных условиях захват НМН в срезах мозга происходит очень быстро, причем НМН в отличие от НА не связывается с внутриклеточными фракциями, оставаясь доступным для действия MAO [30].

В приведенных выше работах использовали фармакологические агенты, нарушавшие равновесие между процессами захвата (I путь метаболизма НА) и реакцией О-метилирования в НМН (II путь) в пользу последней. Однако это равновесие можно сдвинуть и в другую сторону [18]. После введения [ $^3\text{H}$ ] ДА, превращавшегося в [ $^3\text{H}$ ] НА, животные получали резерпин, который, как известно, вызывает разрушение везикул, выход НА в эктоплазму и его интрапейрональную инактивацию под действием MAO. В этих экспериментах наблюдали двукратное усиление образования [ $^3\text{H}$ ] ДОФЭГ по сравнению с [ $^3\text{H}$ ] МОФЭГ.

*Центральная сульфатация МОФЭГ.* Свободный МОФЭГ, образовавшийся в мозге, частично переходит здесь же в связанную форму в результате реакции образования сульфоконъюгатов. Местонахождение АТФ-сульфуриказы, аденозинфосфосульфокиназы и сульфотрансферазы, участвующих в этой реакции, точно неизвестно, однако все они присутствуют в ткани мозга, поскольку сульфоконъюгаты МОФЭГ синтезируются из неорганического сульфата *in vitro* в гомогенатах мозга [24].

Выявленная корреляция между распределением НА и МОФЭГ- $\text{SO}_4$  в различных отделах мозга [38] позволяет предположить, что сульфатация происходит в непосредственной анатомической близости к порадренергическим нейронам. Менее известно о субклеточном распределении энзимов сульфоконъюгации. Во всяком случае сульфуриказа локализована экстрапейронально, поскольку введение [ $^{35}\text{S}$ ]  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  в желудочки мозга приводит к образованию меченых сульфатов ДОФЭГ и МОФЭГ, несмотря на то что нервные окончания непроницаемы для  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  [24].

Молекула свободного МОФЭГ неограниченно диффундирует через клеточные мембраны [40] и, следовательно, для этого метаболита связывание с сульфатной группой не является необходимым условием транспорта через гематоэнцефалический барьер, что характерно для других фенольных метаболитов моноаминов. Существует мнение [24], что сульфоконъюгация МОФЭГ происходит в результате недостаточной специфичности ферментов сульфоконъюгации. Обнаружены зна-

чительные видовые различия эффективности центральной сульфатации МОФЭГ. У крысы и морской свинки весь МОФЭГ содержится в ткани мозга в виде сульфоконъюгатов, у кошки МОФЭГ —  $SO_4$  составляет 16 % от суммарного количества МОФЭГ в ткани мозга, у обезьян (*rhesus*) — 6 % [69], у человека — 25 % [36].

*Уровень свободного и связанного МОФЭГ как показатель центральной норадренергической активности.* Поскольку большая часть НА мозга превращается в МОФЭГ, который здесь же подвергается частичной сульфатации, уровень свободного и связанного МОФЭГ в ткани мозга должен являться показателем центральной норадренергической активности, что подтверждается результатами ряда исследований экспериментального характера.

Сравнивали скорость синтеза [ $^3H$ ] НА из [ $^3H$ ] тирозина и [ $^{35}S$ ] МОФЭГ —  $SO_4$  из [ $^{35}S$ ]  $Na_2SO_4$  в гипоталамусе крысы после введения меченых предшественников в желудочки мозга [77]. Используя препараты, влияющие на центральную норадренергическую активность, удалось показать, что  $\alpha$ -адренергический агонист клонидин значительно понижал синтез как [ $^3H$ ] НА, так и [ $^{35}S$ ] МОФЭГ —  $SO_4$ , а блокатор  $\alpha$ -адренергических рецепторов фенксибензамин повышал уровень и того и другого. Изменения скорости метаболизма, обнаруженные этими независимыми методами, хорошо согласовались между собой качественно и количественно. Результаты других фармакологических воздействий свидетельствуют о количественной связи между образованием МОФЭГ —  $SO_4$  и кругооборотом НА в центральной нервной системе. Блокаторы адренергических рецепторов активируют обмен НА в центральной нервной системе и в различной степени повышают уровень МОФЭГ [39], поскольку блокада рецепторов вызывает по принципу обратной связи усиление секреции НА.

Тесная корреляция между норадренергической активностью и уровнем МОФЭГ в ткани мозга обнаружена у крыс при прямом воздействии на голубое пятно. Повреждение этого ядра вызывало снижение общего МОФЭГ пропорционально степени разрушения, а стимуляция приводила к значительному подъему уровня МОФЭГ в ткани мозга [24, 50].

Содержание МОФЭГ в ткани мозга отражает усиление норадренергической активности, вызываемое некоторыми видами стресса [15, 41]. Электрическое раздражение конечности усиливало обмен НА и повышало уровень МОФЭГ —  $SO_4$  в мозге крыс [76]. Когда стрессу подвергали крыс с поврежденным *locus coeruleus*, уровень МОФЭГ в ткани мозга оставался неизменным, а у крыс, получивших ложные повреждения, в условиях стресса уровень МОФЭГ в коре возвратался на 59 % [50]. Аналогично холодной стресс повышал содержание МОФЭГ на 50 % в мозге мышей [21] и на 19 % в мозге крыс [60]. Тяжелая физическая нагрузка (бег до изнеможения) повышала уровень МОФЭГ в мозге крыс на 18 % [75].

Таким образом, МОФЭГ — основной метаболит НА мозга — в норме образуется преимущественно в результате первичного интранейронального окислительного дезаминирования в ДОФЭГ, который затем O-метилируется в МОФЭГ, подвергающийся частичной сульфатации; суммарный уровень свободного и связанного МОФЭГ служит показателем центральной норадренергической активности.

#### *Содержание свободного и связанного МОФЭГ в различных биологических жидкостях*

У человека измерение уровня МОФЭГ в ткани мозга невозможно и основным объектом исследования является содержание МОФЭГ в различных биологических жидкостях. Однако если в ткани мозга весь метаболит имеет центральное происхождение и служит показателем центральной норадренергической активности, то уровень МОФЭГ в биологических жидкостях складывается из двух частей: первая имеет центральное происхождение, вторая образуется из НА периферической нервной системы, который метаболизируется по тому же пути, что и медиатор центральных норадренергических нейронов. Первоначально большая его часть дезаминируется с образованием ДОФЭГ, легко диффундирующего из клеток в окружающие жидкости и кровь [44]; последующее O-метилирование в МОФЭГ происходит в экстранейрональных тканях, почках и печени. Образовавшийся

МОФЭГ либо переходит в связанную форму (сульфаты и глюкурониды) в кишечнике, почках и печени, либо превращается в ВМК и в таком виде экскретируется с мочой.

В большинстве работ, посвященных изучению роли и значения МОФЭГ у человека, ставилась задача выяснить, насколько велики относительные вклады центрального и периферического метаболизма НА в уровне МОФЭГ в биологических жидкостях, иными словами, какую информацию о центральном и периферическом обмене НА может дать измерение этих уровней.

*Содержание свободного и связанного МОФЭГ в моче.* Если у экспериментальных животных МОФЭГ превалирует среди экскретируемых с мочой метаболитов, то у человека основным экскретируемым метаболитом служит ВМК. Данные об относительном содержании МОФЭГ в мозге, спинномозговой жидкости (СМЖ) и моче экспериментальных животных и человека, полученные в 70-х годах [24, 44], дали основания предположить, что ВМК является периферическим метаболитом НА и образуется в основном при дезаминировании в печени НМН (продукта O-метилирования НА, достигшего экстранейрональных тканей и циркулирующей крови), а МОФЭГ образуется из НА центральных и периферических порадрэнергических нейронов, причем у обезьян и человека значительная часть МОФЭГ в моче имеет центральное происхождение и, следовательно, скорость его экскреции с мочой может служить показателем метаболизма НА в мозге.

Суммарное содержание МОФЭГ в моче здоровых людей колеблется, по данным разных авторов, в широких пределах: от 900 до 3500 мг за 24 ч [19, 24, 31, 35, 65]. На долю свободного МОФЭГ приходится менее 10 % общего его количества в суточной моче, остальное составляют сульфаты и глюкурониды примерно в равных количествах [65]. Экскреция МОФЭГ с мочой имеет суточный ритм: максимум достигается утром и в первой половине дня, минимум — вечером или ночью [78].

У здоровых людей не обнаружено корреляции между уровнем МОФЭГ в моче и диетой, ростом, массой, площадью поверхности тела, диурезом, креатинином, а также курением и дру-

гими факторами [53]. Выявлены некоторое увеличение экскреции МОФЭГ с возрастом и зависимость от пола — мужчины экскретируют больше МОФЭГ, чем женщины [65].

*Соотношение центрального и периферического вкладов в уровень МОФЭГ в моче.* На основе результатов исследования экскреции МОФЭГ у человека с применением метода изотопного разведения было высказано предположение о том, что до 80 % МОФЭГ в моче образуется из НА мозга [25]. Определение уровня МОФЭГ в артериальной крови, поступающей в мозг, и в венозной крови из яремной вены показало наличие артериовенозной разницы в содержании МОФЭГ у обезьян [56] и человека [55]. Из расчета величины артериовенозной разницы и определения суточной экскреции МОФЭГ следовало, что у человека из мозга поступает примерно 60 % того количества, которое затем экскретируется с мочой.

Приведенные выше данные о содержании МОФЭГ в моче и его источниках анализировали обычно на основе предположения, что образовавшийся в организме МОФЭГ далее не метаболизируется, а лишь переходит в связанное состояние (сульфаты и глюкурониды). Однако в последние годы было показано, что значительная часть МОФЭГ превращается в организме человека в ВМК.

После внутривенного введения МОФЭГ —  $CD_3$  в виде рацемата или природного изомера здоровым людям, более половины дейтерия, экскретируемого с мочой, обнаруживалось в виде ВМК —  $CD_3$  [16, 58]. Эти данные согласуются с полученными ранее [52], в соответствии с которыми 62 % МОФЭГ, меченного тритием, превращается в ВМК у ребенка с нейроblastомой.

Количество образующегося в центральной нервной системе МОФЭГ, вычисленное по артериовенозной разнице [55], составляет 60 % от содержания МОФЭГ в моче. Если бы весь образующийся в организме МОФЭГ, не подвергаясь дальнейшему метаболизму, экскретировался с мочой, то это означало бы, что 60 % МОФЭГ в моче имеет центральное происхождение, а остальные 40 % образуются на периферии. В действительности с мочой экскретируется менее половины обра-

зующегося гликоля, другая его часть окисляется в ВМК (до 70 % которой, возможно, образуется из МОФЭГ [46]). Следовательно, центральный вклад МОФЭГ составляет менее 30 % [48, 57]. Доля МОФЭГ, метаболизирующегося далее в ВМК, может варьировать в зависимости от диеты, лекарственных препаратов, факторов внешней среды и т. п. [48].

Уровень сульфоконъюгата МОФЭГ в моче, по-видимому, может лучше отражать центральную порадрепергическую активность, чем суммарный МОФЭГ [35]. Действительно в ткани мозга присутствует сульфотрансфераза [66], тогда как  $\beta$ -глюкуронилтрансфераза до сих пор не обнаружена, и некоторые отделы мозга содержат значительные количества МОФЭГ —  $SO_4$  [36, 42]. Обнаружена отчетливая корреляция между суточной экскрецией МОФЭГ —  $SO_4$  (но не глюкуропида МОФЭГ или ВМК) и тяжестью заболевания шизофренией [35]. Интеллектуальный стресс вызывал подъем экскреции МОФЭГ —  $SO_4$  [17], а уровень глюкуропида МОФЭГ в моче повышался при эмоциональном стрессе, большой физической нагрузке, феохромоцитоме [20, 65, 68, 73].

*Содержание свободного и связанного МОФЭГ в крови и СМЖ.* Содержание МОФЭГ в крови человека составляет приблизительно 10 нг/мл [33], а скорость его кругооборота —  $1,22 \pm 0,20$  мкмоль/ч [46]. Около 35 % МОФЭГ в крови человека и обезьян находится в свободной форме, остальное количество — в виде сульфатов и глюкуропидов [23]. Обнаружен суточный ритм содержания МОФЭГ в крови [59], совпадающий с суточными вариациями его уровня в моче. Сравнение скорости кругооборота МОФЭГ в крови с таковой экскреции НА, МОФЭГ и ВМК показывает, что уровень МОФЭГ в крови составляет  $\frac{2}{3}$  всего количества метаболизируемых в организме веществ катехоламиновой природы [48]. Поскольку время полураспада МОФЭГ равно 45—75 мин [46], уровень МОФЭГ в крови отражает средний метаболизм НА на протяжении нескольких часов. Обнаружена высокая корреляция между содержанием МОФЭГ в крови и его уровнем в СМЖ [48].

Уровень МОФЭГ в СМЖ человека составляет около 8 нг/мл, причем 75—

80 % находится в свободной форме [22, 29]. Молекула МОФЭГ довольно липофильна и легко диффундирует через мембраны в нервную ткань и из нее [40]; по-видимому, происходит свободный обмен между пулами МОФЭГ в крови, СМЖ и нервной ткани, который, вероятно, обуславливает тесную корреляцию между уровнями МОФЭГ в них, отсутствие суточных колебаний МОФЭГ в теменной СМЖ (несмотря на наличие суточного ритма в ней), а также равномерное распределение экзогенного меченого МОФЭГ между кровью и СМЖ [48]. Однако уровень свободного эндогенного МОФЭГ в люмбальной СМЖ выше, чем в крови: МОФЭГ образуется в центральной нервной системе и поступает в СМЖ непосредственно из нервной ткани (в основном, как полагают, из спинного мозга). В норме у человека 50—70 % МОФЭГ в СМЖ происходит из центральной нервной системы, поэтому уровень МОФЭГ в СМЖ отражает скорость его образования в центральной нервной системе [48].

#### *Клиническое значение определения МОФЭГ*

Около 70 % МОФЭГ образуется на периферии из НА симпатических нервов, часть МОФЭГ превращается затем в ВМК. Следовательно, при заболеваниях симпатической нервной системы можно ожидать параллельного снижения уровня обоих метаболитов. У больных ортостатической гипотензией, вызванной дегенерацией периферических симпатических нервов или латеральных рогов спинного мозга (как при идиопатической ортостатической гипотензии), уровни МОФЭГ и ВМК в моче значительно снижены, причем между ними обнаруживается тесная корреляция [49].

Определение МОФЭГ приобретает большое клиническое значение в связи с лабораторной диагностикой катехоламинопродуцирующих опухолей — феохромоцитомы, нейробластомы и ганглионейромы. У больных обнаруживается значительное повышение уровня МОФЭГ в моче [51] и крови [45] за счет усиленного периферического образования гликоля, независимо от метаболизма НА в центральной нервной системе. Концентрация МОФЭГ

в СМЖ у этих больных также увеличена в основном вследствие обмена с кровью [47].

Определение уровня МОФЭГ в моче и других биологических жидкостях шире всего использовали при изучении депрессии. В различных подгруппах больных депрессией показано как снижение [54], так и повышение [74] скорости базальной экскреции МОФЭГ, нарушение ее суточного ритма [28], зависимость от таких факторов, как диета и физическая активность [61, 62], которые в норме не оказывают влияния на уровень МОФЭГ в моче. У больных депрессией обнаружена корреляция между уровнями экскреции свободного кортизола и МОФЭГ [67] и между содержанием кортизола и МОФЭГ в плазме крови после приема дексаметазона [34]. По данным многих авторов [13, 27, 70], уровень экскреции МОФЭГ позволяет предсказать эффективность лечения трициклическими антидепрессантами (больные с низким содержанием МОФЭГ лучше реагируют на имипрамин, а с нормальным и повышенным — на amitриптилин), а также терапевтический эффект депривации сна [7].

Таким образом, исследование содержания МОФЭГ в биологических жидкостях и уровня его экскреции с мочой открывает новые подходы к изучению метаболизма катехоламинов. Включение МОФЭГ в сумму экскретируемых катехоламинов и конечных продуктов их метаболизма обеспечит более точную оценку общей секреторной активности симпатико-адреналовой системы [1]. Изучение соотношений МОФЭГ:НМН, МОФЭГ:НА, МОФЭГ:ВМК как показателей относительной активности процессов окислительного дезаминирования и О-метилирования в норме и при различных формах патологии может иметь важное значение как для диагностики, так и для более углубленного анализа обмена аминов и функционального состояния симпатико-адреналовой системы в клинике и эксперименте.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Большакова Т. Д.* Некоторые показатели обмена катехоламинов при физиологических и патологических состояниях у человека: Дис... д-ра мед. наук. — М., 1973.
2. *Большакова Т. Д.* // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева. — 1976. — Т. 21, № 2. — С. 196—203.
3. *Горкин В. З.* // Вопр. мед. химии. — 1974. — № 3. — С. 227—238.
4. *Горкин В. З.* Амноксидазы и их значение в медицине. — М., 1981.
5. *Матлина Э. Ш., Меньшиков В. В.* Клиническая биохимия катехоламинов. — М., 1967.
6. *Ader J. P., Muskiet F. A., Jeuring H. J., Korj J.* // J. Neurochem. — 1978. — Vol. 30. — P. 1213—1216.
7. *Amin M. M., Khalid R., Khan P.* // Int. Pharmacopsychiat. — 1980. — Vol. 15. — P. 81—85.
8. *Anderson R. A., Meyerson L. R., Tabakoff B.* // Neurochem. Res. — 1976. — Vol. 1. — P. 525—529.
9. *Armstrong M. D., McMillan A., Shaw K. N. F.* // Biochim. biophys. Acta. — 1957. — Vol. 25. — P. 422—423.
10. *Axelrod J.* // Science. — 1957. — Vol. 126. — P. 400—401.
11. *Axelrod J., Inscoe J. K., Senoch S., Witkop B.* // Biochim. biophys. Acta. — 1958. — Vol. 27. — P. 210—211.
12. *Axelrod J., Kopin I. J., Mann J. D.* // Ibid. — 1959. — Vol. 36. — P. 576—577.
13. *Beckmann H., Goodwin F. K.* // Neuropsychobiology. — 1980. — Vol. 6. — P. 91—100.
14. *Blaschko H., Richter D., Schlossman H.* // J. Physiol. (Lond.). — 1937. — Vol. 90. — P. 1—17.
15. *Bliss E. L., Ailion J., Zwanziger J.* // J. Pharmacol. exp. Ther. — 1968. — Vol. 164. — P. 122—134.
16. *Blomberg P. A., Kopin I. J., Gordon E. K.* // Arch. gen. Psychiat. — 1980. — Vol. 37. — P. 1095—1098.
17. *Bond P. A., Howlett D. R.* // Biochem. Med. — 1974. — Vol. 10. — P. 219—228.
18. *Braestrup C., Nielsen M.* // J. Pharm. Pharmacol. — 1975. — Vol. 27. — P. 413—419.
19. *Buchanan D. N., Fucek F. R., Domino E. J.* // J. Chromatogr. — 1979. — Vol. 162. — P. 394—400.
20. *Buchsbaum M. S., Muscettola G., Goodwin F. K.* // Neuropsychobiology. — 1981. — Vol. 7. — P. 212—224.
21. *Ceasar P. M., Hague P., Sharman D. F., Werdinius B.* // Brit. J. Pharmacol. — 1974. — Vol. 51. — P. 187—195.
22. *Chase T. N., Gordon E. K., Ng L. K. J.* // J. Neurochem. — 1973. — Vol. 21. — P. 581—587.
23. *Dekirmenjian H., Maus J. W.* // Clin. chim. Acta. — 1974. — Vol. 52. — P. 203—210.
24. *DeMet E. M., Halaris A. E.* // Biochem. Pharmacol. — 1979. — Vol. 28. — P. 3043—3050.
25. *Ebert M. H., Kopin I. J.* // Trans. Ass. Amer. Physicians. — 1975. — Vol. 88. — P. 256—264.
26. *Eccleston D., Ritchie I. M.* // J. Neurochem. — 1973. — Vol. 21. — P. 635—646.
27. *Gaertner H. J., Gollinopoulos G., Breyer-Pfaff U.* // Pharmacopsychiat. — 1982. — Bd 15. — S. 170—174.
28. *Giedke H., Gaertner H. J., Mahal A.* // Acta psychiat. scand. — 1982. — Vol. 66. — P. 243—253.
29. *Gordon E. K., Oliver J.* // Clin. chim. Acta. — 1971. — Vol. 35. — P. 145—150.
30. *Hendley E. D., Taylor K. M., Snyder S. H.* // Europ. J. Pharmacol. — 1970. — Vol. 12. — P. 167—169.

31. Hollister L. E., Davis K. L., Overall J. E., Anderson T. // Arch. gen. Psychiat. — 1978. — Vol. 35. — P. 1427—1433.
32. Hughes J. // Brit. J. Pharmacol. — 1972. — Vol. 44. — P. 472—491.
33. Jimerson D. C., Ballenger J. C., Lake C. R. et al. // Psychopharmacol. Bull. — 1981. — Vol. 17. — P. 87—89.
34. Jimerson D. C., Insel T. R., Reus V. I., Kopin I. J. // Arch. gen. Psychiat. — 1983. — Vol. 40. — P. 173—176.
35. Joseph M. H., Baker H. F., Johnstone E. C., Crow T. J. // Psychopharmacology. — 1976. — Vol. 51. — P. 47—51.
36. Karoum F., Moyer-Schwing J., Potkin S. G., Wyatt R. J. // Brain Res. — 1977. — Vol. 125. — P. 333—339.
37. Karoum F., Neff N. H., Wyatt R. J. // J. Neurochem. — 1976. — Vol. 27. — P. 33—35.
38. Karoum F., Wyatt R. J., Majchrowicz D. // Brit. J. Pharmacol. — 1976. — Vol. 56. — P. 403—411.
39. Keller H. H., Bartholini G., Pletscher A. // Europ. J. Pharmacol. — 1973. — Vol. 23. — P. 183—186.
40. Kessler J. A., Fenstermacher J. D., Patlak C. S. // Brain Res. — 1976. — Vol. 102. — P. 131—141.
41. Kety S. S., Javoy F., Thierry A. M. et al. // Proc. nat. Acta. Sci. USA. — 1967. — Vol. 58. — P. 1249—1254.
42. Kleinman J. E., Bridge P., Karoum F. et al. // Catecholamines: Basic and Clinical Frontiers / Ed. E. Usdin et al. — New York, 1979. — Vol. 2. — P. 1845—1847.
43. Kopin I. J. // Catecholamines. — Berlin, 1972. — P. 270—282.
44. Kopin I. J. // Endocr. exp. (Bratisl.). — 1982. — Vol. 16. — P. 291—300.
45. Kopin I. J., Axelrod J. // Arch. Biochem. — 1960. — Vol. 89. — P. 148.
46. Kopin I. J., Blomberg P., Ebert M. H. et al. // Nobel Conference. — Skokloster, 1982.
47. Kopin I. J., Gordon E. K., Jimerson D. C., Polinsky R. J. // Science. — 1983. — Vol. 219. — P. 73—75.
48. Kopin I. J., Jimerson D. C., Markey S. P. et al. // Pharmacopsychiatry. — 1984. — Bd 17. — S. 3—8.
49. Kopin I. J., Polinsky R. J., Oliver J. A. et al. // J. clin. Endocr. — 1983. — Vol. 57. — P. 632—637.
50. Korj J., Roth R., Aghajanian G. // Europ. J. Pharmacol. — 1973. — Vol. 23. — P. 276—282.
51. Krstulovic A. M., Matzura C. T., Bertani-Dziedzic L. et al. // Clin. chim. Acta. — 1980. — Vol. 103. — P. 109—116.
52. La Brosse E. H. // J. clin. Endocr. — 1970. — Vol. 30. — P. 580—589.
53. Maas J. W., Dekirmenjian H., Fawcett J. A. // Int. Pharmacopsychiat. — 1974. — Vol. 9. — P. 14—26.
54. Maas J., Fawcett J. A., Dekirmenjian H. // Arch. gen. Psychiat. — 1972. — Vol. 26. — P. 252—262.
55. Maas J. W., Haltox S. E., Green N. M., Landis D. H. // Science. — 1979. — Vol. 205. — P. 1025—1027.
56. Maas J. W., Haltox S. E., Landis D. H., Roth R. A. // Brain Res. — 1976. — Vol. 118. — P. 167—173.
57. Mardh G., Anggard E. // J. Neurochem. — 1984. — Vol. 42. — P. 43—46.
58. Mard G., Sjoquist B., Anggard E. // Ibid. — 1981. — Vol. 36. — P. 1181—1185.
59. Markianos E., Beckmann H. // J. Neurol. Transmis. — 1976. — Vol. 39. — P. 79—93.
60. Meek J. L., Neff N. H. // J. Pharmacol. exp. Ther. — 1973. — Vol. 184. — P. 570—575.
61. Muscettola G., Wehr T., Goodwin E. R. // Amer. J. Psychiat. — 1977. — Vol. 134. — P. 914—916.
62. Muscettola G., Potter W. Z., Pickar D., Goodwin F. K. // Arch. gen. Psychiat. — 1984. — Vol. 41. — P. 337—342.
63. Nielsen M., Braestrup C. // Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. — 1977. — Bd 300. — S. 87—92.
64. Peterson D. W., Sparber S. B. // Pharmacol. Biochem. Behav. — 1976. — Vol. 4. — P. 545—549.
65. Peyrin L., Pequignot J. M. // Psychopharmacology. — 1983. — Vol. 79. — P. 16—20.
66. Renskers K. J., Feor K. D., Roth J. A. // J. Neurochem. — 1980. — Vol. 34. — P. 1362—1368.
67. Rosenbaum A. H., Maruta T., Schatzberg A. F. et al. // Amer. J. Psychiat. — 1983. — Vol. 140. — P. 314—318.
68. Rubin R. T., Miller R. J., Clark B. R. et al. // Psychosom. Med. — 1970. — Vol. 32. — P. 589—596.
69. Schanberg S. M., Breese G. R., Schildkraut J. J. et al. // Biochem. Pharmacol. — 1968. — Vol. 17. — P. 2006—2008.
70. Schatzberg A. F., Rosenbaum A. H., Orsulak P. J. et al. // Psychopharmacology. — 1981. — Vol. 75. — P. 34—38.
71. Schayer R. W. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 189. — P. 301—306.
72. Sharman D. F. // Brit. J. Pharmacol. — 1969. — Vol. 36. — P. 523—534.
73. Shimizu H., LaBrosse E. H. // Biochem. Pharmacol. — 1969. — Vol. 18. — P. 1643—1654.
74. Stokes P. E., Fraser A., Casper R. // Psychopharmacol. Bull. — 1981. — Vol. 17. — P. 70—71.
75. Stone E. A. // J. Neurochem. — 1973. — Vol. 21. — P. 589—601.
76. Stone E. A. // Life Sci. — 1975. — Vol. 16. — P. 1725—1729.
77. Stone E. A. // Ibid. — 1976. — Vol. 19. — P. 1491—1498.
78. Wehr T. A., Muscettola G., Goodwin F. K. // Arch. gen. Psychiat. — 1980. — Vol. 37. — P. 257—263.

Поступила 10.10.86

#### PHYSIOLOGICAL AND CLINICAL IMPORTANCE OF 3-METHOXY-4-HYDROXYPHENYL ETHYLENEGLYCOL, METABOLITE OF NORADRENALINE

T. D. Bol'shakova, M. Ya. Shenderovich  
I Medical School, Moscow

Biochemical pathways of noradrenaline conversion into free and bound forms of 3-methoxy-4-hydroxyphenyl ethylenglycol (MOPEG) in central and peripheral noradrenergic neurones, content of free and bound forms of MOPEG in various biological fluids as well as relative amount of the substance in central and peripheral pools and, at last, clinical im-

portance of the noradrenaline metabolite study are reviewed. The first part of the review considers the experimental data of noradrenaline metabolism in animal brain, the second and third parts deal with experimental and clinical studies of content, role and importance

of MOPEG in a human body. Perspectives of MOPEG studies for diagnostic purposes as well as for the more accurate analysis of catecholamine metabolism and of sympathoadrenal system functional state under clinical and experimental conditions are considered.

УДК 612.015.3:547.284+616-008.932.84(048.8)

*С. П. Анисеева, Л. Ф. Панченко, Ю. М. Штернберг*

## **БИОХИМИЧЕСКИЕ И РЕГУЛЯТОРНЫЕ АСПЕКТЫ ФУНКЦИИ КЕТОНОВЫХ ТЕЛ В ОРГАНИЗМЕ (ОБЗОР)**

ВНИЦ охраны здоровья матери и ребенка Минздрава СССР, ВНИЦ по медико-биологическим проблемам профилактики пьянства и алкоголизма, Институт питания АМН СССР, Москва

Кетоновые тела (ацетоацетат и  $\beta$ -3-оксibuтират) могут функционировать в организме как субстрат окисления, как предшественники липогенеза и как регуляторы метаболизма. В последнем аспекте кетоновые тела (КТ) могут рассматриваться как показатель недостатка углеводов и принимать участие в обмене веществ, обеспечивая замещение углеводов при недостаточном поступлении их. Настоящий обзор посвящен физиологической роли КТ в организме. Под термином «кетоновые тела» подразумеваются ацетоацетат (Ац) и  $\beta$ -оксibuтират ( $\beta$ -ОБ), но при этом не имеется в виду ацетон, который является продуктом ферментативного распада ацетоацетата и вряд ли играет скольконибудь важную роль в метаболизме.

### *Гиперкетонемия*

Концентрация КТ в крови людей и крыс при нормальном пищевом режиме обычно составляет около 0,1 мМ, но она быстро повышается при изменении состояния организма [1, 3, 4]. Именно широкий диапазон возможных изменений концентрации (почти до 30-кратного) определяет чувствительность КТ как метаболических регуляторов. В норме у людей отмечаются хронобиологические и циркадные ритмы изменения концентрации в крови Ац и  $\beta$ -ОБ, причина которых неизвестна [77]. Утром наблюдается низкая концентрация КТ, к концу дня она повышается, достигая максимума около полуночи. Максимум концентрации КТ отмечается у людей и крыс при голодании [42], повышении количества липидов в пище [49], на поздних сроках беременности [22, 59, 73] и в раннем

неонатальном периоде [53, 62]. Содержание КТ может возрастать также в результате метаболических расстройств, что наблюдается при диабете различного генеза [20, 65] и при некоторых гипогликемических состояниях детского возраста, связанных с нарушением метаболизма глюкозы или гликогена [1].

Гиперкетонемия у человека определяется как сумма концентраций Ац и  $\beta$ -ОБ в цельной крови свыше 0,2 мМ. По аналогии с понятием «лактатацидоза» кетоацидозом можно назвать состояние, при котором содержание КТ в крови выше 7 мМ. Концентрация КТ представляет собой баланс между образованием их в печени и утилизацией периферическими тканями. Вообще повышение уровня КТ в периферической крови может рассматриваться как показатель ускорения кетогенеза в печени, которое затем нивелируется увеличением темпа их периферической утилизации. Однако это положение выдерживается не всегда и гиперкетонемия может явиться результатом снижения утилизации КТ, а не изменения скорости кетогенеза. Так, утилизация КТ в периферических тканях снижается при лечении циклопропанкарбоксилазой или дихлорацетатом [67], а также при врожденном отсутствии ключевых ферментов, участвующих в метаболизме КТ, как это было описано для КоА-трансферазы 3-кетокислот, или в результате ряда метаболических дефектов, связанных с инсулидефицитными состояниями [65, 72]. В частности, высокая гиперкетонемия, обнаруженная при продолжительном голодании у людей, может быть в основном результатом накопления КТ почками и снижения потребления их

скелетными мышцами [50]. После 3 дней голодания концентрация КТ в крови составляет 2—3 мМ; в дальнейшем она продолжает возрастать, достигая плато на уровне около 8 мМ после 5—6 нед голодания, хотя скорость кетогенеза в печени не увеличивается. Более того, показано, что гиперкетонемия играет жизненно важную роль в поддержании метаболизма нервных клеток у человека, предупреждая при длительном голодании формирование симптомокомплекса, наблюдаемого обычно при гипогликемии.

#### *Кетогенез и метаболизм углеводов*

В обзорах [42, 73] рассматривается регуляция кетогенеза в тканях млекопитающих, и поэтому здесь этот вопрос будет обсужден лишь кратко. Так как основная роль КТ — снабжение тканей (в первую очередь нервной) субстратом, альтернативным глюкозе, было бы, по-видимому, логично, если при переходе от состояния, в котором глюкоза является преобладающим энергетическим субстратом, к состоянию, в котором выполнять эту роль должны КТ, концентрация последних в кровотоке возросла бы параллельно с уменьшением доставки углеводов. Для достижения такого положения контроль синтеза КТ должен быть интегрирован реципрокным путем с механизмами, обеспечивающими возможности окисления углеводов.

Основными предшественниками КТ являются неэстерифицированные жирные кислоты (НЭЖК). Регуляция выхода их из жировой ткани путем изменения концентрации циркулирующих гормонов (инсулин против глюкагона) или самих КТ может прямо влиять на скорость кетогенеза. Следовательно, снижение содержания глюкозы в крови, ведущее к снижению уровня инсулина, будет стимулировать липолиз в жировой ткани и увеличивать приток НЭЖК в печень. Такой тип контроля получил название внепеченочной регуляции. Могут быть ситуации (например, стресс), когда липолиз в жировой ткани усиливается, но при этом имеются достаточные запасы гликогена в печени, и, следовательно, нет необходимости в немедленном возрастании кетогенеза. Так, если перфузируемая печень сытых и голодных животных получает одну и ту же нагрузку в виде

длинноцепочечных жирных кислот, то в печени сытых крыс большая их часть эстерифицируется, печень же голодных крыс в основном окисляет жирные кислоты до КТ. Эти и другие данные показывают, что имеется внутрипеченочная регуляция кетогенеза.

Хотя о существовании взаимосвязи между кетогенезом и углеводным статусом печени было известно давно, механизм ее выяснен лишь работами Мак-Гарри и соавт. [42, 43]. Ключевым оказался тот факт, что малонил-КоА — интермедиат липогенеза ингибирует карнитиниацилтрансферазу I (КФ 2.3.1.21), которая способствует транспорту длинноцепочечных ацил-КоА в митохондрии, где они утилизируются в цикле  $\beta$ -окисления. Замедление этого процесса приводит к повышению доступности ацил-КоА липидного происхождения для эстерификации с образованием триацилглицеролов, так как глюкоза, полученная из гликогена, — основной источник углевода для липогенеза. Изменение концентрации малонил-КоА является метаболическим регулятором, формирующим углеводный обмен печени и интенсивность гликолиза в ней.

Опыты с изолированными гепатоцитами крыс, получавших углеводы, подтверждают, что имеются реципрокные отношения как между липогенезом и кетогенезом, так и между эстерификацией и кетогенезом [14]. Кроме того, при углеводной диете изменения в скорости липогенеза приводят к обратным изменениям концентрации малонил-КоА и скорости кетогенеза в гепатоцитах крыс [17]. В целом сочетание внутри- и внепеченочного контроля формирует механизм, при помощи которого скорость кетогенеза может чутко реагировать на изменения углеводного метаболизма и тем самым обеспечивать как эффективный субстрат окисления, так и специфический регуляторный сигнал для периферических тканей.

#### *Пути утилизации КТ в периферических тканях. Ферменты утилизации ацетоацетата и $\beta$ -оксипутирата*

Первая ступень утилизации Ац — его превращение в ацетоацетил-КоА — может быть осуществлено двумя ферментами: КоА-трансферазой 3-кетокислот (сукцинил-КоА: 3-оксокислота

КоА-трансфераза, КФ.2.8.3.5) и ацетоацетил-КоА-синтетазой [68]. Как КоА-трансфераза 3-кетокислот, так и ацетоацетил-КоА-синтетаза найдены в различных тканях; обычно активность КоА-трансферазы 3-кетокислот более чем в 10 раз превышает таковую ацетоацетил-КоА-синтетазы.

КоА-трансфераза 3-кетокислот выявлена в митохондриях, тогда как ацетоацетил-КоА-синтетаза — преимущественно в цитозольной фракции клеток. Механизм реакции, катализируемой КоА-трансферазой 3-кетокислот, изучали на ферментах, выделенных из различных тканей (почка, сердце, мозг и скелетная мышца) крысы, коровы и свиньи. Значения  $K_m$  КоА-трансферазы 3-кетокислот для Ац и физико-химические свойства фермента в различных тканях крысы подобны, но не идентичны. Для КоА-трансферазы 3-кетокислот показано субстратное ограничение активности фермента Ац при концентрации, превышающей 5 мМ, и это обстоятельство может иметь значение в ситуациях, связанных с гиперкетонемией.

Ацетоацетил-КоА подвергается расщеплению с образованием ацетил-КоА в реакции, катализируемой ацетоацетил-КоА-тиолазой (КФ 2.3.1.9). Ацетоацетил-КоА-тиолаза найдена в цитозоле и митохондриях многих периферических тканей [45]. Ее активность в митохондриях обычно выше, чем в цитозоле, и коррелирует с активностью КоА-трансферазы 3-кетокислот, что согласуется с ролью этих двух ферментов в митохондриальных превращениях Ац в ацетил-КоА в периферических тканях. Ацетоацетил-КоА-тиолаза обнаружена также в печени, где при фактическом отсутствии КоА-трансферазы 3-кетокислот ей принадлежит центральная роль в кетогенезе. Предполагаемая роль цитозольных ферментов в периферических тканях состоит в синтезе стероидов из ацетата или липидов из Ац [73]. Митохондриальные и цитозольные ацетоацетил-КоА-тиолазы имеют различные свойства. Так, митохондриальный фермент в отличие от цитозольного ингибируется  $K^+$ . Эти два фермента имеют различные значения  $K_m$  для ацетоацетил-КоА и КоА; ацетоацетил-КоА вызывает субстратное торможение митохондриального фермента, КоА — цитозольного. В мозге крысы значение  $K_m$  для ацетоаце-

тил-КоА в реакции с митохондриальной ацетоацетил-КоА-тиолазой составляет 11 мкМ, а с цитозольной — 23 мкМ. Митохондриальная ацетоацетил-КоА-тиолаза периферических тканей, так же как и печени, при хромотографическом выделении на фосфате целлюлозы дает несколько пиков, что подтверждает существование изоферментов.

$\beta$ -ОБ переводится в Ац при помощи 3-оксibuтиратдегидрогеназы — ОБД (КФ 1.1.1.30). Эта реакция обратима, а фермент специфичен для D-(—)-изомера. ОБД найдена во многих периферических тканях [16] и так тесно связана с внутренней митохондриальной мембраной, что для ее выделения требуется обработка фосфолипазой А или детергентом. Субъединица свободного от липидов фермента имеет молекулярную массу около 31 500 Д и лишена активности, которая может быть восстановлена добавлением фосфатидилохолина. Фермент, экстрагируемый из мозга крысы, имеет значение  $K_m$  для Ац 0,39 мкМ. Значения  $K_m$  в реакции Ац и НАДН различны для фермента, выделенного из мозга и из печени, что свидетельствует о наличии изоферментных форм ОБД.

Долгое время считалось, что окисление — основной путь использования КТ в тканях. Позднее при работе с КТ, мечеными  $^{14}C$ , эта точка зрения подтвердилась, но одновременно было показано, что КТ могут быть важными субстратами липогенеза в некоторых тканях как *in vivo*, так и *in vitro*. Исследования, в которых интактным животным вводили КТ, меченные  $3=^{14}C$ , показали, что спинной и головной мозг крыс-сосунков [71] и молочные железы лактирующих крыс — основные места включения КТ в липиды. В жировой ткани взрослых крыс и мышей включение КТ в липогенез весьма ограничено [60]. У эмбриона крысы обнаружена наибольшая скорость включения КТ в липиды в бурой жировой ткани, тогда как в мозге эта скорость была низкой [61]. Как и ожидалось, основное количество  $^{14}C$ , которым были мечены КТ, найдено в выдыхаемом  $CO_2$  [72], но небольшая часть метки оказалась включенной также и в белки.

Как указывалось выше, при окислении КТ в митохондриях происходит образование ацетил-КоА, который за-

тем конденсируется с образованием цитрата и вступает в цикл трикарбоновых кислот. Аминокислоты могут приобретать радиоактивную метку в опытах с мечеными  $^{14}\text{C}$  КТ *in vivo* и *in vitro* в результате образования меченых метаболитов из ацетил-КоА, меченного  $^{14}\text{C}$ . Альтернативным путем для цитрата в липогенных тканях является переход в цитозоль, где он расщепляется под действием АТФ-цитратлиазы (КФ 4.1.3.8), давая ацетил-КоА для синтеза липидов. Ацетил-КоА также может быть образован прямо из Ац в цитозоле, минуя митохондриальные реакции. Цитозольный ацетоацетил-КоА может быть использован для образования оксиметилглутарил-КоА (синтез холестерина) или бутирил-КоА, который выступает нередко как «затравка» липогенеза во многих тканях млекопитающих. Усиленный синтез бутирил-КоА эффективно восстанавливает ход  $\beta$ -окисления [52].

#### *Утилизация L-(+)-3-гидроксибутирата*

Физиологически важным изомером считается D-(—)-3-гидроксибутират, найденный в циркулирующей крови и моче больных диабетом, однако и L-(+)-изомер также может быть утилизирован тканями млекопитающих.

L-(+)-3-гидроксибутират окисляется препаратами почки, сердца, мозга, тонкого кишечника, и в этих тканях утилизация L-(+)-изомера ниже, чем D-(—)-изомера. В то же время L-(+)-3-гидроксибутират — лучший предшественник липидов, чем D-(—)-изомер или Ац у крыс-сосунков, тогда как D-(—)-3-гидроксибутират и Ац окисляются быстрее, чем L-(+)-3-гидроксибутират [71]. Более того, L-(+)-изомер 3-гидроксибутирата эффективно снижает концентрацию глюкозы при введении его собакам.

Известный в настоящее время путь утилизации L-(+)-изомера отличается от такового D-(—)-3-гидроксибутирата, так как 3-оксибутиратдегидрогеназа специфична для D-(—)-изомера и пока нет данных о существовании митохондриальной  $\beta$ -гидроксибутиратдегидрогеназы либо рацемазы, катализирующей взаимопревращения L-(+)- и D-(—)-3-гидроксибутирата. В почке овцы найдена цитозольная 3-гидроксибутиратдегидрогеназа, которая катализирует окисление L-3-гидроксибути-

рата, но при этом значение  $K_m$  достаточно высоко, что указывает на низкое сродство данного фермента к субстрату по сравнению с митохондриальным D-(—)-специфичным ферментом [73]. Путь утилизации L-(+)-3-гидроксибутирата может включать превращение L-(+)-3-гидроксиацил-КоА-дегидрогеназой (КФ 1.1.1.31) с образованием ацетоацетил-КоА. Неизвестно, существует ли 3-гидроксибутирил-КоА-синтетаза как отдельный фермент или она представляет собой проявление активности других ферментов, таких как бутирил-КоА-синтетаза (КФ 6.2.1.2). Как D-(—)-, так и L-(+)-изомеры 3-гидроксибутирата могут быть активированы и перейти в соответствующие ацил-КоА-дериваты, и таким образом может возникнуть дополнительный путь утилизации D-(—)-3-гидроксибутирата.

#### *Факторы, контролирующие утилизацию кетоновых тел*

Считалось, что утилизация КТ в организме определяется в целом количеством их в крови, однако, хотя соотношение между утилизацией КТ и содержанием в крови при низких концентрациях является линейным, при возрастании концентрации КТ образуется плато, на котором утилизация достигает максимума [36, 72]. Подобные соотношения между концентрацией КТ в крови и скоростью утилизации их были показаны путем измерения артериовенозной разницы в отдельных тканях у различных видов млекопитающих (мозг, сердце [71], скелетная мышца [60] и почка).

Между Ац и  $\beta$ -ОБ имеются различия в скорости утилизации в предельной концентрации, после достижения которой прекращается линейное увеличение скорости утилизации их, а также в путях их обмена в тканях. Интерпретация данных о кругообороте метаболитов КТ в условиях целостного организма, полученных в экспериментах с введением болюсов и радиоактивных меток, затрудняется следующим обстоятельством. Несмотря на то что взаимопревращение Ац и  $\beta$ -ОБ в циркулирующей крови может иметь место, КТ между собой не уравновешены полностью [9, 36, 42]. Часто при гиперкетонемических состояниях концентрация  $\beta$ -ОБ увеличивается в большей степе-

ни, чем Ац, что может отражать как избирательные влияния на утилизацию одного из двух КТ, так и изменения в митохондриальном редокс-статусе, особенно в печени. Фактически это означает, что коэффициент  $\beta$ -ОБ/Ац указывает на соответствие редокс-потенциала митохондриальной НАД/НАДН-системы печени и периферических тканей [32]. Имеются некоторые данные о раздельной утилизации КТ, полученные при изучении их оборота с помощью радиоактивной метки [9]. Кроме того, установлено, что гепатэктомия у голодных крыс ведет к более быстрому снижению концентрации Ац, чем  $\beta$ -ОБ. Последнее подтверждает, что использование в качестве субстрата Ац периферическими тканями является предпочтительным. Артериовенозная разница по Ац (несмотря на его более низкую концентрацию) больше, чем по  $\beta$ -ОБ, в мозге крысы и человека [76], мышце задней конечности крысы [61], предплечье человека [22] и сердце собаки. Аналогично этому Ац утилизируется *in vitro* быстрее, чем  $\beta$ -ОБ, в мозге крысы [75], скелетной мышце [60], жировой ткани [67] и молочной железе [57]. Хотя имеющиеся в настоящее время данные указывают, что для большинства тканей Ац является предпочтительным субстратом, есть исключение — в тонком кишечнике крысы нет различий между утилизацией  $\beta$ -ОБ и Ац [29].

На усвоение КТ тканями, помимо концентрации их в периферической крови, могут влиять и другие факторы. Утилизация КТ, измеренная по скорости оборота при их введении, снижается при диабете у людей [65, 72], крыс и собак [36]. Более того, утилизация Ац *in vitro* снижается в скелетной мышце и диафрагме крыс при диабете [60]. При продолжительном голодании утилизация КТ также может быть сниженной, о чем свидетельствует тот факт, что введение  $\beta$ -ОБ тучным людям, голодавшим более 3 дней, приводило к более выраженному повышению концентрации КТ по сравнению с уровнем, определяемым натощак. Потребление КТ предплечьем человека снижается при продолжительном (3 нед) голодании [70]. Изучение тканей крысы *in vitro* показало, что утилизация КТ снижается в жировой ткани в отличие от скелетной мышцы и диафрагмы даже после 5

дней голодания. Имеется доказательство того, что утилизация КТ мозгом может возрастать у крыс при длительном голодании, а также повышаться в неонатальном периоде у людей и крыс [19]; в обоих случаях наблюдается увеличение крутизны наклона линейной зависимости между утилизацией и концентрацией.

#### *Действие гормонов и других метаболитов*

Гиперкетонемия часто сопровождается состояниями, связанные с дефицитом инсулина или с ограничением доступности углеводов для метаболизма, в связи с чем возникает вопрос, насколько значим каждый из этих факторов при утилизации КТ. Глюкоза увеличивает утилизацию Ац у крыс, подвергнутых эвисцерации и нефрэктомии, а также в жировой ткани крысы и человека, мозге новорожденных крыс [47] и молочной железе этих животных [76]. В то же время глюкоза не влияет на утилизацию КТ в сердце, скелетной мышце и диафрагме крыс. Показанные различия между мышечной и другими тканями, видимо, могут быть связаны с синтетической ролью КТ в жировой ткани, мозге и молочной железе.

Инсулин может быть вовлечен в контроль утилизации КТ, так как при диабете утилизация их снижается. У крыс и собак с удаленной поджелудочной железой при однократном введении инсулина отмечается усиление утилизации КТ [36]. Хотя инсулин *in vitro* почти не влияет на утилизацию Ац в мышечной ткани крыс, как здоровых, так и больных диабетом [31, 60], тем не менее в липидах жировой ткани крысы он повышает общую утилизацию КТ и включение их в ткань. Кроме того, включение Ац в липиды под действием инсулина возрастает в молочной железе, но суммарное потребление его не увеличивается, так как окисление Ац при этом снижается [58]. Таким образом, инсулин может оказывать некоторое, хотя и мало выраженное, прямое влияние на утилизацию КТ в определенных тканях, а также пролонгированное воздействие на концентрацию в клетке ферментов утилизации КТ. Так называемая «резистентность к инсулину» при диабете или длительном голода-

нии пока еще не объяснена полностью. При заданной концентрации инсулина усвоение глюкозы (в основном окисление и включение в липиды) снижается, а способность к связыванию инсулина возрастает в изолированных адипоцитах, взятых от голодных крыс или крыс с диабетом [35, 50]. Так как концентрация КТ в этих ситуациях увеличивается, то возможно, что они являются фактором, сопряженным с резистентностью к инсулину.

КТ способны, видимо, реализовывать свое регулирующее воздействие по двум механизмам: путем модуляции связи инсулина с его рецепторами, препятствуя соединению инсулина с рецепторами на клеточной мембране, и путем влияния на внутриклеточный метаболизм глюкозы [2, 3, 5].  $\beta$ -ОБ в концентрациях свыше 2 мМ увеличивал связывание инсулина в культуре лимфоцитов JM1-9 [46], но Олевский и Кобаяси [50] не смогли воспроизвести этот эффект, а дальнейшие исследования показали, что КТ повышают связывание инсулина только тогда, когда оно находится на уровне ниже максимального, обусловленного ацидозом [46]. Возможно, что сами по себе КТ ответственны за поддержание нормального связывания инсулина с рецептором при диабетическом кетоацидозе [20]. Представляется интересным вопрос, могут ли взаимодействия в молочной железе, где утилизация глюкозы снижается под действием Ац, а добавление инсулина дает обратную реакцию, рассматриваться как модель резистентности к инсулину при гиперкетонемических состояниях.

До сих пор еще не найден какой-либо другой гормон, кроме инсулина, который бы прямо действовал на утилизацию КТ. В некоторых отношениях глицерин ведет себя подобно инсулину в тканях молочной железы крысы, вызывая увеличение включения Ац в липиды, но и общая утилизация КТ, и окисление Ац под действием глицерина снижаются [58]. Олеат — субстрат, который может рассматриваться как конкурент КТ, так как он также образует ацетил-КоА, не влияя на утилизацию Ац мышцами задней конечности или молочной железой [57] крысы. В то же время бутират ингибирует потребление Ац в срезах коры почки крысы, поэтому КТ образуются фактически в присутствии высоких

концентраций бутирата и олеата, что указывает на возможную конкуренцию между КТ и жирными кислотами в тканях почки. Ац снижает окисление  $\beta$ -ОБ, но не общее потребление его при перфузии мышц задней конечности крысы, не оказывая подобного действия на диафрагму крысы [22]. Эти результаты могут отражать легкую обратимость реакций утилизации КТ.

### *Обратимость реакций*

Реакции, катализируемые ОБД и сочетанием КоА-трансферазы 3-кетокислот с ацетоацетил-КоА-тиолазой, обратимы *in vitro*. В условиях же *in vivo* в тех случаях, когда эти реакции, происходящие внутри клетки, близки к равновесию, утилизация КТ может регулироваться как их собственной концентрацией, так и количеством необходимых кофакторов, а также продуктами этих реакций. Поэтому утилизация Ац не снижается при уменьшении концентрации ацетил-КоА, в связи с чем Ац способен играть определенную роль в поставке ацетил-КоА для цикла трикарбоновых кислот в условиях, когда альтернативные источники, в частности окисление жирных кислот, не обеспечивают потребности организма. Подобно этому, окисление  $\beta$ -ОБ будет повышаться, если концентрация НАД<sup>+</sup> и Ац снижается. Таким образом, в определенных ситуациях обратимость ферментов утилизации КТ может рассматриваться как механизм «буферирования» пула ацетил-КоА. Концентрации КоА и сукцинил-КоА также могут оказывать влияние на утилизацию Ац, так как эти субстраты необходимы для превращения Ац в ацетил-КоА. Однако атомы углерода, меченные <sup>14</sup>С и находящиеся первоначально в положении С-1 или С-3, ни в одном из КТ не переходят в положение С-3 или С-1 соответственно, что было показано в опытах на собаках и овцах. Это может указывать на отсутствие рециклизации <sup>14</sup>С через ацетил-КоА и в свою очередь подтверждает отсутствие образования КТ из ацетил-КоА в печени или периферических тканях интактных животных. Обратимость реакции ацетоацетил-КоА-синтетазы пока не исследована, но по аналогии с ацил-КоА-синтетазой  $K_m$  предполагается близкой к единице.

КТ должны перейти из циркулирующей крови в ткани и войти в клетки, чтобы достигнуть участков, где происходит их дальнейший метаболизм — окисление в митохондриях или участие в липогенезе в цитоплазме. Маловероятно, чтобы проницаемость ограничивала окисление КТ в скелетной мышце крысы, так как их тканевые концентрации линейно связаны с плазменными; особенно высоки концентрации КТ в скелетной мышце крысы с диабетом, где их утилизация снижена [73]. Напротив, потребление КТ тканью может быть ограничено в скорости, что имеет место при утилизации в мозге. Концентрация КТ в мозге крысы и цереброспинальной жидкости человека значительно ниже, чем в крови при голодании и диабете. В мозге крысы транспорт КТ ускорен у сосунков, он также возрастает при поедании жирной пищи и голодании; это наводит на мысль о возможной функции плазменной мембраны как точки регуляции утилизации КТ. Так как другие ткани, помимо мозга и мышцы, не изучались, остается неизвестным, является ли ограничение проницаемости для КТ специфическим свойством ткани мозга.

По вопросу о транспорте КТ в периферических тканях имеется лишь несколько работ. КТ, возможно, проникают через плазменные и митохондриальные мембраны путем диффузии как недиссоциированные кислоты [29, 54, 60], но они также могут входить в митохондрии как анионы при помощи переносчика, подобного или идентичного тому, который используется пируватом [54]. Специфичность субстрата и температурная зависимость потребления КТ мозгом интактных крыс свидетельствуют о возможности существования переносчика такого рода. Более того, проникающая способность D-(—)-изомера выше, чем L-(+)-изомера 3-гидроксипутирата. Снижение окисления и включения в липиды меченных по 3-<sup>14</sup>C КТ в мозге крыс-сосунков в присутствии фенилпирувата может быть связано с торможением поступления КТ в митохондрии мозга. Этот факт, возможно, частично объясняет некоторые нарушения при фенилкетонурии. Кроме того, фенилпируват может ингибировать ферменты утилизации КТ в мозге крыс-сосунков [13].

Ферменты, необходимые для утилизации КТ, присутствуют во многих тканях. Наиболее велика их активность в почках, сердце и надпочечниках, затем следуют околушная и подчелюстная железы, молочная железа и мозг. В печени активность КоА-трансферазы 3-кетокислот очень низка, и в синтез КТ в этой ткани вовлекаются ацетил-КоА-тиолаза совместно с ОБД. Однако такая ситуация возникает не всегда. Примером могут служить некоторые виды гепатомы крысы, а также печень эмбрионов и поворожденных, где активность КоА-трансферазы 3-кетокислот выше, чем в печени взрослых [24, 63]. Было высказано предположение, что именно низкая активность ОБД в мышце (по сравнению с двумя другими ферментами) может объяснить 5-кратное снижение скорости утилизации β-ОБ относительно Ал [73].

При кратковременном (24—48 ч) переходе на рацион, богатый жирами, голодании или аллоксановом диабете [40] изменения активности ферментов утилизации КТ в мозге, сердце, почках, скелетной мышце и жировых бляшках минимальны или отсутствуют; это служит подтверждением того, что изменения активности указанных ферментов не являются первопричиной возрастания утилизации КТ в данных ситуациях, сопровождающихся гиперкетонемией. Имеется несколько сообщений об изменении активности ферментов после более продолжительных воздействий. 6-Дневное голодание у крыс увеличивает активность КоА-трансферазы 3-кетокислот мозга. На 10-й день диабета активность этого фермента в скелетной мышце снижается [23]. Такого рода изменения активности ферментов соответствуют представлению о том, что данный фактор является первопричиной снижения утилизации КТ. Кормление крыс жирной пищей повышает активность ацетоацетил-КоА-тиолазы в сердце и почке и КоА-трансферазы 3-кетокислот в почке. Особенно велика чувствительность ферментов утилизации КТ к изменениям диеты в период внутриутробного развития. При голодании беременных крыс увеличивается активность ОБД в развивающемся мозге плода [88], а при переводе бе-

ременных крыс на высокожирный рацион возрастает активность ацетил-КоА-тиолазы и КоА-трансферазы 3-кетокислот в почке и мозге как плода, так и матери.

В отличие от трех ферментов утилизации КТ, о которых шла речь выше, ацетоацетил КоА-синтетаза оказалась более чувствительной к изменениям в гормональном и пищевом статусе, ее активность соответствует уровню липогенеза. Активность этого фермента в жировой ткани, а также в молочной железе [77] и печени [74] крысы снижается после 12—48 ч голодания. Изменения активности в молочной железе, вызванные 24-часовым голоданием, быстро восстановились (2 ч) после начала кормления [71]. В связи с этим оправдано предположить, что инсулин может контролировать адаптивные изменения активности ацетил-КоА-синтетазы в печени мышцы.

#### *Органоспецифичность утилизации кетоновых тел*

У крыс-сосунков КТ направляются в мозг, где общая активность ферментов их утилизации выше, чем в других периферических тканях в данном возрастном периоде. Основываясь на величинах активности ферментов окисления субстратов, молочную железу лактирующих крыс можно рассматривать как основной пункт утилизации КТ, что соответствует изменениям массы и кровотока в ней [71]. В период поздней беременности количество ферментов утилизации КТ в тканях возрастает и плод, таким образом, приобретает высокую способность к их утилизации [77]. Физическая тренировка, продолжающаяся в течение многих недель, ведет к увеличению способности скелетной мышцы окислять КТ [22, 73] наряду с увеличением концентрации КТ в крови во время и после работы у тренированных людей и крыс [22, 73]. Изменения ферментативной активности обычно связаны с изменениями потребности определенной ткани в субстратах, обеспечивающих выполнение специфической нагрузки: синтеза молока в лактирующей молочной железе, синтеза холестерина и триацилглицерола в тканях плода [85], синтеза миелина в развивающемся мозге, образования энергии в работающей скелетной мышце [106]. Возникает воп-

рос: какие сигналы вызывают эти изменения? У животных-сосунков таким сигналом может служить длительная гиперкетонемия, однако это условие не является обязательным для лактирующих [79] или беременных крыс или крыс, подвергающихся физической тренировке. В лактирующей молочной железе или работающей скелетной мышце усиление утилизации КТ сопровождается увеличением активности липазы липопротеинов. В настоящее время практически отсутствуют данные, которые бы подтверждали, что различия в кинетических свойствах ферментов утилизации КТ в тканях могут влиять на направленность поступления в них этих метаболитов.

#### *Регуляция кетоновыми телами транспорта и утилизации других субстратов*

Будучи «окисленным топливом» и биосинтетическим субстратом, КТ в то же время могут регулировать доставку и потребление других субстратов. Их регуляторное действие, позволяющее оберегать другие источники энергии, в частности глюкозу, особенно важно в условиях голодания или сниженного поступления углеводов. КТ могут контролировать как утилизацию глюкозы в периферических тканях, так и образование ее в печени и почках путем изменения доставки предшественников. Они снижают выход алапина из мышцы и глицерина из жировой ткани [6]. Кроме того, доставка и утилизация НЭЖК также контролируется КТ, которые тем самым могут регулировать свое собственное образование.

Впервые данные о том, что КТ могут снижать утилизацию глюкозы, были получены Дрэри и Уиком [4], которые показали, что введение  $\beta$ -ОБ снижает окисление глюкозы у кроликов. Эти данные были подтверждены в опытах на собаках, у которых введение КТ снижало окисление глюкозы и увеличивало гипергликемию. In vitro Ац или  $\beta$ -ОБ снижают утилизацию глюкозы, и каждый из них или оба вместе ингибируют окисление пирувата в миокарде [69], диафрагме, камбаловидной мышце [41], перфузируемой *m. gluteus* [15], лактирующей молочной железе [58], подчелюстной железой, почке, мозге [54], тонком кишеч-

пике [42]. Общей чертой всех этих тканей является высокая скорость гликолиза и утилизации КТ, хотя их способность к утилизации КТ в целях синтеза варьирует в широких пределах. Суммарным результатом этого взаимодействия между глюкозой и КТ в периферических тканях является экономия углеводов.

Механизм подавления утилизации глюкозы КТ в сердце крысы хорошо известен благодаря работам Рэндала и соавт. Этот механизм сводится к следующему. Образование ацетил-КоА из Ац в митохондриях приводит к увеличению образования цитрата, транспортируемого в цитозоль, где он ограничивает активность фосфофруктокиназы. Повышение концентрации фруктозо-6-фосфата сопровождается накоплением глюкозо-6-фосфата, который в свою очередь уменьшает активность гексокиназы, что приводит к снижению потребления глюкозы. Ац также может ингибировать мембранный транспорт глюкозы в сердце в отсутствие инсулина. Поскольку изменение концентраций цитрата и глюкозо-6-фосфата, а также снижение чувствительности фосфофруктокиназы к цитрату имеют место во многих тканях [32, 48], механизм ингибирования в них обычно принимался аналогичным таковому в миокарде. Между тканями, однако, имеются различия, связанные с их специфической функцией. Наиболее интересным с точки зрения регуляции является тот факт, что инсулин и адреналин усиливают торможение потребления глюкозы в молочной [58, 73] и подчелюстной железах. В то же время для демонстрации тормозящего действия КТ на гликолиз в камбаловидной мышце [41] и сердце [73] необходимо увеличить его скорость с помощью инсулина.

Кроме того, КТ могут ингибировать пируватдегидрогеназу. Возможно, что эта сторона их регуляторного действия является основной в мозге [55] и тонком кишечнике [30], где именно окисление глюкозы, а не ее потребление контролируется КТ. Инкубация с КТ снижает относительное содержание активной формы пируватдегидрогеназы при экстракции ее из жировой ткани и перфузируемой мышцы задней конечности крысы [28]. Объясняется это, вероятно, тем, что увеличение соотношения ацетил-КоА/КоА в мито-

хондриях, обусловленное метаболизмом Ац, возможно, активирует киназу пируватдегидрогеназы, увеличивая тем самым фосфорилирование фермента и снижая его активность [15, 37]. Кроме того, возможно угнетающее действие НАДН и ацетил-КоА [37].

КТ не являются единственными из имеющихся в циркулирующей крови факторов, ответственных за контроль утилизации глюкозы в периферических тканях. Из других регуляторов, концентрация которых часто меняется при гиперкетонемии, особую роль играют инсулин и НЭЖК. Подобно КТ, НЭЖК снижают утилизацию глюкозы в межжелудочковой перегородке сердца крысы, но не оказывают такого действия в молочной [57] и поджелудочной железах и скелетной мышце [27]. Так, например, при гиперкетонемии, связанной с голоданием или диабетом, увеличение концентрации жирных кислот плазмы крови имеет определенное значение для сбережения запасов глюкозы. Тем не менее на основании имеющихся данных именно КТ, а не НЭЖК следует рассматривать в качестве ключевого регулятора утилизации глюкозы *in vivo*, особенно учитывая влияние КТ на контроль утилизации жирных кислот.

Во-первых, при голодании и диабете концентрация КТ в крови крысы и человека, а также скелетных мышцах и сердце крысы изменяется более выражено, чем концентрация НЭЖК. Во-вторых, утилизация КТ в мышцах задней конечности крысы не меняется под влиянием жирных кислот [60], в то время как КТ снижают потребление и усвоение жирных кислот в сердце, диафрагме, скелетной мышце, а также эстерификацию жирных кислот в молочной железе крысы [57]. Более того, введение Ац снижает оборот и окисление НЭЖК у собак *in vivo*. Эти факты, а также данные о том, что КТ способны снижать утилизацию глюкозы в то время, как их собственная утилизация под влиянием глюкозы не снижается, лежат в основе представления о преимущественном значении окисления КТ перед другими субстратами. В-третьих, в некоторых тканях, включая мозг и молочную железу, жирные кислоты не окисляются в сколько-нибудь значительной степени и не угнетают утилизацию глюкозы в отличие от КТ. В-четвертых, КТ тор-

мозят выход НЭЖК из жировой ткани и тем самым регулируют как свое собственное образование, так и доступность НЭЖК для периферических тканей.

Следовательно, КТ могут рассматриваться как «сигналы» контроля метаболизма, так как их концентрация при изменении физиологического статуса меняется значительно и быстро, что в свою очередь влияет на метаболизм других субстратов, особенно глюкозы и жирных кислот, в различных тканях.

### *Транспорт аланина*

Снижение концентрации аланина плазмы крови обычно сопровождается гиперкетонемией при голодании [22], беременности, диабете [65], травме и кетотической гипогликемии. Введение  $\beta$ -ОБ человеку снижает концентрацию аланина в крови даже в тех случаях, когда его исходная концентрация была достаточно низка в связи с голоданием или диабетом [65]. Гипоаланинемия, вызванная введением КТ, вероятно, обусловлена, как и при голодании [22], снижением выхода аланина из мышцы, что согласуется с другими изменениями, найденными при данном воздействии: пониженной концентрацией глюкозы в крови [6, 56], снижением образования эндогенной глюкозы [18] и экскреции азота. Следовательно, КТ могут косвенно контролировать глюконеогенез и выход глюкозы из печени путем ограничения доступности аланина — важного субстрата глюконеогенеза *in vivo* [22]. Контроль реципрокных отношений между концентрациями аланина и КТ в крови является сложным, так как введение аланина дает антикетотический эффект и снижает концентрацию  $\beta$ -ОБ в крови у крыс и человека.

Фелиг и соавт. [5] предположили, что КТ снижают выход аланина из мышцы, что обусловлено угнетением гликолиза, уменьшающим доступность пирувата для трансаминирования с аминокислотами. В этом случае экзогенный пируват должен обращать тормозящее действие КТ на выход аланина. Другое предположение, состоящее в том, что КТ снижают выход аланина путем ограничения катаболизма аминокислот с разветвленной цепью, не получило должного подтверждения.

Тем не менее возможно, что КТ снижают расход белка у человека, о чем свидетельствует уменьшение экскреции азота, сопровождаемое гипоаланинемией, при длительном введении КТ. Однако данные о прямом действии КТ на регуляцию расщепления белка достаточно противоречивы.

Вместе с тем сами аминокислоты с разветвленной цепью могут снижать расщепление белка в скелетных мышцах крысы [35]. Одним из доказательств этого является снижение экскреции азота у голодающих людей при введении им соответствующих разветвленных кетокислот. Аналогичный эффект наблюдается и при введении аминокислот с разветвленной цепью травмированным крысам [26]. Возможно, некоторые эффекты данных аминокислот связаны с образованием в процессе их метаболизма  $\Delta^2$  и  $\beta$ -ОБ, однако более вероятно, что ответственными за сохранение белка *in vivo* являются КТ, так как количество аминокислот с разветвленной цепью в крови крыс и людей вообще низко, а увеличение их концентрации при голодании или диабете менее выражено, чем увеличение концентрации КТ. Кроме того, концентрация аминокислот с разветвленной цепью у людей при длительном голодании снова возвращается к исходному уровню, в то время как содержание КТ в этих условиях остается повышенным [22]. Аминокислоты с разветвленной цепью не всегда эффективно тормозят распад белка; так, у людей, получивших травму, высокая концентрация аминокислот с разветвленной цепью связывается с высокой скоростью распада белка и экскреции азота.

### *Транспорт неэстерифицированных жирных кислот и метаболизм кетоновых тел*

Снижение концентрации НЭЖК в плазме при введении КТ, показанное на человеке [8, 64], крысе [31] и собаке, очевидно, обусловлено уменьшением выхода НЭЖК из жировой ткани. Антилиполитическое действие КТ часто, хотя и не всегда [8], сопровождается возрастанием концентрации инсулина в крови [52]. Поскольку инсулин оказывает антилиполитическое действие на жировую ткань, снижение концентрации НЭЖК в крови может

быть следствием как прямого воздействия КТ на жировую ткань, так и непрямого, обусловленного действием инсулина.

Оценка вклада инсулина в антилиполитическое действие КТ *in vivo* затруднительна, так как даже малые изменения концентрации инсулина, не оказывающие заметного влияния на обмен углеводов, могут действовать на липолиз. Поскольку КТ, с одной стороны, увеличивают выход инсулина из поджелудочной железы крысы *in vitro*, с другой стороны, не всегда дают увеличение количества этого гормона у интактных животных, то возможность их прямого действия на поджелудочную железу представляется сомнительной. Отсутствие заметных изменений в концентрации инсулина при введении КТ, однако, может быть связано с относительно низким содержанием его в периферической крови по сравнению с кровью портальной вены и с транзитной природой увеличения его концентрации. Последнее, возможно, обуславливает снижение уровня глюкозы крови, часто наблюдаемое при введении КТ [3, 6, 76, 77]. Поэтому одновременное введение собакам Ац и глюкозы, обеспечивающее нормогликемию, приводит к увеличению концентрации инсулина в течение всего периода инфузии. При этом снижение концентрации глюкозы крови не является, по-видимому, следствием уменьшения ее расхода под действием КТ и может быть отнесено за счет снижения выхода глюкозы из печени. Последнему, вероятно, способствует уменьшение транспорта предшественников глюко-неогенеза, особенно аланина [62] и, возможно, глицерина [55], но остается неясным, является ли снижение выхода глюкозы из печени результатом прямого воздействия КТ или при этом требуется участие инсулина.

Осуществление антилиполитического действия КТ через изменения концентрации инсулина не является обязательным; КТ снижают уровень НЭЖК крови в ситуациях, когда концентрация инсулина поддерживается на постоянном уровне: при стрептозоциновом диабете крыс, получающих инсулин, сахарном диабете у детей [3], удалении поджелудочной железы у собак. В жировых бляшках и изолированных адипоцитах крысы  $\beta$ -ОБ ингибирует липолиз, стимулированный

голоданием или добавленным *in vitro* таких липолитических агентов, как порадреналин, АКТГ, теофиллин [14]. Хотя  $\beta$ -ОБ обычно используется в концентрациях свыше 10 мМ, возможность его тормозящего действия была показана и при более низких физиологических величинах. Ац также дает липолитический эффект, по действию  $\beta$ -ОБ, возможно, более выражено, так как изменения количества НЭЖК у крыс в большей степени связаны с уровнем  $\beta$ -ОБ, чем Ац. Примечательно, что липолиз в жировой ткани быка *in vitro* угнетается D- или L-изомерами 3-оксибутирата, но не Ац [55].

Механизм торможения липолиза КТ неясен. Не исключена возможность действия КТ как на функцию, так и на образование цАМФ [44]. Хотя это предположение подтверждено данными о том, что  $\beta$ -ОБ тормозит накопление цАМФ, и липолиз в адипоцитах крысы, однако выявить механизм действия  $\beta$ -ОБ на ферменты, ответственные за образование и расщепление цАМФ, не удалось [21]. Способность КТ угнетать липолиз не ограничивается только жировой тканью; физиологические концентрации Ац или  $\beta$ -ОБ ограничивают липолиз в перфузируемом сердце крысы, стимулированный изопротеренолом или глюкагоном [33].

В настоящее время нет достаточно веских доказательств того, что контроль синтеза КТ по механизму обратной связи играет важную физиологическую роль у интактных животных. Можно лишь умозрительно представить себе механизм саморегуляции липолиза в жировой ткани — один в виде прямого действия КТ, а другой в виде непрямого, через стимуляцию выхода инсулина из поджелудочной железы. Возможно, эти два механизма в совокупности представляют собой предохранительную систему, обеспечивающую снижение синтеза КТ в случае резкого повышения их концентрации.

В настоящее время известно, что многие ткани используют КТ не только как окислительные субстраты, но и как предшественники липогенеза. КТ выступают также в роли «сигналов» недостатка углеводов, играя главную роль в интеграции метаболизма целостного организма. Регуляторное действие их не ограничивается лишь утилизацией углеводов. Возмож-

на роль КТ как регуляторов протеолиза. Доступность КТ как субстратов, альтернативных глюкозе, могла бы способствовать уменьшению расщепления белка, необходимого для образования предшественников глюкозы.

На сегодня нет еще достаточно веских доказательств прямого действия КТ на метаболизм белка. С этих позиций имело бы смысл проанализировать, как отражаются некоторые стороны обмена КТ на метаболизме лейцина и наоборот.

КТ могут также играть важную роль в контроле и метаболизме жирных кислот, регулируя как доставку, так и периферическую утилизацию НЭЖК. Пока неясно, в какой степени метаболизм КТ является частью механизма прямого торможения липолиза в жировой ткани и стимуляции выхода инсулина из поджелудочной железы. В тех случаях, когда возможности окисления углеводов ограничены, часто наблюдается низкая концентрация инсулина, что можно рассматривать как взаимодействие инсулина и КТ в процессе контроля метаболизма. Остаются нерешенными вопросы, являются ли КТ причиной резистентности к инсулину и является ли действие инсулина (длительное и кратковременное) существенным для утилизации кетонových тел *in vivo*, возможно, путем изменения активности ферментов утилизации КТ. Дальнейших исследований требует предположение о роли ацетоацетил-КоА-синтетазы как фермента, направляющего КТ в сторону синтеза липидов. Представляется, что наиболее вероятной локализацией ацетоацетил-КоА-синтетазы являются надпочечники, так как их ткани обладают высокой скоростью синтеза стеролов наряду с высокой активностью других ферментов утилизации КТ. Серьезного рассмотрения требует вопрос об утилизации L-(+)-изомера 3-оксипутирата периферическими тканями и в его возможной роли как липогенного субстрата и регулятора у интактных животных. К настоящему времени большинство работ выполнено на крысах, и, хотя этот вид животных считается подходящей моделью для изучения метаболизма у человека, в будущем следует обратить особое внимание на поиск доказательств справедливости этого положения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Аникеева С. П. К характеристике энергетического обмена при пневмонии у детей раннего возраста: Дис. ... канд. мед. наук. — М., 1973.
2. Безбородный Ю. В. // Успехи совр. биол. — 1981. — Т. 99. — № 1(4). — С. 11—46.
3. Кендыш Н. Н. Регуляция углеводного обмена. — М., 1985.
4. Панин Л. Е. Биохимические аспекты адаптации. — Новосибирск, 1985. — С. 35.
5. Фелинг Ф. // Эндокринология и метаболизм: Пер. с англ. — М., 1985. — Т. 2. — С. 144—149.
6. Шамранов Т. Ж., Мухамужанов Э. К. // Вопр. мед. химии. — 1981. — № 3. — С. 300—310.
7. Aynsley-Green A., Williamson D. H., Gitzelman R. // Arch. Dis. Child. — 1977. — Vol. 52. — P. 573.
8. Aheersova E., Aheers J., Milarova R. // Cas. Lek. cesk. — 1984. — Vol. 123, N 13. — P. 387—388.
9. Bahnes H. I., Albert K. G. // Diabetologia. — 1983. — Vol. 25, N 2. — P. 138.
10. Balasse E. O., Neet M. A. // Metabolism. — 1975. — Vol. 24, N 9. — P. 999—1007.
11. Bates M. W., Linn L. C. // Ibid. — 1976. — Vol. 25. — P. 685.
12. Bartelaj J. C. // Lipids. — 1976. — Vol. 11. — P. 774—777.
13. Benavides J., Gimenez C., Valdiviesco F., Mayor F. // Biochem. J. — 1976. — Vol. 160. — P. 217.
14. Benito M., Williamson D. V. // Ibid. — 1978. — Vol. 176. — P. 331.
15. Berger M., Hagg S. A., Goodman M. W., Ruderman N. B. // Ibid. — 1976. — Vol. 158. — P. 191.
16. Berne C. // Enzyme. — 1976. — Vol. 21. — P. 127.
17. Cook G. A., King M. T., Veech R. L. // J. biol. Chem. — 1978. — Vol. 253. — P. 2529.
18. Dombrowski G. J., Cheung G. P., Swiatek K. R. // Life Sci. — 1977. — Vol. 21. — P. 1821.
19. Edmon J., Nancey A. et al. // Fed. Proc. — 1985. — Vol. 44. — P. 2359—2364.
20. Felts P. W. // Med. Clin. N. Amer. — 1983. — Vol. 63. — P. 831—843.
21. Fain J. N., Shepherd R. E. // J. Lipid Res. — 1976. — Vol. 17. — P. 377.
22. Fery F., Balasse E. O. // Amer. J. Physiol. — 1983. — Vol. 245. — P. 318—325.
23. Fenselau A., Wallis K. // Biochem. J. — 1976. — Vol. 158. — P. 509.
24. Fenselau A., Wallis K., Morris H. P. // Cancer Res. — 1976. — Vol. 36. — P. 4429.
25. Ferre P., Pegorier J.-P., Williamson D. H. // Biochem. J. — 1978. — Vol. 176. — P. 759.
26. Freud H., Yoshimura N., Luneta L., Fischer J. E. // Surgery. — 1978. — Vol. 83. — P. 611.
27. Goodman M. N., Berger M., Ruderman N. B. // Diabetes. — 1974. — Vol. 23. — P. 881.
28. Hagg S. A., Taylor S. I., Ruderman N. B. // Biochem. J. — 1976. — Vol. 158. — P. 203.
29. Halesstrap A. P. // Ibid. — 1978. — Vol. 172. — P. 377.
30. Hanson P. J., Parsons D. A. // J. Physiol. (Lond.). — 1978. — Vol. 278. — P. 55.
31. Haymond M. et al. // Amer. J. Physiol. — 1983. — Vol. 245. — P. E373—E378.

32. Hoffman E. // Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. — 1976. — Vol. 75. — P. 1.
33. Hron W. T., Memahan L. A., Leeh J. J. // J. molec. cell. Cardiol. — 1978. — Vol. 10. — P. 161.
34. Karlsson N., Fellenius B., Riessling K.-H. // Acta physiol. scand. — 1977. — Vol. 99. — P. 113.
35. Kasuga M., Acanuma Y., Iwamoto Y., Kosaka K. // Amer. J. Physiol. — 1978. — Vol. 235. — P. E-175.
36. Keller U., Schnell H., Girard J., Stanjacher W. // Diabetologia. — 1984. — Vol. 26. — P. 103—108.
37. Kernbey A. L., Randle P. J., Cooper R. H. et al. // Biochem. J. — 1976. — Vol. 154. — P. 327.
38. Kümme L. // Biosci. Rep. — 1983. — Vol. 3. — P. 643—646.
39. Kligenberg M., von Hagen H. // Biochem. Z. — 1963. — Bd 337. — S. 120.
40. Lavau M., Fornari V., Hashim S. A. // J. Nutr. — 1978. — Vol. 108. — P. 621.
41. Maizels E. Z., Ruderman N. B., Goodman M. N., Lau D. // Biochem. J. — 1977. — Vol. 162. — P. 557.
42. McGarry J. D., Foster D. W. // Arch. intern. Med. — 1977. — Vol. 137. — P. 495.
43. McGarry J. D., Leatherman G. F., Foster D. W. // J. Biol. Chem. — 1978. — Vol. 253. — P. 4128.
44. Merimee T. J., Pulkkinen A. J., Lofton S. // J. clin. Endocr. — 1976. — Vol. 43. — P. 1190.
45. Middleton B. // Biochemical and Clinical Aspects of Keton Body Metabolism / Eds. H. D. Söling, C. D. Seufert. — Stuttgart, 1978. — P. 1—10.
46. Misben R. I., Pulkkinen A. J., Lofton S. A., Merimee T. J. // Diabetes. — 1978. — Vol. 27. — P. 539.
47. Nankervis A., Proietto J., Ailken R. et al. // Diabetologia. — 1984. — Vol. 27. — P. 497—503.
48. Newsholme E. A., Sugden P. H., Williams T. // Biochem. J. — 1977. — Vol. 166. — P. 123.
49. Neufeld H. et al. // Metabolism. — 1983. — Vol. 32. — P. 748—749.
50. Olejsky J. M., Kobayashi M. // J. clin. Invest. — 1978. — Vol. 61. — P. 329.
51. Owen O. E., Reichard G. A. // Israel J. med. Sci. — 1975. — Vol. 11. — P. 560.
52. Ozand P. T., Reed W. D., Hawkins R. R. et al. // Biochem. J. — 1978. — Vol. 170. — P. 583.
53. Pascal F. et al. // Ibid. — 1983. — Vol. 214. — P. 937—942.
54. Pande S. V., Parvin R. // J. biol. Chem. — 1978. — Vol. 253. — P. 1565.
55. Patel M. S., Omen O. E. // J. Neurochem. — 1977. — Vol. 28. — P. 109.
56. Phinney S. D., Bistrain B. R., Evans W. J. // Metabolism. — 1983. — Vol. 32. — P. 769—776.
57. Rande P. J., England P. I., Denton R. M. // Biochem. J. — 1970. — Vol. 117. — P. 677.
58. Robinson A. M. Aspects of Metabolism in Rat Mammary Glands. — Oxford, 1978.
59. Rolles-Valdes C., McGarry J. D., Foster D. W. // J. biol. Chem. — 1976. — Vol. 251. — P. 6007.
60. Ruderman N. B., Goodman M. N. // Amer. J. Physiol. — 1974. — Vol. 226. — P. 136.
61. Seccombe D. W., Harding P. G. R., Possmaiger F. // Biochim. biophys. Acta. — 1977. — Vol. 488. — P. 402.
62. Seltnergren G., Lindblad B. S., Persson B. // Acta paediat. scand. — 1976. — Vol. 65. — P. 343.
63. Spambaugh G. E., Kochler R. R., Yokoo H. // Amer. J. Physiol. — 1978. — Vol. 235. — P. E-330.
64. Shambaugh G. E., Mrozak S. C., Freinkel N. // Metabolism. — 1977. — Vol. 26. — P. 623.
65. Sherwin R. S., Hendler R. G., Felig P. // Diabetes. — 1976. — Vol. 25. — P. 776.
66. Sumi S. et al. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1984. — Vol. 120, N 1. — P. 103—108.
67. Stacpoole P. W., Moore G. W., Kornhauser D. M. // New Engl. J. Med. — 1978. — Vol. 298. — P. 526.
68. Scofield R. et al. // Metabolism. — 1983. — Vol. 32. — P. 1009—1012.
69. Taegoymer H. // Basic Res. Cardiol. — 1983. — Vol. 75. — P. 435—450.
70. Vina Yucm R. et al. // Biochem. J. — 1983. — Vol. 216. — P. 343—347.
71. Webber R. J., Edmond J. // J. biol. Chem. — 1977. — Vol. 252. — P. 5222.
72. Wildenhoff K. E. // Acta med. scand. — 1976. — Vol. 200. — P. 79.
73. Williamson D. H. // Fed. Proc. — 1985. — Vol. 44. — P. 242—2341.
74. Wolozunowicz M., Rous S. // Life Sci. — 1977. — Vol. 20. — P. 1347.
75. Yeh Y.-Y., Streuli V. L., Zee P. // Lipids. — 1977. — Vol. 12. — P. 957.
76. Yeh Y. Y., Scheenar J. // Fed. Proc. — 1985. — Vol. 44. — P. 2352—2358.
77. Zammit V. // Proc. Nutr. Soc. — 1983. — Vol. 42. — P. 289—302.

Поступила 24.12.86

УДК 617-001.17-07:616.633.415.5-074

Л. Д. Ворончихина, В. Т. Демьянова, Н. В. Манжаров

## ЭКСКРЕЦИЯ ПОЛИАМИНОВ С МОЧОЙ У БОЛЬНЫХ С ТЕРМИЧЕСКИМИ ОЖОГАМИ

Кировский НИИ гематологии и переливания крови

Известно, что в организме обожженных одновременно происходят генерализованный распад белков, ведущий к их дефициту, и активация биохимиче-

ских процессов, направленных на восстановление пораженных травмой тканей. В настоящее время установлено, что полиамины непосредственно ока-

зывают стимулирующее действие на синтез белка и являются показателями интенсивности биосинтетических процессов в организме [1, 13, 18].

Цель работы — изучение реакции полиаминов: спермина, спермидина и путресцина на термическую травму по выделению их с мочой в процессе ожоговой болезни.

### Методика

Полиамины определяли в суточной моче по ранее опубликованной методике [2]. Площадь ожога вычисляли в процентах с учетом коэффициента Франка: до 30 ед. Франка — легкие ожоги, от 31 до 60 ед. — средние, свыше 60 ед. — тяжелые поражения. Применяли комплексное инфузионно-трансфузионное лечение. Цифровой материал обрабатывали статистически [7]. Обследовано 38 больных (7 женщин и 31 мужчина; возраст от 21 до 79 лет) с ожогами различной тяжести. Исследования проводили многократно (от 3 до 7 раз) на каждой стадии ожоговой болезни; у 5 больных анализы повторяли ежедневно в течение всего периода пребывания в клинике. Из числа обожженных, находившихся под наблюдением, умерли 10 больных, имевших средние и тяжелые поражения (от 47 до 91 ед.), из них 6 человек в период шока, 3 в период токсемии, 1 в период септикотоксемии.

### Результаты и обсуждение

Выявлен различный характер количественных изменений фракционного состава полиаминов мочи в зависимости от исхода болезни. У больных с благополучным исходом уже в 1-е сутки после ожога наблюдали повышенное содержание полиаминов в моче по сравнению с нормой. При этом у обожженных отмечали выведение  $80,7 \pm 9,80$  мкмоль полиаминов за 1 сут, в том числе  $9,1 \pm 1,25$  мкмоль спермина,  $36,5 \pm 5,39$  мкмоль спермидина и  $35,1 \pm 4,31$  мкмоль путресцина. Общий уровень экскретируемых полиаминов у здоровых людей в среднем составлял лишь  $57,5 \pm 3,05$  мкмоль/сут.

Поскольку полиамины относятся к маркерам активности пролиферативных процессов, то установленное нами избыточное выведение их с мочой имеет прямую связь с усиленным синтезом белка уже в 1-е сутки после ожога. Пусковой механизм быстрой активации биосинтетических процессов при этом вполне понятен, так как хорошо известно, что в ответ на ожоговую травму возникает компенсаторная нервно-рефлекторная реакция с активацией симпатико-адреналовой и гипо-

таламо-гипофизарно-надпочечниковой систем, сопровождающаяся резким увеличением выработки АКТГ и усилением секреции гликостероидных гормонов. Установлено [11, 14], что синтез полиаминов происходит путем декарбоксилирования аминокислот — орнитина, аргинина, лизина и находится под контролем гормональной системы. В частности, выявлено, что АКТГ [16] и гликостероиды [17] вызывают раннюю стимуляцию активности орнитиндекарбоксилазы — ключевого фермента синтеза полиаминов и накопление путресцина, который усиливает образование спермидина в различных органах животных. Это подтверждается также экспериментальными исследованиями на крысах [6], показавшими резкую активацию этого фермента в печени уже в первые часы и увеличение метаболического предшественника полиаминов — диамина путресцина через 24 ч после термического ожога кожи животных. Об активации репаративных процессов в ряде органов уже с первых часов после ожога наряду с интенсивным катаболизмом свидетельствуют также данные [4, 8].

В последующие периоды ожоговой болезни наблюдали дальнейшее усиление гиперполиаминурии. Наибольшее увеличение экскреции полиаминов обнаружено в стадии токсемии (рис. 1), что свидетельствует о значительной стимуляции биосинтетических процессов в этот период и быстром выведении неуплотненных полиаминов,

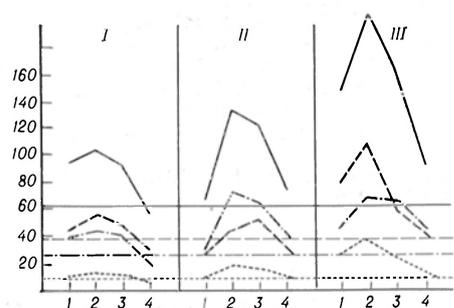


Рис. 1. Характеристика экскреции полиаминов у обожженных при благополучном исходе в зависимости от тяжести поражения и стадии заболевания.

По оси ординат здесь и на рис. 2 — количество экскретируемых полиаминов (в мкмоль/сут); по оси абсцисс — стадия заболевания: 1 — шок, 2 — токсемия, 3 — септикотоксемия, 4 — выздоровление. Степень поражения: I — легкая, II — средняя, III — тяжелая. а — общий уровень полиаминов в норме, б — уровень спермидина в норме, в — уровень путресцина в норме, г — уровень спермина в норме.

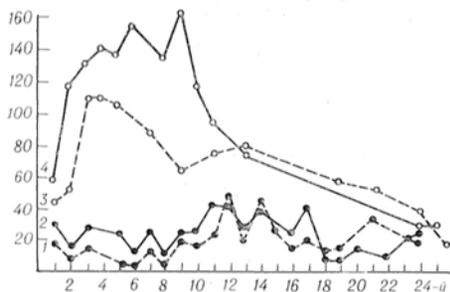


Рис. 2. Сравнительная динамика экскреции полиаминов у здорового человека и у обожженного при благополучном исходе.

По оси абсцисс — дни исследования. 1 — уровень путресцина в норме, 2 — уровень спермидина в норме, 3 — уровень путресцина при термическом ожоге, 4 — уровень спермидина при термическом ожоге.

избыточное количество которых [15], а также продуктов их ферментного распада [12] токсично для организма. Вопрос о природе ожоговых токсинов недостаточно изучен. К факторам, обуславливающим развитие ранней ожоговой токсемии, относят [9, 10] среднемoleкулярные пептиды плазмы крови, в составе которых, как установлено [3], имеются полиамины. Механизм интенсивного синтеза стимуляторов роста в этот период ожоговой болезни можно объяснить дальнейшей мобилизацией внутренних резервов, так как известно [5], что полиамины, образующиеся в ответ на травму, в свою очередь могут действовать как чрезвычайные раздражители, вызывающие последующую адаптационную реакцию нейроэндокринной системы.

В период септикотоксемии полиаминурия также держится на высоком уровне, однако он постепенно снижается по мере выздоровления. Постепенное ослабление напряженности биосинтеза белка за счет собственного пластического материала в это время компенсируется вступающими в обменные процессы продуктами парентерального питания, расщепленными до аминокислот, в том числе предшественников полиаминов.

На рис. 2 показан типичный пример динамики выведения полиаминов с мочой у больного в возрасте 20 лет с ожогом 40 % поверхности тела при наличии 20 % глубоких ожогов. Величина поражения с учетом коэффициента Франка составляла 80 ед. Больной выздоровел.

При благополучном исходе уровень

полиаминов в моче возрастает параллельно тяжести ожога (см. рис. 1). Существование прямой зависимости биосинтетических показателей от тяжести термического поражения было выявлено также в работе [6]. Содержание полиаминов в крови этих больных было несколько выше, чем у здоровых людей, — соответственно  $19,6 \pm 1,47$  и  $16,2 \pm 0,62$  нмоль/мл. Основной причиной отсутствия значительного накопления полиаминов в крови, по-видимому, также является вовлечение их в усиленный биосинтез белка.

У большинства обожженных при летальных исходах, несмотря на обширные поражения, отмечали низкое содержание полиаминов в моче. В первые сутки после травмы отмечали выведение с мочой  $21,1 \pm 5,12$  мкмоль полиаминов ( $4,9 \pm 1,58$  мкмоль спермина,  $8,9 \pm 2,17$  мкмоль спермидина и  $7,4 \pm 1,93$  мкмоль путресцина), что было значительно ниже среднего уровня, характерного для здоровых людей. Особенно низкий уровень полиаминов был у обожженных с ожогами средней тяжести (40--60 ед.) —  $9,2 \pm 2,60$  мкмоль/сут ( $2,1 \pm 1,01$  мкмоль спермина,  $4,2 \pm 1,61$  мкмоль спермидина и  $2,9 \pm 0,82$  мкмоль путресцина). Как видно из таблицы, низкое содержание полиаминов в моче сохранялось и в последние сутки (за исключением 1 больного, умершего в период токсемии). При тяжелой ожоговой травме (62—91 ед.) за это время низкая экскреция полиаминов сохранилась у 3 больных, а у 2 обожженных наблюдали резкое повышение их уровня в моче. Вполне вероятно, что неадекватная реакция полиаминов на тяжелое ожоговое поражение у пострадавших в агональном состоянии может быть связана с сильными стрессовыми явлениями, приводящими не к интенсивной стимуляции функций орнитиндекарбоксилазы, а к снижению ее активности и угнетению синтеза полиаминов. При этом важную роль, вероятно, играет различная реактивность организма пострадавших. По имеющимся сведениям [19], значительное снижение экскреции полиаминов у больных с почечной недостаточностью сопровождалось повышением их уровня в крови. Несмотря на то что у обожженных, находящихся в крайне тяжелом состоянии, тоже происходит нарушение функции почек, при сниженной экскреции

Сравнительная характеристика экскреции полиаминов с мочой (в нмоль/сут;  $M \pm m$ ) у больных с термическими ожогами в зависимости от исхода заболевания

Стадия заболевания	Величина поражения, ед.	Исход	n	Спермин	Спермидин	Путресцин	Общий уровень полиаминов
Шок	31—60	Б	4	8,6±2,3	21,5±5,7	25,3±2,5	55,4±10,2
		Л	3	2,9±2,5	3,7±2,0	3,4±2,6	10,0±5,4
	Более 60	Б	6	20,7±9,5	78,8±34,4	42,4±13,4	136,9±54,0
		Л	2	3,9	6,5	4,0	14,4
Токсемия	31—60	Б	6	14,4±5,5	45,6±20,8	69,8±33,5	129,8±59,2
		Л	1	32,6	92,0	83,6	208,2
	Более 60	Б	10	29,6±6,0	104,9±17,7	67,6±10,7	202,1±31,1
		Л	1	5,6	33,8	125,0	164,5
Септикотоксемия	31—60	Б	11	10,6±3,4	51,2±13,8	57,2±17,2	119,0±34,5
		Л	—	—	—	—	—
	Более 60	Б	13	13,3±2,1	57,4±13,3	60,8±14,7	131,5±25,9
		Л	1	43,0	164,0	231,0	438,0

Примечание. Б — благоприятный исход, Л — летальный.

полиаминов накопления их в крови не наблюдалось. Количество полиаминов в крови этих больных составляло  $16,1 \pm 1,77$  нмоль/мл, снижаясь в последние сутки жизни минимум до 10 нмоль/мл.

Таким образом, полученные результаты в сочетании с известными данными свидетельствуют о прямой зависимости полиаминурии от активности биосинтетических процессов у обожженных. Усиленный белковый синтез уже в первые 2 сут от момента травмы наблюдается при благоприятном течении ожоговой болезни. Слабое протекание биосинтетических реакций характерно для большинства обожженных с неблагоприятным исходом. Чрезвычайно высокий уровень полиаминов в моче также является неблагоприятным прогностическим признаком.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бердинских Н. К. Белок-синтезирующий аппарат клеток при опухолевом росте. — Киев, 1983. — С. 93—97.
2. Ворончихина Л. Д., Демьянова В. Т. // Лаб. дело. — 1983. — № 5. — С. 29/31.
3. Глинский Г. В., Залеток С. П. // Экспер. онкол. — 1980. — № 5. — С. 75—79.
4. Заец Т. Л., Берман А. А., Долгина М. И., Зайденберг М. А. // Клин. мед. — 1978. — № 7. — С. 111—113.
5. Кавецкий Р. Е. Взаимодействие организма и опухоли. — Киев, 1977. — С. 101—106.
6. Михайловский В. О., Цякало Л. В., Стогний Н. А., Гулый М. Ф. // Вопр. мед. химии. — 1982. — № 6. — С. 71—75.
7. Монцевичюте-Эрикене Е. В. // Пат. физиол. — 1964. — № 4. — С. 71—78.
8. Рудакова Ю. И. // Биохимические измене-

ния в организме при травме. — М., 1959. — С. 175—181.

9. Рябинин В. Е., Лифшиц Р. И., Чарная Л. Ф. и др. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 3. — С. 113—116.
10. Саломатин В. В., Лифшиц Р. И. // Там же. — С. 120—124.
11. Janne J., Roso H., Raina A. // Biochim. biophys. Acta. — 1978. — Vol. 473. — P. 241—293.
12. Morgan D. M. L. // Polyamines in Biomedical Research. — Chichester, 1980. — P. 285.
13. Nishioka K., Romsdahl M. M. // Clin. chim. Acta. — 1974. — Vol. 57. — P. 155—161.
14. Raina A., Janne J. // Med. Biol. — 1975. — Vol. 53. — P. 121—147.
15. Rennert O. M., Shukla J. B. // Advances in Polyamine Research. — New York, 1978. — Vol. 2. — P. 195—211.
16. Richman R., Dobbins C., Voina S. // J. clin. Invest. — 1973. — Vol. 52. — P. 2007—2015.
17. Richman R. A., Underwood L. E., Van Wyk J. J., Voina S. J. // Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.). — 1971. — Vol. 138. — P. 880—884.
18. Russell D. H. // Clin. Chem. — 1977. — Vol. 23. — P. 22—27.
19. Swendseid N. E., Panaqua M., Kopple J. O. // Life Sci. — 1980. — Vol. 26. — P. 533—539.

Поступила 28.06.86

EXCRETION OF POLYAMINES WITH URINE IN PATIENTS WITH THERMIC BURNS

L. D. Voronchikhina, V. T. Demyanova, N. V. Manzharov

Institute of Hematology and Blood Transfusion, Kirov

Excretion of spermine, spermidine and putrescine with urine was studied in 38 patients (21-79 years old) with thermic burns of various degree. Certain differences were detected in excretion of the polyamines with urine depending on severity, step and outcome of the disease. In the course of the disease both low and extremely high level of the polyamines, found in urine during thermic shock, were unfavourable prognostically.

Н. Е. Полякова, О. А. Громова, И. Б. Цырлов

## ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ИНАКТИВИРУЮЩИХ АГЕНТОВ НА МИКРОСОМНЫЕ ЦИТОХРОМЫ P-450 И P-448

Институт клинической и экспериментальной медицины СО АМН СССР, Новосибирск

Микросомный гемопротеид — цитохром P-450 — является ферментом, ответственным за связывание ксенобиотиков и активирование молекулярного кислорода в реакциях монооксигеназного типа [7]. О гидрофобной природе цитохрома P-450 свидетельствуют избирательная способность детергентов солиобилизовать гемопротеид в функционально активном виде [13], выраженная тенденция к полимеризации изолированных и очищенных от детергента мономеров цитохрома [14], высокое содержание неполярных аминокислотных остатков [6], способность гемопротеида встраиваться в микросомную [15] или фосфолипидную [12] мембрану.

Изучение спектральных и каталитических свойств микросомного гемопротеида связано с выяснением роли гидрофобных взаимодействий цитохрома с компонентами мембраны. Уникальная способность гемопротеида в восстановленном состоянии связывать СО с образованием спектрального комплекса с  $\lambda_{\text{макс}}$  при 450 нм отражает свойство его нативной формы, так как ряд дестабилизирующих микросомную мембрану обработок, ведущих к появлению обычной для гемопротеидов b-типа спектральной формы (так называемый цитохром P-420), сопровождается полной потерей каталитической активности [16]. В настоящее время известны десятки обладающих гидрофобностью веществ, способных вызывать конверсию цитохрома P-450 в P-420. Как полагают, выраженная лабильность цитохрома P-450 обусловлена гидрофобным окружением гема в мембране микросом, которое обеспечивается как определенной конформацией самого гемопротеида, так и липидным компонентом мембраны [21]. Однако большое разнообразие эффективных реагентов затрудняет интерпретацию механизмов конверсии.

Для комплексной оценки сравниваемых гемопротеидов мы использовали конвертирующие агенты с раз-

личной специфичностью действия на микросомы. При этом исходили из данных о том, что *tert*-бутанол в концентрации 10—20 % преимущественно воздействует на липидный компонент микросомной мембраны, а гуанидин в концентрации до 3 М селективно повреждает белковую структуру [9]. Применение дезоксихолата натрия (ДОХ) обусловлено его способностью в концентрации 0,7—2,5 мМ ослаблять гидрофобные взаимодействия компонентов микросомной мембраны [18]. Для выявления роли в конверсии изменения химического строения активного центра использовали химическую модификацию гемопротеидов реагентом на SH-группы мерсалилом [8].

Мы сравнивали устойчивость к конверсии мембранно-связанных гемопротеидов в микросомах печени контрольных, а также индуцированных фенобарбиталом и 3-метилхолантrenom крыс. Можно предполагать, что изменение содержания и каталитических свойств микросомных гемопротеидов при индукциях определенным образом связано с изменением «упаковки» цитохрома P-450 (P-448) в мембране [11, 17, 19].

### Методика

В экспериментах использованы крысы-самцы Wistar массой 180—200 г. Животных содержали на стандартной лабораторной диете, они получали воду *ad libitum* и голодали ночь перед каждым введением индукторов, а также перед умерщвлением. 3-Метилхолантрен (40 мг на 1 кг массы тела) в минимальном объеме растительного масла или фенобарбитал натрия (100 мг на 1 кг массы тела) в 0,9 % растворе NaCl вводили внутривенно в течение соответственно 4 и 5 сут. Животных декапитировали. Получение микросомной фракции печени и определение микросомного белка биуретовым методом проводили, как описано ранее [18, 19].

Дифференциальные спектры микросомных гемопротеидов измеряли на двулучевом сканирующем спектрофотометре «Hitachi-556» (Япония) с регистрацией на X—Y самописце 057. При определении содержания в препаратах цитохромов P-450 и P-448 использовали коэффициент экстинкции  $91 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ , а для цитохрома P-420— $111 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  [16].

Во всех случаях измерения проводили в 0,1 М фосфатном буфере рН 7,4 при температуре 23 °С. При исследовании конвертирующего влияния *tert*-бутанола, гуанидина, дезоксиколата натрия и мерсалила каждый из реагентов в выбранной концентрации инкубировали с микросомами в течение 5 мин, затем в обе кюветы добавляли несколько кристаллов дитионита натрия и после записи изоэлектрической линии содержимое кюветы продували СО<sub>2</sub> в течение 15 с. Регистрацию дифференциальных спектров проводили в каждом случае многократно, используя режим автоматического сканирования в интервале 500—380 нм.

## Результаты и обсуждение

Существуют многочисленные данные о существенной роли интактности структурного компонента микросомной мембраны для реакций связывания субстратов-ксенобиотиков цитохромом Р-450, его восстановления в НАДФХН-зависимой цепи переноса электронов, а также для поддержания спектральных свойств этого гемопротеида [2]. Поскольку индукция микросомных монооксигеназ барбитуратами и полициклическими ароматическими углеводородами включает изменение активности лимитирующих реакций и спектральной характеристики цитохрома [3, 17, 20], можно было полагать, что индукторы частично реализуют свое влияние через изменение

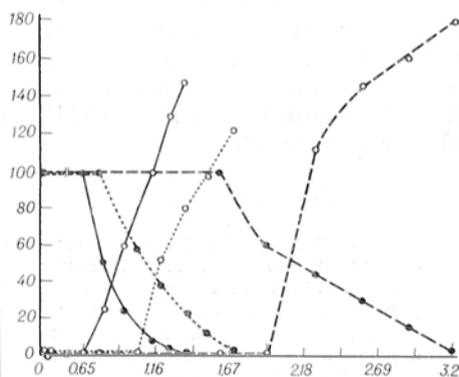


Рис. 1. Сравнение устойчивости контрольных и индуцированных микросомных гемопротеидов к конверсии *tert*-бутанолом.

По оси абсцисс — ммоль *tert*-бутанола/ммоль гемопротеида; по оси ординат — %. Принимали за 100 %: P-450<sub>К</sub> — 0,83 ± 0,05 ммоль/мг белка, P-450<sub>ФБ</sub> — 2,03 ± 0,11 ммоль/мг белка, P-448<sub>МХ</sub> — 1,56 ± 0,09 ммоль/мг белка. Пунктир — контрольные препараты микросом (1 мг белка/мл), сплошная линия — ФБ-микросомы (1 мг белка/мл), точечная — МХ-микросомы (1 мг белка/мл). Темные кружки — исходные микросомные гемопротеиды (P-450<sub>К</sub>, P-450<sub>ФБ</sub>, P-448<sub>МХ</sub>), светлые — инaktivированные гемопротеиды (P-420<sub>К</sub>, P-420<sub>ФБ</sub>, P-420<sub>МХ</sub>).

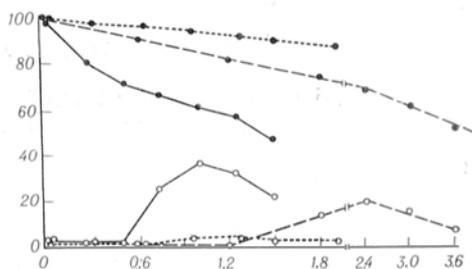


Рис. 2. Сравнение устойчивости контрольных и индуцированных микросомных гемопротеидов к конверсии гуанидином.

По оси абсцисс — ммоль гуанидина/ммоль гемопротеида; по оси ординат — % к контролю. Остальные обозначения здесь и на последующих рисунках те же, что на рис. 1.

взаимоотношения гемопротеида с компонентами мембраны. Известны данные о различной устойчивости микросомных цитохромов Р-450 и Р-448 к воздействиям, дестабилизирующим мембрану [1, 11, 19].

Поскольку *tert*-бутанол в определенном пределе концентраций преимущественно повреждает фосфолипидный компонент мембраны [9], мы использовали этот реагент для выявления роли фосфолипидов в конверсии цитохрома Р-450 в контрольных препаратах микросом (P-450<sub>К</sub>) и в микросомах, выделенных из крыс, индуцированных фенобарбиталом (P-450<sub>ФБ</sub>) и 3-метилхалантреном (P-448<sub>МХ</sub>). Как видно на рис. 1, кривые изменения содержания активной и инактивированной форм цитохромов пересекаются при соотношении спирт/гемопротеид 2,06, 0,84 и 1,16 ммоль соответственно, что свидетельствует о наибольшей чувствительности к *tert*-бутанолу цитохрома Р-450<sub>ФБ</sub>, а наименьшей — P-450<sub>К</sub>. По-видимому, это непосредственно связано с увеличением синтеза и относительного содержания микросомных фосфолипидов при введении крысам фенобарбитала [2, 22]. Кроме того, во всех случаях наблюдается значительное превышение цитохромом Р-420 исходного уровня цитохромов Р-450<sub>К</sub>, P-450<sub>ФБ</sub>, и P-448<sub>МХ</sub>. Полученные данные подтверждают результаты предыдущих работ [4, 19], свидетельствующие об отсутствии стехиометрии при конверсии в условиях направленного воздействия на фосфолипидный компонент микросомной мембраны.

Согласно принятым представлениям, соли гуанидина вызывают в

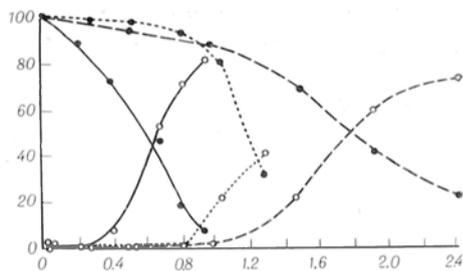


Рис. 3. Сравнение устойчивости контрольных и индуцированных микросомных гемопротендов к конверсии дезоксихолатом натрия.

По оси абсцисс — мкмоль ДОХ/нмоль гемопротенда; по оси ординат — % к контролю.

белках изменение пространственного расположения части звеньев полипептидной цепи и перегруппировку ряда внутримолекулярных водородных связей, которая сопровождается экспонированием функциональных групп; таким образом, выявляется зависимость функциональной активности простетических групп (в данном случае гемовой группы) от состояния полипептидного компонента цитохрома [9]. При добавлении гуанидина в возрастающих концентрациях к контрольным и индуцированным фенобарбиталом микросомам наблюдается снижение содержания P-450<sub>к</sub> и P-450<sub>fb</sub> без увеличения пика абсорбции при 420 нм, пока изменение молярного отношения гуанидин/гемопротенд не достигнет величины 0,48 ммоль/нмоль для P-450<sub>fb</sub> и 1,2 ммоль/нмоль для P-450<sub>к</sub> (рис. 2). Максимальный уровень инактивированной формы цитохрома в этих группах достигается при соотношении 0,97 ммоль/нмоль в микросомах индуцированных животных и 2,4 ммоль/нмоль в препаратах контрольных микросом. Последующее снижение абсорбционных пиков как при 450 нм, так и при 420 нм, очевидно, связано с окислительной деградацией гемовой группы цитохрома P-420 при повреждении структуры гемопротенда гуанидином, так как показано, что обработка гуанидином приводит к образованию высокоспиновой формы P-420, которая неспособна к реконверсии и подвергается окислительному распаду [10, 21]. Практически полная устойчивость P-448<sub>мх</sub> к гуанидину (см. рис. 2) может объясняться устойчивостью структуры самого фермента либо более гидрофобным микроокружением гемовой группы

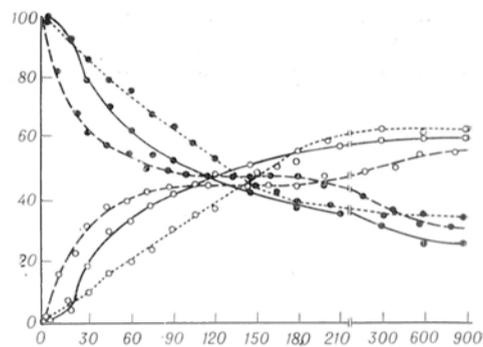


Рис. 4. Сравнительная устойчивость контрольных и индуцированных микросомных гемопротендов к конвертирующему влиянию мерсалила.

По оси абсцисс — нмоль мерсалила/нмоль гемопротенда; по оси ординат — % к контролю.

P-448<sub>мх</sub> в микросомной мембране (подобно наблюдавшемуся в опытах с хаотропным агентом KSCN [11]). В пользу последнего предположения свидетельствуют результаты экспериментов с изолированными и высокоочищенными цитохромами P-450 и P-448, в которых в отличие от микросомных препаратов показана относительно большая устойчивость P-448 к гуанидину по сравнению с P-450.

Известно, что дезоксихолат в концентрации 0,7—2,5 мМ вызывает постепенную конверсию P-450<sub>к</sub> в энзиматически неактивную форму и снижение субстратсвязывающей и электронакцептирующей способности гемопротенда вследствие повреждения гидрофобной зоны мембраны, включающей активный центр гемопротенда [18]. При добавлении возрастающих концентраций ДОХ к микросомам исследуемых групп (рис. 3) показано, что для достижения равного содержания активных и инактивированных форм гемопротендов необходимо использовать соотношение дезоксихолат/гемопротенд (в мкмоль/нмоль), равное соответственно 0,6 и 1,2 для индуцированных фенобарбиталом и 3-метилхолантrenom микросом и только 1,6 — для контрольных препаратов микросом. Это свидетельствует о большей устойчивости P-450<sub>к</sub> к действию детергента. Сходный эффект tert-бутанола (см. рис. 2) и ДОХ (см. рис. 3) позволяет сделать вывод, что ответственными за поддержание спектра цитохрома P-450 гидрофобными связями являются связи гемовой груп-

пы цитохрома с жирнокислотными цепями фосфолипидов [18].

Использование реагента на тиоловые группы мерсалила при исследовании конверсии контрольных и индуцированных микросомных цитохромов было описано ранее [8]. Нами получены результаты, в принципе подтверждающие эти данные (рис. 4). Так, характерно резкое снижение содержания  $P-450_K$  и  $P-450_{ФБ}$  и возрастание уровня  $P-420_K$  и  $P-420_{ФБ}$  в отличие от плавного снижения содержания  $P-448_{МХ}$  и роста уровня  $P-420_{МХ}$ . Из рис. 4 видно, что наибольшей чувствительностью к конвертирующему влиянию мерсалила в расчете молярного отношения мерсалил/гемопротейд характеризуется цитохром  $P-450_{ФБ}$ , а наименьшей —  $P-450_K$ . На основании данных, полученных на изолированных гемопротейдах, можно заключить, что именно такая последовательность отражает реальную относительную чувствительность цитохрома к конвертирующему влиянию SH-реагента.

В работе [8] равное содержание в препарате активной и инактивированной форм наблюдали при молярном соотношении мерсалил/цитохром, равном 60 для индуцированных фенобарбиталом, 70 для индуцированных 3-метилхолантронем и 90 для контрольных микросом. В наших опытах эти соотношения равны соответственно 120, 146 и 190 имольей мерсалила/имоль гемопротейда (см. рис. 4). По-видимому, двукратное расхождение эффективных концентраций реагента объясняется тем, что в работе [8] сначала восстанавливали микросомные гемопротейды дитионитом и продували суспензию  $CO$ , а затем обрабатывали мерсалилом, а в наших опытах подвергали воздействию SH-реагента окисленные микросомы. Известно же, что комплекс  $Na_2S_2O_4-P-450-CO$  более чувствителен к конверсии, чем окисленный гемопротейд.

Характерно, что внутри сравняемой группы гемопротейдов наблюдается такая же относительная чувствительность к конвертирующему эффекту мерсалила, как и при действии  $DOX$ , т. е.  $P-450_{ФБ} > P-448_{МХ} > P-450_K$  (см. рис. 3 и 4). Ранее показано, что при обработке микросом анионными детергентами и SH-реагентами появляется цитохром  $P-420$ ,

имеющий ЭПР-сигнал низкоспинового железа и способный реконвертировать в  $P-450$  в присутствии полиолов или восстановленного глутатиона [10, 21]. Полагают, что сульфид служит лигандом гема цитохрома  $P-450$  и конверсия цитохрома  $P-450$  в  $P-420$  при обработке сульфгидрильными ядами — следствие прямой атаки этими реагентами SH-лиганда [5].

В этой связи совпадение относительной устойчивости микросомных гемопротейдов к действию мерсалила и дезоксихолата натрия позволяет считать, что ответственные за поддержание спектра гемопротейда SH-группы находятся в гидрофобной зоне, образованной фосфолипидами мембраны; менее вероятно участие полипептидных цепей апофермента. Об этом свидетельствует расхождение относительной чувствительности изолированных цитохромов к мерсалилу и гуанидину, а также необходимость использовать большие концентрации мерсалила для конверсии этих гемопротейдов.

Таким образом, показано, что воздействие различных гидрофобных реагентов вызывает едиобразный феномен — конверсию цитохрома  $P-450$  ( $P-448$ ) в энзиматически неактивную форму. Между тем нельзя предполагать одинаковый механизм конверсии, поскольку в каждом случае наблюдается специфичная для данного реагента динамика инактивации микросомного гемопротейда. По-видимому, в зависимости от конкретного реагента точкой приложения может быть либо фосфолипид, либо ассоциированная с ним белковая или простетическая часть цитохрома  $P-450$ . В этой связи результаты изложенных выше экспериментов с *tert*-бутанолом и гуанидином, используемых в пределах концентраций, примененных в работе [9], позволяют предложить модель, когда по динамике конверсии цитохрома  $P-450$  в инактивированную форму  $P-420$  в условиях *in vitro* можно сделать вывод о преимущественном повреждении фосфолипидного (см. рис. 1) или белкового компонента (см. рис. 2) микросомной мембраны.

Представленные в статье данные свидетельствуют о решающей роли «первичной мишени», т. е. макромолекулы, атакуемой конвертирующими агентами. Поскольку среди последних

известны продукты внутриклеточного метаболизма и проникающие в клетку токсичные ксенобиотики и яды, можно наметить подходы для понимания инактивации микросомных монооксигеназ как клеточного явления.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Громова О. А., Захарова Н. Е., Ляхович В. В., Цырлов И. Б. // Биол. экпер. биол. — 1977. — № 5. — С. 553—555.
2. Ляхович В. В., Цырлов И. Б. Структурные аспекты биохимии монооксигеназ. — Новосибирск. — 1978.
3. Ляхович В. В., Цырлов И. Б. Индукция ферментов метаболизма ксенобиотиков. — Новосибирск, 1981.
4. Ляхович В. В., Цырлов И. Б., Мишин В. М., Громова О. А. // Биохимия. — 1973. — Т. 38. — С. 897—900.
5. Райхман Л. М., Аннаев Б., Мамедниязов О. Н., Розанцев Э. Г. // Биофизика. — 1973. — Т. 18. — С. 228—233.
6. Coon M., Chiang Y. L., French J. S. // Induction of Drug Metabolism / Eds. R. W. Estabrook, E. Lindenlaub. — Stuttgart, 1979. — P. 201—211.
7. Estabrook R. W., Baron J., Peterson J. A., Ishimura Y. // Biological Hydroxylation Mechanisms / Eds. G. S. Boyd, R. Smellie. — London, 1972. — P. 159—185.
8. Franklin M. // Molec. Pharmacol. — 1972. — Vol. 8. — P. 711—730.
9. Grisham C. M., Barnett R. E. // Biochim. biophys. Acta. — 1972. — Vol. 266. — P. 613—624.
10. Ichikawa Y., Yamano T. // Ibid. — 1970. — Vol. 200. — P. 220—240.
11. Imai Y., Siekevitz Ph. // Arch. Biochem. — 1971. — Vol. 144. — P. 143—159.
12. Ingelman-Sundberg M., Johansson I., Hansson A. // Acta biol. med. germ. — 1979. — Bd 38. — S. 379—388.
13. Lu A. Y. H., Levin W. // Biochim. biophys. Acta. — 1974. — Vol. 344. — P. 205—240.
14. Lu A. Y. H., West S. B. // Hepatic Cytochrome P-450 Monooxygenase System / Eds. J. Schenkman, A. D. Kupfer. — Oxford, 1982. — P. 523—544.
15. Miwa G. T., West S. B., Lu A. Y. H. // J. biol. Chem. — 1978. — Vol. 253. — P. 1921—1929.
16. Omura T., Sato R. // Ibid. — 1964. — Vol. 239. — P. 2370—2385.
17. Parke D. // Enzyme Induction. — London, 1975. — P. 207—271.
18. Tsyrllov I. B., Gromova O. A., Lyakhovich V. V. // Biochem. J. — 1976. — Vol. 160. — P. 75—83.
19. Tsyrllov I. B., Polyakova N. E., Gromova O. A. et al. // Biochem. Pharmacol. — 1979. — Vol. 28. — P. 1473—1478.
20. Tsyrllov I. B., Zakharova N. E., Gromova O. A., Lyakhovich V. V. // Biochim. biophys. Acta. — 1976. — Vol. 421. — P. 44—56.
21. Yamano T., Ichikawa Y. // Hepatic Cytochrome P-450 Monooxygenase System / Eds. J. Schenkman, A. D. Kupfer. — Oxford, 1982. — P. 449—468.
22. Young D. L., Powell G., McMillan W. // J. Lipid. Res. — 1971. — Vol. 12. — P. 1—11.

Поступила 17.09.86

#### INFLUENCE OF VARIOUS AGENTS ON THE MICROSOMAL CYTOCHROMES P-450 AND P-448

N. E. Polyakova, O. A. Gromova, I. B. Tsyrllov

Institute of Clinical and Experimental Medicine, Siberian Branch of the Academy of Medical Sciences of the USSR, Novosibirsk

The properties of tert-butanol, sodium deoxycholate, guanidine and mersalyle to convert microsomal cytochromes P-450 and P-448 into enzymatically inactive form P-420 were studied under comparable conditions. Phenobarbital-induced cytochrome P-450 was especially sensitive to the influence of all the agents studied, while cytochrome P-450 from untreated animals was the least sensitive; the 3-methylcholanthrene-induced cytochrome P-448 exhibited the least sensitivity to guanidine. The dynamics of changes in content of active and inactive hemoprotein forms after *in vitro* treatment with the suitable agent might serve as a criterion for estimation whether the phospholipid or protein component of microsomal membrane was damaged.

УДК 616-005.1-036.11-036.882-08-036.8-07:616.12-008.933.15-39

В. Т. Долгих

#### ВЛИЯНИЕ ОСТРОЙ СМЕРТЕЛЬНОЙ КРОВОПОТЕРИ НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ СЕРДЦА В ПОСТРЕАНИМАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ

Омский медицинский институт

В раннем восстановительном периоде независимо от причины, вызвавшей клиническую смерть, отчетливо выявляются фазные изменения со стороны сердечно-сосудистой системы: кратковременная (5—10 мин) гипердинамия сменяется относительной

нормализацией кровообращения, а через 30 мин развиваются длительная гиподинамия и синдром низкого сердечного выброса [7, 17]. Не исключено, что в формировании этого синдрома наряду с экстракардиальными факторами [9, 17] существенная, а

возможно, и ключевая роль принадлежит повреждению самой сердечной мышцы и в первую очередь фосфолипидной основы мембран продуктами перекисного окисления липидов (ПОЛ), образующимися в избытке во время гипоксии, ишемии и последующей реоксигенации [2, 14].

Цель работы — изучение состояния процессов ПОЛ в сердце после острой смертельной кровопотери и оценка патогенетической значимости нарушений системы ПОЛ в постреанимационной сердечной недостаточности.

### Методика

Опыты проведены на 370 беспородных крысах-самцах массой 180—210 г, содержащихся на обычном рационе. Животных наркотизировали нембуталом. 4-минутную клиническую смерть вызывали острой кровопотерей из сонной артерии, а оживление осуществляли центрипетальным пагнетанием выпущенной крови и искусственной вентиляцией легких. Регистрировали ЭКГ и ритмограмму сердца. Металлическими щипцами, охлажденными в жидком азоте, извлекали сердца для биохимических исследований в конце периода клинической смерти, а также через 5, 15, 30 и 90 мин, 3 и 6 ч, 1, 3, 7, 14, 21 и 30 сут после оживления. В постмитохондриальной фракции сердца определяли активность супероксиддисмутазы [19], каталазы [26], глутатионпероксидазы [27], глутатионредуктазы [28] и содержание белка по Лоури. В липидном экстракте определяли содержание общих липидов [21], гидроперекисей липидов [20], триеновых карбоновых соединений — ТКС [29], флуоресцирующих шиффовых оснований [22], антиокислительную активность липидов [25] и уровень неэстерифицированных жирных кислот (НЖК) [23]. Результаты обработаны статистически с использованием критерия Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

Продолжительность умирания составила  $4,8 \pm 0,5$  мин, кровопотеря —  $41 \pm 1,5$  мл/кг. Первые сердечные сокращения появились через  $1,8 \pm 0,12$  мин после начала оживления, первый вдох — через  $13,9 \pm 0,6$  мин. Роговичные рефлексы восстанавливались через  $23,9 \pm 1,8$  мин.

Из 347 подопытных животных (в их число не входят 12 контрольных и 11 крыс, у которых сердце было извлечено в конце периода клинической смерти) после кровопотери в разные сроки погибли 178 (51,3%), причем летальность за 1-е сутки достигала 31,4%. Выжившие крысы были разделены на 2 группы: с благоприятным (I) и неблагоприятным (II) течением

постреанимационного периода. В основу такого деления были положены дефицит неврологического статуса [13] и общее состояние животных.

Результаты биохимических исследований приведены в таблице. Сердечной мышце интактных животных присущ низкий, но вполне определенный уровень ПОЛ, о чем можно судить по содержанию гидроперекисей липидов, шиффовых оснований и ТКС. Благодаря стационарному уровню протекания процессов ПОЛ, поддерживаемых активными формами кислорода, образующимися в тканях постоянно в результате нормального функционирования окислительно-восстановительных ферментных систем [8], в организме осуществляются физиологическая репарация клеточных мембран, регуляция ионного транспорта [2], регуляция процесса размножения клеток [1], биосинтез гормонов, простагландина  $E_1$ , тромбоксанов и другие физиологические процессы [3, 12]. Факторами, сдерживающими процессы ПОЛ в сердечной мышце (см. таблицу), являются достаточно высокая активность антиоксидантных ферментов и наличие биоантиоксидантов, определяющих уровень антиокислительной активности (АОА) липидов.

У подопытных животных уровень гидроперекисей липидов, ТКС и шиффовых оснований повышается в сердце уже к концу клинической смерти, а с началом реанимационных мероприятий и реоксигенации организма процессы ПОЛ усиливаются в еще большей степени, о чем свидетельствует дальнейшее увеличение содержания продуктов ПОЛ, особенно у животных с тяжелым течением постреанимационного периода. Содержание продуктов ПОЛ в сердечной мышце у этих животных превышает в 2,5—3 раза контрольный уровень и в 1,5—2 раз показатели у крыс с благоприятным течением восстановительного периода.

Прекращение кровообращения и оксигенации организма и сердца, в частности во время клинической смерти, выключает дыхательную цепь митохондрий, что приводит к восстановлению ИАД в НАД·Н, высвобождению ферритина и  $Fe^{2+}$  из мембран и попаданию их в цитозоль, а также к неполному восстановлению растворенного в липидном матрикс мембран

Влияние клинической смерти на процессы перекисного окисления липидов в миокарде в постреанимационном периоде ( $M \pm m$ )

Этап эксперимента	Группа животных (в скобках — число животных)	Гидроперекиси липидов, нмоль/мг	Шиффовые основания, ед/мг	ТКС, нмоль/мг	Антиокислительная активность липидов, мк-экв/г	НЖК, мк-экв/г
Контроль	(12)	1,56 ± 0,061	3,43 ± 0,18	0,25 ± 0,014	11,1 ± 0,66	0,36 ± 0,023
	(11)	2,99 ± 0,258***	5,47 ± 0,56**	0,48 ± 0,046***	5,6 ± 0,29***	0,62 ± 0,103*
Клиническая смерть						
Постреанимационный период:						
5 мин	(11)	2,47 ± 0,213***	6,67 ± 0,41***	0,35 ± 0,025**	4,3 ± 0,24***	0,39 ± 0,057
15 мин	(15)	2,71 ± 0,277***	7,35 ± 0,41***	0,41 ± 0,055*	4,0 ± 0,26***	0,45 ± 0,029*
30 мин	I (13)	2,48 ± 0,184***	3,95 ± 0,34	0,40 ± 0,042**	2,3 ± 0,14***	0,45 ± 0,036*
90 мин	II (5)	3,86 ± 0,192*****	12,04 ± 1,62*****	0,66 ± 0,025*****	1,8 ± 0,11***	0,97 ± 0,132*****
	I (9)	2,57 ± 0,192***	5,25 ± 0,61**	0,45 ± 0,033***	2,8 ± 0,24***	0,44 ± 0,047
3 ч	II (5)	3,69 ± 0,241*****	11,13 ± 1,15*****	0,68 ± 0,085***	2,0 ± 0,12***	1,05 ± 0,179***
	I (9)	2,77 ± 0,283***	4,10 ± 0,31	0,40 ± 0,051*	4,8 ± 0,33***	0,55 ± 0,069*
6 ч	II (5)	4,81 ± 0,433*****	7,42 ± 0,85*****	0,68 ± 0,087*****	3,1 ± 0,22***	0,90 ± 0,067*****
	I (12)	3,23 ± 0,160***	6,10 ± 0,20***	0,48 ± 0,031***	5,1 ± 0,43***	0,41 ± 0,032
1 сут	II (5)	5,02 ± 0,392*****	8,79 ± 0,68***	0,69 ± 0,063*****	3,5 ± 0,32***	0,62 ± 0,015*****
	I (12)	2,44 ± 0,148***	3,49 ± 0,38	0,34 ± 0,032*	6,4 ± 0,40***	0,24 ± 0,029**
3 сут	II (5)	3,96 ± 0,593***	8,13 ± 0,80***	0,64 ± 0,140**	3,0 ± 0,16***	0,45 ± 0,041***
	I (10)	2,60 ± 0,133***	4,17 ± 0,54	0,37 ± 0,041*	7,5 ± 0,48***	0,31 ± 0,044
7 сут	II (6)	4,01 ± 0,292***	9,20 ± 1,02***	0,59 ± 0,037***	3,8 ± 0,24***	0,56 ± 0,199
	I (9)	2,13 ± 0,064***	3,96 ± 0,23	0,41 ± 0,021***	6,4 ± 0,55***	0,40 ± 0,031
14 сут	II (4)	3,85 ± 0,311***	7,98 ± 0,63***	0,80 ± 0,045***	4,0 ± 0,33***	0,54 ± 0,062*
	I (10)	2,88 ± 0,161***	4,39 ± 0,29*	0,42 ± 0,031***	12,2 ± 0,74	0,35 ± 0,026
21 сут	II (4)	4,24 ± 0,274***	13,37 ± 1,12***	0,61 ± 0,081***	7,6 ± 0,45*****	0,44 ± 0,031*
	(10)	2,10 ± 0,172*	3,80 ± 0,41	0,31 ± 0,027	14,6 ± 1,10*	0,41 ± 0,049
1 мес	(10)	1,77 ± 0,187	3,71 ± 0,48	0,22 ± 0,026	13,3 ± 0,86	0,36 ± 0,052

Продолжение

Этап эксперимента	Группа животных (в скобках — число животных)	Супероксиддисмутаза, ед/мг/мин	Каталаза, ед/мг/мин	Глутатионпероксидаза, нмоль/мг/мин	Глутатионредуктаза, нмоль/мг/мин
Контроль	(12)	3,41 ± 0,21	86,0 ± 6,08	7,18 ± 0,49	4,94 ± 0,32
	(11)	1,58 ± 0,20***	19,5 ± 2,43***	4,92 ± 0,33**	4,10 ± 0,40
Клиническая смерть					
Постреанимационный период:					
5 мин	(11)	2,42 ± 0,15***	48,6 ± 4,03***	6,86 ± 0,51	3,66 ± 0,35*
15 мин	(15)	3,56 ± 0,36	35,5 ± 4,06***	5,93 ± 0,40	3,38 ± 0,31**
30 мин	I (13)	2,90 ± 0,16*	66,4 ± 6,51*	5,59 ± 0,33*	4,00 ± 0,27*
90 мин	II (5)	1,28 ± 0,10*****	48,4 ± 4,02***	3,58 ± 0,40*****	2,72 ± 0,20***
	I (9)	2,62 ± 0,19*	70,1 ± 6,45	4,50 ± 0,23***	3,90 ± 0,34*
3 ч	II (5)	1,52 ± 0,11*****	47,2 ± 5,52***	3,56 ± 0,37***	2,40 ± 0,17***
	I (9)	4,52 ± 0,33*	67,2 ± 6,93	6,57 ± 0,51	3,08 ± 0,26***
	II (5)	1,25 ± 0,16*****	54,2 ± 4,31**	4,03 ± 0,36*****	2,63 ± 0,21***

Этап эксперимента	Группа животных (в скобках — число животных)	Супероксиддисмутаза, ед/мг/мин	Каталаза, ед/мг/мин	Глутатионпероксидаза, нмоль/мг/мин	Глутатионредуктаза, нмоль/мг/мин
6 ч	I (12)	3.80 ± 0.22	79.5 ± 7.62	5.51 ± 0.43	2.86 ± 0.24***
1 сут	II (5)	1.53 ± 0.11***+++	48.8 ± 3.53***+++	1.20 ± 0.40***+	2.21 ± 0.20***
	I (12)	3.29 ± 0.19	102.5 ± 9.33	6.78 ± 0.51	2.43 ± 0.30***
3 сут	II (5)	1.72 ± 0.15***+++	73.5 ± 7.81+	4.21 ± 0.37***+++	1.84 ± 0.14***
	I (10)	3.15 ± 0.18	93.4 ± 9.53	6.19 ± 0.51	2.70 ± 0.18***
7 сут	II (6)	2.06 ± 0.16***+++	43.5 ± 3.21***+++	4.30 ± 0.35***+	1.63 ± 0.14***++
	I (9)	2.41 ± 0.14**	71.3 ± 6.52	6.32 ± 0.45	2.66 ± 0.15***
14 сут	II (4)	2.15 ± 0.13***	37.8 ± 3.02***+++	3.95 ± 0.3***+++	1.56 ± 0.12***+++
	I (10)	2.67 ± 0.21*	58.7 ± 5.53**	5.67 ± 0.38*	2.70 ± 0.21***
21 сут	II (4)	1.93 ± 0.12***+++	38.0 ± 3.11***+++	4.06 ± 0.29***	1.64 ± 0.13***+++
1 мес	I (10)	6.87 ± 0.45***	81.5 ± 6.94	5.50 ± 0.33*	1.79 ± 0.19***
	II (10)	4.49 ± 0.35	109.0 ± 8.15	6.69 ± 0.52	2.85 ± 0.20***

Примечание. Достоверность различий с контролем отмечена звездочками, а между группами — плюсами: \*,  $^+P < 0.05$ ; \*\*,  $^{++}P < 0.01$ ; \*\*\*,  $^{+++}P < 0.001$ .

кардиомиоцитов молекулярного кислорода, что сопряжено с образованием активных форм кислорода: супероксидных радикалов, перекиси водорода, гидроксильных радикалов [2, 16]. Образовавшиеся в избытке активные формы кислорода и свободные радикалы реагируют с НЖК фосфолипидов мембран, образуя перекисные соединения. Появление перекисных группировок в углеводных цепочках НЖК, входящих в фосфолипиды мембран, приводит к нарушению и ослаблению гидрофобных связей в мембранах, разрыхлению мембран, появлению в них гидрофильных «пор», к ингибированию мембраносвязанных липидзависимых ферментов [4, 11].

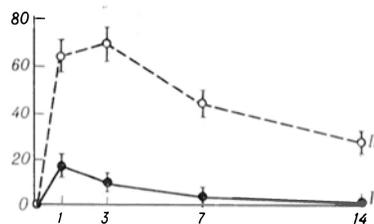
Усиление липоперекисления и избыточное накопление продуктов ПОЛ в миокарде во время клинической смерти сопряжены с ингибированием ферментной системы антиоксидантной защиты, ключевым компонентом которой является супероксиддисмутаза. Активность этого фермента, обезвреживающего супероксидные анион-радикалы путем их дисмутации и превращения в менее реакционноспособные молекулы перекиси водорода и триплетного кислорода, снижается более чем в 2 раза, а активность каталазы, разрушающей перекись водорода, — в 4,5 раза. Активность глутатионпероксидазы, разрушающей липидные перекиси без образования свободнорадикальных продуктов и тем самым исключаяющей возможность окислительного повреждения клеточных компонентов при распаде перекиси, оказалась также сниженной. Усиление процессов ПОЛ способствует снижению в 2 раза АОО липидов, отражающей запасы антиоксидантов в миокарде, которые, взаимодействуя с радикалами, «преодолевающими» ферментативный антиоксидантный барьер, замедляют или обрывают цепной свободнорадикальный процесс.

Накопление в миокарде продуктов ПОЛ в известной степени обусловлено изменением структурного фактора, или так называемого структурного антиоксиданта [12], характеризующегося строго определенным размещением в мембране составляющих ее элементов, предохраняющих липидный компонент мембраны от радикальной атаки. Этому также способ-

ствуется развившаяся при гипоксии дезэнергизация митохондрий, сопровождающаяся выбросом в цитоплазму  $\text{Ca}^{2+}$ , активацией этими ионами фосфолипазы  $\text{A}_2$ , разрушающей фосфолипидную основу мембран [18]. Кроме того, гиперкатехоламинемия и гипоксия, усиливая липолиз, увеличивают на 72 % уровень НЖК в сердечной мышце, которые, как известно, являются субстратом липоперекисления.

В первые минуты оживления с началом рециркуляции и реоксигенации организма количество кислорода, растворенного в липидном матриксе митохондрий миокарда, резко увеличивается и закономерно повышается вероятность реакции молекулярного кислорода с восстановленными переносчиками дыхательной цепи [24]. В итоге происходит еще большее усиление образования свободных радикалов с дальнейшим вовлечением фосфолипидов мембран в цепные свободнорадикальные реакции, продолжают усиленно расходоваться антиоксиданты (АОА липидов снижается в еще большей степени). Активность заблочно-окисленных во время клинической смерти антиоксидантных ферментов несколько повышается, но не достигает контрольного уровня.

Через 15 мин после оживления отмечают дальнейшее увеличение (в сравнении с 5-минутным периодом после реанимации) содержания гидроперекисей липидов, ТКС и шиффовых оснований на фоне пониженной активности каталазы и глутатионпероксидазы и уменьшенных запасов антиоксидантов. По времени это совпадает с угнетением сократительной функции миокарда и формированием синдрома низкого сердечного выброса [2, 6] вследствие повреждения систем транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  и митохондрий продуктами ПОЛ [5, 15]. Известно, что системы транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  в мембранных структурах сердца обладают исключительно высокой чувствительностью к ПОЛ: незначительное накопление продуктов ПОЛ в саркоплазматическом ретикулуме и сарколемме сердца приводит к выраженному ингибированию  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортирующей способности, обусловленному разобщением гидролиза АТФ с транспортом  $\text{Ca}^{2+}$  [11]. Токсическое действие продуктов ПОЛ заключается в их



Динамика неврологического статуса крыс после оживления.

I и II — группы животных соответственно с благоприятным и неблагоприятным течением постреанимационного периода. По оси абсцисс — время после оживления (в сут); по оси ординат — оценка неврологического статуса (в баллах).

способности инактивировать SH-группы белков, разобщать и подавлять окислительное фосфорилирование, вызывать деформацию, набухание, слипание и даже полное разрушение митохондрий [2], что нарушает энергетическое обеспечение сократительной функции миокарда.

С 30-й минуты по интенсивности протекания процессов ПОЛ в сердце отчетливо выявляются 2 группы животных: в  $2/3$  случаев отмечаются умеренные активация процессов ПОЛ и накопление продуктов липоперекисления (I — животные с благоприятным течением постреанимационного периода и меньшим дефицитом неврологического статуса в более поздние сроки — см. рисунок), в  $1/3$  случаев наблюдаются выраженная активация ПОЛ и значительное накопление в миокарде гидроперекисей, ТКС и шиффовых оснований (II — животные с неблагоприятным течением постреанимационного периода и выраженным дефицитом неврологического статуса).

Как видно из таблицы, для постреанимационного периода независимо от группы животных характерно чередование периодов значительного усиления (90 мин, 6 ч, 1—3, 14 сут) и снижения (3 ч, 7, 21 и 30 сут) интенсивности липоперекисления и соответствующих изменений содержания гидроперекисей липидов, ТКС и шиффовых оснований. Характерно, что уровень антиоксидантов в сердечной мышце животных независимо от группы имел минимальные значения в первые 90 мин после оживления, а позднее на фоне повышения активности антиоксидантных ферментов, особенно в I группе, АОА липидов постепенно увеличивалась, однако в тече-

ние 1-й недели постреанимационного периода контрольного уровня так и не достигла. Лишь через 2—3 нед величина АОА свидетельствовала об относительной насыщенности миокарда биоантиоксидантами (соответственно 110 и 131% от контрольного уровня АОА липидов). Полной нормализации ПОЛ не наступало и к концу 1-го месяца после оживления, хотя через 3 нед разница между одноименными показателями в изучаемых группах отсутствовала и поэтому они были объединены в одну. Достаточно высокая активность ПОЛ в этот период вызвана, очевидно, интенсивно протекающими репаративными процессами [10].

Таким образом, чрезмерная активация ПОЛ, особенно в раннем периоде оживления, и накопление токсических продуктов, способных нарушать структурную целостность и функциональную активность липидов и липидзависимых ферментов мембран кардиомиоцитов, являются одним из ключевых звеньев патогенеза постреанимационной недостаточности сердца.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте. / Буракова Е. Б., Алесенко А. В., Молочкина Е. М. и др. — М., 1975.
2. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М., 1972.
3. Воскресенский О. П., Жутаев И. А., Бобырев В. П. и др. // Вопр. мед. химии. — 1982. — № 1. — С. 14—27.
4. Даленов В. С., Ситковский М. В., Каган В. Е. и др. // Изв. АН СССР. Серия биол. — 1971. — № 4. — С. 574—579.
5. Долгих В. Т. // Бюл. Сиб. отд. АМН СССР. — 1984. — № 4. — С. 10—17.
6. Долгих В. Т. // Пат. физиол. — 1984. — № 1. — С. 45—50.
7. Долгих В. Т., Корпачев В. Г. // Анест. и реаниматол. — 1978. — № 2. — С. 37—44.
8. Дубинина Е. Е., Сильникова Л. А., Раменская Н. П. и др. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 5. — С. 28—33.
9. Евтушенко А. Я. // Вопросы патогенеза и экспериментальной терапии ишемических и постинфарктных состояний. — Кемерово, 1981. — С. 3—9.
10. Ескунов П. П., Семченко В. В. // Арх. анат. — 1982. — № 1. — С. 53—58.
11. Каган В. Е., Савов В. М., Диденко В. В.

- и др. // Бюл. exper. биол. — 1983. — № 4. — С. 46—48.
12. Козлов Ю. П. // Биоантиокислители. — М., 1975. — С. 5—14.
  13. Лысенков С. П., Корпачев В. Г., Тель Л. З. // Клиника, патогенез и лечение неотложных состояний. — Новосибирск, 1982. — С. 8.
  14. Меерсон Ф. З. Адаптация, стресс и профилактика. — М., 1981.
  15. Меерсон Ф. З., Долгих В. Т. // Кардиология. — 1982. — № 10. — С. 38—43.
  16. Меерсон Ф. З., Каган В. Е., Козлов Ю. П. и др. // Там же. — № 2. — С. 81—93.
  17. Неговский В. А., Гурвич А. М., Золотокрылина Е. С. Постреанимационная болезнь. — М., 1979.
  18. Сороковой В. И., Владимиров Ю. А. // Биофизика. — М., 1975. — Т. 5. — С. 11—55.
  19. Чумаков В. П., Осинская Л. Ф. // Вопр. мед. химии. — 1977. — № 5. — С. 712—716.
  20. Bolland L. L., Koch H. P. // J. Chem. Soc. — 1945. — N 7. — P. 445—451.
  21. Bragdon J. H. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 190, N 2. — P. 513—517.
  22. Csallany A. S., Ayal K. U. // Lipids. — 1976. — Vol. 11. — P. 412—417.
  23. Duncombe W. G. // Clin. chim. Acta. — 1964. — Vol. 9. — P. 122—125.
  24. Gauduel I. Y., Duvelloy M. A. // Oxygen Transport to Tissue. — New York, 1984. — P. 421—431.
  25. Glavind J. // Acta chem. scand. — 1963. — Vol. 17. — P. 1635—1640.
  26. Hübl P., Bretschneider R. // Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. — 1964. — Bd 335. — S. 146—155.
  27. Paglia D. E., Valentine W. N. // J. Lab. clin. Med. — 1967. — Vol. 70. — P. 158—169.
  28. Racker E. // J. biol. Chem. — 1955. — Vol. 217. — P. 855—865.
  29. Silvestein R. M., Bassler G. C. Spectrometric Identification of Organic Compounds. — London, 1963.

Поступила 04.04.86

#### EFFECT OF ACUTE LETHAL HEMORRHAGE ON LIPID PEROXIDATION IN HEART DURING POSTRESUSCITATION PERIOD

V. T. Dolgikh

Medical School, Omsk

Distinct increase in lipid peroxidation was found in myocardium of rats, subjected to acute hemorrhage followed by clinical death. Inhibition of the enzymatic system, protecting cells from free radicals influence, as well as a decrease of the bioantioxidants content in myocardium correlated with activation of lipid peroxidation. Content of lipid hydroperoxides, trionic carbonyls and Schiff bases achieved especially high level under unfavourable conditions of the postresuscitation period.

Е. А. Косенко, Ю. Г. Каминский, М. С. Гончаренко

## АДЕНИННУКЛЕОТИДЫ И АДЕНИЛАТНЫЙ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ЗАРЯД В ЭРИТРОЦИТАХ ПРИ ПСОРИАЗЕ

Институт биологической физики АН СССР, Пущино, НИИ дерматологии и венерологии  
Минздрава УССР, Харьков

Энергетическое состояние клетки определяется стационарными концентрациями АТФ, АДФ, АМФ и суммарной концентрацией адениннуклеотидов и контролируется аденилатным энергетическим зарядом — отношением  $(\text{АТФ} + \frac{1}{2}\text{АДФ})/(\text{АТФ} + \text{АДФ} + \text{АМФ})$  [4, 5]. Гипотеза об аденилатном контроле энергетического обмена основана на предположениях, что небольшие изменения энергетического заряда должны вызывать мощные активности ферментов, которые утилизируют или генерируют АТФ, и что активность аденилаткиназы в клетке достаточна для поддержания равновесия между индивидуальными адениннуклеотидами [4, 5].

Псориаз является общим заболеванием кожи неизвестной этиологии, с неизвестным биохимическим дефектом. Многочисленные исследования показали, что при псориазе скорость, с которой пролиферируют клетки эпидермиса, в значительной (до 10-кратной) степени возрастает [9, 10]. Это означает, что энергетический обмен в эритроцитах, выполняющих, в частности, функцию переноса аденозина между печенью и периферическими тканями, в том числе для обеспечения потребности регенерирующего эпидермиса в пуринах [17], должен интенсифицироваться при псориазе.

Информация о природе и степени изменений в метаболитах эритроцитов при псориазе крайне ограничена, а данные о концентрациях адениннуклеотидов в эритроцитах почти отсутствуют в литературе. Этот аспект энергетического обмена заслуживает, однако, определенного внимания, так как влияние повреждения кожи на энергетическое состояние эритроцитов может быть оценено просто и прямо — путем измерения внутриклеточных концентраций АТФ, АДФ и АМФ биохимическими методами и вычисления энергетического заряда. Величина энергетического заряда указывает на то, способна ли клетка данного типа

выполнять энергозависимые процессы, например транспорт ионов и биосинтезы [4, 5]. Поэтому задачу данной работы было определением указанных показателей обмена адениннуклеотидов в эритроцитах больных псориазом и здоровых людей.

### Методика

Для анализов брали кровь больных псориазом и здоровых людей, используя часть материала, отобранного из вены утром натощак в биохимической лаборатории клиники. Непосредственно из гепаринизированного шприца кровь переносили в мерные пробирки, которые немедленно погружали в жидкий азот. В таком виде отобранный материал накапливали и сохраняли в течение 1—4 нед перед биохимическим анализом.

К цельной крови и сыворотке немедленно после размораживания при комнатной температуре добавляли охлажденную до  $-18^\circ\text{C}$  смесь 8 % хлорной кислоты и 40 % этилового спирта (1,5 мл смеси на 0,5 мл крови или сыворотки). Экстракцию адениннуклеотидов проводили на тающем льду при постоянном перемешивании в течение 10 мин. Реакционную смесь центрифугировали при 10 000  $\text{g}$  в  $-10^\circ\text{C}$  в течение 10 мин, надосадочную жидкость нейтрализовали 30 % раствором КОН при непрерывном перемешивании и на льду. Образующиеся кристаллы  $\text{KClO}_4$  удаляли вторичным центрифугированием.

В нейтрализованных экстрактах определяли концентрации АТФ, АДФ и АМФ ферментативными методами, описанными ранее [12].

В экспериментах *in vitro* использовали кровь других здоровых и больных людей. Свежевыделенные эритроциты отмывали 3 раза в солевом растворе, содержащем 0,14 М NaCl, 2 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 10 мМ трис-НСl (рН 7,4) и 5 мМ глюкозу, и инкубировали при  $37^\circ\text{C}$  в среде следующего состава: 0,12 М NaCl, 3 мМ KCl, 2 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1,2 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 50 мМ трис-НСl (рН 7,4) и 10 мМ глюкозу (по [1]). После инкубации в течение 1—5 ч отбирали часть суспензии клеток для определения АТФ.

Тени эритроцитов готовили следующим образом. 4 мл отмытых эритроцитов смешивали с 20 мл охлажденного до  $0-2^\circ\text{C}$  раствора, содержащего 2 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1 мМ АТФ и 10 мМ трис-НСl (рН 7,4). После 5 мин инкубации на холоде в полученный гемолизат добавляли NaCl до конечной концентрации 0,15 М и оставляли на 10 мин для реставрации клеточных мембран. Замкнутые тени эритроцитов отделяли от незамкнутых дополнительной инкубацией при  $37^\circ\text{C}$  в течение 15 мин (способствующей дальнейшему разрушению

незамкнутой тени эритроцитов) и центрифугированием при 10 000 g в течение 5 мин. Полученные таким образом тени эритроцитов промывали 3—4 раза (по 5 мин при 10 000 g) в среде их инкубации, содержащей 0,14 M NaCl, 10 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM АТФ и 10 mM трис-HCl (pH 7,4).

Активность Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-стимулируемой АТФазы в эритроцитарных мембранах измеряли при 37 °С по высвобождению <sup>33</sup>P<sub>i</sub> из <sup>33</sup>P-γ-АТФ. 0,5 мл тени эритроцитов инкубировали в 5,5 мл инкубационной среды, в которую добавляли 50 мкл <sup>33</sup>P-γ-АТФ (2,8 мКи/мл), в присутствии или в отсутствие 1 mM уабина. После 30 или 60 мин инкубации реакцию останавливали добавлением 0,5 мл холодной концентрированной хлорной кислоты и содержимое смешивали с 1 мл 20 % водной суспензии древесного угля (адсорбирующего адениннуклеотиды, в том числе меченные радиоактивными изотопами, но не взаимодействующего со свободным P<sub>i</sub> [7]). Затем древесный уголь осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 3000 g и 0 °С. 0,5 мл надосадочной жидкости смешивали с 4 мл сцинтилляционной жидкости и измеряли радиоактивность <sup>33</sup>P<sub>i</sub> на счетчике проточного типа 4 Пи. Активность Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы вычисляли как разность активности фермента, измеренной в отсутствие и в присутствии уабина, и выражали в импульсах в минуту на 1 мл суспензии тени эритроцитов.

Результаты обрабатывали статистически по *t*-критерию Стьюдента.

## Результаты и их обсуждение

В таблице приведены концентрации АТФ, АДФ и АМФ, измеренные в крови здоровых людей и больных псориазом в период обострения заболевания. Оказалось, что содержание АТФ в цельной крови больных на 71 % выше, чем у здоровых людей. Концен-

Концентрация адениннуклеотидов и аденилатный энергетический заряд в крови больных псориазом и здоровых людей

Показатель	Контрольная группа (n=7)	Больные псориазом в период обострения (n=11)
АТФ	0,311±0,048	0,531±0,014*
АДФ	0,084±0,011	0,92±0,005
АМФ	0,045±0,010	0,040±0,005
АТФ+АДФ+АМФ	0,500±0,023	0,662±0,015*
Энергетический заряд	0,78±0,03	0,86±0,01**
АТФ×АМФ/АДФ <sup>2</sup>	3,18±0,22	5,60±0,50**

Примечание. Концентрации АТФ, АДФ и АМФ выражены в миллимолях на 1 мл цельной крови. АТФ·АМФ/АДФ<sup>2</sup> — отношение действующих масс аденилаткиназной реакции. 1 звездочка — P<0,001, 2 звездочки — P<0,01 при сравнении с показателем контрольной группы.

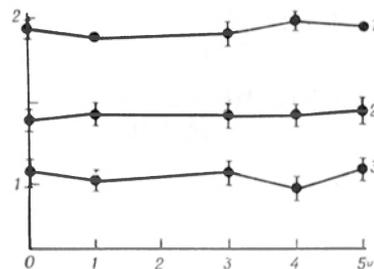


Рис. 1. Концентрация АТФ в эритроцитах при их инкубации с глюкозой.

Отмытые клетки инкубировали при 37 °С в среде, содержащей 0,12 M NaCl, 3 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и 50 mM трис-HCl (pH 7,4). Через время, указанное на оси абсцисс, часть суспензии отбирали для определения АТФ. 1 — эритроциты больных псориазом; 2 — эритроциты тех же больных в период клинической ремиссии; 3 — контроль (здоровые люди). Приведены средние значения и среднеквадратичные отклонения от средних для 16 (кривая 1), 9 (кривая 2) и 16 (кривая 3) препаратов разных людей. Все различия внутри каждой группы недостоверны; все различия между группами достоверны (P<0,001).

трации АДФ и АМФ в крови больных и здоровых индивидуумов отличались незначительно. Это привело к увеличению как суммарной концентрации адениннуклеотидов, так и величины энергетического заряда в крови больных псориазом (см. таблицу). Концентрации АТФ, АДФ и АМФ в сыворотке крови тех же доноров не превышали 6 мкмоль/л (предел обнаружения нашими методами), следовательно, приведенные в таблице данные полностью отражают соответствующие показатели для эритроцитов.

В литературе имеются сведения о сниженных концентрациях АТФ и величине энергетического заряда, повышенных концентрациях АДФ и АМФ в эритроцитах периферической крови больных псориазом [3]. В этой работе [3], однако, не были указаны методы отбора, хранения крови и определения адениннуклеотидов. Длительное же хранение крови при комнатной температуре может привести к распаду эндогенного АТФ, накоплению АДФ и АМФ.

В очагах поражения кожи у больных псориазом внутриклеточная концентрация АТФ возрастает в 2—3 раза и находится в прямой зависимости от тяжести заболевания [2]. Другие авторы [11] определяли адениннуклеотиды в эпидермисе поражения псориазом кожи люциферин-люциферазным методом после замораживания материала в жидком азоте и кислотной экстракции. Эти авторы сообщили,

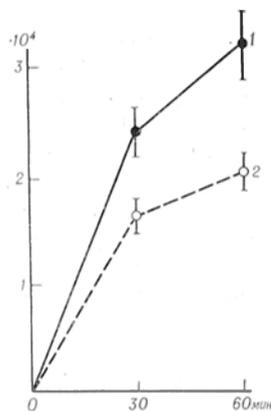


Рис. 2. АТФазная активность эритроцитарных мембран.

0,5 мл теней эритроцитов инкубировали при 37 °С в 5,5 мл среды, содержащей 0,14 М NaCl, 10 мМ KCl, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,5 мМ АТФ, 10 мМ трис-HCl (pH 7,4) и 50 мкл <sup>32</sup>P-γ-АТФ. После 30 или 60 мин инкубации в реакционную смесь добавляли хлорную кислоту и в нейтрализованных экстрактах определяли радиоактивность свободного <sup>32</sup>P<sub>i</sub>. 1 — контроль (здоровые люди); 2 — больные псориазом. Результаты — в имп/мин × 10<sup>4</sup> на 1 мл суспензии теней эритроцитов. Приведены средние значения и средсквадратичные отклонения от средних для 8—18 препаратов разных доноров. Все отличия достоверны (P < 0,05).

что концентрации индивидуальных адениннуклеотидов в эпидермисе больных находятся в пределах нормы, однако их данные явно свидетельствуют об увеличенной на 40 % концентрации АТФ при неизменных концентрациях АДФ и АМФ в пораженном эпидермисе (см. табл. 1 в [11]).

Таким образом, как наши результаты (см. таблицу), так и данные литературы [2, 11] демонстрируют увеличенную концентрацию АТФ, суммарную концентрацию адениннуклеотидов и величину аденилатного энергетического заряда в эритроцитах и клетках эпидермиса у больных псориазом.

Причинами повышенной концентрации АТФ в клетке может быть усиление синтеза или ослабление распада адениннуклеотидов. Единственным источником метаболической энергии в форме АТФ в эритроцитах человека и других млекопитающих является гликолиз [13]. Так как внутриклеточная концентрация АТФ может изменяться в широких пределах при инкубации эритроцитов с глюкозой, причем стационарная концентрация АТФ устанавливается после 30 мин инкубации [1], мы провели такой эксперимент с отмытыми клетками крови больных псориазом и здоровых людей. При инкубации, однако, не выявлено ускорения

или ослабления сопряженного с гликолизом синтеза АТФ в эритроцитах больных в сравнении с клетками здоровых доноров (рис. 1). Хотя содержание АТФ в эритроцитах больных сохранялось почти вдвое более высоким, чем в контрольном препарате, на всем протяжении инкубации (5 ч) клеток с глюкозой внутриклеточная концентрация АТФ не изменялась в обоих случаях. В эритроцитах тех же больных после терапии традиционными методами (иглотерапии и др.) концентрация АТФ снижалась (см. рис. 1), но не достигала нормы (P < 0,001) и поддерживалась на таком промежуточном уровне в течение всего периода инкубации.

При инкубации теней эритроцитов, предварительно сохраняемых в той же среде с высокой концентрацией Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, равной 0,14 М, активность Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы в клеточных мембранах больных псориазом оказалась достоверно меньшей, чем в контрольном препарате (рис. 2), причем это различие наблюдалось как после 30 мин, так и после 60 мин инкубации.

Таким образом, наши результаты показали, что не ускоренный гликолитический синтез АТФ, а ослабленный его гидролиз является основной причиной увеличенной концентрации АТФ в эритроцитах при псориазе.

Развитие псориаза сопровождается нарушением ряда метаболических процессов в клетках крови и эпидермиса, сопряженных с обменом пуринов: увеличивается активность ферментов, участвующих в синтезе и распаде пурипнуклеотидов [15], возрастают скорости поглощения пуринов в клетках и их включения в пурипнуклеотиды [16], изменяется характер фосфорилирования мембранных белков [14]. Распределение индивидуальных адениннуклеотидов в эритроцитах при псориазе изменяется так же, как и их распределение в эпидермисе (данные таблицы и работы [11]). Все эти данные указывают на системный характер патологии, а также на то, что при псориазе нарушается вся многоферментная система обмена адениннуклеотидов в клетках крови и пораженного эпидермиса. Так как скорости синтеза белка и нуклеиновых кислот пропорциональны внутриклеточной концентрации АТФ [8], Приведенные и обсуждаемые данные объясняют потреб-

пость регенерирующего эпидермиса в повышенной концентрации АТФ. Увеличенный уровень АТФ в эритроцитах больных псориазом, не обладающих системой синтеза белка, объяснить таким способом не представляется возможным. Эритроциты, однако, участвуют в переносе аденозина из печени в периферические ткани [17], и повышенный уровень АТФ может быть следствием ускоренного оборота аденозина в эритроцитах, который необходим для обеспечения регенерирующего эпидермиса в повышенных количествах пуринов.

Представляет интерес вопрос о постоянстве энергетического заряда аденилатной системы в эритроцитах. Энергетический заряд является фундаментальным параметром, контролирующим энергетическое состояние клетки в том смысле, что любое увеличение энергетического заряда вызывает активацию ферментативных процессов, утилизирующих АТФ и образующих АДФ или АМФ, и инактивацию реакций противоположного характера, а уменьшение энергетического заряда приводит, напротив, к активации синтеза АТФ и инактивации его распада [4, 5]. В нормальных физиологических условиях величина энергетического заряда поддерживается на постоянном уровне в клетках многих животных [4, 6] благодаря четкому взаимодействию систем, утилизирующих и генерирующих АТФ, и равновесию между АТФ, АДФ и АМФ в клетке, которое в свою очередь поддерживается аденилаткиназой.

Увеличенная концентрация АТФ в эритроцитах (как и в клетках эпидермиса) и неизменные концентрации АДФ и АМФ при псориазе приводят к увеличению энергетического заряда, что свидетельствует также о нарушении стабилизации этого фундаментального параметра энергетического состояния клетки. Такое нарушение оканчивается прямо связанным с нарушением равновесия в аденилаткиназной реакции, так как при псориазе отношение действующих масс аденилаткиназной реакции увеличивается почти в 2 раза (см. таблицу). Анализ механизмов, ответственных за изменение равновесия между индивидуальными адениннуклеотидами и за стабилизацию энергетического заряда, выходит

за рамки настоящей работы и подлежит дополнительному исследованию.

Независимо от механизмов, вызывающих нарушения в обмене адениннуклеотидов в эритроцитах и эпидермисе при псориазе, данные об увеличенных уровнях АТФ, суммы адениннуклеотидов и аденилатного энергетического заряда в эритроцитах и цельной крови могут быть использованы в диагностике и терапии этого заболевания.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Атауллаханов А. И., Атауллаханов Ф. И., Витвицкий В. М. и др. // Биохимия — 1985. — Т. 50. — С. 1005—1011.
2. Свирид А. А. // Патогенез и терапия распространенных хронических дерматозов и венерических болезней. — Киев, 1983. — С. 29—31.
3. Суворов А. П. // Здоровоохран. Белоруссии. — 1981. — № 4. — С. 34—36.
4. Atkinson D. E. Cellular Energy Metabolism and Its Regulation. — New York, 1977.
5. Atkinson D. E., Walton G. M. // J. biol. Chem. — 1967. — Vol. 242. — P. 3239—3241.
6. Chapman A. G., Fall L., Atkinson D. E. // J. Bact. — 1971. — Vol. 108. — P. 1072—1086.
7. Crane R. K., Lippman F. // J. biol. Chem. — 1953. — Vol. 201. — P. 235—243.
8. Edwards K., Urban J., Schreiber G. // Aust. J. biol. Sci. — 1979. — Vol. 32. — P. 299—307.
9. Fitzpatrick T. B., Haynes H. A. // Principles of Internal Medicine. — Tokyo, 1980. — P. 247—268.
10. Gelfont S. // Brit. J. Derm. — 1976. — Vol. 95. — P. 577—590.
11. Harmon C. S., Phizackerley P. J. R. // Clin. Sci. — 1984. — Vol. 67. — P. 291—298.
12. Kaminsky Yu. G., Kosenko E. A., Kondrashova M. N. // Comp. Biochem. Physiol. — 1982. — Vol. B-73. — P. 957—963.
13. Kaneko J. J. // Advanc. Vet. Sci. Comp. Med. — 1974. — Vol. 18. — P. 117—154.
14. Kumar R., Weiss V. C., West D. P., Chiero L. A. // Brit. J. Derm. — 1983. — Vol. 109. — P. 277—286.
15. Matsuo I., Ohkido M., Kizaki H., Sakurada T. // Acta derm. Venereol. (Stockh). — 1979. — Vol. 59. — P. 105—106.
16. Parsch G., Gatzakis S., Ebert R., Luger A. // Z. Hautkr. — 1979. — Bd 54. — S. 808—812.
17. Seegmiller J. E. // The Year in Metabolism: 1977. — New York, 1978. — P. 253—325.

Поступила 10.03.86

## ADENINE NUCLEOTIDE AND ADENYLATE ENERGY CHARGE IN ERYTHROCYTES UNDER CONDITIONS OF PSORIASIS

*E. A. Kosenko, Yu. G. Kaminsky,  
M. S. Goncharenko*

Institute of Biological Physics, Academy of Sciences of the USSR, Puschino, Institute of Dermatology and Venereology, Ministry of Public Health of the Ukrainian SSR, Kharkov

Concentration of ATP, total content of adenine nucleotides and energy charge of the adenylate system were distinctly higher in blood

of patients with psoriasis as compared with corresponding patterns of healthy persons blood. In psoriasis the rate of glycolytic production of ATP was unaltered in erythrocytes, whereas  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity was decreased in the cell membranes. Similar alterations occurred in epidermis impaired with psoriasis. The data obtained suggest the systemic type of the pathological process, which caused impairment of adenine nucleotides metabolism. Estimation of ATP concentration, of total content of adenine nucleotides and adenylate energy charge might be of importance in diagnosis and therapy of psoriasis.

УДК 616.153.455.627-055.5/7-092:616-008.934.556.27

*Н. А. Соловьева, Э. Х. Гинзбург, Ф. С. Казаринова, В. В. Кандауров,  
Р. И. Салганик*

## ПОВЫШЕННЫЙ ТРАНСПОРТ ГАЛАКТОЗЫ В КЛЕТКИ КАК ПРИЧИНА РАЗВИТИЯ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ГАЛАКТОЗЕМИИ У КРЫС

Институт цитологии и генетики Сибирского отделения АН СССР, Новосибирск

Ранее в серии работ описано создание линии крыс с наследственной галактоземией и приведены характеристики биохимических, физиологических и морфологических особенностей таких животных [2, 6, 22]. Одновременно была создана линия крыс, для которой характерна низкая частота спонтанно развивающейся галактоземии. Крысы галактоземической линии, зарегистрированной как линия W/SSM [10], характеризуются развитием катаракты, гепато- и спленоmegалии, нарушением долговременной памяти. У них снижена активность галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы (Гал-1-ФУТ), ответственной за превращение галактозы в глюкозу, и повышен транспорт галактозы в клетки. Имеют место пониженная толерантность к галактозе и аминоацидурия.

Полагают, что в основе наследственной галактоземии человека, для которой характерно большинство этих же признаков, лежит сниженная активность Гал-1-ФУТ [15, 19], ведущая к накоплению галактозы и ее токсических производных в клетках. В связи с этим важно было выяснить, является ли у крыс линии W/SSM низкая активность этого фермента причиной развития наследственной галактоземии.

Данные проведенного ранее генетического анализа не противоречат предположению о том, что развитие катаракты и, вероятно, иных признаков га-

лактоземии у крыс линии W/SSM контролируется одним доминантным геном с выраженным плейотропным действием. Однако оказалось, что катаракта наследуется доминантно, а низкая активность Гал-1-ФУТ — рецессивно. Это давало основание предполагать, что снижение активности этого фермента не может быть основной причиной развития галактоземии.

Биохимические исследования отвергли ряд предполагаемых механизмов развития галактоземии у крыс и позволили остановиться на предположении о том, что причиной этой наследственной патологии является усиленный транспорт галактозы в клетки животных [7].

Настоящая работа посвящена генетическому и биохимическому исследованию этого предположения.

### Методика

Опыты проводили на крысах галактоземической линии W/SSM и крысах линии, характеризующейся низкой частотой спонтанной галактоземии. Для проведения генетического анализа усиленного транспорта галактозы в клетки были получены гибриды  $F_1$  путем реципрокных скрещиваний крыс этих двух линий, а также беккросные гибриды. У таких животных исследовали транспорт галактозы в эритроциты и белки мембран эритроцитов, ответственные за активный перенос гексоз через клеточную мембрану.

Исследование транспорта гексоз и фенилаланина в эритроциты крыс. Эритроциты отделяли от лейкоцитов и плазмы путем центри-

фугирования гепаринизированной крови при 600 г в течение 10 мин, трижды отмывали от белков плазмы раствором, содержащим  $10^{-2}$  М трис-НСI-буфер рН 7,4 и 0,14 М NaCl, затем инкубировали в течение 10 мин с 6,5-кратным объемом смеси, содержащей 9 объемов 0,14 М NaCl с 0,05 М глюкозой и 1 объем 0,1 М фосфатного буфера рН 7,3. После этого эритроциты трижды отмывали раствором, содержащим  $10^{-2}$  М трис-НСI-буфер рН 7,4 и 0,14 М NaCl. К осадку эритроцитов приливали такой же раствор в количестве, достаточном для достижения исходного объема крови. Все процедуры проводили на холоду.

Полученную эритроцитарную взвесь (500 мкл) инкубировали с  $^{14}$ C-галактозой,  $^{14}$ C-маннозой,  $^{14}$ C-глюкозой или с  $^{14}$ C-фенилаланином (0,05—0,25 мМ; 0,2 мкКи) в течение 1—10 мин при 37°C. Транспорт гексоз и фенилаланина останавливали добавлением к реакционной смеси 10-кратного объема раствора, состоящего из 9 объемов 0,2 М HgCl<sub>2</sub> с 1 % NaCl и 1 объема 0,1 М фосфатного буфера рН 6,5. Величины убыли  $^{14}$ C-галактозы из инкубационной среды и накопления ее в эритроцитах служили показателями транспорта галактозы в эритроциты [3, 11].

*Получение мембран эритроцитов и тритонного экстракта, содержащего глюкозный транспортер.* Гемолиз эритроцитов проводили, добавляя к ним 10 объемов холодного 5 мМ натрий-фосфатного буфера рН 7,4. Центрифугировали смесь при 4000 г в течение 30 мин. Надосадочную жидкость отбрасывали, а содержащиеся в осадке мембраны отмывали трижды тем же буфером. Затем к ним добавляли 2 объема 0,2 мМ ЭДТА и доводили до рН 11,0 с помощью NaOH. Смесь инкубировали при 4°C в течение 30 мин. Отмытые мембраны растворяли в 2 % тритоне X-100 и 50 мМ трис-НСI-буфере рН 7,4 так, чтобы концентрация белка составляла 2 мг/мл; смесь инкубировали в течение 30 мин при 4°C, затем центрифугировали при 100 000 г в течение 1 ч. Надосадочную жидкость, содержащую транспортный белок, хранили при -70°C [20]. Освобождение надосадочной жидкости от тритона X-100 проводили по методу [14]. Градиентный ДСН (додecilсульфат натрия)-гель-электрофорез мембранных белков и фракции, содержащей глюкозный транспортер, проводили в 5—10 % полиакриламидном геле [26].

*Очистка гексозного транспортера.* Гексозный транспортер очищали с помощью колоночной хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе по методу [16]. Тритоновый экстракт мембранных белков наносили на колонку с ДЕАЕ-целлюлозой (1,5×20 см), уравновешенную 2 % тритон X-100 и 50 мМ трис-НСI-буфером рН 7,4 при 4°C. Колонку промывали 50—100 мл того же раствора, а затем тем же раствором, но с добавлением 1 М NaCl. Элюаты собирали по 6 мл (скорость элюации 20 мл/ч). Объединяли элюаты, содержащие белок, после элюции уравновешивающим буфером (фракция I), а также после элюции 1 М NaCl (фракция II). Обе фракции диализовали против 30 объемов 10 мМ трис-НСI-буфера рН 7,4 в течение ночи. После концентрирования белка до 0,4 мг/мл обе фракции хранили при -20°C.

*Получение липосом и встраивание в них гексозного транспортера проводили по методу [16, 17].* Липосомы получали из фосфати-

дилхолина: 22 мг фосфатидилхолина высушивали тонким слоем в круглодонной колбе под вакуумом, добавляли 0,5 мл 10 мМ трис-НСI-буфера рН 7,4 и встряхивали в течение 10 мин, а затем озвучивали в течение 5 мин при 20—25°C (частота ультразвука 22 кГц).

Для идентификации и изучения свойств транспорта гексоз тритоновый экстракт мембранных белков или хроматографически очищенные фракции встраивали в липосомы. С этой целью тритоновый экстракт или фракции с колонки (0,05—0,3 мг белка) объединяли с липосомами (7,5 мг) в объеме 0,5 мл и смесь озвучивали в течение 5—7 с.

*Исследование транспорта гексоз в липосомы.* Транспорт  $^{14}$ C-D-гексоз инципировали, добавляя 15 мкл гексозы (0,2 мМ; 0,4 мкКи) к 185 мкл липосом со встроеным глюкозным транспортером. Включение  $^{14}$ C-L-фукозы служило показателем неспецифического транспорта. Величину транспорта измеряли при 37°C через разные промежутки времени. Транспорт останавливали, приливая к инкубационной смеси 0,3 мл холодного раствора, содержащего 10 мМ трис-НСI-буфера рН 7,4, 2 мМ MgCl<sub>2</sub> и 0,5 мМ HgCl<sub>2</sub>. Смесь наносили на мембранные фильтры («Millipore», 0,22 мкм), активность которых измеряли с помощью счетчика радиоактивности «Марк-2» («Nuclear Chicago»).

В работе использовали следующие реактивы и материалы:  $^{14}$ C-галактозу (удельная активность 319 мКи/ммоль),  $^{14}$ C-глюкозу (удельная активность 61,1 мКи/ммоль),  $^{14}$ C-маннозу (удельная активность 31,8 мКи/ммоль),  $^{14}$ C-фукозу (удельная активность 47 мКи/ммоль) и  $^{14}$ C-фенилаланин (удельная активность 513 мКи/ммоль, «Amersham», Великобритания), гепарин («Richter», ВНР).

## Результаты и обсуждение

### *Генетический анализ и оценка роли интенсивного транспорта галактозы в клетки в развитии наследственной галактоземии у крыс*

Ранее было установлено, что крысы галактоземической линии характеризуются интенсивным транспортом галактозы в эритроциты и клетки печени [7]. В табл. 1 показана средняя интенсивность транспорта галактозы в эритроциты крыс галактоземической линии (Г) и крыс линии, устойчивой к галактоземическому действию галактозы (У) с редким спонтанным проявлением признаков галактоземии, а также их гибридов (F<sub>1</sub>) и беккроссных гибридов (F<sub>1</sub>×У и F<sub>1</sub>×Г). Из этих данных видно, что высокая интенсивность транспорта доминирует у гибридов F<sub>1</sub> и F<sub>1</sub>×Г, а среднее значение интенсивности транспорта у беккроссных гибридов F<sub>1</sub>×У занимает промежуточное положение. Это дает основание предположить моногенную детерминацию это-

Т а б л и ц а 1

Средние значения (и дисперсии) активности транспорта галактозы в эритроциты крыс галактоземической и устойчивой к галактозе линий и их гибридов :

Животные	Число животных	Среднее значение	
		нмп/мин/мл × 10 <sup>3</sup>	
Устойчивая к галактозе линия (У)	44	6,42	16,37
Галактоземическая линия (Г)	23	23,75	335,60
Гибриды F <sub>1</sub>	14	25,69	329,30
Беккросные гибриды:			
F <sub>1</sub> × У	40	13,33	134,32
F <sub>1</sub> × Г	37	25,03	180,41

го признака. На данном экспериментальном материале (5 множеств измерений) представляется возможным проверить только моногенную гипотезу о наследовании усиленного транспорта галактозы в клетки без подробного описания модификационного распределения. Такая гипотеза формулируется и формализуется так же, как это сделано ранее [1]. Модификационное распределение признака  $x$

(в  $\frac{\text{нмп}}{\text{мин} \cdot \text{мл}} \times 10^3$ ) выбрано квадратичным  $Q(x/\gamma_g, \sigma_g^2)$ , где  $\gamma_g$  — генотипическое значение ( $g=1, 2, 3$  для  $A_1A_1, A_1A_2$  и  $A_2A_2$  соответственно) и  $\sigma_g^2$  — дисперсия модификационного распределения для генотипа  $g$ .  $\int_0^t Q(x/\gamma_g, \sigma_g^2) dx$  равна 0

при  $t < \mu_1$ , 1 при  $t > \mu_2$  и составляет  $\frac{3}{20\sqrt{5}\sigma^3} \left\{ \frac{1}{3} [\mu_1^2 (\mu_2 + \sqrt{5}\sigma) - t^3] \right\} + \gamma t^2 - t\mu_1\mu_2$  при  $\mu_1 < t \leq \mu_2$ .

Используя эти значения для представленных 5 множеств, можно получить значение критерия  $\chi^2$ , с помощью

Т а б л и ц а 2

Оценки параметров моногенной гипотезы

Вариант	$\gamma_1$	$\sigma_1^2$	$\gamma_2$	$\sigma_2^2$	$\gamma_3$	$\sigma_3^2$
1	1,58	0,85	3,08	0,42	2,86	0,71
2	1,30	0,58	2,96	0,22	2,75	0,42
3	1,86	1,36	3,20	1,08	2,98	1,41
4	1,68	0,34	3,11	0,14	2,96	0,45
5	1,70	0,27	3,01	0,27	3,01	0,27

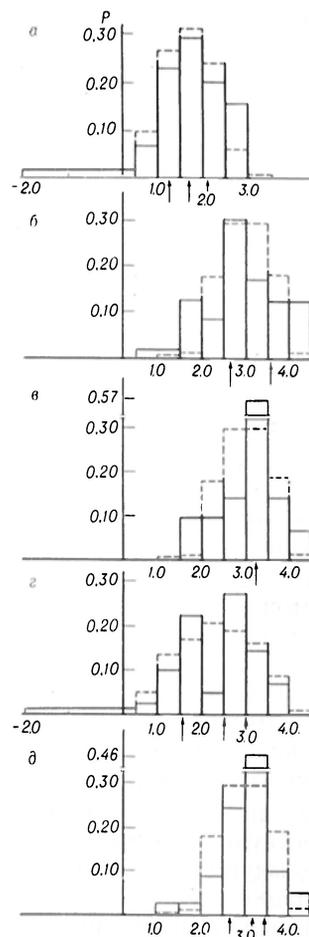


Рис. 1. Гистограммы распределения характеристик поглощения галактозы эритроцитами крыс устойчивой к галактозе линии (а), галактоземической линии (б) и их гибридов F<sub>1</sub> (в) и беккросных гибридов F<sub>1</sub> × У (г) и F<sub>1</sub> × Г (д).

Сплошные линии — эмпирическое, прерывистые — гипотетическое распределение а —  $n=44$ ,  $\gamma=23,75$ ,  $\sigma=335,60$ ; б —  $n=23$ ,  $\gamma=6,42$ ,  $\sigma=16,37$ ; в —  $n=14$ ,  $\gamma=25,09$ ,  $\sigma=329,30$ ; г —  $n=40$ ,  $\gamma=13,39$ ,  $\sigma=134,32$ ; д —  $n=37$ ,  $\gamma=25,03$ ,  $\sigma=180,41$ .

которого проверяется непротиворечивость гипотезы экспериментальному материалу. Проверка такой гипотезы по исходным данным показала, что она отвергается по критерию  $\chi^2$  с вероятностью 0,98. Можно предположить, что это объясняется непригодностью выбранного модификационного распределения  $Q(x/\gamma, \sigma^2)$ : оно симметрично, тогда как распределения всех 5 массивов имеют явную левую асимметрию. В связи с этим та же гипотеза проверялась на трансформированных данных: каждое животное характеризовалось натуральным логарифмом интенсивности транспорта (табл. 2).

В первой строке табл. 2 приведены средние значения ( $\gamma_g$ ) и дисперсии  $\sigma_g^2$  для выборок У, F<sub>1</sub> и Г соответственно. Вторая и третья строки представляют собой значения верхней и нижней границ 95% доверительных интервалов, построенных для среднего значения и дисперсии обычным образом. На рис. 1 представлены гистограммы логарифмов интенсивности транспорта в 5 выборках. Стрелки на оси абсцисс указывают границы интервалов, для которых строятся компоненты критерия  $\chi^2$  [1]. В предположении, что  $\sigma_g^2$  может быть разной для разных  $g$ , число степеней свободы критерия  $\chi^2 df = 17 - 5 - 6 = 6$ , где 17 — общее число интервалов; 5 — число условий нормировки; 6 — число оцениваемых параметров. Оценки  $\gamma_g$  и  $\sigma_g^2$ , полученные по минимуму  $\chi^2$ , приведены в четвертой строке табл. 2. При этих оценках значение критерия  $\chi^2 = 5,9$ , что соответствует вероятности отвергнуть гипотезу  $P = 0,45$ .

Поскольку оценки  $\gamma_2$  и  $\gamma_3$  приблизительно равны и оценки  $\sigma_g^2$  получены по малому числу наблюдений, введем более жесткую гипотезу, отличающуюся от предыдущей тем, что  $\gamma_2 = \gamma_3$  (полное доминирование аллеля, ответственного за высокую интенсивность транспорта галактозы) и  $\sigma_g^2 = \sigma^2$  (одинаковая гомеостатичность всех 3 генотипов). Оценки параметров этой гипотезы приведены в пятой строке табл. 2. Минимальное значение  $\chi^2 = 11,9$ , что при 9 степенях свободы (оценивается только 3 параметра:  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$  и  $\sigma^2$ ) дает вероятность отвергнуть эту гипотезу  $P = 0,75$ . Таким образом, результат проверки моногенной гипотезы показал, что она не противоречит экспериментальному материалу как в случае произвольного генного взаимодействия с произвольной гомеостатичностью генотипов, так и в случае полного доминирования аллеля высокой интенсивности транспорта галактозы в клетки при одинаковой гомеостатичности генотипов. При этом модификационная изменчивость признака в линиях и гибридах определяется средовыми признаками и, возможно, действием других генов с эффектами, существенно более низкими, чем у выделенного гипотетического.

Для утвердительного суждения о моногенном контроле усиленного транс-

порта галактозы в клетки необходима генетическая или биохимическая идентификация гена, т. е. его необходимо либо локализовать в группе сцепления, либо получить и охарактеризовать его первичный продукт.

#### *Биохимические исследования роли интенсивного транспорта галактозы в клетки в развитии наследственной галактоземии*

Известно, что транспорт сахаров в клетки животных осуществляется с помощью транспортных белков — переносчиков сахаров D-конфигурации (глюкозы, галактозы, маннозы, ксилозы, арабинозы) [18]. Позднее был выделен так называемый глюкозный транспортер, переносящий через мембрану ряд D-гексоз [16, 17, 26]. Проведенное нами исследование транспорта глюкозы и маннозы в эритроциты крыс галактоземической линии показало, что у этих животных усилен транспорт как этих гексоз, так и галактозы (рис. 2). Эти данные согласуются с представлением о том, что для крыс галактоземической линии характерна повышенная активность мембранных белков — переносчиков гексоз. Показано, что изменения активности мембранной системы транспорта сахаров в клетки сопровождаются изменениями в транспорте и иных веществ в клетки. Так, для трансформированных ви-

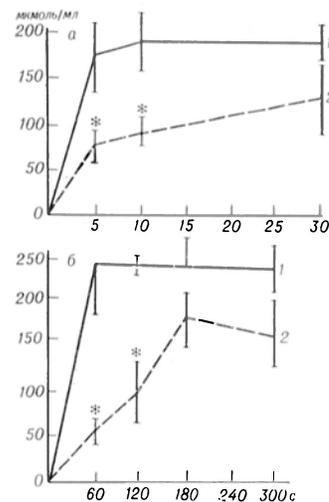


Рис. 2. Транспорт <sup>14</sup>C-глюкозы (а) и <sup>14</sup>C-маннозы (б) в эритроциты крыс галактоземической (1) и устойчивой к галактозе (2) линий. Каждая точка на кривой — среднее из 5 опытов. Звездочкой отмечены достоверные различия средних по критерию Стьюдента.

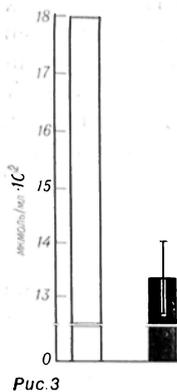


Рис. 3. Транспорт  $^{14}\text{C}$ -фенилаланина через плазматическую мембрану эритроцитов крыс галактоземической (светлые столбики) и устойчивой к галактозе (темные столбики) линий.

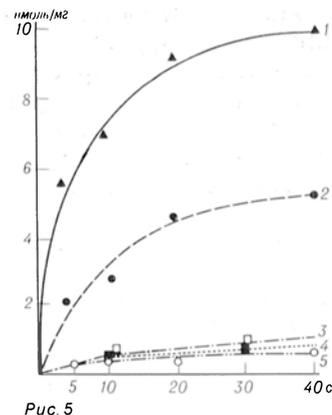


Рис. 5. Кинетика транспорта  $^{14}\text{C}$ -D-галактозы в липосомы со встроенными в них очищенными белками (фракция I) из эритроцитов крыс галактоземической и устойчивой к галактозе (2) линий.

При встраивании в липосомы белков фракции II из эритроцитов крыс, устойчивой к галактозе линии (3) и галактоземической линии (4), а также в intactные липосомы (5).

Рис. 5

русами фибробластов характерен повышенный транспорт не только сахаров, но и аминокислот [9]. В связи с этим мы исследовали поглощение  $^{14}\text{C}$ -фенилаланина эритроцитами крыс. На рис. 3 видно, что фенилаланин, как и гексозы, усиленно переносится в эритроциты крыс с наследственной галактоземией. Ранее показано, что для крыс галактоземической линии характерна аминокацидурия [6, 7], которая является характерным симптомом и при галактоземии у человека [19]. Данные настоящей работы позволяют предположить, что этот симптом является следствием повышенного транспорта аминокислот через мембраны почечных клубочков и канальцев.

При электрофоретическом исследовании мембранных белков из эритроцитов человека показано, что белки — переносчики гексоз сосредоточены в зонах 3, 4, 5 и частично в зоне 7 [17, 20, 21, 26].

На рис. 4, см. вклейку приведены результаты электрофоретического разделения мембранных белков, выделенных из теней эритроцитов крыс галактоземической и устойчивой к галактозе

линий, а также хроматографически очищенной фракции (фракция I), предположительно содержащей глюкозный транспортер. Мы сравнили активность хроматографически очищенной фракции I у крыс галактоземической и устойчивой к галактозе линий. С этой целью мы использовали метод реконструкции транспорта в липосомах [17]. Транспорт  $^{14}\text{C}$ -D-галактозы был выше в том случае, когда в липосомы встраивали фракцию I из эритроцитов крыс галактоземической линии (табл. 3 и рис. 5), такая же картина наблюдалась и в отношении D-глюкозы и D-фукозы.

Транспорт гексоз в липосомы специфичен, что видно из сравнения транспорта D- и L-фукозы (см. табл. 3 и рис. 5). Накопление L-фукозы в липосомах служило показателем неспецифического транспорта.

При встраивании в липосомы фракции II транспорт D-галактозы не осуществлялся либо был на уровне неспецифического транспорта (см. рис. 5).

Из результатов градиентного ДСН-гель-электрофореза мембранных белков эритроцитов крыс, фракции I, содержащей глюкозный транспортер, и

Перенос  $^{14}\text{C}$ -D и  $^{14}\text{C}$ -L-гексоз (в наномолях гексоз на 1 мг белка за 15 мин) в липосомы со встроенными в них транспортными белками из эритроцитов крыс галактоземической и устойчивой к галактозе линий ( $M \pm m$ )

Линия крыс	D-галактоза	D-фукоза	L-фукоза
Галактоземическая	$7,48 \pm 0,73$ (9)	$1,37 \pm 0,21$ (6)	$0,04 \pm 0,004$ (8)
Устойчивая к галактозе	$4,45 \pm 0,52$ (9)	$0,85 \pm 0,09$ (6)	$0,036 \pm 0,004$ (8)
<i>P</i>	$< 0,01$	$< 0,05$	—

Примечание. В скобках указано число опытов.

фракции II, представленных на рис. 4, видно, что фракция I, содержащая глюкозный транспортер, состоит из 2 полос (белки с молекулярной массой 85 и 65 кД); фракция II содержит 4 полосы (белки с молекулярной массой 240, 220, 94 и 81 кД).

Наши результаты сходны с данными, полученными при исследовании глюкозного транспортера из эритроцитов человека [8, 13, 20, 21, 23, 28].

Приведенные данные позволяют сделать вывод о том, что транспортные белки из эритроцитов крыс галактоземической линии обладают более высокой удельной транспортной активностью по сравнению с белками из эритроцитов крыс устойчивой к галактозе линии.

Биохимические исследования позволяют заключить, что крысы галактоземической линии характеризуются усиленным транспортом галактозы в эритроциты, что обусловлено повышенной удельной активностью белков — транспортеров гексоз. Генетический анализ природы усиленного транспорта галактозы в эритроциты крыс позволяет считать, что этот признак контролируется одним мутантным доминантным геном с выраженным плейотропным действием. Развитие катаракты, гепато- и спленоmegалии и иных симптомов галактоземии у крыс, наследуемых также доминантно, является, по всей вероятности, результатом плейотропного действия мутантного гена, ответственного за транспорт гексоз.

Представляется маловероятным, чтобы низкая активность Гал-1-ФУТ у крыс галактоземической линии контролировалась независимым мутантным геном. Селекция и инбридинг, которые привели к созданию линии W/SSM [6], вряд ли могли обеспечить одновременный отбор по двум мутантным генам. Возможно, низкая активность Гал-1-ФУТ также является следствием плейотропного эффекта мутантного гена, ответственного за усиленный транспорт галактозы; этот эффект проявляется у гомозигот и ослаблен у гетерозигот [6, 7].

Причиной наследственной галактоземии у человека считают пониженную активность Гал-1-ФУТ, также ведущую к накоплению галактозы в клетках [15, 19].

В литературе снижение активности Гал-1-ФУТ при галактоземии рассмат-

ривает как следствие мутации структурного гена, кодирующего этот фермент [15, 19]. Однако имеются указания [12, 24, 25] на то, что Гал-1-ФУТ, выделенная из эритроцитов больных галактоземией, не отличается по физико-химическим свойствам от фермента здоровых людей.

Полагают, что наличие мутации, ведущей к снижению активности Гал-1-ФУТ при галактоземии, в настоящее время не может считаться доказанным [27].

Данные настоящей работы позволяют заключить, что одной из истинных причин развития признаков галактоземии и у людей может быть усиленный транспорт галактозы в клетки. Галактоза, накапливаясь в повышенном количестве в клетках животных в течение перинатального периода, может участвовать в стабильном подавлении экспрессии генов, кодирующих синтез Гал-1-ФУТ [4, 5].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гинзбург Э. Х., Куликов А. В. // Генетика. — 1983. — № 4. — С. 571—576.
2. Елисеєва А. Г., Соловьева Н. А., Морозкова Т. С. // Там же. — 1975. — № 5. — С. 72—79.
3. Никольский Н. Н., Трошин А. С. Транспорт сахаров через клеточные мембраны. — Л., 1973.
4. Салганик Р. И., Соловьева Н. А., Кандауров В. В. // Генетика. — 1982. — № 3. — С. 428—433.
5. Салганик Р. И., Соловьева Н. А., Кнорре В. Л. и др. // Вопр. мед. химии. — 1985. — № 4. — С. 65—70.
6. Соловьева Н. А., Морозкова Т. С., Салганик Р. И. // Генетика. — 1975. — № 5. — С. 63—71.
7. Соловьева Н. А., Салганик Р. И. // Там же. — 1982. — № 3. — С. 420—427.
8. Acevedo F., Lundahl P., Fröman G. // Biochim. biophys. Acta. — 1981. — Vol. 648. — P. 254—261.
9. Baker R. M., Ling V. // Methods in Membrane Biology. — New York, 1978. — P. 337—341.
10. Borodin P. M., Kloitchkov D. V., Kolpakov V. G. et al. // Rat News Lett. — 1977. — N 1. — P. 5051.
11. Britten H. G. // J. Physiol. (Lond.). — 1964. — Vol. 70. — P. 1—18.
12. Dale G. L., Popjak G. // J. biol. Chem. — 1976. — Vol. 251. — P. 1057—1063.
13. Fröman G., Lundahl P., Acevedo F. // FEBS Lett. — 1981. — Vol. 129. — P. 100—104.
14. Harikawa S., Ogasawara H. // Analyt. Biochem. — 1979. — Vol. 97. — P. 116—121.
15. Kalckar H. M. // Fed. Proc. — 1960. — Vol. 19. — P. 984—990.
16. Kasahara M., Hinkle P. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1976. — Vol. 73. — P. 396—400.

17. *Kasahara M., Hinkle P. C.* // J. biol. Chem. — 1977. — Vol. 252. — P. 7384—7390.
18. *Le Fevre P. G.* // Protoplasmatologia. — 1955. — Vol. 7. — P. 56—61.
19. *Nadler N. L., Inoye T., Hsia D. J. J.* // Galactosemia. — Springfield, 1969. — P. 127—139.
20. *Sase S., Anraku J., Nagano M. et al.* // J. biol. Chem. — 1982. — Vol. 257. — P. 11100—11105.
21. *Shelton R. L., Langdon R. G.* // Biochim. biophys. Acta. — 1983. — Vol. 733. — P. 25—33.
22. *Solovyeva N. A., Griseva O. N., Salganik R. I.* // Federation of European Biochemical Societies. Meeting, 12th: Abstracts. — Dresden, 1978. — N 0807.
23. *Steck T. L.* // J. Cell Biol. — 1974. — Vol. 62. — P. 1—19.
24. *Tedesco T. A.* // J. biol. Chem. — 1972. — Vol. 247. — P. 6631—6636.
25. *Tedesco T. A., Mellman W. J.* // Galactosemia. — Springfield, 1969. — P. 66—82.
26. *Wagner R., Zimmer G., Lacko L.* // Biochim. biophys. Acta. — 1984. — Vol. 771. — P. 99—102.
27. *Williams V. P., Helmer G. R., Fried C.* // Arch. Biochem. — 1982. — Vol. 216. — P. 503—511.
28. *Witlers L. A., Valer C. A., Lienhard G. E.* // Nature. — 1985. — Vol. 315. — P. 777—779.

Поступила 01.04.86

## HIGH GALACTOSE TRANSPORT INTO THE CELLS AS THE CAUSE OF HEREDITARY GALACTOSEMIA IN RATS

*N. A. Solovyeva, E. H. Ginsburg, F. S. Kazarina, V. V. Kandaurov, R. I. Salganik*

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

A strain of rats with symptoms of inherited galactosemia (cataracts, hepatosplenomegaly, aminoaciduria etc) was produced by selection and inbreeding of Wistar rats highly susceptible to the galactosemic effect of galactose. The salient biochemical feature of these rats, like human galactosemics, is manifested as a decrease in the activity of galactose-1-phosphate uridylyltransferase (Gal-1-PUT) in liver tissue and erythrocytes. However, the cross experiments have shown that the decrease in Gal-1-PUT activity was not required for expression of main galactosemia symptoms. Genetic analysis of cataract formation demonstrated that this trait was controlled by a single dominant gene. High transport rate of <sup>14</sup>C-galactose into erythrocytes was a characteristic of galactosemic rats. Genetic analysis demonstrated that this trait was under the control of a single dominant gene, similar to the cataract formation. The intracellular accumulation of galactose ensured by its high transport, simultaneously with a decrease in Gal-1-PUT activity, were assumed to be the main reasons of galactosemic symptoms. The glucose transporter isolated from erythrocytes of the galactosemic rats, when integrated into the liposome membrane transferred more actively galactose into the liposomes than that of the control galactose resistant rats.

УДК 616.379-008.64-092.9-085.356:577.164.11.042.2]-036.8:616-008.939.15-074

*И. Г. Обросова, Ф. С. Ларин, А. С. Ефимов, Н. Д. Тронько,  
В. Л. Цырук, А. К. Павленя*

## ИЗУЧЕНИЕ ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ АНТИВИТАМИНА В<sub>1</sub> — ОКСИТИАМИНА — У ДИАБЕТИЧЕСКИХ МЫШЕЙ (db/db)

НИИ эндокринологии и обмена веществ Минздрава УССР, Киев, Институт биохимии  
АН БССР, Гродно

Актуальность поисков адекватной модели инсулинезависимого типа диабета и особенно изучения патогенетических взаимосвязей последнего с ожирением объясняют возрастающий интерес исследователей к животным с генетически детерминированным инсулинезависимым диабетом, в частности мышам линий C57BL6I (ob/ob) и C57BL/KsI (db/db) [1, 10, 14]. Однако, несмотря на явные нарушения липидного обмена, проявляющиеся в развитии ожирения, точные сведения об интенсивности процессов биосинтеза и

распада отдельных классов липидов и их регуляции у этих животных практически отсутствуют. В полной мере вышеуказанное относится к процессу биосинтеза жирных кислот, в то время как известно, что интенсивность липогенеза является важной детерминантой скорости образования липопротеидов атерогенных классов (особенно ЛПОНП) в эндоплазматическом ретикулуме печени [21].

В задачи данной работы входило изучение интенсивности липогенеза и ряда показателей обмена липидов у

здоровых и больных диабетом мышей, а также у животных, получавших на фоне диабета курс антивитамина В<sub>1</sub> — окситиамина [11]. Последний, как известно [3, 9, 18], оказывает гиполипидемическое действие и широко используется для изучения роли ТДФ-зависимых реакций в процессах углеводного [2] и липидного [4] обмена.

### Методика

Эксперименты проведены на нормальных мышцах линии C57BL/K<sub>s</sub>1, мышцах линии C57BL/K<sub>s</sub>1 (db/db) и животных той же линии, получавших курс окситиамина (внутримышечно в течение 10 сут ежедневно в дозе 12,5 мг на 1 кг массы тела). После декапитации животных печень замораживали в жидком азоте и использовали для определения общего холестерина [13], диеновых конъюгатов [6], малонового диальдегида [20]. Липопротеиды сыворотки крови фракционировали методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле [16] на приборе «Quick-Disk Electrophoresis» («Эймз», Австрия) с последующей денситометрией гелей. Содержание кортикостерона в плазме крови определяли флюорометрически [15]. Для изучения интенсивности липогенеза части животным трех исследуемых групп за 1 ч до декапитации вводили 1-<sup>14</sup>С-ацетат (0,3 мкКи на 1 г массы тела), другой части — соответственно 2-<sup>14</sup>С-пируват в той же дозировке с последующим определением содержания, общей и удельной радиоактивности свободных жирных кислот СЖК [17].

Полученные результаты обрабатывали методами вариационной статистики.

### Результаты и обсуждение

Данные, представленные в табл. 1, свидетельствуют о значительно более высокой интенсивности липогенеза в печени мышей с инсулиннезависимым, генетически детерминированным диабетом по сравнению с контролем. Так, в опытах с введением 1-<sup>14</sup>С-ацетата

общая и удельная радиоактивность СЖК печени диабетических животных была в 1,7 раза выше, чем в контроле. Различия между показателями двух групп становятся еще более демонстративными при использовании в качестве предшественника 2-<sup>14</sup>С-пирувата: общая и удельная радиоактивность СЖК печени соответственно в 2,5 и 2,7 раза превышает контрольные величины. При сравнении скорости включения радиоактивной метки двух изучаемых предшественников установлено, что как у контрольных, так и у диабетических мышей интенсивность использования пирувата для синтеза жирных кислот значительно превосходит таковую ацетата, причем вклад «пируватного» пути в липогенез при диабете заметно возрастает.

Следует отметить, что содержание СЖК у животных диабетической группы достоверно не отличалось от контрольных величин, несмотря на резкое (в 4,3 раза) возрастание в плазме крови уровня кортикостерона (рис. 1), обладающего, как известно, высокой липолитической активностью [12]. В этом заключается одно из существенных отличий данной модели генетически детерминированного диабета с отсутствием выраженного инсулинового дефицита от инсулинзависимого, аллоксанового или стрептозотоцинового диабета, характеризующегося ингибированием липогенеза, активацией липолиза и уменьшением массы тела. По-видимому, этот факт можно объяснить усилением у диабетических мышей процессов эстерификации, последующим увеличением жировых депо и развитием ожирения. Вышесказанное предположение находит подтверждение в дан-

Таблица 1

Содержание, общая и удельная радиоактивность СЖК в печени мышей

Исследуемая группа	Содержание СЖК, мкмоль на 1 г ткани	Общая радиоактивность СЖК, имп в 1 мин на 1 г ткани	Удельная радиоактивность СЖК, имп на 1 мкмоль СЖК
<b>При введении 1-<sup>14</sup>С-ацетата</b>			
Контроль (8)	3,19±0,147	76 200±10 100	23 900±2 270
Диабет (8)	3,95±0,58	128 000±8 110*	40 800±4 720*
Диабет+окситиамин (7)	7,29±0,24**	179 000±21 100**	24 000±2 650**
<b>При введении 2-<sup>14</sup>С-пирувата</b>			
Контроль (8)	2,54±0,069	344 000±57 700	129 000±14 400
Диабет (8)	2,64±0,175	878 000±55 200*	347 000±35 200**
Диабет+окситиамин (7)	8,26±0,34**	196 000±17 100**	24 130±2 750**

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 одна звездочка —  $P < 0,05$  по сравнению с контролем, две —  $P < 0,05$  по сравнению с показателями животных с диабетом.

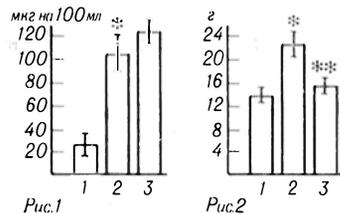


Рис. 1. Содержание кортикостерона (в мкг на 100 мл) в плазме крови мышей.

Здесь и на рис. 2: 1 — контроль, 2 — диабет, 3 — диабет + окситиамин; звездочкой отмечено  $P < 0,05$  по сравнению с контролем.

Рис. 2. Изменение массы тела мышей при диабете и введении окситиамина на его фоне. Двумя звездочками отмечено  $P < 0,05$  по сравнению с показателями животных с диабетом.

ных, представленных на рис. 2, из которых следует, что масса диабетических животных в 1,7 раза превышает такую контрольных.

Поскольку скорость образования липопротеидов атерогенных классов (липопротеидов очень низкой и низкой плотности — ЛПОНП и ЛПНП) в печени прямо пропорциональна интенсивности липогенеза [21], следовало ожидать существенных изменений в спектре липопротеидов сыворотки крови при изучаемом типе диабета. Как показано в табл. 2, диабетические мыши характеризуются гиперлипопроteinемией с одновременным перераспределением относительного содержания липопротеидов различных классов. В спектре липопротеидов сыворотки крови при диабете обращает на себя внимание прежде всего резкое (в 5,9 раза) увеличение процентного содержания ЛПОНП, т. е. богатой триглицеридами фракции липопротеидов, обнаруживающей наиболее сильную зависимость от интенсивности липогенеза в печени [21]. Возрастание уровня ЛПНП — богатой холестерином фракции — в 2,3 раза согласуется с данными по содержанию общего холестерина в печени, представленными в

табл. 3. В свою очередь повышенное содержание холестерина в печени и, следовательно, ЛПНП в сыворотке крови у диабетических мышей может быть опосредовано накоплением перекисей липидов и продуктов их деградации (табл. 3), модифицирующих ферменты биосинтеза и катаболизма холестерина [8] в микросомах.

У диабетических животных, получавших курс окситиамина, отмечено ингибирование биосинтеза жирных кислот (см. табл. 1). В опытах с введением  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата удельная радиоактивность СЖК снижена в 1,7 раза, а при использовании  $2\text{-}^{14}\text{C}$ -пирувата — в 14,4 раза по сравнению с таковой животных, не получавших препарата. В отличие от контрольных и диабетических животных у крыс, получавших окситиамин, на фоне диабета не обнаружено заметных различий в интенсивности липогенеза из двух изучаемых предшественников, что может быть следствием ингибирования пируватдегидрогеназного комплекса при развитии  $\text{B}_1$ -гиповитаминоза [3]. Результаты проведенных экспериментов с применением окситиамина для моделирования тиаминовой недостаточности позволяют предположить, что в интенсификации биосинтеза жирных кислот при данном типе диабета существенную роль играют ТДФ-зависимые реакции, а нарушения регуляции липогенеза локализованы (по крайней мере частично) на уровне дегидрогеназ  $\alpha$ -кетокислот и/или транскетолазы — ключевого фермента пентозофосфатного пути, обеспечивающего синтез жирных кислот восстановительными эквивалентами [5].

Снижение удельной радиоактивности СЖК при параллельном увеличении их содержания (см. табл. 1) в опытах с введением окситиамина предполагает сочетание ингибирования липогенеза в печени с активацией липолиза.

Таблица 2

Липопротеидный спектр сыворотки крови мышей контрольных, диабетических и получавших окситиамин

Исследуемая группа	Общее содержание липидов	ЛПОНП	ЛПНП	ЛПВП
Контроль (15)	100	4,4±0,6	10,1±2,0	85,5±22,1
Диабет (15)	160±38,9	25,9±5,7*	22,8±4,5*	105±30,0
Диабет + окситиамин (6)	130±12,9	18,1±0,95	16,8±0,67	107±2,04

Примечание. Содержание липопротеидов в сыворотке крови контрольных мышей принято за 100 %.

Показатели липидного обмена в печени мышей контрольных, диабетических и получавших окситиамиин

Исследуемая группа	Общий холестерин, мг на 1 г ткани	Диеновые конъюгаты, ΔЕ на 1 г ткани	Малоновый диальдегид, мкмоль на 1 г ткани
Контроль	1,34±0,14	11,7±1,1	4,73±0,43
Диабет	2,52±0,017*	21,7±1,3*	10,1±0,69*
Диабет±окситиамиин	1,50±0,10**	13,7±0,98**	8,18±0,56

Подобные сдвиги в соотношении процессов липолиза и липогенеза, вызванные окситиамином, сопровождаются существенным уменьшением массы животных — от  $22,3 \pm 0,79$  г до введения препарата до  $15,1 \pm 0,83$  г после 10-дневного курса окситиамина (рис. 2;  $p < 0,05$ ). Отсутствие изменений при этом в содержании кортикостерона (см. рис. 1) позволяет предположить, что усиление окситиамином липолитической активности печени не опосредовано действием на уровень глюкокортикоидов и что последним принадлежит незначительная роль в регуляции липолиза при данном типе диабета.

Существенные изменения в скорости липогенеза при введении окситиамина на фоне диабета сопровождались адекватными изменениями в липопротеидном спектре сыворотки крови (см. табл. 2). Уменьшение относительного содержания ЛПОНП, однако, не было достоверным. Аналогичная картина отмечена и в отношении ЛПНП сыворотки крови, несмотря на существенное (в 1,7 раза) снижение уровня холестерина в печени. Отсутствие строгой корреляции между изменением показателей липидного обмена в печени и липопротеидным спектром сыворотки крови может быть сопряжено с тем, что окситиамиин оказывает влияние не только на образование различных классов липидов в печени, но и на белковые фрагменты липопротеидов через изменение скорости биосинтеза белка [7].

Снижение окситиамином уровней диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в печени свидетельствует об определенном антиоксидантном эффекте антивитамина В<sub>1</sub>. Не исключена возможность реализации последнего на уровне циклооксигеназной системы [22], а также ферментов превращения глутатиона [19].

Таким образом, результаты данного исследования свидетельствуют о значительной интенсификации липогенеза и «атерогенных» изменениях ряда показателей липидного обмена при генетически детерминированном инсулиннезависимом диабете. Ингибирование биосинтеза жирных кислот окситиамином в сочетании со снижением общего холестерина печени и изменением липопротеидного спектра сыворотки крови позволяет предположить, что ТДФ-зависимые реакции играют существенную роль в развитии гиперлипидогенеза, тучности и атеросклеротических поражений при инсулиннезависимом диабете.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Баранов В. Г. Экспериментальный сахарный диабет. — Л., 1983.
2. Бородинский А. П., Петушок В. Г., Буко В. У., Островский Ю. М. // Изв. АН БССР. — 1978. — № 5. — С. 71—75.
3. Буко В. У., Ларин Ф. С., Горенштейн Б. И., Островский Ю. М. // Докл. АН БССР. — 1982. — Т. 26, № 7. — С. 650—653.
4. Буко В. У., Ларин Ф. С., Тарасов Ю. А., Виноградов В. В. // Укр. биохим. журн. — 1983. — Т. 55, № 4. — С. 453—456.
5. Великий Н. П. // Там же. — 1984. — Т. 56, № 4. — С. 369—383.
6. Гаврилов В. Б., Мишкорудная М. И. // Лаб. дело. — 1983. — № 3. — С. 33—35.
7. Горбач З. В., Островский Ю. М. // Докл. АН БССР. — 1975. — Т. 19, № 12. — С. 181—183.
8. Ланкин В. З. // Кардиология. — 1980. — № 8. — С. 42—48.
9. Ларин Ф. С., Островский Ю. М. // Изв. АН БССР. — 1977. — № 5. — С. 81—85.
10. Обросова И. Г., Дубровская Г. В., Кириенко Т. Я. // Биохимия, фармакология и медицинское применение производных витаминов и других предшественников коферментов. — Иркутск, 1983. — С. 56—57.
11. Экспериментальная витаминология / Под ред. Ю. М. Островского. — Минск, 1979.
12. Розен В. Б. Основы эндокринологии. — М., 1984.

13. Abell L. L., Levy B. A., Brodie B. B., Kendall F. L. // J. biol. Chem. — 1952. — Vol. 195. — P. 357—366.
14. Coleman D. L. // Diabetes. — 1982. — Vol. 31. — Suppl. 1. — P. 1—6.
15. Dupont W., Bourgeois Ph., Vaillant P. // J. Physiol. (Paris). — 1979. — Vol. 74. — P. 659—671.
16. Noilo H. K., Waga M., Ehrhart L. A., Lewis L. A. // Clin. Chem. — 1973. — Vol. 19. — P. 229—234.
17. Ncvak M. // J. Lipid Res. — 1968. — Vol. 6. — P. 431—433.
18. Ostrovsky Yu. M., Larin F. S. // Acta biol. med. germ. — 1964. — Bd 12. — S. 612—614.
19. Prasanna K. G., Kondaiak M. S., Kalyansundaram S., Sundaresan R. // Indian J. Biochem. Biophys. — 1973. — Vol. 10. — P. 119—122.
20. Satoh K. // Clin. chim. Acta. — 1978. — Vol. 9. — P. 507—516.
21. Windmueller H. G., Spaeth A. E. // Arch. Biochem. — 1967. — Vol. 122. — P. 362—369.
22. Wolfe L. S., Kostorowski K., Pappius H. M. // Canad. J. Biochem. — 1976. — Vol. 54. — P. 629—640.

Поступила 01.04.86

## HYPOLIPIDEMIC EFFECT OF ANTIVITAMIN B<sub>1</sub>, OXYTHIAMINE IN MICE WITH DIABETES

I. G. Obrosova, F. S. Larin, A. S. Efimov, N. D. Tron'ko, V. L. Tsyruk, A. K. Pavlenya

Institute of Endocrinology and Metabolism, Ministry of Public Health of the Ukrainian SSR, Kiev, Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Grodno

A rate of lipogenesis from 1-<sup>14</sup>C-acetate and 2-<sup>14</sup>C-pyruvate as well as total cholesterol, diene conjugates, malonic dialdehyde were increased in liver tissue of mice db/db strain with genetically determined diabetes, whereas content of free fatty acids was not distinctly altered despite of the marked elevation of corticosterone in blood plasma. Ratio of atherogenous lipoproteins VLDL and LDL was increased in blood plasma of these mice with diabetes. As oxythiamine, administered into the mice, exhibited hypolipidemic and antioxidant effects, TDP-dependent reactions appear to be among the factors responsible for deterioration of lipid metabolism in the diabetes.

УДК 617-001.17-053.2-092.9-085.357.631.015.2:615.272.6]-07.616.153.96-074

Э. Г. Давлетов, Р. М. Салыхова, Ф. Х. Камиллов

## ВЛИЯНИЕ РЕТАБОЛИЛА И ОКСИМЕТАЦИЛА НА БЕЛКОВЫЙ ОБМЕН ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОЖГОВОЙ БОЛЕЗНИ У НЕПОЛОВОЗРЕЛЫХ КРЫС

Кафедра биохимии Башкирского медицинского института, Уфа

Ранее нами было показано резкое снижение уровня тестостерона в сыворотке крови неполовозрелых крыс после термического ожога, что указывало на целесообразность применения стимуляторов белкового анаболизма при лечении ожоговой болезни в детском возрасте [11].

В настоящей работе изучено влияние анаболического стероидного препарата (ретаболила) и пиримидинового производного (оксиметацила) на показатели белкового обмена при термической травме у животных раннего допубертатного возраста как экспериментальной модели ожоговой болезни у детей.

### Методика

Опыты выполнены на неполовозрелых крысах 1-месячного возраста массой 40—60 г, у которых под эфирным рауш-наркозом вызвали термический ожог кожи IIIA—IIIB степени площадью 23—25 % поверхности тела по методике, описанной ранее [11].

Показатели белкового обмена исследовали в динамике на 1-е, 3-и и 7-е сутки после термического воздействия.

Общий белок сыворотки крови определяли методом Лоурн [28], мочевины — по цветной реакции с помощью набора «Биотест-мочевина» (ЧССР).

Для оценки протесолитических процессов определяли активность катепсина D (КФ 3.4.23.5) в тканях печени, почек и скелетных мышц. 10 % гомогенаты тканей в 1 % растворе KCl обрабатывали ионным детергентом Triton X-100 и центрифугировали в течение 15 мин при 12 000 г в центрифуге К-24 (ГДР). Активность фермента в надосадочной жидкости определяли при инкубации с 2,5 % раствором гемоглобина (рН 3,8) в течение 2 ч при 37 °С. Количество тирозина, образующегося при расширении гемоглобина, определяли по цветной реакции с реактивом Фолина—Чиокальтеу. Активность катепсина D выражали в микрограммах тирозина на 1 мг белка за 1 ч [22].

С целью изучения биосинтетических процессов определяли интенсивность включения <sup>35</sup>S-метионина в суммарные белки печени, почек и скелетных мышц. Аминокислоту вводили внутривенно за 2 ч до забоя в дозе 1,665 МБк на 100 г массы тела животного. Ткани для определения удельной радиоактивности белка гомогенизировали с 10 % раствором трихлоруксусной кислоты (ТХУ), двукратно промывали 5 % раствором ТХУ, подвергали кислотному гидролизу при 60 °С в течение 30 мин, охлаждали, вновь промывали спиртом, смесью спирт—эфир (1:2), затем дву-

кратно эфиром и высушивали. Навеску сухого белка растворяли в концентрированной муравьиной кислоте и наносили на бумажные фильтры [19]. Радиоактивность проб измеряли на сцинтилляционном счетчике «Isocap-300» (США).

Для коррекции нарушений белкового обмена у обожженных крысят использовали анаболический стероид ретаболил и производное пиримидина оксиметацил (4-метил-5-оксурацил). Животные были разделены на 4 группы: 1-я — интактные крысы; 2-я — контрольные животные с ожогами 23—25 % поверхности тела. Остальным животным сразу после нанесения термического ожога вводили лекарственные препараты; 3-я — ретаболил внутривенно из расчета 1 мг на 100 г массы; 4-я — оксиметацил внутривенно из расчета 5 мг на 100 г массы тела. В последующие дни препараты продолжали вводить ежедневно в утренние часы в указанных дозах.

Результаты исследований обработаны методами вариационной статистики [7] с применением ЭВМ «Наири-С».

### Результаты и обсуждение

Исследования показали, что в остром периоде экспериментальной ожоговой болезни у крысят развиваются выраженные нарушения белкового обмена по всем изученным показателям (табл. 1). Так, содержание белка в сыворотке крови в условиях опытов снижалось на 21,2—26 %.

Полученные результаты согласуются с данными клинических наблюдений, свидетельствующими о гипопротеемии у обожженных детей [5, 21]. В числе причин, приводящих к возникновению гипопротеемии, указывают плаз-

мопотерию [24, 27], выраженную экскрецию белка и азота с мочой [25, 26], усиление протеолитических процессов в тканях [8], нарушение биосинтетических процессов в печени [18, 20].

В ряду указанных причин особое значение имеет нарушение соотношения анаболических и метаболических процессов белкового обмена [10, 13]. В пользу этой точки зрения могут свидетельствовать многочисленные факты установления отрицательного азотистого баланса, азотемии и азотурии у обожженных [2, 23, 30].

Результаты наших исследований также указывают на существенное повышение содержания конечного продукта белкового катаболизма — мочевины в сыворотке крови крысят после термического ожога (см. табл. 1).

Одним из основных факторов, приводящих к развитию азотемии, является усиление распада белка в организме. Для характеристики протеолитических процессов мы определяли активность катепсина D в тканях печени, почек и скелетных мышц. Исследования показали, что термическая травма кожи вызывает у обожженных крысят активацию катепсина D в интактных тканях на 101—236 % (см. табл. 1).

Оценивая значение при ожоговой болезни активации распада белка, следует упомянуть, что она является интегральной реакцией организма и сопро-

Таблица 1  
Изменения показателей белкового обмена при термическом ожоге у неполовозрелых крыс ( $M \pm m$ )

Срок исследования после ожога, сутки	Общий белок в сыворотке крови, г/л	Мочевина в сыворотке крови, ммоль/л	Активность катепсина D, мкг тирозина на 1 мг белка за 1 ч			Интенсивность включения $^{35}\text{S}$ -метионина в белки тканей, имп/мин/мг белка		
			печень	почки	скелетные мышцы	печень	почки	скелетные мышцы
Исходные показатели (норма)	68,7±2,6	5,63±0,35	7,4±0,5	12,2±0,9	2,5±0,2	405±11	666±28	258±9
1-е	50,7±1,2 (74)	11,2±0,84 (199)	14,9±1,1 (201)	26,4±1,8 (216)	8,4±0,7 (336)	697±32 (172)	1205±56 (181)	173±7 (67)
P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
3-и	54,1±1,6 (79)	8,47±0,54 (150)	17,8±1,2 (240)	34,6±2,6 (284)	7,2±0,6 (287)	490±24 (121)	670±27 (101)	214±9 (83)
P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	>0,05	<0,001
7-е	54,3±1,7 (79)	9,05±0,54 (161)	20,1±1,9 (271)	30,3±2,8 (248)	6,8±0,6 (272)	316±18 (78)	500±25 (75)	218±12 (84)
P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Примечание. Число животных в каждой группе 8—10; исходные показатели приняты за 100 %; в скобках — данные в процентах.

Таблица 2

Влияние ретаболила и оксиметацила на содержание общего белка и мочевины в сыворотке крови неполовозрелых крыс при термическом ожоге ( $M \pm m$ )

Лекарственный препарат	Срок исследования после ожога, сутки	Общий белок, г/л	<i>P</i>	Мочевина, ммоль/л	<i>P</i>
Ретаболил	1-е	50,9±1,29 (74)	>0,05	8,15±0,53 (145)	<0,05
	3-и	55,4±1,72 (81)	>0,05	7,9±0,48 (140)	>0,05
	7-е	60,5±1,89 (88)	<0,05	6,07±0,31 (108)	<0,001
Оксиметацил	1-е	54,8±1,46 (80)	<0,05	6,04±0,38 (107)	<0,001
	3-и	57,0±1,45 (83)	>0,05	6,9±0,44 (123)	<0,05
	7-е	59,3±1,64 (86)	<0,05	5,28±0,21 (94)	<0,001

Примечание. В табл. 2—4: каждая цифра — среднее 8—10 опытов. *P* — по сравнению с контрольной группой нелеченых животных, в скобках — данные в процентах.

воздаёт и другие экстремальные состояния. В ее возникновении при термических поражениях наряду с перестройкой нейрогуморальной регуляции [6, 15] могут, вероятно, участвовать и другие факторы «метаболического поломы» [16]: гипоксия, действие «ожоговых токсинов», липоперекисей [3, 8, 17].

Важное значение при ожоговой болезни ввиду резкого усиления распада белка и развития белковой недостаточности имеет состояние биосинтеза тканевых белков. Эксперименты с введением <sup>35</sup>S-метионина животным после нанесения им термической травмы показали существенные изменения интенсивности включения аминокислоты в суммарные белки печени, почек и скелетных мышц (см. табл. 1). Эти сдвиги имели определенную специфичность в различных тканях и зависели от сроков исследования. Так, в печени и поч-

ках крысят термическая травма приводила к резкому усилению синтеза тканевых белков в периоде шока (1-е сутки) и отчетливому ослаблению этого процесса в периоде токсемии (7-е сутки). В то же время в скелетных мышцах крысят снижение удельной радиоактивности белка при введении <sup>35</sup>S-метионина отмечается уже в периоде ожогового шока и продолжается в периоде ожоговой токсемии. Угнетение процессов биосинтеза тканевых белков после ожога, отмеченное в наших опытах, может быть связано с нарушением их энергообеспечения [4] и сопряженного с этими процессами обмена нуклеиновых кислот [9].

На основании полученных данных можно заключить, что при термических ожогах у неполовозрелых животных возникает существенное превалирование катаболических реакций белкового метаболизма над анаболическими.

Таблица 3

Влияние лекарственных препаратов на активность катепсина D в тканях неполовозрелых крыс после термического ожога, мкг тирозина на 1 мг белка за 1 ч ( $M \pm m$ )

Исследуемая ткань	Срок исследования после ожога, сутки	Ретаболил	<i>P</i>	Оксиметацил	<i>P</i>
Печень	1-е	12,2±0,7 (165)	<0,05	12,6±0,6 (170)	>0,05
	3-и	16,4±1,1 (220)	>0,05	13,6±0,6 (183)	<0,01
	7-е	18,3±0,6 (247)	>0,05	16,5±1,2 (223)	>0,05
Почки	1-е	22,0±1,5 (180)	>0,05	21,0±1,8 (175)	<0,05
	3-и	31,0±2,1 (254)	>0,05	22,0±1,1 (183)	<0,01
	7-е	25,6±2,1 (210)	<0,05	25,0±2,1 (207)	>0,05
Скелетная мышца	1-е	7,0±0,6 (280)	>0,05	5,0±0,3 (198)	<0,001
	3-и	5,6±0,2 (224)	<0,05	5,5±0,5 (220)	<0,02
	7-е	6,4±0,5 (256)	>0,05	4,8±0,3 (192)	<0,01

Таблица 4

Влияние лекарственных препаратов на интенсивность включения  $^{35}\text{S}$ -метионина в суммарные белки интактных тканей у крысят при термической травме, имп/мин/мг белка ( $M \pm m$ )

Исследуемая ткань	Сроки исследования после ожога, сутки	Ретаболил	<i>P</i>	Оксиметацил	<i>P</i>
Печень	1-е	737±80 (182)	<0,001	575±30 (142)	<0,05
	3-и	619±36 (153)	<0,02	547±27 (135)	>0,05
	7-е	729±49 (180)	<0,001	778±59 (192)	<0,001
Почки	1-е	786±33 (118)	<0,001	939±39 (141)	<0,001
	3-и	1132±64 (170)	<0,001	719±33 (108)	>0,05
	7-е	1006±41 (151)	<0,001	966±37 (145)	<0,001
Скелетная мышца	1-е	206±10 (80)	<0,02	222±10 (86)	<0,001
	3-и	364±19 (141)	<0,001	243±8 (94)	<0,05
	7-е	289±18 (118)	>0,05	310±13 (120)	<0,01

Тяжелым последствием белковой недостаточности при ожоговой болезни является развитие необратимых структурных и функциональных изменений органов и систем, нередко приводящих к истощению организма и летальному исходу [12, 29]. Это обуславливает необходимость борьбы с белковой недостаточностью, для чего в настоящее время применяются как заместительная терапия, так и лекарственная коррекция, направленная на снижение катаболических и усиление анаболических процессов. В связи с этим нами изучено влияние стероидного анаболика ретаболила и производного пиримидина оксиметацила на состояние белкового обмена у неполовозрелых животных при тяжелом ожоге.

Результаты исследований показали, что введение лекарственных препаратов способствует коррекции гипопроteinемии у обожженных животных (табл. 2). При этом статистически достоверные изменения были отмечены при введении ретаболила на 7-е сутки, а при введении оксиметацила — на 1-е и 7-е сутки после ожога.

Было отмечено также нормализующее влияние лекарственных средств и на уровень мочевины. Значительное снижение его наблюдалось в сыворотке крови крысят, получавших оксиметацил (см. табл. 2). Так, на 1-е сутки после ожога уровень мочевины при введении этого препарата достоверно не отличался от исходного значения, на 3-и сутки — существенно снижался, а уже на 7-е сутки после ожога соответствовал норме. Применение ретаболи-

ла вызывало достоверное понижение концентрации мочевины только на 7-е сутки эксперимента.

Исследование активности катепсина D в тканях показало, что лекарственные препараты понижают степень активации протеолиза, вызванной действием термической травмы. Так, при действии оксиметацила у обожженных крысят было отмечено достоверное снижение активности катепсина D в печени на 3-и сутки, в почках — на 1-е и 3-и сутки, а в скелетных мышцах — во все сроки исследования (табл. 3). Введение ретаболила обожженным животным также вызывало снижение протеолиза в тканях, однако достоверные изменения были обнаружены в почках на 7-е сутки, а в печени и скелетных мышцах — на 1-е и 3-и сутки опыта соответственно.

О действии исследуемых препаратов на процессы белкового анаболизма судили по изменению интенсивности включения  $^{35}\text{S}$ -метионина в суммарные белки тканей. Введение ретаболила обожженным животным обуславливало существенное повышение интенсивности включения метионина в суммарные белки всех исследованных тканей (табл. 4), однако этот эффект не был однозначным. Так, в печени и скелетных мышцах отмечалось усиление синтеза белка в течение всего острого периода ожоговой болезни. Особенно оно было выражено в печени на 7-е сутки, в скелетных мышцах — на 3-и сутки опыта. В то же время в почках существенное повышение интенсивности включения  $^{35}\text{S}$ -метионина отмечалось

только в периоде токсемии (3-и и 7-е сутки), а в фазе шока (1-е сутки) она достоверно снижалась по сравнению с таковой в контрольной группе.

Применение оксиметацила также повышало интенсивность включения  $^{35}\text{S}$ -метионина в суммарные белки тканей. Наиболее выраженное усиление биосинтеза белка отмечалось в печени. Подобно ретаболилу оксиметацил значительно усиливал биосинтез белка на 1-е, 3-и и 7-е сутки опыта в скелетных мышцах, печени и почках, хотя, по сравнению с действием анаболического стероида, этот эффект был менее выражен. В то же время в почках на 1-е сутки, а в печени на 7-е сутки после ожога введение пиримидинового аналога вызывало более значительную в сравнении с ретаболилом стимуляцию синтеза белка.

Таким образом, при сравнительном изучении влияния ретаболила и оксиметацила на белковый обмен при экспериментальной ожоговой болезни у неполовозрелых животных выявлена большая эффективность пиримидинового производного. Высокая фармакологическая активность оксиметацила отмечена также при изучении влияния различных производных пиримидина на процессы иммуногенеза [14]. Учитывая низкую токсичность пиримидиновых производных [1, 14] и их значительную эффективность в коррекции нарушений обмена белка, по-видимому, необходимо включать оксипроизводные пиримидина, оказывающие выраженное анаболическое и антикатаболическое действие, в комплексную терапию ожоговой болезни у детей.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Билич Г. Л. Стимуляция регенерации и защитных механизмов в детской хирургии. — М., 1976.
2. Билич Г. Л., Щедловский М. В. // Педиатрия. — 1971. — № 12. — С. 35—37.
3. Бурлакова Е. Б., Заец Т. Л., Молочкина Е. М. и др. // Всесоюзная конф. «Биоантисидант, 1-я». Тезисы. — Черноголовка, 1983. — С. 156—157.
4. Вальдман Б. М. // Вопросы биохимии ожоговой травмы. — Челябинск, 1973. — С. 84—91.
5. Воздвиженский С. И., Иванова М. П. // Хирургия. — 1976. — № 2. — С. 36—40.
6. Голиков П. П., Бобкова А. С., Потанова С. И. // Клин. мед. — 1981. — № 3. — С. 99—104.
7. Доерфель К. Статистика в аналитической химии: Пер. с нем. — М., 1969.
8. Заец Т. Л. // Вопр. мед. химии. — 1969. — № 1. — С. 43—46.
9. Идрисова Ф. М., Ханбекова Е. Н. // Вопросы экспериментальной и клинической медицины. — Уфа, 1980. — С. 39.
10. Камиллов Ф. Х. // Вопросы биохимии ожоговой травмы. — Челябинск, 1973. — С. 6—27.
11. Камиллов Ф. Х., Давлетов Э. Г., Гильманов А. Ж. // Вопр. мед. химии. — 1982. — № 1. — С. 56—59.
12. Клячкин Л. М., Пинчук В. М. Ожоговая болезнь. — Л., 1969.
13. Кузин М. И., Заец Т. Л. // Хирургия. — 1981. — № 5. — С. 35—43.
14. Лазарева Д. Н., Алехин Е. К. Стимуляторы иммунитета. — М., 1985.
15. Лемус В. Б., Давыдов В. В. Нервные механизмы и кортикостеронды при ожогах. — Л., 1974.
16. Лицишиц Р. И. // Метаболические основы острой ожоговой токсемии. Омск, 1977. — С. 3—5.
17. Лицишиц Р. И. // Всесоюзная конф. по проблеме «Глубокие и обширные ожоги, 2-я: Тезисы. — М., 1979. — С. 21—22.
18. Окадьев В. С. Патологические изменения печени при ожоговой болезни у детей: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 1972.
19. Прохорова М. И., Туникова З. Н. Методы определения радиоактивного углерода. — Л., 1959.
20. Розанов В. Е. // Восп.-мед. журн. — 1982. — № 4. — С. 66—67.
21. Alexander J. W., Macmillan B. G., Dwight-stinnett J. et al. // Ann. Surg. — 1980. — Vol. 192, N 4. — P. 505—515.
22. Anson M. L. // J. gen. Physiol. — 1939. — Vol. 22. — P. 79—83.
23. Artz C. P. // J. Trauma. — 1976. — Vol. 16. — P. 3—15.
24. Carvajal H. F., Linares H. A., Brouhard B. H. // Surg. Gynec. Obstet. — 1979. — Vol. 149, N 2. — P. 193—202.
25. Coombes E. J. // J. clin. Chem. clin. Biochem. — 1981. — Vol. 19, N 4. — P. 244—247.
26. Davies J. W., Fell G. S. // Clin. chim. Acta. — 1974. — Vol. 51, N 1. — P. 83—92.
27. Diem E. // Wien. klin. Wschr. — 1978. — Bd 90, N 9. — S. 290—298.
28. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
29. Sawchuk R. J., Rector T. S. // Clin. Pharmacol. — 1980. — Vol. 5, N 6. — P. 548—556.
30. Threlfall C. J., Little R. A., Frayn K. N. // Burns. — 1980. — Vol. 7, N 11. — P. 25—32.

Поступила 07.04.86

#### RETABOLYL AND OXYMETACYL INFLUENCE ON PROTEIN METABOLISM IN EXPERIMENTAL BURNS OF PREADOLESCENT RATS

E. G. Davletov, R. M. Saliakhova, F. Kh. Kamilov

Chair of Biochemistry, Medical School, Ufa  
Impairments of protein metabolism, expressed as predominance of catabolism over ana-

bolism and hypoproteinemia, were observed in one month old rats with experimental burns of the IIIA-IIIB degree, when 20-25 % of a body surface was impaired. After administration of steroid drugs (retabolyl at a dose of 1 mg/100 g of body mass or oxymetacyl — 4-methyl-5-oxyuracyl — at a dose of 5 mg/100 g of body mass) content of protein and urea

normalized in blood serum, activity of cathepsin D decreased in tissues, the rate of  $^{35}\text{S}$ -methionine incorporation into tissue proteins increased. The pyrimidine derivative oxymetacyl exhibited higher effect on protein metabolism in burns of preadolescent rats as compared with retabolyl.

УДК 615.362.438.017:615.276.4].015.4:612.014.46.015.1

*В. Я. Арион, Ю. И. Хроменков, А. К. Тагирова, А. В. Караулов,  
Ю. Н. Бреусов, И. В. Санина*

## ВЛИЯНИЕ Т-АКТИВИНА НА ФЕРМЕНТЫ МЕТАБОЛИЗМА КСЕНОБИОТИКОВ

НИИ физико-химической медицины, Москва

Т-активин — комплекс пептидов тимуса с ярко выраженным иммуномодулирующим действием. Препарат воздействует на различные ступени дифференцировки Т-лимфоцитов, активирует предшественники киллерных Т-клеток у мышей, влияет на репродукцию и миграцию тимоцитов, т. е. в целом способствует нормальному созреванию и функционированию Т-звена иммунной системы [1]. Т-активин успешно прошел апробацию в клинике при лечении иммунодефицитных состояний [2, 3, 7]. Вместе с тем совершенно не изучен вопрос о влиянии Т-активина на такую важную защитную систему организма, как ферменты метаболизма ксенобиотиков (ФМК). Эта полифункциональная мультиферментная система связана прежде всего с цитохромом Р-450, а также с группой ферментов, участвующих в конъюгации промежуточных метаболитов с глутатионом, сульфогруппами и др.

Имеются данные, указывающие на связь между иммунной системой и ФМК. Так, была исследована [4] взаимосвязь иммунных реакций и биохимического механизма поддержания гомеостаза организма. В результате было установлено, что функции монооксигеназной и иммунологической систем сопряжены между собой. Однако до сих пор не выяснено влияние иммуноперегulatoryных пептидов на монооксигеназную систему.

Цель настоящей работы — исследование действия Т-активина на ферменты метаболизма ксенобиотиков и характеристика иммунитета мышей с вторичной иммунологической недостаточностью.

### Методика

В опытах были использованы мыши-самцы СВА массой 20—22 г по 6—8 животных в группе. Т-активин был получен по методике, описанной ранее [1]. Препарат вводили внутривенно в дозе 5 мкг на мышшь в течение 5 дней после иммунодефицитного состояния. Для получения картины подострой бензольной интоксикации (БИ) бензол вводили в дозе 2 мл на 1 кг массы тела животного в течение 2 мес через день, для получения хронической БИ — в течение 6 мес. При планировании эксперимента предусматривалось, чтобы забой мышшей производили одновременно. Мышей декалтировали через 24 ч после последней инъекции Т-активина. Активность или содержание ферментов метаболизма ксенобиотиков изучали в микросомах гепатоцитов, а иммунологические исследования проводили на лимфоцитах селезенки и лимфатических узлов. Таким образом, показатели иммунной системы и ФМК мы изучали на одном и том же животном.

Микросомы из печени выделяли методом дифференциального центрифугирования. По методу [8] устанавливали содержание цитохрома Р-450. Активность цитохром с-редуктазы определяли кинетическим методом по изменению оптической плотности при длине волны 550 нм [9]. Бензпиренгидроксилазную активность выявляли флуориметрическим методом по количеству образовавшихся гидроксированных продуктов [10]. В качестве стандарта для калибровки использовали 3-ОН-бензпирен. Активность глутатион-S-трансферазы определяли методом [11]. Инкубационная смесь содержала 0,1 мМ 1-хлор-2,4-динитробензол и 1,0 мМ восстановленный глутатион в 0,01 М фосфатном буфере рН 6,5. Реакцию инициировали добавлением 20—100 мкг цитозольного белка. Изменение оптической плотности устанавливали при длине волны 340 нм, проводя коррекцию на неферментативную реакцию. Для измерений активности эпоксидгидразы использовали реакцию превращения 9,10-фенантrenoксида в 9,10-фенантrenoидол [12]. Реакционная смесь содержала 100—200 мкг микросомального белка, 10—20 мкмоль субстрата в 1 мл 0,015 М трис НСl-буфера рН 8,7. Реакцию проводили в термостатируемой кювете при 37°C. Относительную флуоресценцию регистрировали при длине волны возбуждения 270 нм

и эмиссии 320 нм как функцию времени. Известные концентрации высокоочищенного 9,10-фенантренола использовали для построения калибровочной кривой. Лимфоциты из лимфоузлов и селезенки выделяли общепринятыми способами, макрофаги отделяли адсорбцией на пластике или с помощью обработки карбонильным железом [13]. Активность НК-клеток тестировали на клетках-мишенях линии УАС-1 [14]. Антителозависимую клеточную цитотоксичность определяли по методу [5], в качестве клеток-мишеней использовали эритроциты барана, цитотоксичный эффект оценивали спектрофотометрически по выходу гемоглобина в инкубационную среду. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

Для изучения действия Т-активина на ФМЖ были выбраны 2 модели — подострая и хроническая БИ. БИ является адекватной моделью вторичного иммунодефицита и предлейкозного состояния [15]. Действие бензола на иммунную систему состоит преимущественно в нарушении Т-зависимых иммунных реакций; это связано как с прямым токсическим действием на Т-клетки, так и с нарушением регуляторных звеньев иммунитета. Полученные в настоящей работе данные о влиянии бензола и Т-активина на некоторые показатели иммунитета представлены в табл. 1. Показано, что различие между подострой и хронической БИ заключается лишь в степени угнетения различных показателей иммунной системы. Т-активин оказывает воздействие на все изученные иммунологические параметры, но не в одинаковой степени. Так, под воздействием препарата активность НК-клеток возрастает и достигает нормального уровня при хронической БИ. В опытах с подострой БИ

наблюдается та же тенденция к увеличению активности этих клеток, однако в исследуемый период полного восстановления активности не наблюдалось. Т-активин стимулирует угнетенные бензолной интоксикацией К-клетки. Причем в подостром периоде этот параметр достигает нормы, а при хронической БИ возрастает, но не так выражено. Значительное влияние Т-активина обнаруживается при анализе количества антителообразующих клеток на обеих исследованных моделях. Под действием бензола существенно снижается спонтанная активность макрофагов в опытах с хронической БИ. При этом препарат существенно повышает активность этих клеток. В опытах с активацией макрофагов препарат усиливает активность клеток в НСТ-тесте в 2 раза и нормализует ее. Хотя при подострой БИ показатели спонтанной активности не столь снижены, как в хронических экспериментах, достоверного изменения показателей под действием Т-активина не наблюдалось. Такая же картина обнаруживается и в экспериментах с подострой интоксикацией и для активированных макрофагов.

В экспериментах по изучению влияния бензола на ферменты, метаболизирующие ксенобиотики, не наблюдалось однонаправленного действия бензола на обеих моделях. Оказалось (табл. 2), что хроническая БИ приводит к снижению активности всех исследуемых ферментов, за исключением глутатион-S-трансферазы, активность которой несколько повышается. В противоположность этому подострая БИ вызывает резкое увеличение активности ферментов второй фазы метаболизма ксенобиотиков: глутатион-S-трансферазы в

Таблица 1  
Действие Т-активина на иммунологический статус мышей с бензолной интоксикацией

Иммунологические показатели	Подострая БИ		Хроническая БИ		Контроль
	Т-активин				
	—	+	—	+	
Активность НК-клеток	6,8±1,9	9,6±2,0	7,7±3,1*	12,7±5,6	12,9±4,5
Активность К-клеток	10,9±1,4*	16,7±0,7	9,6±2,2	11,9±3,1	17,0±3,0
Количество антителообразующих клеток	40,0±9,1*	100,5±28,9	22,3±3,5*	60,1±4,6	105,8±24,0
Активность макрофагов в НСТ-тесте	8,1±2,7 <sup>а</sup> 10,6±6,0 <sup>б</sup>	8,9±1,9 10,2±3,7	5,2±0,9* 10,6±3,8*	8,3±2,1 20,5±4,2	11,7±3,1 18,5±1,1

Примечание: а — спонтанная, б — активированная активность макрофагов. Здесь и в табл. 2 звездочкой отмечено  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

Влияние Т-активина на активность ферментов метаболизма ксенобиотиков в печени мышей с бензольной интоксикацией

Ферменты	Подострая БИ		Хроническая БИ		Контроль
	Т-активин				
	-	+	-	+	
Содержание цитохрома Р-450, нмоль/мг	0,82±0,11*	0,66±0,12	0,40±0,05*	0,53±0,07	0,61±0,08
Бензпиренгидроксилаза, нмоль/мг·мин	566±52	488±35	320±46*	495±41	529±40
Цитохром с-редуктаза, мкмоль/мг·мин	0,20±0,03	0,17±0,02	0,13±0,02*	0,16±0,01	0,17±0,02
Глутатион-S-трансфераза, мкмоль/мг·мин	10,5±0,9*	3,8±0,5	3,1±0,6	4,2±0,3	2,5±0,4
Эпоксидгидраза, нмоль/мг·мин	31,0±2,4*	21,4±1,7	7,3±1,3*	12,5±1,5	17,0±1,2

4 раза, эпоксидгидразы в 1,8 раза. Незначительное увеличение активности наблюдали и для ферментов первой фазы метаболизма — бензпиренгидроксилазы и цитохрома Р-450.

Установлено, что Т-активин оказывает регулирующее действие на ФМК (см. табл. 2). В том случае, если наблюдается повышение активности ферментов (подострая БИ), препарат снижает активность до нормы. Когда же при хронической БИ обнаруживается снижение активности, Т-активин способствует ее повышению. На иммунорегуляторную функцию пептидов тимуса указывалось ранее [6].

В настоящей работе приводятся экспериментальные данные, которые свидетельствуют о том, что пептиды тимуса обладают *in vivo* более широким спектром действия и выступают как биорегуляторы. Конечно, эти данные не позволяют заключить, что Т-активин непосредственно влияет на монооксигеназную систему клетки. Не исключено, что это действие опосредовано через процессы, которые связаны с усилением иммунологических функций организма. Для проверки этого предположения необходимо изучить влияние Т-активина на ФМК *in vitro*.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Арюн В. Я. // Иммунология. — М., 1982. — Т. 10. — С. 45—53.
2. Арюн В. Я., Санина И. В., Бреусов Ю. П. // Химия и биология иммунорегуляторов. — Рига, 1985. — С. 39—52.
3. Зиллин Ю. И., Чуканов С. В., Каганов Б. С. // Иммунология. — 1982. — № 3. — С. 79—82.
4. Ковалев И. Е. // Химия и биология иммунорегуляторов. — Рига, 1985. — С. 188—205.

5. Ковалев И. Е., Полевая О. Ю. // Биохимические основы иммунитета к низкомолекулярным химическим соединениям. — М., 1985. — С. 303.
6. Линднер Д. П., Арюн В. Я. // Иммунология. — 1985. — № 6. — С. 21—25.
7. Лопухин Ю. М. // Иммунология. — М., 1982. — Т. 10. — С. 30—44.
8. Чучалин А. Г., Арюн В. Я., Бабушкина В. А. и др. // Тер. арх. — 1984. — № 10. — С. 10—14.
9. Cerrotini J., Brunner J. // B and T Cells in Immune Recognition. — London, 1977. — P. 319.
10. Dansette P. M., Du Bois G. C., Jerina D. M. // Analyt. Biochem. — 1979. — Vol. 97. — P. 340—345.
11. Dehnen W., Tomingas R., Roos J. // Ibid. — 1973. — Vol. 53. — P. 373.
12. Habig W. H., Pabst M. J., Jacoby W. B. // J. biol. Chem. — 1974. — Vol. 249. — P. 713.
13. Jam L. T., Li C. G., Crosby W. H. // Amer. J. clin. Path. — 1971. — Vol. 55. — P. 283.
14. Karaulov A. V. // Haematologia. — 1981. — Vol. 14, N 1. — P. 13.
15. Masters B. S., Williams C. H., Kamin H. // Meth. Enzymol. — 1967. — Vol. 10. — P. 566—573.
16. Omura T., Sato R. // J. biol. Chem. — 1964. — Vol. 239. — P. 2379.

Поступила 10.04.86

## EFFECT OF T-ACTIVIN ON THE XENOBIOTIC METABOLIZING ENZYMES

V. Ya. Arion, Yu. I. Chromenkov, A. K. Tagirova, A. V. Karaulov, Yu. N. Breusov, I. V. Sanina

Institute of Physico-Chemical Medicine, Moscow

Effect of T-activin on some xenobiotic metabolizing enzymes and several immunity parameters in secondary immune deficiency (subacute and chronic benzene intoxication) were investigated. T-activin was shown to regulate the xenobiotic metabolizing enzyme system. The compound decreased the enzymatic activity in subacute benzene intoxication, approaching their values up to the control level. In chronic benzene intoxications, which were accompanied by decrease in xenobiotic metabolizing enzy-

mes activity, except of glutathione-S-transferase, T-activin stimulated these enzymes. At the same time, T-activin increased some immuno-

logical parameters in these models. Thymus-tropic peptides appear to be the bioregulators of some *in vivo* systems.

УДК 612.351.11+612.173.1.015.1|014.46:|615.31:547.262+615.31:547.791

*В. Д. Антоненков, В. А. Гусев, С. Н. Краснова*

## **ВЛИЯНИЕ ЭТАНОЛА И ИНГИБИТОРА КАТАЛАЗЫ АМИНОТРИАЗОЛА НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ АНТИОКИСЛИТЕЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ В ПЕЧЕНИ И СЕРДЦЕ КРЫС**

ВНИИ общей и судебной психиатрии им. В. П. Сербского, Москва

В последнее время накапливается все больше данных, указывающих на существенную роль пероксидам в клеточной патологии [3]. Эти субклеточные структуры содержат несколько перекисьгенерирующих оксидаз и каталазу — фермент детоксикации  $H_2O_2$ . Совместное введение животным этанола и высокоспецифичного ингибитора каталазы — 3-амино-1,2,4-триазола (аминотриазола) — сопровождается развитием в сердце крыс патологического процесса, который по ряду морфологических признаков имеет сходство с алкогольной кардиомиопатией у человека [17]. Предполагается, что в данном случае пусковым механизмом, приводящим к гибели кардиомиоцитов, является активация внутриклеточного перекисного окисления липидов. В то же время в печени этих животных развития воспалительных и деструктивных изменений не наблюдается [17]. Подобные различия свидетельствуют об органоспецифичности эффектов этанола и аминотриазола. Одной из причин избирательности токсического действия этих веществ может являться неодинаковый уровень антиокислительной защиты клетки. Известно, что в печени ферментные системы детоксикации перекисей и активных форм кислорода значительно более активны, чем в сердце [1, 7, 19]. Кроме того, имеются данные об индукции отдельных компонентов этих систем в гепатоцитах при длительном введении этанола [9, 15].

В настоящей работе исследовано влияние острого и хронического воздействия этанола, аминотриазола и совместного введения этих веществ на содержание восстановленного глутатиона, а также на активность ряда ферментов антиокислительной защиты в ткани печени и сердца крыс.

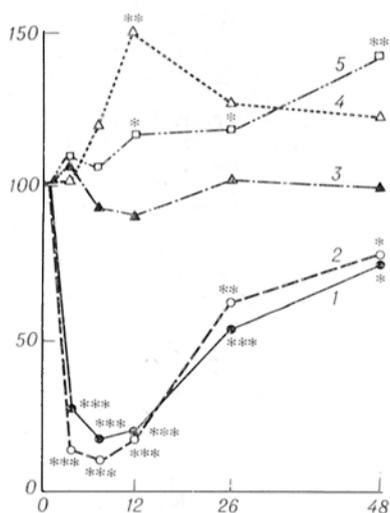
### **Методика**

В работе использовали самцов крыс линии Вистар с начальной массой тела 160—180 г. При хроническом введении этанола и аминотриазола животным содержали в течение 8—10 нед на сбалансированном по основным компонентам (белки, жиры, углеводы) полужидком корме, в состав которого входили также витамины и минеральные вещества [1]. Опыты проводили параллельно на 4 группах крыс: 1-я — контроль, 2-я — этанол, 3-я — аминотриазол, 4-я — этанол+аминотриазол. Животные 2-й и 4-й групп в составе корма получали этанол в конечной концентрации 10% (34—36% от общей калорийности корма; 10—12 г на 1 кг массы тела в сутки, крысы 1-й и 3-й групп — изокалорийное количество сахарозы. Аминотриазол в виде 10% водного раствора вводили интранеритонсально в дозе 1 г/кг 3 раза в неделю. Животным 1-й и 2-й групп аналогичным образом вводили 0,9% раствор натрия хлорида. Крыс лишали корма и производили последние инъекции аминотриазола за 18—20 ч до забоя. При однократной алкогольной интоксикации спирт вводили в виде 40% водного раствора интрагастрально животным, голодавшим в течение 18—20 ч, в дозе 9 г/кг. Через 6 ч животных забивали. Однократную инъекцию аминотриазола (1 г/кг) осуществляли за 20 ч до забоя. Сразу после декапитации у крыс собирали кровь, в которой методом газовой хроматографии [10] определяли содержание этанола. Как при однократном, так и при хроническом введении этанола его концентрация в крови в момент забоя животных не превышала 0,5—0,7 мМ. Печень и сердце перфузировали холодной средой выделения (0,15 М КСl, 20 мМ трис-НСl-буфер рН 7,4). Органы извлекали и затем быстро замораживали в сухом льду, после чего кусочки ткани хранили при  $-80^\circ\text{C}$  не более 2—3 нед. Гомогенизацию проводили в среде выделения (5 мл среды на 1 г ткани) в гомогенизаторе Даунса (стекло/тефлон). Активность каталазы (КФ 1.11.1.6) [4] и супероксиддисмутазы (КФ 1.15.1.1) [21] измеряли при  $25^\circ\text{C}$ , остальных ферментов — при  $37^\circ\text{C}$ . Субстратами для селензависимой глутатионпероксидазы (КФ 1.11.1.9) [22] и глутатион-S-трансферазы (КФ 2.5.1.18) [13] служили соответственно  $H_2O_2$  и 1-хлор-2,4-динитробензол. Активность глутатионредуктазы (КФ 1.6.5.2) [30] и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.49) [31] определяли по скорости восстановления НАДФ<sup>+</sup>. Активность каталазы [23] и супероксиддисмутазы [21] выражали

в относительных единицах. Активность остальных ферментов представлена в микромолях за 1 мин на 1 г ткани. Количество восстановленного глутатиона измеряли в цельном гомогенате органов после осаждения белка 10 % трихлоруксусной кислотой, используя реактив Эллимана [24]. Содержание белка определяли по методу [18].

### Результаты и обсуждения

Как видно на рисунке, введение крысам аминотриазола сопровождается существенным уменьшением активности каталазы печени и сердца. Наибольшее ингибирование фермента наблюдается в период от 3 до 12 ч после однократной инъекции. Затем активность каталазы постепенно возрастает, однако даже через 48 ч она составляет лишь около 70 % от исходной. Известно, что аминотриазол необратимо ингибирует каталазу и восстановление ее активности может происходить только за счет синтеза новых молекул фермента [3, 7]. Одновременно в ткани печени исследовали содержание глутатиона, а также активность глутатион-S-трансферазы и супероксиддисмутазы (см. рисунок). Через 12 ч с момента введения аминотриазола наблюдали достоверное увеличение в клетках печени количества восстановленного глутатио-



Изменение активности ферментов печени и сердца при однократном введении аминотриазола.

По оси абсцисс — время с момента однократной инъекции аминотриазола в дозе 1 г/кг (в ч); по оси ординат — изменение активности ферментов и содержания глутатиона (% от показателей в контроле). 1 — каталаза печени; 2 — каталаза сердца; 3 — супероксиддисмутаза; 4 — глутатион-S-трансфераза; 5 — глутатион. Звездочками обозначена достоверность различий с показателями в контроле: одна звездочка —  $P < 0,05$ , две —  $P < 0,01$ , три —  $P < 0,001$ .

на на 19 %, через 48 ч содержание трипептида возрастает на 40 %. Выявлено также увеличение активности глутатион-S-трансферазы. Изменения активности супероксиддисмутазы обнаружено не было. Полученные результаты подтверждены при изучении активности ферментов в группе крыс, которым однократные инъекции аминотриазола производили за 20 ч до забоя (табл. 1). И в данном случае наблюдали выраженное угнетение активности каталазы при параллельном возрастании в ткани печени содержания глутатиона и активности глутатион-S-трансферазы. Активность других исследованных ферментов (глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и супероксиддисмутазы) не изменялась.

Через 6 ч после однократного интрагастрального введения этанола активность ферментов антиокислительной защиты в печени не отличалась от значений, полученных в контрольной группе животных (см. табл. 1). Не было также выявлено достоверного уменьшения содержания глутатиона. Последнее, видимо, объясняется использованием в наших опытах высокой дозы алкоголя (9 г/кг). Согласно данным литературы, умеренное снижение концентрации восстановленного глутатиона в печени (на 20—50 %), как правило, выявляется при однократном введении спирта в дозе 4—6 г/кг [12, 27]. Кроме того, показано [29], что в суспензии гепатоцитов также наблюдается уменьшение количества глутатиона при добавлении этанола в концентрации 10 мМ и особенно 20 мМ, однако при увеличении содержания спирта до 40 мМ уровень глутатиона в клетках печени вновь возрастал. По нашим данным, концентрация алкоголя в крови крыс через 6—8 ч после скармливания животных этанолсодержащего рациона превышает 60 мМ. Как видно из табл. 1, совместное введение этанола и аминотриазола сопровождается активацией глутатион-S-трансферазы, однако содержание глутатиона в ткани печени не изменяется.

Более выраженные различия получены при хроническом введении этанола и аминотриазола (табл. 2). В этом случае также наблюдается ингибирование активности каталазы под влиянием аминотриазола. Хроническое введение этанола сопровождается уве-

Т а б л и ц а 1

Влияние однократного введения этанола и аминотриазола на активность фермента антиоксидательной защиты в гомогенате печени крыс ( $M \pm m$ )

Показатель	Группа животных			
	1-я (контроль)	2-я (этанол)	3-я (аминотриазол)	4-я (аминотриазол + этанол)
	активность, мкмоль за 1 мин на 1 г ткани			
Каталаза, отн. ед на 1 г ткани	40,8±1,5	40,0±1,4	18,3±0,4***	17,1±1,2***
Глутатионредуктаза	7,96±0,48	8,16±0,50	9,60±0,88	8,26±0,47
Глутатионпероксидаза	29,6±2,2	—	30,7±1,9	—
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	4,78±0,38	5,12±0,36	4,49±0,59	4,90±0,66
Глутатион-S-трансфераза	92,1±7,5	99,5±11,7	120,6±9,6*	122,5±11,2*
Супероксиддисмутаза, отн. ед. на 1 г ткани	2406±221	2857±410	2573±412	2500±412
Глутатион, мкмоль на 1 г ткани	1,97±0,13	1,82±0,27	3,11±0,11***	1,74±0,09
Белок, мг на 1 г ткани	151±4	161±9	142±12	165±8

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 число животных в каждой группе 4—6, звездочками отмечены достоверные различия с показателями в контроле (1-я группа): одна —  $P < 0,05$ , две —  $P < 0,01$ , три —  $P < 0,001$ .

личением относительной массы печени, что является характерным признаком алкогольного ожирения этого органа [1]. Подобно аминотриазолу этанол при длительном введении увеличивает содержание глутатиона в гепатоцитах; кроме того, возрастает активность глутатион-S-трансферазы. Как известно, этот фермент обладает значительной глутатионпероксидазной активностью [2] и, кроме того, катализирует реакцию взаимодействия глутатиона с альдегидными продуктами перекисного окисления липидов [8]. В то же время суммации эффектов этанола и амино-

триазола в 4-й группе крыс (этанол + аминотриазол) выявлено не было (см. табл. 2). В отличие от результатов, полученных в опытах с однократным введением веществ, хроническое воздействие аминотриазола сопровождается достоверным снижением активности супероксиддисмутазы как в 3-й, так и в 4-й группе животных. Последнее, возможно, связано с возрастанием внутриклеточной концентрации  $H_2O_2$  в результате инактивации каталазы. Известно, что  $H_2O_2$  эффективно ингибирует супероксиддисмутазу в опытах in vitro [6].

Т а б л и ц а 2

Влияние длительного введения этанола и аминотриазола на активность ферментов антиоксидательной защиты в гомогенате печени крыс ( $M \pm m$ )

Показатель	Группа животных			
	1-я (контроль)	2-я (этанол)	3-я (аминотриазол)	4-я (аминотриазол + этанол)
	активность, мкмоль за 1 мин на 1 г ткани			
Каталаза, отн. ед. на 1 г ткани	31,2±1,6	33,5±1,7	5,6±0,7***	11,2±0,9***
Глутатионредуктаза	7,86±0,32	8,77±0,36	8,71±0,75	8,83±0,60
Глутатионпероксидаза	21,7±1,3	21,5±2,0	22,2±2,5	20,7±1,7
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	9,43±1,16	4,38±0,47***	8,89±1,24	4,47±0,34***
Глутатион-S-трансфераза	70,9±7,4	104,7±13,4*	120,4±22,7*	122,5±17,0**
Супероксиддисмутаза, отн. ед. на 1 г ткани	2048±132	1828±188	1659±98*	1411±241*
Глутатион, мкмоль на 1 г ткани	2,58±0,18	3,43±0,20**	4,76±0,42***	4,43±0,25***
Белок, мг на 1 г ткани	151±5	151±4	146±4	153±5
Относительная масса органа, %	4,0±0,1	4,9±0,3*	3,9±0,1	4,5±0,2*

Примечание. Число животных в каждой группе 8—10.

Влияние длительного введения этанола и аминотриазола на активность ферментов антиокислительной защиты в гомогенате сердца крыс ( $M \pm m$ )

Фермент	Группа животных			
	1-я (контроль)	2-я (этанол)	3-я (аминотриазол)	4-я этанол+аминотриазол
	активность, мкмоль за 1 мин на 1 г ткани			
Каталаза, отн. ед. на 1 г ткани	0,72±0,09	1,46±0,16***	0,33±0,05***	0,41±0,03**
Глутатионредуктаза	0,75±0,11	0,86±0,14	0,71±0,18	0,87±0,12
Глутатионпероксидаза	16,6±1,2	16,1±1,3	17,4±1,1	16,4±1,3
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	0,28±0,02	0,29±0,02	0,24±0,01	0,24±0,02
Глутатион-S-трансфераза	3,7±0,2	3,7±0,3	3,6±0,3	3,2±0,2
Супероксиддисмутаза, отн. ед. на 1 г ткани	388±41	371±39	312±30	342±43
Глутатион, мкмоль на 1 г ткани	0,70±0,04	0,72±0,06	0,74±0,11	0,68±0,05
Белок, мг на 1 г ткани	66±3	63±3	65±4	67±1
Относительная масса органа, %	0,287±0,007	0,321±0,014*	0,290±0,019	0,276±0,012

Примечание. Число животных в каждой группе 8—10.

В ткани печени животных, получавших вместо этанола изокалорийное количество глюкозы (1-я и 3-я группы), обнаружено существенное возрастание активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, которое может быть объяснено повышенным количеством в кормовой смеси углеводов. В печени крыс, содержащихся на рационе вивария (пеллетированный корм), активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы составляла  $4,78 \pm 0,38$  мкмоль/мин на 1 г ткани (см. табл. 1) и не отличалась от активности фермента во 2-й и 4-й группах животных, длительно получавших этанол (см. табл. 2). Зависимость активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы печени от состава кормового рациона неоднократно отмечалась в литературе [16]. Полученные нами данные в ряде случаев подтверждают уже известные факты. В частности, ранее было описано увеличение содержания глутатиона [15] и повышение активности глутатион-S-трансферазы [9, 15] печени грызунов при хроническом воздействии этилового спирта. Не было также обнаружено изменения активности супероксиддисмутазы при длительном введении крысам раствора этанола в качестве единственного источника жидкости. При этом отмечалось возрастание скорости образования супероксидных анионов в микросомальной фракции печени [5]. Как предполагают авторы, ускорение генерации супероксидных анионов способствует акти-

вации перекисных процессов в цельном гомогенате и субклеточных фракциях гепатоцитов. В то же время, по данным других авторов, введение этанола в составе изокалорийного рациона не влияет на уровень перекисного окисления липидов в микросомальной фракции [25].

Длительная алкогольная интоксикация сопровождается возрастанием активности каталазы в сердечной мышце (табл. 3). Активацию этого фермента под влиянием этанола наблюдали и другие авторы [11, 20]. Кроме того, обнаружено, что при воздействии алкоголя в кардиомиоцитах происходит увеличение количества и размеров пероксисом [11]. Как видно на рисунке и в табл. 3, введение аминотриазола сопровождается ингибированием активности каталазы сердца в 3-й и 4-й группах животных. В отличие от ткани печени в миокарде крыс этанол и аминотриазол не влияют на активность других исследованных ферментов антиокислительной защиты и на содержание восстановленного глутатиона. В то же время этанол приводит к умеренному возрастанию относительной массы сердца. Характерно то, что параллельное введение аминотриазола предотвращает гипертрофию миокарда.

Обсуждая механизмы изменения количества глутатиона и активности ферментов антиокислительной защиты в печени и сердце крыс при введении этанола и аминотриазола, следует от-

метить, что оба вещества, видимо, способны активировать внутриклеточные перекисные процессы [3, 7, 28]. В первом случае это может быть связано с индукцией в гепатоцитах под влиянием этанола активности микросомальной монооксигеназной системы, включающей цитохром P<sub>450</sub> [14], а также метаболизмом ацетальдегида [26] предположительно по альдегидоксидазному пути. Во втором случае, при ингибировании каталазы аминотриазолом, происходит увеличение внутриклеточной стационарной концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [3, 7]. В связи с этим важны сходные эффекты хронического воздействия на ткань печени этанола и аминотриазола, которые проявляются в увеличении содержания глутатиона и активности глутатион-S-трансферазы. Можно ожидать, что указанные эффекты опосредованы единым адаптивным механизмом антиокислительной защиты, где пусковым моментом является активация перекисных процессов. В ткани сердца подобный защитный механизм, видимо, отсутствует. Таким образом, имеются основания предполагать, что обнаруженные межорганные различия в реакции антиокислительных ферментных систем на воздействие этанола и аминотриазола могут наряду с другими причинами обусловить органоспецифичность кардиотоксического эффекта совместного введения животным этих соединений.

Авторы выражают признательность проф. Л. Ф. Панченко за ценные советы при обсуждении рукописи.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Антоненков В. Д., Попова С. В., Панченко Л. Ф. // *Вопр. мед. химии.* — 1983. — № 6. — С. 79—85.
2. Кахновер И. Б., Хмелевский Ю. В. // *Укр. биохим. журн.* — 1983. — Т. 55. — С. 86.
3. Панченко Л. Ф., Герасимов А. М., Антоненков В. Д. Роль пароксисом в патологии клетки. — М., 1981.
4. Beers R. F., Sizer J. W. // *J. biol. Chem.* — 1952. — Vol. 195. — P. 133.
5. Boveris A., Fraga C. G., Varsavsky A. I., Koch O. R. // *Arch. Biochem.* — 1983. — Vol. 227. — P. 534.
6. Bray R. C., Cockle S. A., Fielden E. M. et al. // *Biochem. J.* — 1974. — Vol. 139. — P. 43.
7. Chance B., Sies H., Boveris A. // *Physiol. Rev.* — 1979. — Vol. 59. — P. 527.
8. Danielson U. H. // *FEBS Lett.* — 1985. — Vol. 179. — P. 267.
9. David R. M., Nerland D. E. // *Biochem. Pharmacol.* — 1983. — Vol. 32. — P. 2809.
10. Eriksson C. J. P. // *Ibid.* — 1973. — Vol. 22. — P. 2283.
11. Fahimi H. D., Kino M., Hicks L. et al. // *Amer. J. Path.* — 1979. — Vol. 96. — P. 373.
12. Fernandez V., Videla L. A. // *Experientia (Basel).* — 1981. — Vol. 37. — P. 392.
13. Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B. // *J. biol. Chem.* — 1974. — Vol. 249. — P. 7130.
14. Hasumura Y., Tescke R., Lieber C. S. // *J. Pharmacol. exp. Ther.* — 1975. — Vol. 194. — P. 469.
15. Helu C., Yelle L., Joly J. G. // *Drug Metab. Dispos.* — 1982. — Vol. 10. — P. 246.
16. Hollman S. *Non-Glycolytic Pathways of Metabolism of Glucose.* — New York, 1964.
17. Kino M. // *J. molec. cell Cardiol.* — 1981. — Vol. 13. — P. 5.
18. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // *J. biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193. — P. 265.
19. De Marchena O., Guarnieri M., McKhann G. // *J. Neurochem.* — 1974. — Vol. 22. — P. 773.
20. De Master E. G., Kaplan E., Chesler E. // *Alcoholism: clin. exp. Res.* — 1981. — Vol. 5. — P. 45.
21. Misra H. P., Fridovich I. // *J. biol. Chem.* — 1972. — Vol. 247. — P. 6960.
22. Paglia D. E., Valentine W. N. // *J. Lab. clin. Med.* — 1967. — Vol. 70. — P. 158.
23. Panchenko L. F., Antonenkov V. D., Gerasimov A. M. // *Int. J. Biochem.* — 1976. — Vol. 7. — P. 409.
24. Sedlak J., Lindsay R. H. // *Analyt. Biochem.* — 1968. — Vol. 25. — P. 192.
25. Shaw S., Jayatilke E., Lieber C. S. // *Biochem. biophys. Res. Commun.* — 1984. — Vol. 118. — P. 233.
26. Sies H. // *Advanc. Enzyme Regulat.* — 1985. — Vol. 23. — P. 217.
27. Speisky H., Macdonald A., Giles G. et al. // *Biochem. J.* — 1985. — Vol. 225. — P. 565.
28. Videla L. A., Valenzuela A. // *Life Sci.* — 1982. — Vol. 31. — P. 2395.
29. Vina J., Estela J. M., Guerri C., Romero F. J. // *Biochem. J.* — 1980. — Vol. 188. — P. 549.
30. Worthington D. J., Rosemeyer M. A. // *Europ. J. Biochem.* — 1974. — Vol. 48. — P. 167.
31. Zakim D., Paradini R. S., Hermann R. H. // *Biochem. Pharmacol.* — 1970. — Vol. 19. — P. 305.

Поступила 03.09.86

#### EFFECTS OF ETHANOL AND CATALASE INHIBITOR AMINOTRIAZOLE ON ACTIVITY OF ENZYMES PARTICIPATING IN THE ANTIOXIDATION SYSTEM IN RAT LIVER AND HEART TISSUES

V. D. Antonenkov, V. A. Gusev, S. N. Krasnova

V. P. Serbsky All-Union Institute of General and Forensic Psychiatry, Moscow

Tissue-specific effects of ethanol and aminotriazole were studied in rats. Simultaneous administration of both these drugs caused alcoholic cardiomyopathy in the animals, while liver tissue impairment was not detected. Effect of ethanol and aminotriazole on content

К ст. Н. А. Соловьевой и соавт.

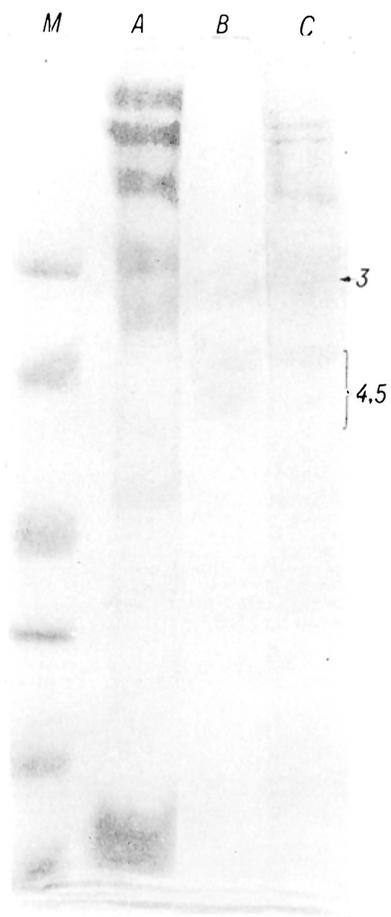


Рис. 4. ДСН-полнакриламидный электрофорез.

Белки телей эритроцитов крыс (А). Очищенный хроматографически гликозный транспортер — фракция I с колонки с ДЕАЕ-целлюлозой, 30 мкг (В). Белки фракции II (С). Маркерные белки с известной молекулярной массой: 94, 67, 43, 20 и 14,4 кД (М).

К ст. С. Н. Кузьминой и соавт.

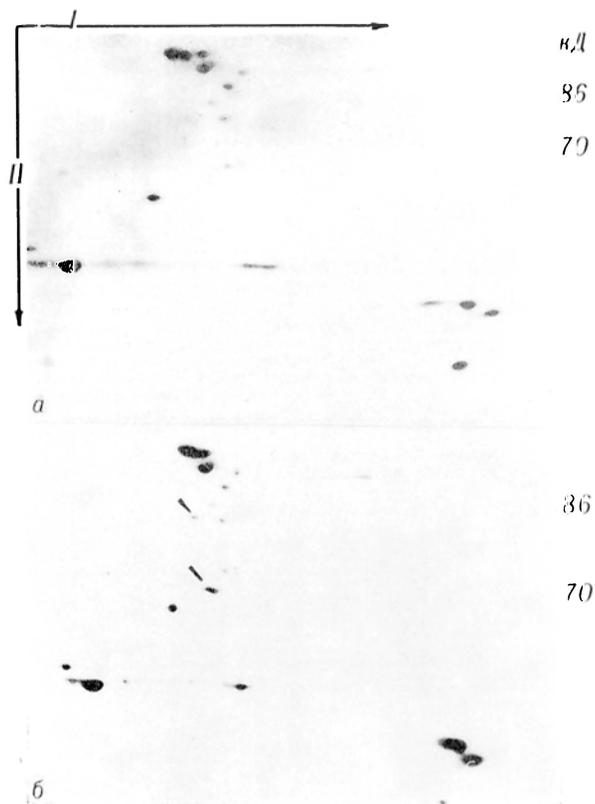


Рис. 1. Флуорограммы меченых  $^{35}\text{S}$ -метионином белков ядерного матрикса фибробластов китайского хомячка до (а) и после (б) прогревания клеток при  $46^\circ\text{C}$  в течение 10 мин и последующей инкубации при  $37^\circ\text{C}$  в течение 6 ч.

Белки разделяли двухмерным электрофорезом: I — изоэлектрическое фокусирование, II — электрофорез в 10% ПААГ, содержащем додецилсульфат натрия. Белки теплового шока показаны стрелками.

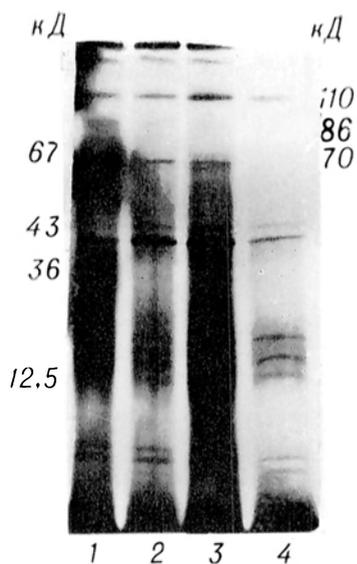


Рис. 2

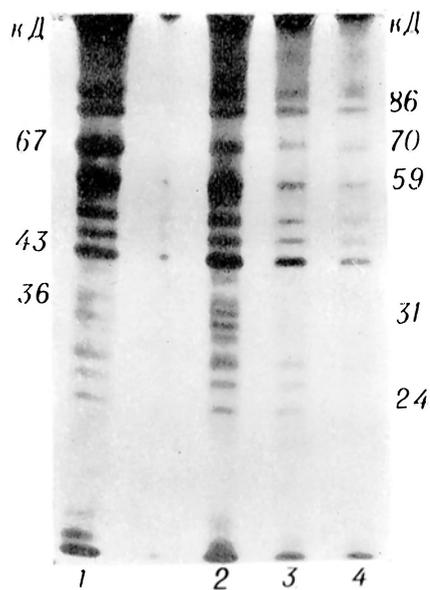


Рис. 3

Рис. 2. Ингибирование актиномицином D новообразования белков теплового шока ядерного матрикса фибробластов китайского хомячка.

Здесь и на рис. 3 и 4 на флуорограммах слева — молекулярная масса свидетелей (в кД: 67 — сывороточный альбумин, 43 — яичный альбумин, 36 — лактатдегидрогеназа, 18,5 — субъединица ферритина); справа — молекулярная масса белков теплового шока, рассчитанная по калибровочной кривой (в кД). Внизу: 1 — ядерный матрикс инкубировали без антибиотиков, 2 и 3 — в среду инкубации внесли сразу после прогревания соответственно 2 и 1 мкг/мл актиномицина D, 4 — в среду инкубации внесли 2 мкг/мл актиномицина до прогревания.

Рис. 3. Ингибирование актиномицином D новообразования белков теплового шока цельной клетки.

Внизу: 1 — клетки после теплового шока, 2 и 3 — в среду инкубации внесли соответственно 1 и 2 мкг/мл актиномицина D после прогревания, 4 — в среду инкубации внесли 1 мкг/мл антибиотика до прогревания.

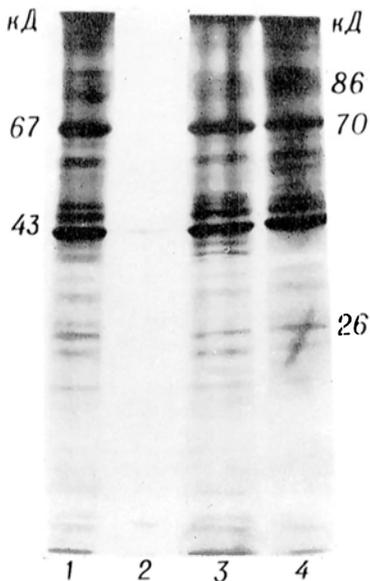


Рис. 4а

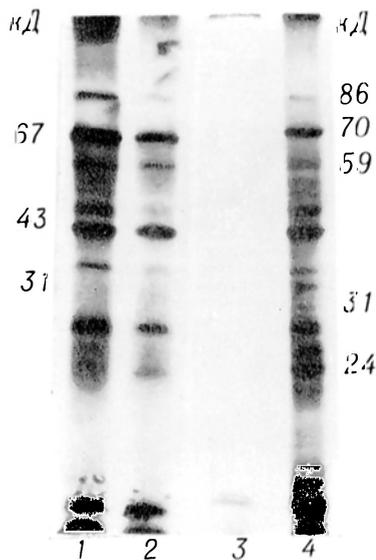


Рис. 4б

Рис. 4. Влияние ряда антибиотиков на новообразование белков теплового шока ядерного матрикса (а) и цельной клетки (б).

Внизу — а: 1 — ядерный матрикс инкубировали без антибиотиков, 2-4 — после внесения циклогексимида (1 мкг/мл), пурамицина (60 мкг/мл) и митомиицина С (1 мкг/мл) соответственно; б: 1 — белки клеток, инкубированных без антибиотиков, 2-4 — после внесения пурамицина (60 мкг/мл), циклогексимида (1 мкг/мл) и митомиицина С (1 мкг/мл) соответственно.

of reduced glutathione as well as on activity of catalase, superoxide dismutase, glutathione-S-transferase and glucose-6-phosphate dehydrogenase, the enzymes participating in the anti-oxidation system, were also studied in liver and heart tissues. After repeated simultaneous or separate administration of these drugs concentration of glutathione and glutathione-S-transferase activity were elevated in liver tis-

sue. Acute and repeated administration of aminotriazole led to inactivation of catalase. At the same time, superoxide dismutase was inhibited in liver tissue as a result of the drug repeated administration. Activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase was increased in liver tissue of control rats, the diet of which contained isocaloric carbohydrates instead of ethanol.

УДК 615.246.2.03:615.214.24:547.854.5].099.084

Е. А. Лужников, А. М. Трушин, О. В. Кабанов

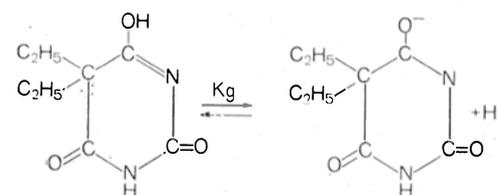
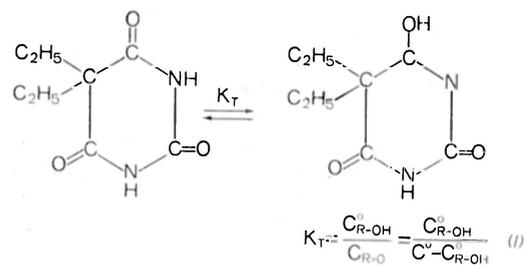
## ЗАКОНОМЕРНОСТИ АДСОРБЦИИ БАРБИТУРАТОВ НА АКТИВИРОВАННЫХ УГЛЯХ

НИИ скорой помощи им. Н. В. Склифосовского, Московский химико-технологический институт им. Д. И. Менделеева

В настоящее время широко применяется экстракорпоральный метод детоксикации организма (гемосорбция), основанный на адсорбционном поглощении токсических веществ из крови. Важное место гемосорбционная детоксикация занимает в лечении острых отравлений лекарственными препаратами, особенно отравлений барбитуратами. В связи с этим представляет большой практический интерес выявление закономерностей адсорбции производных барбитуровой кислоты.

Исследовали адсорбцию барбитала (веронала) и барбитала натрия (медипала) из их водных растворов на активированных углях БАУ, АР-3, АР-Б, АР-А, СКТ-6А. Адсорбция барбитала носит сложный характер, так как в водных растворах образуется несколько таутомерных форм этого соединения: амидная, имидольная и диимидольная. Две последние таутомерные формы ведут себя в водных растворах как слабые кислоты за счет отщепления водорода группы OH. При pH 1—2 равновесие таутомерного превращения сдвинуто в сторону амидной формы. При низких концентрациях ионов водорода (pH 10) барбитал находится в имидольной форме, а при pH 13 — в диимидольной. Таким образом, в нейтральных растворах барбитал существует в амидной и имидольной формах. Будучи слабой кислотой, имидольная форма барбитала находится в частично ионизированном состоянии. Таким образом, из водных растворов барбитал может сорбироваться в трех формах: в амидной, недиссоциированной имидольной и в виде аниона барбитала. Концентрации

всех трех форм барбитала могут быть определены на основе констант таутомерного равновесия и равновесия диссоциации:



где  $C^{\circ}$  — суммарная концентрация всех форм барбитала;  $C_{R-OH}$  — суммарная концентрация диссоциированной и недиссоциированной имидольной формы барбитала;  $C_{R=O}$  — концентрация амидной формы;  $C_{R-O^-}$  — концентрация ионизированной имидольной формы.

Из константы равновесия таутомеризации и диссоциации получаем  $C_{R-OH}$  и  $C_{R-O^-}$ :

$$C_{R-OH} = \frac{K_T C^{\circ}}{1 + K_T} \quad (3)$$

$$C_{R-O^-} = \frac{C_{R-OH}}{1 + \frac{K_g}{C_{H^+}}} \quad (4)$$

Ввиду незначительной концентрации барбитала в растворе, суммарная адсорбция ( $a$ ) может рассматриваться как аддитивная функция адсорбции всех трех форм барбитала:

$$a = f_1(C_{R=O}) + f_2(C_{R-O^-}) + f_3(C_{R-OH}^0 - C_{R-O^-}), \quad (5)$$

где  $f_1, f_2, f_3$  — функции, описывающие изотермы адсорбции соответственно амидной, ионизированной имидольной и неионизированной имидольной.

При адсорбции барбитала натрия в растворе присутствуют ионизированная и неионизированная имидольная формы барбитала, причем ионизированная форма преобладает. Концентрацию неионизированной формы барбитала можно получить, исходя из равновесия реакции гидролиза:

$$C_{R-OH} = -\frac{K_{\text{гидр}}}{2} + \sqrt{\left(\frac{K_{\text{гидр}}}{2}\right)^2 + K_{\text{гидр}} C_{R-OH}^0} \quad (6)$$

где  $K_{\text{гидр}} = \frac{10^{-14}}{K_{\text{д}}}$ ,  $K_{\text{д}} = 1,58 \cdot 10^{-8}$  [1].

Суммарная сорбция барбитала натрия таким образом будет также выражаться уравнением (5), однако в данном случае недиссоциированная форма барбитала будет в основном свободная, поскольку pH растворов близки к 9,8. При pH 10—12 преобладающей формой барбитала в растворе будет ионизированная имидольная.

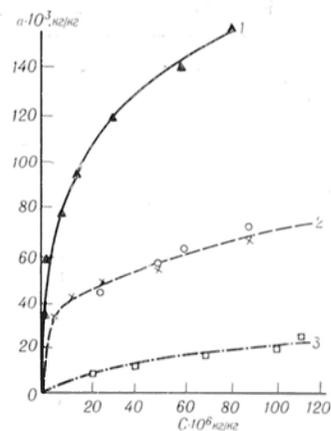
#### Методика

Определение равновесной емкости активированных углей по барбитуратам проводили путем длительного контактирования при перемешивании массы активированного угля с растворами барбитала и барбитала натрия различных концентраций. Масса угля составляла 1 г, объем раствора — 50 см<sup>3</sup>, время контакта — 48 ч.

Концентрацию барбитуратов до и после адсорбции определяли спектрофотометрически. Растворы (1 мл) разбавляли боратным буфером pH 10 в соотношении от 1:5 до 1:100 и концентрацию барбитуратов определяли по изменению оптической плотности при длине волны 240 нм.

#### Результаты и обсуждение

Представленные экспериментальные данные по адсорбции барбитала и барбитала натрия (см. рисунок) показывают, что максимальную адсорбцию имеет барбитал, а минимальную — его имидольная ионизированная форма (pH 12).



Адсорбция барбитала и барбитала натрия. 1 — барбитал из нейтрального водного раствора; 2 — барбитал натрия из нейтрального водного раствора (крестик — эксперимент, кружочек — расчет); 3 — барбитал натрия из 0,01 н. раствора NaOH.

Известно, что в случае слабых электролитов ( $pK_a$  4—4,2) из равновесного раствора ионизированной и неионизированной форм кислоты (или основания) адсорбируется только неионизированная форма [3].

Как видно из данных, представленных на рисунке, в данном случае эта закономерность не соблюдается. Причиной этого, очевидно, является дополнительная ионизация амидной и имидольной форм, за счет участия в таутомерном превращении. Известно, что первичным актом таутомеризации является ионизация (отрыв протона) с дальнейшим образованием отрицательного иона на другом конце молекулы. Благодаря этому при большой подвижности протона, т. е. при большой суммарной скорости прямой и обратной реакций значительная часть амидной и имидольной форм будет ионизирована [2]. Это позволяет считать, что степень гидратации вероната как недиссоциированной слабой кислоты (имидольная форма) и его амидной формы может оказаться сравнимой со степенью гидратации диссоциированной формы вероната. В этом случае недиссоциированные формы вероната не подавляют до конца сорбцию его аниона.

В качестве подтверждения того факта, что сорбция аниона барбитала вносит значительный вклад в общую адсорбцию барбитала натрия, служит достаточно хорошее совпадение расчетных и экспериментальных данных

Расчетные и экспериментальные величины адсорбции барбитала натрия

Активированный уголь	Концентрация барбитурата, кг/кг			Адсорбция барбитурата, кг/кг	
	$C^0$	$C_{R-OH}^0 + C_{R=O}$	$C_{R-O^-}$	расчетная	экспериментальная
БАУ	0,000654	0,00000916	0,000645	0,019	0,020
АР-3	0,000604	0,0000088	0,000595	0,0216	0,0250
АР-Б	0,000596	0,0000874	0,000587	0,024	0,026
АР-А	0,000504	0,00000803	0,000496	0,0303	0,0340

на изотермы барбитала натрия. Расчет производился по уравнению (2), где  $f_1(C_{R=O}) + f_3(C_{R-OH}^0 - C_{R-O^-})$  брали из изотермы веронала при концентрациях, рассчитанных по уравнению (6), умноженных на величину  $\frac{1}{1 + K_{\text{д}}/C_{\text{H}^+}}$ , учитывающую, согласно уравнению (4), диссоциации кислоты, а адсорбцию аниона  $f_2(C_{R-O^-})$  определяла по изотерме полностью ионизированного барбитала натрия pH 12.

Незначительное расхождение расчетных и экспериментальных определенных величин адсорбции барбитала натрия, очевидно, объясняется тем, что относительное содержание двух таутомерных форм в растворе барбитала натрия и барбитала различны. В растворе барбитала натрия преобладает имидольная форма, а в растворе барбитала концентрации амидной и имидольной форм сравнимы между собой. Ввиду сложности экспериментального определения адсорбции недиссоциированной имидольной формы величину адсорбции двух таутомерных форм, как указано выше, брали из изотермы адсорбции веронала, что делает расчет достаточно приближенным, так как адсорбционная способность двух таутомерных форм различна.

Аналогичные результаты по сравнению с расчетной и экспериментально определенной величинами адсорбции получены для ряда активированных углей: БАУ, АР-3, АР-Б, АР-А (см. таблицу). Эти данные также показывают достаточно хорошие совпадения опытных и расчетных величин (среднее расхождение составляет 9,3%).

Приведенный анализ адсорбции барбитала и барбитала натрия, находящихся в различных формах, позволяет сделать вывод, что одновременная сорбция ионных и неионных форм этих

соединений на активированных углях объясняется значительной долей ионизации барбитуратов как в результате таутомерного превращения, так и диссоциации образующейся кислоты. Эти данные показывают также, что адсорбция барбитала натрия и барбитала может быть рассчитана при различных значениях pH раствора с учетом реакций диссоциации и гидролиза, что важно при энтеросорбционном извлечении барбитуратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Альберт Э. Избирательная токсичность: Пер. с англ. — М., 1971. — С. 76.
2. Беккер Г. Введение в электронную теорию органических реакций: Пер. с нем. — М., 1965. — С. 63.
3. Когановский А. М., Левченко Г. М., Кириченко В. А. Адсорбция растворенных веществ. — Киев, 1977. — С. 138.

Поступила 14.04.86

PATTERNS OF BARBITURATES ADSORPTION ON ACTIVATED CHARCOAL

E. A. Luzhnikov, A. I. Trushin, O. V. Kabanov

Equilibration patterns of barbiturates adsorption on activated charcoals were studied using aqueous solutions of barbital and sodium barbital and commercially available charcoals BAU, AR-3, AR-B, AR-A, SKT-6A. The rate of barbiturates adsorption was described as an additive function of concentrations of amide, ionized and non-ionized imidol forms calculated considering the reactions of dissociation and hydrolysis. Relatively low equilibrium concentrations of barbiturates in the solid phase and simultaneous sorption of the barbital anion as well as of its non-ionized form were related to the considerable rate of the substance ionization due to both tautomeric transformation and dissociation of the acid formed. The procedure for calculation of equilibrium described assumes that the rate of barbital and sodium barbital adsorption on activated charcoals of various brands might be estimated at various pH values of a solution, based on dissociation and hydrolysis reactions, which is of importance under conditions of the barbiturates enterosorption.

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

## ВЛИЯНИЕ ПРОТИВОИШЕМИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЫ НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ИЗОЛИРОВАННОЙ ПЕРФУЗИРУЕМОЙ ПЕЧЕНИ

НИИ гематологии и переливания крови, г. Киров

Существующие методы получения донорской печени не позволяют избежать периода тепловой ишемии [3]. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в противоишемической защите почек [5], меры противоишемической защиты печени разработаны недостаточно.

Нами проведено сравнительное исследование при ишемии печени ряда антигипоксантов (преднизолон,  $\alpha$ -токоферола, лидокаина, аминазина), хорошо зарекомендовавших себя при ишемии почки [1], а также глутаминовокислого натрия, проявляющего значительную эффективность при гипоксической и гемической гипоксии [2].

### Методика

Проведено 44 опыта с перфузией печени кроликов породы Шиншилла обоего пола массой 2—2,5 кг. Под гексеналовым наркозом (50 мг/кг внутривенно) осуществляли срединную лапаротомию. Вводили канюли в воротную, нижнюю полую вены и общий желчный проток. Печень отделяли из окружающих тканей и извлекали из брюшной полости. В целях избежания неконтролируемого периода тепловой ишемии сразу же после катетеризации воротной вены начинали через нее перфузию печени оксигенированным желатинолем при температуре 4—6 °С. На 1 печень расходовали 450 мл желатиноля. Животных забивали кровопусканием на фоне гексеналового наркоза и печень подвергали 60-минутной ишемии при температуре 22—24 °С. Оценка функционального состояния печени проводили в ходе последующей 60-минутной нормотермической перфузии (36—38 °С) раствором Хенкса (рН 7,4—7,5) по следующим параметрам: скорость потребления кислорода, скорость образования лактата, скорость поступления в перфузат аспартатаминотрансферазы (АсАТ) и аланинаминотрансферазы (АлАТ). Концентрацию лактата в перфузате определяли по методу [8], активность трансаминаз в перфузате — по методу [6, 7]. Перфузию печени осуществляли в открытом контуре через воротную вену. Перфузионная система состояла из напорного сосуда, теплообменника, камеры для органа и специального приспособления для автоматического регулирования перфузионного давления (10—15 мм рт. ст.). Оксигенацию перфузата проводили путем барботирования кислорода.

Животные были разделены на 6 групп. 1-я группа была контрольной (противоишемическая защита печени не осуществлялась). Животным остальных групп за 1 ч до опыта

вводили внутривенно испытуемый препарат ( $\alpha$ -токоферол внутривенно за 1 сут до опыта). Животным 2-й группы внутривенно вводили аминазин (10 мг/кг), 3-й — лидокаин (10 мг/кг), 4-й — преднизолон (2 мг/кг), 5-й —  $\alpha$ -токоферол (200 мг/кг) внутривенно за 1 сут до опыта, 6-й — глутаминовокислый натрий в виде 5% раствора (200 мг/кг) за 1 ч до опыта внутривенно.

Статистическую обработку данных проводили по методу непрямых разностей с использованием константной формулы [4].

### Результаты и обсуждение

В таблице представлены данные о влиянии противоишемической защиты на ряд биохимических показателей изолированной перфузируемой печени кроликов. Наименьшую скорость потребления кислорода обнаруживает контрольная печень, не защищенная от ишемии введением препаратов. Практически не отличается от уровня контроля среднее потребление кислорода в группе с противоишемической защитой печени аминазином. Статистически значимое повышение средней скорости потребления кислорода наблюдали при использовании в качестве средств противоишемической защиты преднизолон,  $\alpha$ -токоферола, лидокаина и глутаминовокислого натрия.

Статистически значимое снижение образования печени лактата наблюдали лишь при противоишемической защите  $\alpha$ -токоферолом. Положительное влияние на скорость поступления в перфузат трансаминаз также наблюдали лишь при использовании в качестве противоишемического препарата  $\alpha$ -токоферола, который снижал скорость выброса печенью, перенесшей 60-минутную ишемию, трансаминаз, что свидетельствует о его положительном влиянии на сохранность клеточных мембран. При использовании преднизолон наблюдали тенденцию к снижению скорости поступления в перфузат трансаминаз.

Таким образом, противоишемическая активность в отношении печени обнаружена у всех исследуемых пре-

Биохимическая характеристика изолированной перфузируемой печени кроликов после 60-минутной ишемии

Показатель	Контроль	Препарат, использованный для противоишемической защиты печени				
		аминазин	лидокаин	преднизолон	$\alpha$ -токоферол	глутаминово-кислый натрий
Потребление кислорода, $\text{мл} \times \text{мин}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$	$0,70 \cdot 10^{-2}$ $\pm 0,05 \cdot 10^{-2}$ (7)	$0,78 \cdot 10^{-2}$ $\pm 0,04 \cdot 10^{-2}$ (6)	$0,87 \cdot 10^{-2}$ $\pm 0,06 \cdot 10^{-2}$ (6)*	$0,89 \cdot 10^{-2}$ $\pm 0,05 \cdot 10^{-2}$ (6)*	$0,96 \cdot 10^{-2}$ $\pm 0,06 \cdot 10^{-2}$ (6)*	$0,88 \cdot 10^{-2}$ $\pm 0,06 \cdot 10^{-2}$ (6)*
Образование лактата, $\text{ммоль} \times \text{мин}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$	$12,7 \cdot 10^{-4}$ $\pm 0,8 \cdot 10^{-4}$ (5)	$13,3 \cdot 10^{-4}$ $\pm 0,9 \cdot 10^{-4}$ (5)	$14,1 \cdot 10^{-4}$ $\pm 0,6 \cdot 10^{-4}$ (5)	$12,2 \cdot 10^{-4}$ $\pm 0,4 \cdot 10^{-4}$ (5)	$7,7 \cdot 10^{-4}$ $\pm 0,4 \cdot 10^{-4}$ (5)***	$12,6 \cdot 10^{-4}$ $\pm 0,5 \cdot 10^{-4}$ (5)
Поступление в перфузат АсАТ, $\text{нкат} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$	0,090 $\pm 0,009$ (7)	0,094 $\pm 0,007$ (6)	0,103 $\pm 0,007$ (6)	0,084 $\pm 0,015$ (6)	0,063 $\pm 0,009$ (6)*	0,092 $\pm 0,006$ (6)
Поступление в перфузат АлАТ, $\text{нкат} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$	0,044 $\pm 0,006$ (7)	0,043 $\pm 0,005$ (6)	0,051 $\pm 0,006$ (6)	0,031 $\pm 0,006$ (6)	0,024 $\pm 0,004$ (6)**	0,042 $\pm 0,003$ (6)

Примечание. В скобках представлено число наблюдений. Одна звездочка —  $P < 0,05$ , две —  $P < 0,01$ , три —  $P < 0,001$ .

паратов, за исключением аминазина. Наименьшая активность была отмечена у глутаминовокислого натрия и лидокаина, несколько бóльшая — у преднизолона и, наконец, наибольшая противоишемическая активность наблюдалась у  $\alpha$ -токоферола. Не все препараты, обнаруживающие высокую противоишемическую активность в отношении почек [1], проявляют такую в отношении печени. Это относится к аминазину и отчасти к лидокаину. Преднизолон и  $\alpha$ -токоферол проявляют одинаково высокую эффективность при противоишемической защите как почек [1], так и печени. Глутаминовокислый натрий, хорошо зарекомендовавший себя при гипоксической и гемической гипоксии [2], оказался относительно мало эффективным при противоишемической защите печени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Курпатовский В. И., Онищенко Н. А., Козырева Т. А., Блюмкин В. Н. // Вестн. АМН СССР. — 1981. — № 10. — С. 48—52.
2. Кораблев М. В., Лукиенко П. И. Противогипоксические средства. — Минск, 1976.

3. Маргулис М. С., Сорокин Ю. А., Квицинская Е. А. и др. // Экспериментальная гепатология. — Рига, 1985. — С. 118—123.
4. Монцевичуте-Эрингене Е. В. // Пат. физиол. — 1964. — № 4. — С. 71—79.
5. Шумаков В. И., Онищенко П. А., Курпатовский В. И. Фармакологическая защита трансплантата. — М., 1983.
6. Bergmeyer H. U., Bernt E. // Methoden der enzymatischen Analyse / Hrsg. H. U. Bergmeyer. — Berlin, 1970. — Bd 1. — S. 723—727.
7. Bergmeyer H. U., Bernt E. // Ibid. — S. 691—695.
8. Hohorst H. J. // Ibid. — Bd 2. — S. 1425—1429.

Поступила 15.04.86

EFFECT OF ANTIISCHEMIC DRUGS ON BIOCHEMICAL PATTERNS IN ISOLATED PERFUSED LIVER TISSUE

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

$\alpha$ -Tocopherol and prednisolone exhibited the highest antiischemic activity, while lidocaine and sodium glutamate were less active after administration into isolated perfused rabbit liver tissue subjected to 60-min thermic ischemia. Chlorpromazine-HCl did not affect the biochemical patterns studied in isolated perfused liver tissue.

Л. А. Ляпина, Б. А. Кудряшов, Л. А. Баратова

## ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ АЛЬБУМИНОВОЙ ФРАКЦИИ КРОВИ В НОРМЕ И ПРИ ДИАБЕТЕ

МГУ им. М. В. Ломоносова

В плазме крови человека и животных в норме содержится около 7% белков, из которых на долю альбуминов приходится 55% [2]. В составе альбуминов сыворотки крови содержится 19 аминокислот. Молекулярная масса альбуминов колеблется от 35 тыс. до 70 тыс. Д, а изоэлектрическая точка лежит при рН 4,6—4,7 [3]. В плазме крови человека и животных, больных инсулинзависимым диабетом, был обнаружен белок альбуминовой природы с мол. массой около 60 тыс. Д. Этот белок был назван диабетогенным фактором (ДГФ), так как он при внутривенном введении здоровым животным вызывал гипергликемию и развитие других признаков, характерных для диабета. В крови здоровых людей и животных ДГФ отсутствовал [5, 6].

В настоящей работе предпринята попытка изучения аминокислотного состава гомогенного белка, полученного из альбуминовой фракции крови крыс, больных аллоксановым диабетом. Исследовали и другие физико-химические свойства (электрофоретические, спектральные) ДГФ.

### Методика

Для получения ДГФ использовали плазму крови крыс, больных аллоксановым диабетом, которую нам предоставил А. М. Ульянов. Выделяли альбуминовые фракции белков из плазмы крови здоровых и больных диабетом крыс. Полученные фракции подвергали ультрацентрифугированию в градиенте плотности сахарозы и высушиванию из замороженного состояния [5].

Проводили исследования белков с применением электрофореза в геле полиакриламида (ПАГ) с додецилсульфатом натрия (ДСН) как с добавлением  $\beta$ -меркаптоэтанола, так и без него [8].

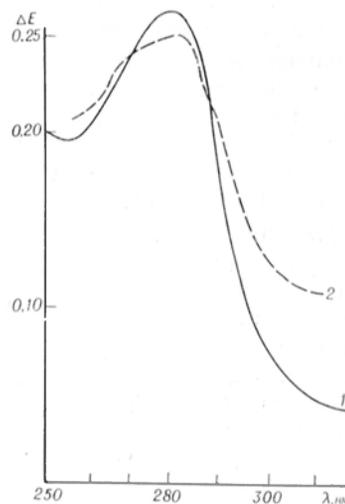
Для анализа аминокислотного состава осуществляли гидролиз навески белка (5 мг) растворяли в 0,5 мл 6 н. HCl в толстостенной стеклянной ампуле, которую заплавляли под вакуумом). Гидролиз проводили при температуре  $110 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 4 ч. Избыток соляной кислоты удаляли при температуре 40—45 $^\circ\text{C}$ , используя роторный испаритель; образец разбавляли соответствующим количеством

0,2 М натрий-цитратного буфера рН 2,2 и отбирали аликвотные порции раствора белка для анализа [1]. Анализ аминокислотного состава белков осуществляли на аминокислотном анализаторе японской фирмы «Хитачи». Спектрофотометрирование белка проводили в УФ-области на регистрирующем спектрофотометре SP-8000 в кюветках 3 мл в диапазоне длин волн от 220 до 300 нм.

Казеинолитическую активность препарата ДГФ устанавливали методом [9]. Для определения биологической активности ДГФ проводили внутривенное трехкратное введение ДГФ по 1 мг на 200 г массы тела крыс в день с последующим определением уровня сахара крови [5].

### Результаты и обсуждение

Белок, выделенный нами из крови крыс, больных диабетом, был гомогенен при электрофорезе в ПАГ с ДСН. Как в отсутствие  $\beta$ -меркаптоэтанола, так и в его присутствии при электрофорезе обнаруживали только 1 полосу, электрофоретическая подвижность которой соответствовала белку с мол. массой 60 тыс. Д. Это свидетельствует о том, что ДГФ представляет собой белок альбуминовой природы, состоя-



Спектры поглощения в УФ-области ДГФ (1) и контрольной альбуминовой фракции из плазмы крови здоровых крыс (2).

По оси абсцисс — длина волны (в нм); по оси ординат — изменение оптической плотности.

**Аминокислотный состав альбуминовой фракции плазмы крови здоровых крыс (контроль) и крыс, больных аллоксановым диабетом (ДГФ)**

Аминокислота	Содержание аминокислот, %	
	ДГФ	контроль
Аспарагиновая	18,2	17,4
Треонин	4,0	4,1
Серин	5,3	5,0
Глутаминовая	25,0	17,0
Пролин	5,0	5,0
Глицин	9,0	7,1
Аланин	10,3	11,8
Цистин	1,3	1,6
Валин	3,0	3,0
Метионин	0,8	0,6
Изолейцин	1,3	1,1
Лейцин	8,3	9,2
Тирозин	2,3	2,6
Фенилаланин	2,3	3,3
Лизин	5,3	6,1
Гистидин	2,0	2,0
Аргинин	3,0	3,0
Всего . . .	106,4	99,9

ций, по-видимому, только из одной полипептидной цепи.

В последующих исследованиях применяли активный ДГФ, трехкратное внутривенное введение которого приводило к развитию достоверной гипергликемии. Содержание сахара в крови повышалось в среднем с 90—95 мг% (исходный уровень) до 130—135 мг% через 7 дней и до 150—160 мг% через 14 дней после введения ДГФ.

При изучении свойств препарата ДГФ в нем не обнаружено казеинолитической активности, а также неферментативной фибринолитической активности (на нестабилизированный фактором XIII фибрин).

Спектры поглощения ДГФ и альбуминовой фракции, полученной тем же методом из плазмы крови здоровых животных, приведены на рисунке. Максимум поглощения ДГФ лежит в области 278 нм, максимум поглощения контрольной фракции находится при 276—279 нм. Максимум спектра поглощения при 278—280 нм обусловлен наличием триптофана и тирозина [7].

При исследовании аминокислотного состава ДГФ вышеуказанным методом не могли быть выявлены в полной мере тирозин и пролин, которые раз-

рушаются при гидролизе [1, 7]. Кроме того, при этом совершенно не определяется триптофан [7].

Полученные нами данные (см. таблицу) указывают на то, что в составе ДГФ присутствуют глутаминовая кислота — 25,0 % (рI 3,22), аспарагиновая кислота — 18,2 % (рI 2,97 %), аланин — 10,3 % (рI 6,02), глицин — 9 % (рI 5,97), лейцин — 8,3 % (рI 5,98). В контрольной альбуминовой фракции, полученной из плазмы крови здоровых крыс, обнаружены те же аминокислоты, но глутаминовой кислоты было меньше на 8 %, аланина — больше на 1,5 %, лейцина — больше на 1 %.

Следовательно, в ДГФ в отличие от контрольной альбуминовой фракции крови крысы в более значительных количествах в расчете на 1 моль белка присутствуют глутаминовая кислота, глицин и аспарагиновая кислота.

При расчете изоэлектрической точки установлено, что для альбумина крови здоровых животных она составляет 4,8, а для ДГФ — 4,4, т. е. ДГФ значительно более кислый белок, чем альбумин здоровых крыс. Это подтверждено и данными потенциометрического исследования. При добавлении ДГФ в конечной концентрации 0,1 % рН дистиллированной воды снизился до 4,4 (с 6,0), а при добавлении контрольной альбуминовой фракции здоровой крысы рН составлял 4,8. При физиологическом значении рН альбумины находятся в N-форме, при рН 3—4 происходит полная изомеризация альбумина, и он образует F-форму. В кислой зоне рН к альбумину присоединяется до 3 протонов, причем происходит разрыв соответствующего звена водородных связей и добавочно освобождаются 3 карбоксильные группы [3].

Возможно, что различия между ДГФ и альбуминами крови здоровых животных связаны либо со степенью амидирования, либо с последовательностью аминокислот в пептидах. Обнаруженное нами повышение содержания некоторых аминокислот (глутаминовой, глицина) в альбумине плазмы крови животных, больных диабетом, очевидно, связано с тем, что в результате интоксикации и патологических изменений поджелудочной железы нарушается метаболизм аминокислот в печени. Кроме того, увеличение содержания некоторых аминокислот в

ДФФ плазмы крови, по-видимому, обусловлено распадом белков тканей и последующим переходом освобождающихся аминокислот из тканей в кровь [3].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Баратова Л. А., Белянова Л. П. Методы биохимического эксперимента. — М., 1974. — С. 3—37.
2. Березов Т. Т., Коровкин Б. Ф. Биологическая химия. — М., 1982. — С. 72—75.
3. Капланский С. Я. // Химические основы процессов жизнедеятельности. — М., 1962. — С. 263—273.
4. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А. // Вopr. мед. химии. — 1986. — № 2. — С. 64—65.
5. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А., Ульянов А. М. // Пробл. эндокринологии. — 1985. — № 6. — С. 51—53.
6. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А., Ульянов А. М. // Физиол. журн. СССР. — 1986. — Т. 72, № 3. — С. 377—380.
7. Остерман Л. А. Хроматография белков и

нуклеиновых кислот. — М., 1985. — С. 515—527.

8. Farbank S. G., Steck T. L., Wallach F. U. // Biochemistry (Wash.). — 1971. — Vol. 13, N 6. — P. 2606—2616.
9. Sgouris J. T., Juman J. K., McCall K. B. // Amer. J. Cardiol. — 1960. — Vol. 6. — P. 406—410.

Поступила 17.04.86

#### PROPERTIES OF A PROTEIN ISOLATED FROM BLOOD ALBUMIN FRACTION UNDER NORMAL CONDITIONS AND IN DIABETES

L. A. Lyapina, B. A. Kudrjashov, L. A. Baratova  
M. V. Lomonosov State University, Moscow

Diabetogenic factor, isolated from blood plasma of rats with alloxane diabetes, was shown to be an acid albumin, which appears to contain a single polypeptide chain. The amino acid composition of the factor was similar to that of albumin from blood of healthy animals. At the same time, content of glutamic acid and glycine was higher in the diabetogenic factor as compared with the albumin of control rats.

УДК 616.155.392.8-036.12-07:616.155.25-008.931-074

Я. М. Соковнина, Т. И. Пестина, А. Г. Туркина, И. И. Вотрин

#### СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗЫ ТРОМБОЦИТОВ В НОРМЕ И ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ МИЕЛОЛЕЙКОЗЕ

НИИ медицинской энзимологии АМН СССР, Москва

Ранее было установлено, что многие лейкоэмические заболевания сопровождаются изменениями в активности аденозиндезаминазы (АД; КФ 3.5.4.4) в тромбоцитах крови [1].

Механизмы, ответственные за эти изменения, в настоящее время не изучены. Отклонения от нормы в активности АД могут быть обусловлены структурными изменениями генов, нарушением экспрессии генов, дефектом посттрансляционной модификации и др. Определенную информацию в этом отношении дает сравнительное исследование кинетических и в большей степени — физико-химических свойств фермента.

Изучению свойств АД в нормальных форменных элементах крови (исключая тромбоциты) посвящено значительное число работ. На высокоочищенных гомогенных препаратах показано, что фермент существует в нескольких молекулярных формах в клетках тканей человека; с большой молекулярной массой (298 000) в виде тканево-специфических электрофорети-

ческих вариантов и с малой молекулярной массой (38 000) [2, 6, 13]. АД с большой молекулярной массой содержит 2 молекулы малой молекулярной массы и 1 молекулу выделенного и очищенного до гомогенного состояния специфического белка, названного «фактором превращения» с мол. массой 213 000. Обе формы фермента кодируются одним и тем же аутосомным геном, локализованным в 20-й хромосоме [5, 16]. Следует отметить, что АД человека является генетически полиморфным ферментом и что наблюдаемые формы АД контролируются двумя аллельными генами. Эти аллели определяют 3 фенотипа, различающиеся по электрофоретической подвижности [12, 13]. Генетическая гетерогенность сопровождается различными мутациями в структурном гене.

В форменных элементах крови присутствует АД с малой молекулярной массой. Наиболее хорошо охарактеризован фермент из эритроцитов крови, изучены его кинетические параметры, аминокислотная последовательность.

Влияние аналогов пуринов на активность АД тромбоцитов доноров и больных ХМЛ ( $M \pm m$ )

Аналоги пуринов (2,5 мМ)	Ингибирование, %	
	доноры	больные ХМЛ
8-азааденин	11,3±3,1 (7)	48,8±5,4 (7)
6-метиламинопурин	52,4±2,0 (5)	34,3±2,6 (8)
6-хлорпуририбозид	45,6±4,8 (5)	25,5±2,4 (4)
Аденин	65,6±6,3 (5)	63,0±4,8 (4)
6-меркаптопурин	45,3±4,0 (4)	36,6±3,0 (5)
6-хлорпурин	46,0±1,8 (4)	38,3±1,9 (4)
2,6-диаминопурин	81,3±5,4 (4)	83,8±5,4 (5)
Формицин	41,8±2,7 (6)	40,0±1,0 (4)
N <sup>6</sup> -метиладенозин	100 (2)	100 (4)

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

Фермент является мономером, имеет одну полипептидную цепь и вместе с тем показаны множественные электрофоретические формы, возникающие в результате посттрансляционной модификации [3, 4, 6, 10, 12, 14].

Данные о свойствах АД в лимфоцитах и тромбоцитах весьма ограничены [8, 9]. Не дают исчерпывающей информации материалы литературы о свойствах фермента при патологии. Имеются единичные работы [7, 8, 17], показывающие структурные изменения эритроцитарного фермента, выражающиеся в изменении электрофоретической подвижности, термолабильности при синдроме иммунной недостаточности, в культуре клеток лимфобластов и в гранулоцитах при хроническом миелолейкозе (ХМЛ).

Задачей настоящего исследования явилось сравнительное изучение ряда свойств АД тромбоцитов в норме и при ХМЛ с целью использования определенных параметров их в качестве показателей аномалий фермента.

#### Методика

Для определения микроколичеств АД тромбоцитов крови доноров и больных ХМЛ использовали радиоизотопный метод [15]. Тромбоциты выделяли путем центрифугирования на Фиколе—Паке. Выделенные тромбоциты разрушали озвучиванием, центрифугировали 20 мин при 25 000 g и надосадочную жидкость использовали для определения ферментативной активности [1]. Инозин, образовавшийся в ходе ферментативной реакции, отделяли от аденозина методом нисходящей хроматографии, используя ионообменную бумагу Ватман DE-81 и дистиллированную воду в качестве растворителя. Удельную активность ферментов выражали в наномолях образовавшегося инозина на 1 мг белка, определяемого по методу Лоури [11].

#### Результаты и обсуждение

Ранее было выявлено снижение активности АД при ХМЛ в среднем на 52 % по сравнению с активностью в тромбоцитах доноров [1].

Одним из подходов в изучении возможных структурных изменений фермента, обуславливающих изменение его активности, является изучение влияния аналогов субстрата. Нами было изучено влияние различных структурных аналогов пурина, у которых в 6-м положении пуринового кольца NH<sub>2</sub>-группа замещена на хлор-, меркапто-, метил-группы и аналоги пу-

ринов, модифицированные в имидазольном кольце (азааденин, формицин).

Наблюдалось разное воздействие структурных аналогов пурина на активность АД тромбоцитов в норме (табл. 1).

АД в норме более чувствительна к действию 2,6-диаминопурина — величина ингибиторного эффекта достигала 81,3 %. Средние значения ингибирования в присутствии 6-метиламинопурина, 6-хлорпуририбозиды, аденина, 6-меркаптопурина, 6-хлорпурина и формицина составляют 41—65 %. При действии 8-азааденина наблюдалось слабое ингибирование — 11,3 %. Следует отметить, что по характеру влияния ряда ингибиторов на АД тромбоцитов доноров фермент не отличается от такового в эритроцитах [4, 7].

Другая картина наблюдалась при воздействии тех же веществ на активность АД тромбоцитов при ХМЛ. Азааденин подавлял активность в большей степени (4,6 раза) по сравнению с нормой. Однако ряд других структурных аналогов пурина — 6-метиламинопурин и 6-хлорпуририбозид ингибировали фермент при ХМЛ в меньшей степени — лишь в 1,8 раза по сравнению с нормой, N<sup>6</sup>-метиладенозин оказывал ингибирующее влия-

Таблица 2

## Влияние ионов металлов на активность АД

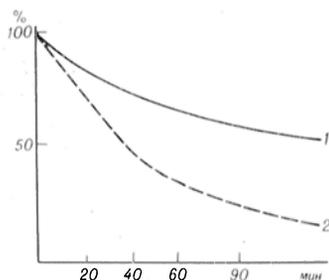
Катионы (2,5 мМ)	Ингибирование, %	
	доноры	больные ХМЛ
Cu <sup>2+</sup>	100 (5)	100 (4)
Cd <sup>2+</sup>	93,8±1,4 (5)	100 (4)
Mn <sup>2+</sup>	30,8±3,4 (4)	63,0±3,1 (4)
Ba <sup>2+</sup>	18,5±2,2 (4)	19,5±3,7 (4)
Mg <sup>2+</sup>	Не влияет (4)	21,8±5,6 (4)
Cs <sup>2+</sup>	Не влияет (4)	11,3±3,9 (4)

ние в равной степени как в норме, так и при ХМЛ.

При исследовании влияния ионов двухвалентных металлов на активность АД доноров выяснилось, что ионы Cu<sup>2+</sup> и Cd<sup>2+</sup> полностью ингибируют фермент. Отмечено 30 и 18% ингибирование фермента ионами Mn<sup>2+</sup> и Ba<sup>2+</sup>, однако Mg<sup>2+</sup> и Cs<sup>2+</sup> не оказывают влияния на него (табл. 2).

Изучение влияния ионов металлов на активность АД при ХМЛ показало, что Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> и Ba<sup>2+</sup> ингибируют с той же эффективностью, что и фермент доноров. Однако значительные различия выявлены в ингибировании активности АД при ХМЛ ионами Mn<sup>2+</sup> (в 2,2 раза) по сравнению с таковым доноров. Следует отметить, что Mg<sup>2+</sup> и Cs<sup>2+</sup> не оказывают выраженного ингибирующего действия.

При исследовании термолабильности АД ферментные препараты инкубировали в течение разных периодов времени при 60°C. Отмечено, что АД тромбоцитов при ХМЛ более чувствительна к тепловой обработке в сравне-



Термолабильность АД тромбоцитов доноров (1) и больных ХМЛ (2). По оси абсцисс — время (в мин); по оси ординат — активность фермента (в %).

нии с нормой (см. рисунок). Возможно, имеют место конформационные изменения в структуре белка, приводящие к более быстрой денатурации.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об изменении каталитических свойств АД тромбоцитов больных ХМЛ по сравнению с нормой по действию ряда ингибиторов, ионов металлов и температуры. По-видимому, дефект заключается в мутации структурного гена в процессе опухолевой трансформации, а не в нарушении экспрессии или механизмов регуляции.

Ранее было установлено, что при лимфопролиферативных заболеваниях (хроническом лимфолейкозе и неходжкинской лимфоме) имелась гетерогенная группа больных как с повышенной, так и с пониженной активностью фермента. Активность АД может изменяться по-разному при выраженной клинической картине заболевания, резко выраженной форме заболевания, в процессе лечения различными средствами и на стадии ремиссии.

Однако несмотря на разную исходную активность фермента при хроническом лимфолейкозе и неходжкинской лимфоме, ответ АД на воздействие ряда ингибиторов (8-азааденина, 6-метиламинопурина, формицина) и ионов металлов (Mn<sup>2+</sup>) был аномальным и подобным наблюдаемому в случае ХМЛ. Это дает основание предложить использовать в качестве критерия выявления начальных стадий заболевания лейкозом не классическое (стандартное) определение активности фермента, что является в ряде случаев малоинформативным, а изменения кинетических параметров АД в ответ на воздействие ряда ингибиторов и ионов металлов, что будет указывать на изменение молекулярной структуры фермента даже в тех случаях, когда активность фермента при патологии будет незначительно отличаться от нормы. Разработка таких критериев весьма актуальна в плане прогноза болезни.

## ЛИТЕРАТУРА

- Соковнина Я. М., Пестина Т. И., Тенцова И. А. и др. // Вестн. АМН СССР. — 1984. — № 8. — С. 75—80.
- Agarwal R. P., Sagar S. M., Parks R. E. // Biochem. Pharmacol. — 1975. — Vol. 24. — P. 693—701.

3. Agarwal R. P., Spector T., Parks R. E. // *Ibid.* — 1977. — Vol. 26. — P. 359—367.
4. Agarwal R. P., Parks R. E. // *Meth. Enzymol.* — 1978. — Vol. 51. — P. 502—507.
5. Aitken D. A., Ferguson-Smith M. A. // *Cytogenet. cell. Genet.* — 1978. — Vol. 22. — P. 514—517.
6. Daddona P. E., Kelley W. N. // *J. biol. Chem.* — 1977. — Vol. 252. — P. 110—115.
7. Daddona P. E., Kelley W. N. // *Molec. Cell. Biochem.* — 1980. — Vol. 29. — P. 91—100.
8. Daddona P. E., Kelley W. N. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1981. — Vol. 658. — P. 280—290.
9. Doni M. G. // *Haemostasis.* — 1981. — Vol. 10. — P. 79—88.
10. Hirschhorn R., Marlinskiuk F., Roegner-Maniscalco V., Ellenbogen A. // *J. clin. Invest.* — 1983. — Vol. 71. — P. 1887—1892.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // *J. biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
12. MacQuarrie R., Buel E. // *Molec. Cell. Biochem.* — 1982. — Vol. 42. — P. 121—126.
13. Schrader W. R., Stacy A. R., Pollara B. // *J. biol. Chem.* — 1976. — Vol. 251. — P. 4026—4032.
14. Stoecler J. D., Bell C. A., Parks R. E. // *Biochem. Pharmacol.* — 1982. — Vol. 31. — P. 1723—1728.
15. Weyden M. B., Bailey L. // *Clin. chim. Acta.* — 1978. — Vol. 82. — P. 179—184.
16. Weyden M. B., Bailey L., Garson O. M. // *Experientia (Basel).* — 1978. — Vol. 34. — P. 531—532.
17. Wiginton D. A., Coleman M. S., Hutton J. J. // *Biochem. J.* — 1981. — Vol. 195. — P. 389—397.

Поступила 23.04.86

#### CATALYTIC PROPERTIES OF ADENOSINE DEAMINASE FROM THROMBOCYTES UNDER CONDITIONS OF CHRONIC MYELOLEUKOSIS AND IN NORMAL STATE

Ya. M. Sokovnina, I. I. Pestina, A. G. Turkina, I. I. Votrin

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

Properties of adenosine deaminase from thrombocytes of healthy persons and of patients with chronic myeloleukosis were studied in presence of various structural analogues of purines and metal ions as well as at various temperature. Catalytic properties of the enzyme in thrombocytes of patients with chronic myeloleukosis were distinct from those of thrombocytes of healthy donors. These differences in the enzymatic properties (contrary to standard estimation of the enzyme activity) might be used both as a criterion of adenosine deaminase anomalies and for detection of the initial steps of the disease.

УДК 616.831-018.86-008.939.37-074

А. В. Ткаченко

### ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БИЛИРУБИНА, АЛЬБУМИНА И СИНАПТОСОМНОЙ МЕМБРАНЫ

Институт биофизики АН СССР, г. Пущино Московской области

Неврологические нарушения у новорожденных детей при ядерной желтухе [1] объясняют накоплением билирубина (БР) и некоторых его производных [6, 12, 28] в тканях головного мозга. Билидинен, по-видимому, может проникать в нервные клетки и вызывать нарушения функциональной активности митохондрий и синтеза белков [6, 14, 20, 21]. Проникновению БР в клетки должно предшествовать взаимодействие его с плазматической мембраной. В некоторых работах указано, что БР обладает свойством взаимодействовать с мембраной эритроцитов [11, 25]. Применительно к нервным клеткам взаимодействие БР с плазматической мембраной представляет собой неисследованную проблему. Задача данной работы заключается в изучении взаимодействия БР и его основного транспортера в системе циркуляции организма — сывороточного альбумина с изолированной плазматической

мембраной нервных окончаний — синаптосомальной мембраной (СМ).

#### Методика

В опытах использовали крыс-самцов Вистар массой 180—200 г. Из гомогената головного мозга в 0,32 М сахарозе выделяли фракцию СМ [2]. Отмытые от сахарозы мембранные частицы ресуспендировали в 3 мл бидистиллированной воды и лиофилизировали. Нативность СМ до и после лиофилизации контролировали по активности мембранной  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы [20] и ацетилхолинэстеразы [15]. Содержание белка в мембранных препаратах определяли колориметрически [7]. Использовали препараты БР «Реахим» (СССР) или «Reanal» (ВНР), очищенные экстракционным методом [19]. Чистоту нужного для работы  $\text{I}\chi\alpha$ -изомера БР контролировали тонкослойной хроматографией [18]. После указанной очистки растворы БР в хлороформе имели  $\epsilon_{459} = (5,9 \pm \pm 0,1) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Это соответствовало требованиям, предъявляемым препаратам БР [24]. Данную величину молярной экстинкции использовали для количественного определения связываемого мембранными частицами БР после экстракции связанного пигмента хлороформом. Для получения водных растворов БР

навеску пигмента растворяли в нескольких каплях 0,1 н. NaOH и незамедлительно разбавляли растворителем (рН 7,2—7,4). Все операции с растворами БР проводили под защитой от дневного света. В качестве растворителя использовали 0,7—0,9 % раствор NaCl на 0,1 М фосфатцитратном буфере рН 4,2—8,0. Для водных растворов БР принимали  $\epsilon_{438} = 5,20 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{см}^{-1}$ , а для водных растворов БР, связанного сывороточным альбумином человека (САЧ), —  $\epsilon_{460} = 4,65 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{см}^{-1}$  [9]. Отмытые от не связанного пигмента мембранные частицы отделяли центрифугированием ( $10^5 \text{ g}$  в течение 10—20 мин при 4 или 20 °С) или фильтрованием через бумажные фильтры.

Использовали препарат САЧ, полученный в Центральном институте гематологии и переливания крови (Москва). При спектрофотометрическом определении концентрации растворов этого белка принимали  $\epsilon_{279}^{1\%} = 5,34$ , а его молекулярную массу, равной 6,6 кД [29]. Спектры поглощения света измеряли на спектрофотометре «Specord» (ГДР) или «Perkin-Elmer» модель 575 (США). Спектры флуоресценции измеряли на скорректированном спектрофлуориметре «Perkin-Elmer MRF-44B» (США). Для центрифугирования использовали бакет-роторы 30 или 40 препаративной ультрацентрифуги VAC-601 (ГДР), угловые роторы центрифуги К-4 (ГДР) или ЦЛР-1 (СССР).

### Результаты и обсуждение

При спектрофотометрическом титровании в видимой области спектра раствора БР (рН 7,2) суспензией СМ (рН 7,2) спектр поглощения света БР с характерным для него единственным максимумом при 438—440 нм постепенно преобразуется в характерный

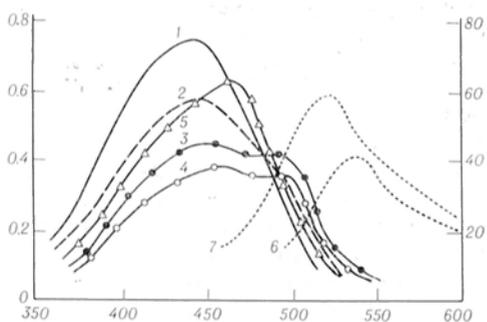


Рис. 1. Спектры поглощения света и флуоресценции БР.

По оси абсцисс — длина волны (в нм); по оси ординат: слева — оптическая плотность; справа — интенсивность флуоресценции (в отн. ед.). 1 — спектр поглощения  $1,4 \cdot 10^{-5}$  М БР в 0,9% растворе NaCl на 0,1 М фосфатцитратном буфере (рН 7,2; 20 °С); 2, 3, 4 — то же (2 мл) после добавления суспензии СМ до конечной концентрации мембранных белков в пробе соответственно 18, 45 и 315 мкг/мл (максимальное разбавление пробы в 1,05 раза); 5 — спектр поглощения 4 после добавления 100 мкг 7-10-4 М САЧ (рН 7,2); 6 — спектр флуоресценции БР, связанного СМ, при длине волны возбуждающего света 430 нм; 7 — то же после добавления избытка САЧ (рН 7,2).

для БР, связанного СМ, спектр со сдвигом максимума в длинноволновую область (460 нм) и с возникновением плеча в области 480—510 нм (рис. 1). Собственная флуоресценция БР в свежем водном растворе при длине волны возбуждающего света 280, 360, 430 или 480 нм ничтожна. Связывание БР частицами СМ сопровождается заметным усилением флуоресценции пигмента (см. рис. 1). Ее спектр имеет единственный максимум в области 530—540 нм (рН 7,2; 20 °С) независимо от длины волны возбуждающего света. Особенно интенсивной флуоресценции связанного СМ желчного пигмента оказывается при длине возбуждающего света 430 нм.

Связывание БР частицами СМ и хранение влажного осадка окрашенных пигментов мембранных частиц в течение 12—24 ч при 18—20 °С или при 0—7 °С под защитой от дневного света не сопровождаются заметными изменениями химической природы БР: при добавлении к суспензии хранящихся окрашенных СМ (рН 7,2) избытка САЧ спектр поглощения связанного мембранными частицами БР преобразуется в характерный для связанного с САЧ пигмента спектр с исчезновением упомянутого плеча в области 480—510 нм с сохранением максимума в области 460—470 нм (оптическая плотность в этой области возрастает) и с небольшим плечом в области 430 нм. Интенсивность флуоресценции пигмента, «снятого» САЧ с частиц СМ, увеличивается примерно в 2 раза (в области 520 нм), а ее спектр при длине волны возбуждающего света 280, 360, 430 или 480 нм имеет единственный максимум при 520 нм (см. рис. 1) и ничем не отличается от спектра флуоресценции БР, связанного САЧ в отсутствие СМ. Спектр поглощения света БР, экстрагированного из окрашенных им мембранных частиц хлороформом, имеет единственный максимум при 459—460 нм и ничем не отличается от спектра поглощения БР, растворенного в хлороформе, без СМ. Таким образом, связывание БР частицами плазматической мембраны стабилизирует желчный пигмент (по меньшей мере на ближайшие 12—24 ч), противодействуя тем спонтанным необратимым физико-химическим превращениям билидина, которые он претерпевает в

водном растворе [18, 29]. Достаточно продолжительное (например, в течение 1 мес) хранение влажного осадка окрашенных желчным пигментом мембранных частиц при 0—7°C под защитой от дневного света сопровождается необратимым превращением связанного частицами БР в соединении, напоминающее своим спектром поглощения видимого света мезобилирубин [28]. Обнаруженное при связывании *in vitro* БР мембранными частицами смещение максимума спектра поглощения желчного пигмента в длинноволновую область может быть обусловлено связыванием липофильного БР мембранными липидами [21, 22]. Возникновение плеча на спектре поглощения БР в области 480—510 нм при связывании его СМ может быть обусловлено агрегацией пигмента на мембранных частицах [22]. Растворимость БР в водной среде при кислотности и ионной силе, соответствующих характеристикам безбелковой части плазмы крови, составляет 50 мкг/мл [8]. Исследована зависимость количества связываемого мембранными частицами БР от содержания этих частиц в пробах при постоянной концентрации в них БР 50 мкг/мл ( $9 \cdot 10^{-5}$  М). В диапазоне исходных навесок лиофилизированных частиц СМ 1,0—4,0 мг (0,5—2,0 мг мембранных белков) данная зависимость оказалась близкой к прямой. В этих же опытах найдено, что для БР, связанного СМ,  $\epsilon_{460} = 1,6 \cdot 10^4$  М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup> (рН 7,2; 20°C).

При зацелачивании суспензии окрашенных БР и отмытых от несвязанного пигмента СМ (концентрация БР, связанного СМ,  $4 \cdot 10^{-5}$  М, 4 мл, рН 7,2; 20°C) до рН 8,4 с увеличением оптической плотности спектр поглощения по мере зацелачивания утрачивает форму, характерную для БР, связанного мембранными частицами, и приобретает форму, обычную для спектра поглощения свободного БР в свежеприготовленном водном растворе. После осаждения мембранных частиц в центрифуге ( $10^5$  g в течение 20 мин) практически весь пигмент оказывался в надосадочной жидкости (рН 8,4). При последующем кислотном титровании суспензии СМ, содержащей высвободившийся БР, происходит по мере закисления среды уменьшение оптической плотности и преобразование спектра поглощения, харак-

терного для свободного БР, в спектр, характерный для БР, связанного СМ (рН 7,2—6,8). После осаждения мембранных частиц в центрифуге пигмент сосредоточивался в осадке частиц, а надосадочная жидкость оказывалась бесцветной (рН 6,8). При ограничении диапазона кислотности суспензии мембранных частиц от рН 8,0 до рН 7,2 описанные преобразования спектра поглощения, связанные с чередованием зацелачивания и закисления среды, были обратимы и многократно воспроизводимы в одной и той же пробе. Амплитуда этих преобразований при повторных чередованиях зацелачивания и закисления среды сокращалась в связи с разрушением БР во время зацелачивания. При закислении среды от рН 7,2—6,8 до рН 4,8 спектр поглощения оставался без изменений. При дальнейшем закислении до рН 4,6—4,2 происходили резкое, но небольшое уменьшение оптической плотности и исчезновение максимума при 460 нм. Такое изменение спектра было необратимым.

При изменении температуры инкубации СМ (0,5 мг) в присутствии БР ( $10^{-4}$  М) в пределах от 0 до 50°C (продолжительность инкубации 10 мин, рН 7,2) наибольшее количество связываемого мембранными частицами БР находили после инкубации при 0°C, а наименьшее — после инкубации при 50°C. Средние величины ( $n=4$ ) оптической плотности при 460 нм хлороформных экстрактов окрашенных БР частиц СМ после инкубации при 5, 10, 20, 37 или 50°C составляли соответственно 79, 76, 76, 66 и 47% от средней величины оптической плотности экстрактов, полученных после инкубации при 0°C (рис. 2).

При изменении продолжительности инкубации от 0 до 30 мин (рН 7,2, 20°C) мембранных частиц в присутствии БР было обнаружено, что связывание пигмента частицами плазматической мембраны практически полностью завершается в течение 2—4 мин.

Для кинетического анализа взаимодействия БР и СМ использовали навески лиофилизированных частиц СМ 2,0 мг (1,0 мг мембранных белков) в пробах. Конечная концентрация БР в этих приборах (4 мл, рН 7,2) составляла  $(1-43) \cdot 10^{-5}$  М. Весовое соотношение БР и мембранных белков

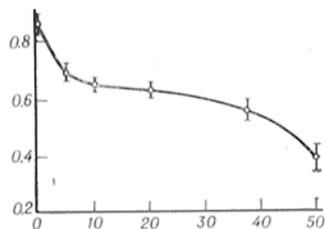


Рис. 2. Зависимость свойства СМ связывать БР от температуры среды (рН 7,2).

По оси абсцисс — температура (в °С); по оси ординат — оптическая плотность при 460 нм. Вертикальные линии показывают величины стандартной ошибки.

в пробах изменяли в пределах от 0,02 до 1,0. Пробы инкубировали при 20 °С в течение 3 мин, после чего избыток раствора БР удаляли фильтрованием. Спектрофотометрии подвергали водные суспензии отфильтрованных мембранных частиц и их хлороформные экстракты (по 2 мл хлороформа на каждую пробу). Результаты спектрофотометрии представлены в виде кривой титрования на рис. 3 и в виде графика Скэтчерда [13] на рис. 4. Приведенная на рис. 3 кривая титрования свидетельствует о существовании в СМ одного типа центров прочного связывания БР с константой ассоциации ( $K_a$ ) порядка  $0,8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ . Продолжающиеся после насыщения центров этого типа связывания БР признаков насыщения не обнаруживает. Не исключено, что оно носит неспецифический характер и обусловлено агрегацией пигмента на поверхности мембранных частиц [22].

Изображенный на рис. 4 график свидетельствует о существовании в СМ двух типов центров связывания БР. Максимальное связывание БР (в расчете на количество мембранных белков) в центрах одного из этих типов составляет 5,0 нмоль/мг ( $K_a \approx 0,6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ ), а в центрах второго типа — 7,0 нмоль/мг ( $K_a \approx 0,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ ).

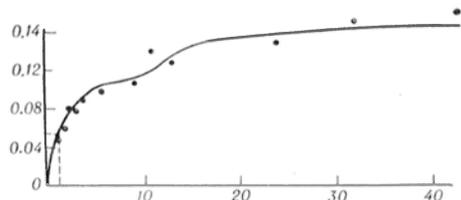


Рис. 3. Кривая титрования суспензии СМ раствором БР ( $4 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ , рН 7,2; 20 °С).

По оси абсцисс — концентрация свободного БР ( $\cdot 10^{-5} \text{ M}$ ); по оси ординат — концентрация БР, связанного СМ ( $\cdot 10^{-5} \text{ M}$ ).

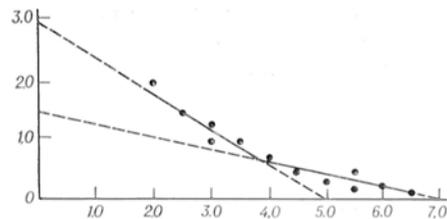


Рис. 4. Результаты титрования суспензии СМ раствором БР ( $4 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ , рН 7,2; 20 °С) в координатах Скэтчерда.

По оси абсцисс — количество связанного БР (в нмолях на 1 мг белка СМ); по оси ординат — соотношение концентрации связанного БР (в нмолях на 1 мг белка СМ) и концентрации свободного БР ( $\cdot 10^{-5} \text{ M}$ ).

В опытах с липосомами из суммарной фракции липидов головного мозга крупного рогатого скота для комплексов БР-липосома  $K_a$  составляла  $(2,5—5,0) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$  [22].

После добавления в суспензию мембранных частиц, окрашенных БР ( $3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ , 2 мл, рН 7,6, 20 °С), 3,4 % раствора САЧ (рН 7,6) до его конечной концентрации  $1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$  в течение 10 мин происходит небольшое сохраняющееся в течение последующих 60 мин увеличение оптической плотности в области 400—490 нм с полным исчезновением плеча в области 480—510 нм и смещением максимума поглощения света с 460 до 470 нм, т. е. спектр приобретает форму, очень близкую к форме спектра, характерного для БР, связанного с САЧ. При последующем закислении среды до рН 7,0 происходит (в течение 25 мин) обратное преобразование спектра из формы, характерной для БР, связанного с САЧ, в форму, характерную для БР, связанного с СМ. Для воспроизведения таких преобразований спектра поглощения БР (обратимых связанных с чередованием закисления и защелачивания среды в пределах от рН 7,0 до рН 7,6) в присутствии САЧ и СМ критическое значение имеет молярное соотношение САЧ и билидиена, связанного мембранными частицами, порядка 1:30. При увеличении концентрации альбумина в пробе до  $10^{-5}—10^{-4} \text{ M}$  без изменения концентрации БР, связанного СМ ( $3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ), переход желчного пигмента из состояния, связанного с СМ, в состояние, связанное с САЧ, при рН 7,6 необратим.

Одним из факторов, способствующих возникновению ядерной желтухи,

является респираторный ацидоз у недоношенных новорожденных детей [3, 6]. Имеются сведения о том, что ацидоз, возникающий в детском организме, недостаточен для повышения проницаемости гематоэнцефалического барьера по отношению к накапливающемуся в крови БР, связанному с альбумином [4, 5, 26, 27]. Результаты, полученные *in vitro* с использованием БР, СМ и САЧ, могли означать, что этиопатогенетический фактор в ядерной желтухе ацидоз приобретает, вероятно, только в сочетании с недостатком способного связывать БР альбумина в системе микроциркуляции головного мозга.

При спектрофотометрическом титровании суспензии мембранных частиц, окрашенных БР, отмытых от несвязанного пигмента (2 мл, pH 7,4; 20°C) раствором САЧ ( $9,4 \cdot 10^{-4}$  М, pH 7,4), на полное титрование  $0,4 \cdot 10^{-7}$  моль связанного билидиена уходит  $2,0 \cdot 10^{-7}$  моля альбумина (исходная концентрация связанного БР составляла  $2 \cdot 10^{-5}$  М). Во взаимодействии с БР участвует, вероятно, главный центр связывания пигмента в молекуле альбумина [9, 16, 23]. Связывание БР молекулами САЧ ( $10^{-4}$  М) в гомогенной водной среде происходит менее чем за 10 мс [10]. В гетерогенной водной суспензии окрашенных БР мембранных частиц связывание пигмента САЧ происходит в течение 10—20 мин после добавления каждой порции альбумина ( $10^{-8}$ — $10^{-9}$  моль) вплоть до конечной концентрации его в пробе  $\sim 10^{-4}$  М. Результаты электрофореза суспензии обработанных САЧ частиц СМ в ПААГ свидетельствуют о сорбции альбумина на интактных мембранных частицах. В результате такой сорбции количество БР, фиксирующегося на СМ, увеличивается на 18—22% по сравнению с таким пигмента, фиксирующегося на мембранных частицах без предварительной обработки их САЧ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Таболин В. А. Билирубиновый обмен и желтухи новорожденных. — М., 1967.
2. Ткаченко А. В. // Биохимия. — 1972. — Т. 37, № 2. — С. 248—254.
3. Aidin R., Corner B., Tovey G. // *Lancet*. — 1950. — Vol. 258. — P. 1153—1154.
4. Bakay L. The Blood-Brain Barrier with Special Regard to the Use of Radioactive Isotopes. — Springfield, 1956.

5. Barlow Ch. F. // *Ann. Rev. Med.* — 1964. — Vol. 15. — P. 187—202.
6. Blanc W., Johnson L. // *J. Neuropath. exp. Neurol.* — 1959. — Vol. 18, N 1. — P. 165—189.
7. Bradford M. M. // *Analyt. Biochem.* — 1976. — Vol. 72, N 1—2. — P. 248—254.
8. Burnsteine R., Schmid R. // *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*. — 1962. — Vol. 109, N 2. — P. 356—358.
9. Chen R. // *Fluorescence Techniques in Cell Biology* / Ed. A. Thayer, M. Sernetz. — New York, 1973. — P. 273—282.
10. Chen R. // *Arch. Biochem.* — 1974. — Vol. 160, N 1. — P. 106—112.
11. Cheung W., Sawitsky A., Isenberg H. // *Transfusion*. — 1966. — Vol. 6, N 6. — P. 475—486.
12. Claireaux A., Cole P., Lathe G. // *Lancet*. — 1953. — Vol. 265. — P. 1226—1230.
13. Frezza M., Tiribelli C., Panfili E., Sandri G. // *FEBS Lett.* — 1974. — Vol. 38, N 2. — P. 125—128.
14. Gurba P., Zand R. // *Biochem. biophys. Res. Commun.* — 1974. — Vol. 58, N 4. — P. 1142—1147.
15. Hestrin Sh. // *J. biol. Chem.* — 1949. — Vol. 180, N 1. — P. 249—261.
16. Lamola A., Eisinger J., Blumberg W. et al. // *Analyt. Biochem.* — 1979. — Vol. 100, N 1. — P. 25—42.
17. Martin N. // *J. Amer. chem. Soc.* — 1949. — Vol. 71, N 4. — P. 1230—1232.
18. McDonagh A., Assisi F. // *FEBS Lett.* — 1971. — Vol. 18, N 2. — P. 315—317.
19. McDonagh A., Assisi F. // *Biochem. J.* — 1972. — Vol. 129, N 3. — P. 797—800.
20. Menken M., Waggoner J. G., Berlin N. // *J. Neurochem.* — 1966. — Vol. 13, N 11. — P. 1241—1248.
21. Mustafa M., King T. // *J. biol. Chem.* — 1970. — Vol. 245, N 5. — P. 1084—1089.
22. Nagaoka Sh., Coweger M. // *Ibid.* — 1978. — Vol. 253, N 6. — P. 2005—2011.
23. Odell G. // *J. Pediat.* — 1959. — Vol. 55, N 2. — P. 268—279.
24. Recommendation on uniform bilirubin standard // *Clin. Chem.* — 1962. — Vol. 8, N 4. — P. 405—407.
25. Sato H., Kashiwamata S. // *Biochem. J.* — 1983. — Vol. 210, N 2. — P. 489—496.
26. Stempfel R., Zetterstrom R. // *Pediatrics*. — 1955. — Vol. 16, N 2. — P. 184—193.
27. Takahashi M., Sugiyama K., Shumiya S., Nagase S. // *J. Biochem. (Tokyo)*. — 1984. — Vol. 96, N 6. — P. 1705—1712.
28. Vogel F. // *J. exp. Med.* — 1953. — Vol. 98, N 5. — P. 509—519.
29. Wooly P., Hunter J. // *Arch. Biochem.* — 1970. — Vol. 140. — N 1. — P. 197—209.

Поступила 24.04.86

#### INTERACTION BETWEEN BILIRUBIN, ALBUMIN AND SYNAPTOSOMAL MEMBRANE

A. V. Tkachenko

Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow Region, Puschino

Binding of bilirubin with particles of synaptosomal membrane (pH 7.2, 20°) resulted in shifting of absorption maximum of bilirubin aqueous solution towards the long-wave region with ma-

ximal extinction at 460 nm and the plateau at 430-510 nm as well as in amplification of the pigment fluorescence at 530-540 nm (excitation at 430 nm). Two types of bilirubin binding sites were detected in synaptosomal membrane. At the sites of the first type content of bound bilirubin (calculated per membrane proteins) constituted 5 nmol/mg ( $K_a = 0.6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ ). This value was 7 nmol/mg ( $K_a = 0.2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ ) at the sites of the second type. Alterations in pH of a medium

within ranges from pH 7.2 to pH 8.0 led to reverse transition of the bilirubin free form (pH 8.0) to the form bound with membrane particles (pH 7.2). On the molar ratio of 1:30 of human blood albumin and the bilirubin, bound with plasmatic membrane, shifting of pH within the ranges of pH 7.0-7.6 was followed by reverse binding of bilirubin with synaptosomal membranes (pH 7.2) or with albumin (pH 7.6).

УДК 616-001.16-001.36-07:616-008.939.6-02:615.332

*С. Н. Кузьмина, С. Б. Акопов, Т. В. Бульдяева, И. Б. Збарский*

## **ВЛИЯНИЕ АКТИНОМИЦИНА D, ЦИКЛОГЕКСИМИДА, ПУРОМИЦИНА И МИТОМИЦИНА С НА НОВООБРАЗОВАНИЕ БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА ЯДЕРНОГО МАТРИКСА ФИБРОБЛАСТОВ КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА**

Институт биологии развития им. Н. К. Колылова АН СССР, Москва

В клетках в ответ на действие повышенной температуры индуцируется синтез специфических белков теплового шока. Белки теплового шока выявлены в различных одноклеточных и многоклеточных организмах от бактерий до человека [13, 15], что свидетельствует об универсальности реакции клетки на стрессогенное воздействие.

Для большинства белков теплового шока получены матричные РНК и расшифрованы последовательности кодирующих их генов [2, 12, 13, 15]. Вместе с тем мы располагаем крайне ограниченными сведениями о механизмах регуляции, обеспечивающих изменение клеточного метаболизма и направленный биосинтез белков теплового шока.

В настоящей работе исследовали влияние ряда антибиотиков на новообразование белков теплового шока 86 и 70 кД, выявляемых в составе ядерного матрикса фибробластов китайского хомячка.

### **Методика**

В работе использовали культуру фибробластов китайского хомячка *Cricetulus griseus* линии В11 дп1 FAF-28 в стационарной фазе роста. Клетки культивировали в среде № 199, смешанной со средой Игла (1:1). К среде роста добавляли инактивированную бычью сыворотку до конечной концентрации 20% и антибиотики (стрептомицин и пенициллин по 50 ЕД/мл). Клетки культивировали при температуре 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>.

Процедуру теплового шока проводили при 46°C в течение 10 мин, как описано ранее [1]. После теплового шока клетки инкубиро-

вали в течение 6 ч при 37°C и снимали раствором Версена. Антибиотики вносили в среду роста клеток непосредственно перед тепловым воздействием или сразу после него. <sup>35</sup>S-метионин (1,1 МБк на 1 мл среды) вносили за 1 ч до снятия клеток в среде, не содержащей метионина. В серии опытов часть клеток после 10 мин прогревания инкубировали при 37°C в течение 2 ч, а другую часть прогревали при 46°C в течение 2 ч и сразу же снимали версеном. Радиоактивную метку в обоих случаях вводили за 1 ч до снятия клеток.

Клетки суспендировали, дважды промывали и изолировали ядра и ядерный матрикс, как описано ранее [1]. Белки исследовали электрофорезом в 10% ПААГ, содержащем додецилсульфат натрия [8]. Для разделения белков двумерным электрофорезом использовали метод, опубликованный ранее [14].

### **Результаты и обсуждение**

После прогревания фибробластов китайского хомячка среди белков ядерного матрикса выявляются белки теплового шока с мол. массой 86 и 70 кД (рис. 1, показано стрелками, см. вклейку). Полипептид теплового шока 86 кД, рI 5,5 при исследовании белков ядерного матрикса двумерным электрофорезом выявляется как новый белок; соответствующий ему белок в непрогретой клетке не обнаруживается. В области 70 кД в непрогретой клетке выявляется минорный, очень слабо выраженный компонент рI 5,2—5,4, резко усиливающийся после теплового шока.

Новообразование белков теплового шока 86 и 70 кД ядерного матрикса подавляется актиномицином D, блокирующим транскрипцию мРНК (рис. 2, см. вклейку). Антибиотик добавляли

в среду инкубации клеток до процедуры прогревания или сразу после нее. После тепловой травмы клетки инкубировали при 37°C в течение 6 ч. <sup>35</sup>S-метионин вносили за 1 ч до снятия клеток. Добавление актиномицина D в концентрации 2 мкг на 1 мл среды инкубации клеток до теплового шока практически полностью подавляет включение меченого предшественника в полипептиды 86 и 70 кД ядерного матрикса (см. рис. 2, дорожка 4). При добавлении антибиотика в концентрации 2 мкг на 1 мл среды инкубации клеток сразу же после процедуры прогревания среди белков ядерного матрикса полипептиды теплового шока выявляются, но интенсивность их выражения несколько снижена. Повышение концентрации антибиотика до 4 мкг/мл ингибирующий эффект практически не усиливает.

Обращают на себя внимание полипептиды в области 100—110 кД, которые выявляются более интенсивно при внесении в среду роста 2 мкг/мл актиномицина D сразу после теплового шока. При повышении концентрации антибиотика до 4 мкг/мл интенсивность полипептидов 100—110 кД увеличивается (см. рис. 2, дорожки 3 и 4). При этой концентрации антибиотика усилена также группа полипептидов в области 20—28 кД.

Эти результаты хорошо согласуются с данными, полученными на цельной клетке, где актиномицин D подавляет включение меченого предшественника в белки теплового шока и ингибирующий эффект выражен более глубоко при добавлении антибиотика в среду инкубации клеток до процедуры прогревания (рис. 3, см. вклейку).

На рис. 4, см. вклейку, представлены флюорограммы белков теплового шока ядерного матрикса и (для сравнения) цельной клетки при инкубации фибробластов китайского хомячка в присутствии циклогексимида, пурамицина и митомцина C, внесенных после процедуры прогревания клеток. Циклогексимид (1 мкг на 1 мл среды инкубации) полностью подавляет включение меченого предшественника в белки как гомогената, так и теплового шока 86 и 70 кД ядерного матрикса, что свидетельствует о подавлении трансляции белков теплового шока на матричной РНК. Пурамицин (60 мкг/мл), блокирующий рост поли-

пептидной цепи, относительно слабо ингибирует включение <sup>35</sup>S-метионина в белки теплового шока. В гомогенате наиболее выражено подавление включения меченого предшественника в белки с мол. массой 86, 59 и 70 кД (перечислено в порядке интенсивности ингибирования). Среди белков ядерного матрикса можно отметить только некоторое снижение интенсивности полипептида 86 кД; белок 70 кД оказался нечувствительным к пурамицину в данной концентрации. В присутствии митомцина C (1 мкг/мл), блокирующего репликацию ДНК, не наблюдалось подавления включения меченого предшественника в белки теплового шока гомогената и ядерного матрикса (см. рис. 4).

Биосинтез белков теплового шока вследствие высокой скорости ответа клетки на тепловую травму и интенсивного накопления небольшой группы белков теплового шока является удобной моделью для исследования регуляторных механизмов клетки, например регуляции экспрессии генов у эукариот, регуляции транскрипции и последующего процессинга первичного транскрипта, регуляции трансляции и т. д. Индукция пуфов, специфичных для теплового шока, хорошо выражена уже через 1 мин после подъема температуры, а первичный транскрипт выявляется через 1—2 мин [2, 13, 15]. Поскольку новообразование белков теплового шока ядерного матрикса фибробластов китайского хомячка не подавляется митомцином C, а также, как показали Бардон и соавт. [3], биосинтез белков теплового шока клеток HeLa нечувствителен к гидроксимочевине, индукция белков теплового шока не зависит от ДНК-репликации.

Актономицин D при внесении в среду инкубации фибробластов китайского хомячка до прогревания клеток полностью подавляет включение меченого предшественника в белки теплового шока 86 и 70 кД ядерного матрикса. Однако при внесении антибиотика сразу же после теплового шока эти полипептиды выявляются, хотя и несколько слабее, чем в клетках, прогретых без антибиотика. Увеличение концентрации антибиотика ингибирующий эффект практически не усиливает. Таким образом, биосинтез матричной РНК белков теплового шока 86 и 70 кД ядерного матрикса индуцируется по-

вышением температуры инкубации клеток. Поскольку добавление антибиотика после прогревания клеток не останавливает новообразование белка теплового шока, а лишь снижает его, что показано также в клетках дрозофилы [5, 9, 11], очевидно, в клетках эукариот транскрипция РНК белков теплового шока осуществляется сравнительно быстро в период процедуры прогревания клеток.

В клетках различного происхождения скорость ответа на тепловое воздействие чрезвычайно велика. В течение первых 10 мин после старта теплового шока уже синтезируется матричная РНК и последующее прогревание клеток, по мнению Бардон и соавт. [3], не увеличивает количественное содержание РНК и соответственно белков теплового шока. Таким образом, в клетках различного генезиса биосинтез белков теплового шока регулируется на уровне транскрипции, и эта регуляция, по-видимому, однородна в различных клетках. Однако на дальнейших этапах биосинтеза белка выявляются видимые различия.

В клетках дрозофилы белки теплового шока выявляются очень быстро — через 10—15 мин после повышения температуры появляются минорные полипептиды теплового шока, которые быстро накапливаются и через 30—60 мин превалируют над всеми белками клетки [2, 5, 6, 15]. Белки теплового шока в клетках дрозофилы синтезируются *de novo* в течение процедуры прогревания на фоне резкого подавления биосинтеза белков непрогретой клетки.

В клетках теплокровных белки теплового шока выявляются после тепловой травмы только через 2—6 ч [1, 3, 10, 12, 16]. Таким образом, между транскрипцией матричной РНК и трансляцией проходит сравнительно большой интервал времени, и пока не ясно, на каком посттранскрипционном уровне осуществляется регуляция биосинтеза белков теплового шока.

В фибробластах китайского хомячка белки теплового шока не синтезируются в течение процедуры прогревания клеток. В ряде опытов, помимо обычной схемы прогревания клеток (10 мин при 46 °С и затем инкубация клеток при температуре роста не менее 2 ч), применяли и другую, в соответствии с которой часть клеток инку-

бировали при 45 °С в течение 2 ч и новообразование белков теплового шока исследовали непосредственно после прогревания. Такое длительное прогревание не сопровождалось гибелью клеток, при окрашивании их 0,05 % трипановым синим в препарате были выявлены лишь единичные погибшие клетки. Включение <sup>35</sup>S-метионина в белки клеточных фракций подавлялось в среднем на 55—75 %, однако белки теплового шока не выявлялись ни в гомогенате, ни в ядерном матриксе, полипептидный профиль клеточных фракций не отличался от соответствующего профиля непрогретых клеток (флуорограммы не приводятся). Вместе с тем через 2 ч после 10-минутного прогревания клеток и последующего содержания их при 37 °С выявляются белки теплового шока. Эти результаты согласуются с данными, полученными на клетках HeLa [3], и свидетельствуют о том, что у теплокровных в восстановительный после теплового шока период активируются неизвестные еще механизмы регуляции биосинтеза белков на посттранскрипционном уровне. Эти механизмы активируются, по-видимому, и при повышенной температуре, но в более отдаленные сроки [7, 16]. Природа регуляторного механизма неизвестна. Не ясно также, на каком уровне белоксинтезирующей системы он действует. Можно допустить, что это фактор белковой природы, но не известно, присутствует ли он в непрогретой клетке или синтезируется *de novo* после стрессогенного воздействия. Наличие белкового регулятора в фибробластах китайского хомячка не противоречит данным, в соответствии с которыми в пострибосомном супернатанте лизата ретикулоцитов после прогревания при 44 °С выявляется ингибитор биосинтеза белков клетки [4]. Однако для того чтобы ответить на все эти вопросы, требуется проведение дополнительных исследований.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бульдьева Т. В., Акопов С. Б., Кузьмина С. Н., Збарский И. Б. // Биохимия. — 1986. — Т. 51, № 3. — С. 494—504.
2. Ashburner M., Bonner J. J. // Cell. — 1979. — Vol. 17. — P. 241—254.
3. Burdon R. H., Slater A., McMahon M., Calo A. C. B. // Brit. J. Cancer. — 1982. — Vol. 45. — P. 953—965.

4. Bonanou-Tzedaki S., Sohl M. K., Arnstein H. R. V. // *Europ. J. Biochem.* — 1981. — Vol. 114. — P. 69—77.
5. DiDomenico B. J., Bugaisky G. E., Lindquist S. // *Cell.* — 1982. — Vol. 31. — P. 593—603.
6. DiDomenico B. J., Bugaisky G. E., Lindquist S. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.* — 1982. — Vol. 79. — P. 6181—6185.
7. Heat Shock: From Bacteria to Man / Ed. M. J. Schlesinger et al. — Cold Spring Harbor, N. Y., 1982.
8. Kelley P. M., Aliperti G., Schlesinger M. J. // *J. biol. Chem.* — 1980. — Vol. 255. — P. 3230—3233.
9. Laemmli U. K. // *Nature.* — 1970. — Vol. 227. — P. 680—685.
10. Lewis M., Helmsing P. J., Ashburner M. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.* — 1975. — Vol. 72. — P. 3604—3608.
11. Li G. C., Werb Z. // *Ibid.* — 1982. — Vol. 79. — P. 3218—3222.
12. Lindquist S. // *Nature.* — 1981. — Vol. 293. — P. 311—314.
13. Lowe D. G., Moran L. A. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.* — 1984. — Vol. 81. — P. 2317—2321.
14. Nover L. Heat Shock Response of Eukaryotic Cells. — Leipzig, 1984.
15. O'Farrell P. H. // *J. biol. Chem.* — 1975. — Vol. 250. — P. 4007—4021.
16. Welch W. J., Feramisco J. R. // *J. biol. Chem.* — 1984. — Vol. 259. — P. 4501—4513.

Поступила 25.04.86

УДК 612.015.1:577.152.165'133]-06:[612.397.81+612.352.15

В. В. Федуров

## ВЛИЯНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА И ЖЕЛЧНЫХ КИСЛОТ НА ОБМЕН УБИХИНОНА В ОРГАНАХ КРЫС

Киевский медицинский институт им. А. А. Богомольца

Активность ряда ферментов, катализирующих образование изопrenoидных предшественников боковой цепи убихинона у животных, колеблется в широких пределах и зависит как от содержания стерина в пище, так и полноты всасывания этих соединений из желудочно-кишечного тракта [2, 5, 6, 7, 10—12, 14, 20]. Всасывание стерина осуществляется при участии желчных кислот и изменяется при нарушении нормальной их печеночно-кишечной циркуляции [5, 6, 8, 12]. Цель данной работы — исследовать изменения в обмене убихинона в органах крыс, длительно получавших стандартный или искусственный корм, в состав которого входил либо холестерин, либо желчные кислоты.

### Методика

Опыты поставлены на самцах белых беспородных крыс с начальной массой тела

EFFECT OF ACTINOMYCIN D, CYCLOHEXIMIDE, PUROMYCIN AND MITOMYCIN C ON BIOSYNTHESIS OF THERMAL SHOCK PROTEINS IN FIBROBLAST NUCLEAR MATRIX OF CHINESE HAMSTER

S. N. Kuz'mina, S. B. Akopov, T. V. Bul'dyeva, I. B. Zbarsky

Institute of Developmental Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The thermal shock proteins with molecular mass of 86 kD and pI 5.5 as well as of 70 kD and pI 5.2-5.4 were isolated by means of two-dimensional electrophoresis in polyacrylamide gel from nuclear matrix of chinese hamster fibroblasts after heating of the animals. Incorporation of <sup>35</sup>S-methionine into the thermal shock proteins was completely inhibited by actinomycin D (2 µg/ml), if the antibiotic was added into the cell incubation medium before heating, while the incorporation of methionine was decreased only slightly when the antibiotic was added after heating of the cells. Thus, biosynthesis of mRNA of the thermal shock proteins of 86 and 70 kD in nuclear matrix was induced by means of an increase in temperature during the incubation of the cells. Biosynthesis of the thermal shock proteins in nuclear matrix was distinctly inhibited by cycloheximide (1 µg/ml) and was not practically inhibited by puromycin (60 µg/ml).

200±15 г, содержащихся при естественной освещенности. Контрольные крысы получали стандартный корм вивария, подопытные — искусственный рацион, включающий в себя обезжиренный казеин (20 %), крахмал (65 %), сахарозу (10 %), солевую смесь (4 %), метилловые эфиры животных жирных кислот (5 %) и витамины [19].

Для мечения эндогенного убихинона в органах животных использовали его непосредственный биосинтетический предшественник — [<sup>14</sup>C]-*л*-оксисбензойную кислоту [18]. Ее получали щелочным плавлением [<sup>14</sup>C]-тирозина (удельная активность 315 мКи/ммоль, производство ЧССР) [13] и вводили в хвостовую вену по 0,5 мКи в 0,2 мл 0,9 % раствора хлористого натрия. Крыс, содержащихся на стандартном рационе вивария, декаптитировали по 6 животных из каждой группы через 1, 3, 6, 12, 18 сут после введения метки, извлекали печень, почки, скелетные мышцы и тонкую кишку [3]. Крыс, получавших искусственный рацион, декаптитировали по 4 из каждой группы через 3, 9, 15 сут (в некоторых случаях через 21 сут) после введения метки. Части из них через сутки после инъекции раствора [<sup>14</sup>C]-*л*-оксисбензойной кислоты в рацион вводили либо 2 % холестерина, либо 0,2 % желч-

ных кислот, суммарный препарат которых получали из свежесобранной бычьей желчи [21]. Выделение и количественное определение урбихинона и его радиоактивности описаны ранее [3]. Изменения в обмене урбихинона под влиянием холестерина и желчных кислот оценивали по константам скоростей деградации, которые вычисляли по кинетике убыли радиоактивности по формуле:

$$C_t = C_0 e^{-kT}, \quad (1)$$

а полупериод его обмена по формуле:

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}, \quad (2)$$

где  $C_t$  — радиоактивность урбихинона в момент  $t$ ;  $C_0$  — в нулевое время,  $k$  — константа скорости деградации,  $T$  — время в днях и  $T_{1/2}$  — период биологического полураспада [3]. Все расчеты были проведены с помощью ЭВМ «Мир-2» по программе линейной регрессии [1, 3]. В основу программы положено преобразование уравнения (1) в линеаризованную форму:

$$\ln C_t = \ln C_0 - kT. \quad (3)$$

Значимость различий констант деградации урбихинона в органах различных групп крыс определяли по критерию Стьюдента [1].

### Результаты и обсуждение

Результаты исследований представлены в таблице. У крыс, получавших стандартный корм вивария, полупериоды обмена урбихинона в печени и почках почти одинаковы и составляют 12 и 13 сут соответственно, в скелетных мышцах — 18 сут, в тонкой кишке — 5 сут.

У животных, рацион которых прак-

тически не содержал холестерина, обмен урбихинона в печени, почках и скелетных мышцах значительно ускорился, тогда как в тонкой кишке замедлялся. Дополнительное введение в искусственный корм 2 % холестерина сопровождалось значительным замедлением обмена урбихинона в почках, скелетных мышцах и особенно выражено в печени.

При введении в рацион желчных кислот обмен урбихинона в печени крыс замедляется более чем в 13 раз по сравнению с соответствующим значением у животных, получавших искусственную диету, тогда как в тонкой кишке, наоборот, увеличивается в 2 раза. В почках и скелетных мышцах эти изменения выражены в меньшей степени.

Известно, что у крыс при переводе на искусственные рационы происходят значительные изменения обмена стероидов во многих органах и прежде всего в печени [16, 17]. По нашим данным при этом наблюдаются существенные изменения и в обмене урбихинона. Бесхолестериновая диета, очевидно, значительно ускоряет как биосинтез, так и распад этого кофермента в большинстве органов, за исключением тонкой кишки. При этом, по-видимому, изменяется и рециркуляция его из печени в желудочно-кишечный тракт и обратно в пе-

Константы ( $k$ ) скоростей распада и полупериоды ( $T_{1/2}$ ) обмена урбихинона- $^3$  в органах крыс, получавших стандартную или искусственную диету с холестерином или желчными кислотами

Диета	Печень		Почки		Скелетные мышцы		Тонкая кишка	
	$k \pm$ стандартное отклонение	$T_{1/2}$ , дни	$k \pm$ стандартное отклонение	$T_{1/2}$ , дни	$k \pm$ стандартное отклонение	$T_{1/2}$ , дни	$k \pm$ стандартное отклонение	$T_{1/2}$ , дни
Стандартная в условиях вивария (30/6)	$-0,0556 \pm 0,00074$	12,46	$-0,0522 \pm 0,0015$	13,27	$-0,0378 \pm 0,0015$	18,33	$-0,1303 \pm 0,0235$	5,32
Искусственная (16/4)	$-0,0932 \pm 0,0149^*$	7,44	$-0,0945 \pm 0,0218^*$	7,33	$-0,0515 \pm 0,0199^*$	13,46	$-0,0440 \pm 0,0229^*$	15,76
Искусственная + 2 % холестерина (12/4)	$-0,0294 \pm 0,0485^{**}$	23,60	$-0,0458 \pm 0,0319^{**}$	15,14	$-0,0225 \pm 0,0435^{**}$	30,83	$-0,0598 \pm 0,0455^{***}$	11,59
Искусственная + 0,2 % желчных кислот (12/4)	$-0,0075 \pm 0,0283^{**}$	92,62	$-0,0702 \pm 0,0243^{**}$	9,26	$-0,0413 \pm 0,0325$	16,78	$-0,0975 \pm 0,0451^*$	7,11

Примечание. В скобках — число животных: в числителе — общее, в знаменателе — в отдельный интервал времени. Одна звездочка —  $p < 0,001$  по сравнению с показателями у крыс, получавших корм вивария; две звездочки — то же, у крыс, получавших искусственный корм, три —  $p < 0,05$ .

чень, так как синтез желчных кислот у таких крыс понижается [17]. Введение на этом фоне холестерина приводит к торможению синтеза не только стерина, но и убихинона. В условиях гомеостаза это неизбежно сопровождается и торможением распада убихинона. Более сложная картина наблюдается при введении желчных кислот. Во-первых, экзогенные желчные кислоты тормозят синтез изопреноидных предшественников убихинона [6, 12, 13], во-вторых, они, несомненно, увеличивают его рециркуляцию из кишечника снова в печень. Известно, что убихинон выделяется с желчью [9, 15] и может всасываться из желудочно-кишечного содержимого и поступать в кровь и лимфу [15]. По-видимому, все это в наших опытах приводило к значительному замедлению убыли из печени радиоактивного убихинона. Возможно, что с всасывающимися желчными кислотами убихинон из клеток кишечника может поступать также в кровь, а затем в гепатоциты, вследствие чего скорость его обмена в них возрастает.

Таким образом, холестерин и желчные кислоты при введении в корм крыс вызывают изменения не только их собственного обмена, но и других продуктов изопреноидного метаболизма, в частности убихинона. Выраженные изменения в обмене убихинона, обнаруженные в печени, обусловлены, по-видимому, регуляторной ролью этого органа в обмене изопреноидов [4]. В печени крыс при стандартных условиях питания синтезируется около 50 % всех стерина организма [4]. Недавно было показано, что печень может быть источником убихинона, который с липопротеинами низкой плотности может поступать в другие органы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Браунли К. А. Статистическая теория и методология в науке и технике: Пер. с англ. — М., 1977.
2. Федуров В. В. // *Вопр. мед. химии.* — 1978. — № 2. — С. 232—240.
3. Федуров В. В. // *Молекулярная биология.* — Киев, 1980. — Вып. 25. — С. 17—28.
4. Федуров В. В. // *Успехи совр. биол.* — 1985. — Т. 100, Вып. 3 (6). — С. 357—371.
5. Andersen J. M., Dietschy J. M. // *J. Biol. Chem.* — 1977. — Vol. 252, N 11. — P. 3646—3659.

6. Back P., Hamprecht B., Lynen F. // *Arch. Biochem.* — 1969. — Vol. 133, N 1. — P. 11—21.
7. Clinkenbeard K. D., Suziyama T., Reed W. D., Lane M. D. // *J. Biol. Chem.* — 1975. — Vol. 250, N 8. — P. 3124—3135.
8. Danielsson H., Sjövall J. // *Ann. Rev. Biochem.* — 1975. — Vol. 44. — P. 233—254.
9. Fujita T., Tanayama S., Shirakawa Y., Suzuoki J. // *J. Biochem.* — 1971. — Vol. 69, N 1. — P. 53—61.
10. Goldfarbs S., Pilot H. C. // *J. Lipid Res.* — 1972. — Vol. 13, N 6. — P. 791—801.
11. Gould R. C., Swyryd E. A. // *Ibid.* — 1966. — Vol. 7, N 5. — P. 698—707.
12. Harry D. S., Dini M., McIntyre N. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1973. — Vol. 296, N 1. — P. 209—220.
13. Ho L., Nilson J. L., Skelton F. S. et al. // *J. org. Chem.* — 1973. — Vol. 38, N 5. — P. 1059—1062.
14. Jabaluinto A. N., Cardemil E. // *Lipids.* — 1980. — Vol. 15, N 3. — P. 196—199.
15. Katayama K., Fujita T. // *Chem. pharm. Bull.* — 1972. — Vol. 20, N 12. — P. 2585—2592.
16. Kelly M. J., Story J. A. // *Lipids.* — 1985. — Vol. 20, N 1. — P. 53—55.
17. McNamara D. J., Proia A., Edwards K. D. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1982. — Vol. 711, N 2. — P. 252—260.
18. Parson W., Rudney H. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.* — 1964. — Vol. 51, N 3. — P. 444—450.
19. Ramasarma T., Jayaraman J. // *Meth. Enzymol.* — 1971. — Vol. 18, Pt C. — P. 232—237.
20. Slaky L. L., Craig M. C., Beytia E. et al. // *J. Biol. Chem.* — 1972. — Vol. 247, N 10. — P. 3014—3022.
21. Sjövall J. // *Meth. biochem. Analys.* — 1964. — Vol. 12. — P. 97—141.
22. Yuzuriha T., Takada M., Katayama K. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1983. — Vol. 759, N 3. — P. 286—294.

Поступила 25.04.86

#### EFFECT OF CHOLESTEROL AND BILE ACIDS ON UBIQUINONE METABOLISM IN RAT TISSUES

V. V. Fedurov

Medical School, Kiev

Rate of degradation and half-life of ubiquinone were studied in tissues of rats, maintained on standard and artificial diet, which included either cholesterol or bile acids. Metabolism of ubiquinone was distinctly accelerated in liver, kidney tissues and skeletal muscles and was decreased in small intestine of the animals kept on the artificial cholesterol-free diet. After addition of 2 % cholesterol to the ration metabolism of ubiquinone was decreased in skeletal muscles and, especially, in liver tissue. When 0.2 % bile acids were included into the ration, metabolism of ubiquinone was decreased more than 13-fold in liver tissue, whereas in small intestine it was accelerated and approached the values corresponding to those of control animals.

## ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ НИТРОЗОДИМЕТИЛАМИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ СЕТИ ПЕЧЕНИ КРЫС

НИИ общей и коммунальной гигиены АМН СССР, Москва

Биологическое действие нитрозодиметиламина (НДМА), относящегося к классу канцерогенных N-нитрозосоединений, тесно связано с метаболической активацией этого соединения микросомальными оксигеназами, в каталитические центры которых входят цитохромы P-450 [25]. Метаболизм и обезвреживание ксенобиотиков, в том числе и НДМА, в организме животных имеют две фазы [12]. В первой фазе происходит перестройка в молекуле канцерогена, в результате которой образуются электрофильные продукты. Во второй фазе образующиеся метаболиты, точнее, некоторая часть из них, вступают в реакцию конъюгации либо с глюкуроновой, либо с серной кислотой, либо с глицином и выводятся из организма [5]. Неконъюгированные метаболиты благодаря своей повышенной реакционной способности по сравнению с исходной молекулой канцерогена взаимодействуют с нуклеофильными центрами различных макромолекул клетки (белки, фосфолипиды, ДНК, РНК, олигосахариды) [9, 27]. Именно метаболиты НДМА отводят главную роль в цитотоксическом и канцерогенном действии его на ткани различных органов [21, 26]. В первую очередь активные метаболиты НДМА воздействуют на ферментные системы и мембраны эндоплазматической сети клетки, в которой протекает метаболизм канцерогена. В некоторых экспериментальных работах выявлено снижение содержания белка и цитохрома P-450, скорости НАДФ·Н-зависимого деметилирования, нарушения структурной целостности мембран микросом печени крыс через 24 и 48 ч после однократного введения 30–50 мг/кг НДМА [14, 19]. В реальных условиях человеку приходится контактировать с низкими концентрациями канцерогена [22].

Цель настоящей работы — изучение функционального состояния фер-

ментных систем эндоплазматической сети печени крыс в зависимости от длительности воздействия низких концентраций НДМА.

### Методика

Эксперименты проведены на неинбредных крысах-самцах с начальной массой 150–170 г, которые получали постоянно с питьевой водой НДМА в концентрациях 0,1; 1,0 и 10,0 мг/л в течение 2, 5, 10 мес. Опыты выполнены на 12 группах животных, в том числе 3 контрольных (в каждой группе по 6–10 животных). Животных забивали декапитацией через 2, 5 и 10 мес воздействия канцерогена.

В гомогенатах печени определяли активность УДФ-глюкуронилтрансферазы — УДФ-ГТ (КФ 2.4.1.17) [10], глюкозо-6-фосфатазы (КФ 3.1.3.9) [17], β-глюкуронидазы (КФ 3.2.1.31) [18], ацетилэстеразы (КФ 3.1.1.6) [16], инозин-5-дифосфатазы (КФ 3.1.3) [17]. Гомогенаты печени готовили на 0,25 М растворе сахарозы (рН 7,4) в соотношении 1:10 (масса:объем). При определении активности ферментов использовали неионный детергент тритон X-100 (конечная концентрация 0,1%). Выделение фракции микросом и определение содержания цитохромов P-450 и b<sub>5</sub> проводили по методу [8]. Белок определяли по [23]. Статистическую обработку полученных экспериментальных данных проводили по [3, 11].

### Результаты и обсуждение

Как видно из табл. 1, содержание цитохромов P-450 и b<sub>5</sub> колеблется в печени подопытных крыс, получавших НДМА в различных концентрациях. Наибольшая индукция, т. е. увеличение содержания цитохромов P-450 и b<sub>5</sub> (на 50–60%), отмечена через 2 мес воздействия канцерогена в концентрациях 0,1 и 1,0 мг/л. Небольшое, но достоверное увеличение содержания цитохрома P-450 (18%) и цитохрома b<sub>5</sub> (28%) наблюдалось под влиянием НДМА в концентрации 1,0 мг/л через 10 мес и в концентрации 10,0 мг/л через 2 мес воздействия, соответственно. Снижение уровня цитохрома P-450 в микросомах печени подопытных крыс установлено через 5 мес воздействия НДМА в концентрациях 1,0 и 10,0 мг/л на 22 и 34% соответственно.

Т а б л и ц а 1

Содержание цитохромов Р-450 и  $b_5$  и активность УДФ-ГТ в печени крыс при постоянном воздействии различных концентраций НДМА ( $M \pm m$ )

Длительность воздействия, мес	Концентрация НДМА, мг/л	Содержание цитохромов, нмоль/мг белка		Активность УДФ-ГТ (мкмоль/мин/г ткани)
		Р-450	$b_5$	
2	Контроль	0,83±0,10	0,61±0,03	2,78±0,23
	0,1	1,31±0,06*	0,98±0,11*	2,44±0,48
	1,0	1,33±0,11*	0,92±0,10*	2,40±0,48
	10,0	0,75±0,09	0,78±0,06*	2,21±0,12*
5	Контроль	0,95±0,07	0,60±0,03	5,31±0,15
	0,1	0,92±0,07	0,73±0,02	4,53±0,18*
	1,0	0,74±0,05*	0,53±0,03	3,57±0,18*
	10,0	0,62±0,05*	0,54±0,06	2,90±0,12*
10	Контроль	0,79±0,10	0,57±0,05	3,05±0,12
	0,1	0,77±0,03	0,52±0,03	2,25±0,12
	1,0	0,97±0,10*	0,62±0,07	1,92±0,03*
	10,0	0,72±0,03	0,50±0,01	1,63±0,09*

\* Здесь и в табл. 2 —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

Быстрая индуцируемость монооксигеназных систем микросом при действии различных ксенобиотиков отмечена многими авторами [1, 5, 13]. Однако обращает на себя внимание тот факт, что индукция этой системы наблюдается при введении больших концентраций или доз чужеродных соединений. Даже классический индуктор монооксигеназных систем фенобарбитал вызывает увеличение содержания цитохрома Р-450 и активирует другие ферментные системы микросом печени крыс при введении суммарной дозы 240 мг/кг (троекратное введение по 80 мг/кг через 24 ч) и не дает такого эффекта при введении в суммарной дозе 6 мг/кг через 24 ч после последнего введения [7]. По-видимому, при массивном поступлении ксенобиотика быстрее достигается максимальное насыщение активных центров монооксигеназных систем, и метаболизм чужеродных соединений протекает с большей скоростью; при введении в организм низких концентраций ксенобиотика он окисляется с небольшой скоростью, т. е. «медленно горит» [1].

В нашем эксперименте индукция монооксигеназных систем, оцениваемая по содержанию цитохромов Р-450 и  $b_5$ , наблюдалась при относительно низких концентрациях НДМА (0,1 и 1,0 мг/л) через 2 мес воздействия (см. табл. 1). Это явление можно объяснить, если предположить, что вследствие высокой константы сродства ( $K_m$ ) НДМА к окислительным ферментам микросом и относительно низ-

кой константы ( $k_3$ ) диссоциации фермент-субстратного комплекса на свободный фермент и продукт [1] часть НДМА медленно окисляется данными ферментными системами, а часть постепенно накапливается в гидрофобном слое мембран микросом. Кумуляция канцерогена до определенной концентрации, вероятно, вызывает индукцию монооксигеназной системы. Индуцированная система ускоряет как метаболизм НДМА, так и перекисное окисление высших жирных кислот фосфолипидов, которые являются эндогенными субстратами этой системы [1, 13]. Индукция гасится, по-видимому, за счет разрушения цитохромов Р-450 и  $b_5$  как продуктами перекисного окисления, так и активными метаболитами НДМА, большинство из которых являются алкилирующими соединениями [26]. В свою очередь, процессы разрушения монооксигеназных систем тормозятся антиоксидантными системами клетки, чутко реагирующими на повышенный уровень перекисей [15].

Можно думать, что все описанные процессы разрушения и восстановления в микросомальной мембране после вспышки активности монооксигеназных систем протекают с различной скоростью, которая зависит от концентрации вводимого канцерогена. Так, через 5 и 10 мес воздействия НДМА в концентрации 0,1 мг/л содержание цитохромов Р-450 и  $b_5$  соответствует контрольному уровню, а при увеличении концентрации канцерогена

на в 10 раз (1,0 мг/л) индукция сменяется снижением содержания цитохрома Р-450 (5 мес) и вновь небольшой индукцией (10 мес).

Скорость окисления НДМА в концентрации 10 мг/л в первые месяцы постоянного воздействия (2 мес) протекает быстрее, чем окисление при концентрации 0,1 и 1,0 мг/л. Индукция монооксигеназной системы прошла в более ранние сроки (см. табл. 1). Большой выброс активных продуктов канцерогена и активация перекисного окисления, по-видимому, усилили степень деградации цитохрома Р-450 (через 5 мес его содержание снизилось на 34 %) и тем самым уменьшили скорость метаболизма НДМА. Временное снижение ниже контрольного уровня скорости окисления НДМА в данной концентрации позволяет клеткам печени восстановить уровень цитохрома Р-450 к 10 мес до нижней границы контрольных величин. Следовательно, скорость метаболизма НДМА связана с величиной вводимой концентрации и в зависимости от длительности воздействия изменяется циклически. Циклические изменения уровней цитохромов Р-450 и  $b_5$  в зависимости от интенсивности и длительности воздействия НДМА, вероятно, отражают не только скорость метаболизма канцерогена, но и равновесие между процессами повреждения и восстановления монооксигеназных систем.

Наиболее важным и самым распространенным механизмом детоксикации активных продуктов эндогенного и экзогенного происхождения у млекопитающих считается процесс конъюгации этих метаболитов с глюкуроновой кислотой, катализируемый УДФ-ГТ, расположенной в фосфолипидном слое внутренней мембраны микросом [5, 12]. Глюкуронированные метаболиты выводятся либо с желчью, либо с мочой [24].

В отличие от изменений монооксигеназной системы окисления активность УДФ-ГТ в зависимости от интенсивности и длительности воздействия НДМА изменялась однонаправленно — в сторону ее снижения. Степень снижения активности фермента повышалась с увеличением интенсивности и длительности воздействия. Так, степень снижения активности УДФ-ГТ была наименьшей при дейст-

вии НДМА в концентрации 0,1 мг/л: на 14 % через 5 мес, на 26 % через 10 мес (см. табл. 1), а под влиянием концентрации 1,0 мг/л активность фермента уменьшалась на 32—37 % (через 5 и 10 мес). НДМА в наибольшей из исследуемых концентраций (10,0 мг/л) уже через 2 мес воздействия снижал активность УДФ-ГТ на 20 %, увеличение срока воздействия до 5—10 мес приводило к дальнейшему снижению активности на 45 %.

Баланс между первой и второй фазами катаболизма ксенобиотиков имеет решающее значение в аккумуляции токсических продуктов метаболизма чужеродного соединения [20]. Стойкое и прогрессирующее снижение активности УДФ-ГТ, выявленное при длительном и постоянном воздействии различных концентраций НДМА, сдвигает баланс между этими фазами в сторону накопления активных метаболитов изучаемого канцерогена в клетках печени. Сопоставляя полученные данные по различным концентрациям НДМА, можно предположить, что при введении наименьшей из исследуемых концентраций (0,1 мг/л) незначительное снижение активности фермента, ответственного за выведение метаболитов канцерогена, и сохранение активности окислительных систем на уровне контрольных величин дают возможность клеткам печени активно метаболизировать канцероген и активно выводить продукты его метаболизма из органа, обеспечивая тем самым меньшую степень поражения других ферментных систем микросом по сравнению с большими концентрациями НДМА (табл. 2). При постоянном действии НДМА в концентрациях 1,0 и 10 мг/л в клетках печени подопытных крыс скорость окисления канцерогена преобладает над скоростью выведения его активных продуктов, что приводит к увеличению содержания активных метаболитов в клетках печени.

Прогрессирующее накопление активных метаболитов НДМА с увеличением интенсивности и длительности воздействия канцерогена обуславливает и прогрессирующее увеличение неблагоприятных изменений в микросомах печени крыс. Наименьшие изменения активности ферментных систем микросом, не относящихся к системам детоксикации, наблюдались

Активность ферментов в печени крыс (мкмоль/мин/г ткани) при постоянном воздействии различных концентраций НДМА ( $M \pm m$ )

Длительность воздействия, мес	Концентрация НДМА, мг/л	Активность ферментов, мкмоль/мин/г ткани			
		$\beta$ -глюкуронидазы	глюкозо-6-фосфатазы	ацетилэстеразы	инозин-5-дифосфатазы
2	Контроль	0,98 $\pm$ 0,04	8,00 $\pm$ 0,58	111,1 $\pm$ 7,2	27,7 $\pm$ 1,70
	0,1	0,57 $\pm$ 0,05*	6,80 $\pm$ 0,11	98,5 $\pm$ 7,2	25,5 $\pm$ 1,90
	1,0	0,85 $\pm$ 0,10	7,60 $\pm$ 0,64	103,2 $\pm$ 5,0	23,0 $\pm$ 2,30
	10,0	1,06 $\pm$ 0,04	7,30 $\pm$ 0,13	121,3 $\pm$ 11,4	28,3 $\pm$ 6,10
5	Контроль	0,98 $\pm$ 0,04	13,50 $\pm$ 0,30	168,5 $\pm$ 5,0	31,4 $\pm$ 1,80
	0,1	0,59 $\pm$ 0,04*	10,30 $\pm$ 0,42*	119,7 $\pm$ 5,0*	29,3 $\pm$ 1,20
	1,0	1,25 $\pm$ 0,10*	8,60 $\pm$ 0,44*	107,5 $\pm$ 7,8*	32,9 $\pm$ 1,80
	10,0	1,65 $\pm$ 0,10*	4,60 $\pm$ 0,22*	130,5 $\pm$ 13,4*	34,4 $\pm$ 2,10
10	Контроль	1,17 $\pm$ 0,02	13,50 $\pm$ 0,14	241,3 $\pm$ 17,0	36,8 $\pm$ 2,40
	0,1	0,50 $\pm$ 0,04*	6,50 $\pm$ 0,50*	221,8 $\pm$ 17,1	32,7 $\pm$ 1,90
	1,0	0,37 $\pm$ 0,01*	6,80 $\pm$ 0,12*	176,1 $\pm$ 2,9*	23,6 $\pm$ 0,90*
	10,0	0,31 $\pm$ 0,01*	5,60 $\pm$ 0,25*	114,0 $\pm$ 3,3*	19,1 $\pm$ 0,35*

под влиянием НДМА в концентрации 0,1 мг/л: стойкое снижение активности  $\beta$ -глюкуронидазы и глюкозо-6-фосфатазы, начиная с 5-го месяца исследования (см. табл. 2). При 5-месячном сроке исследования отмечено снижение активности ацетилэстеразы на 29 %, однако к 10-му месяцу активность этого фермента восстанавливается до контрольного уровня. Для НДМА в концентрациях 1,0 и 10,0 мг/л установлено стойкое снижение активности глюкозо-6-фосфатазы, ацетилэстеразы (через 5, 10 мес); цикличность изменений активности  $\beta$ -глюкуронидазы (повышение активности через 5 мес; снижение — через 10 мес). При этом степень повышения и снижения активности была более выражена при воздействии НДМА в концентрации 10 мг/л. Через 10 мес воздействия канцерогена в концентрации 1,0 мг/л впервые отмечено снижение на 35 % активности инозин-5-дифосфатазы — фермента, расположенного на внутренней поверхности микросомального пузырька [1]. Еще большее снижение активности (на 47 %) наблюдалось при действии НДМА в концентрации 10 мг/л также только через 10 мес.

Таким образом, в нашем эксперименте отмечалось в первую очередь изменение активности ферментов, расположенных в фосфолипидном слое внутренней мембраны микросом (цитохромы P-450, b<sub>5</sub>, УДФ-ГТ, глюкозо-6-фосфатаза), что косвенно свидетельствует о влиянии продуктов НДМА на фосфолипидный компонент мем-

бран микросом, так как одним из необходимых условий нормального функционирования этих ферментов является структурная целостность липидов и нативность фосфолипидного окружения [2, 4, 6]. Затем к этим изменениям добавляются изменения активности ферментов, расположенных на внешней мембране микросом (снижение активности ацетилэстеразы через 5, 10 мес — 1,0 и 10 мг/л). В конечном итоге в последний срок исследования (10 мес) процесс разрушения микросомального пузырька усугубляется повреждением его внутренней мембраны (снижение активности инозин-5-дифосфатазы — 1,0 и 10 мг/л).

Следовательно, степень поражения функционального состояния ферментных систем микросом в зависимости от интенсивности и длительности воздействия НДМА зависит от содержания активных метаболитов канцерогена в клетках печени.

Уровень активных метаболитов НДМА в клетках печени определяется соотношением скоростей окисления канцерогена в монооксигеназной системе и процессов выведения окисленных активных продуктов.

Скорость метаболизма НДМА зависит от величины концентраций, вводимых в организм подопытных крыс.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. — М., 1975.
2. Арчаков А. И. Оксигеназы биологических мембран. — М., 1983.
3. Бирюкова Р. И. // Гиг. и сан. — 1962. — № 7. — С. 43—46.

4. Бурлакова Е. Б., Джеллябова М. М. и др. // Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. — М., 1982. — С. 113—140.
5. Головенко Н. Я., Карасева Т. Л. Сравнительная биохимия чужеродных соединений. — Киев, 1983.
6. Дятловицкая Э. В., Леменовская А. Ф., Бергельсон Л. Д. // Биохимия. — 1979. — Т. 44, № 3. — С. 498—503.
7. Журков В. С., Меркурьева Р. В. и др. // Бюл. exper. биол. — 1983. — № 4. — С. 77—79.
8. Карузина И. И., Арчаков А. И. // Современные методы в биохимии. — М., 1977. — С. 49—62.
9. Кобляков В. А., Карамышева А. Ф., Озрина Р. Д., Ягузгинский Л. С. // Биохимия. — 1976. — Т. 41, № 8. — С. 1497—1502.
10. Кокировцева М. Г., Якушко В. Е., Кузьминская У. А. // Лаб. дело. — 1977. — № 3. — С. 179—181.
11. Лакин Г. Ф. Биометрия. — М., 1980.
12. Лакин К. М., Крылов Ю. Ф. Биотрансформация лекарственных веществ. — М., 1981.
13. Лукьянова Л. Д., Белмухинов Б. С., Уголев А. Т. Кислородзависимые процессы в клетке и ее функциональное состояние. — М., 1982.
14. Меркурьева Р. В., Бурмантова Н. П. и др. // Канцерогенные N-нитрозосоединения — действие, образование, определение. — Таллин, 1978. — С. 103—105.
15. Пальмина Н. П., Бурлакова Е. Б. // Вести. АМН СССР. — 1985. — № 1. — С. 85—91.
16. Покровский А. А., Арчаков А. И. // Докл. АН СССР. — 1965. — Т. 160. — С. 1203—1205.
17. Покровский А. А., Арчаков А. И., Бурмантова Н. П. // Цитология. — 1968. — Т. 10, № 11. — С. 1473—1478.
18. Покровский А. А., Кравченко Л. В., Тутельян В. А. // Биохимия. — 1971. — Т. 36, № 4. — С. 690—696.
19. Тутельян В. А., Лашинева Н. В. // Фармакол. и токсикол. — 1983. — № 2. — С. 111—115.
20. Vock K. W., Vock-Henning B. S. et al. // Biological Reactive Intermediates II. — New York, 1982. — P. 53—73.
21. Doolittle D. J., Goodman J. J. // Environm. Hlth Perspect. — 1984. — Vol. 57. — P. 327—333.
22. Fine D., Rounbeheler D. P., Belcher N. M., Epstein S. S. // IARC Sci. Publ. — 1976. — N 14. — P. 401—408.
23. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
24. Malern H., Malern S., Schezing Ch., Gerok W. // FEBS Lett. — 1980. — Vol. 118. — P. 251—254.
25. Michejada C. J., Koepks S. R., Kupper R. A. // IARC Sci. Publ. — 1980. — N 31. — P. 155—165.
26. Prodi G., Grilli S., Bertoluzzi A. // Centre National de la Recherche Scientifique. Colloques internationalix. — Paris, 1979. — P. 57—69.
27. Shaw Ch. R. // Cancer Bull. — 1980. — Vol. 32. — P. 147—149.

Поступила 06.05.86

EFFECT OF NITROSODIMETHYLAMINE AT LOW CONCENTRATIONS ON THE FUNCTIONAL STATE OF ENZYMATIC SYSTEMS IN RAT LIVER ENDOPLASMIC RETICULUM

N. N. Litvinov, S. I. Dolinskaya, L. F. Astakhova, N. P. Burmantova

Institute of General and Communal Hygiene, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Functional state of enzymatic systems in rat liver endoplasmic reticulum was studied. Content of cytochromes P-450 and b<sub>5</sub> as well as activities of UDP-glucuronyl transferase, glucose-6-phosphatase, β-glucuronidase, acetylsterase, inosine-5-diphosphatase were evaluated after permanent administration of nitrosodimethylamine within 2, 5 and 10 months at concentrations of 0.1, 1.0 and 10.0 mg/l. Content of the cancerogene active metabolites in liver cells was shown to be responsible for impairment of the functional state of microsomal enzymatic systems and was also related to intensity and duration of the nitrosodimethylamine effect. The level of these cancerogene metabolites in liver cells depended on rates of the cancerogene oxidation in the monooxygenase system and elimination of active products. At the same time, the rate of nitrosodimethylamine metabolism correlated with the doses of the substance administered into rats.

Э. А. Бауманис, И. А. Бирска, Г. О. Рейхман, И. Э. Кируле,  
В. И. Шведов, В. З. Горкин

## О МЕХАНИЗМЕ КАЧЕСТВЕННОЙ МОДИФИКАЦИИ ПИРАЗИДОЛОМ АКТИВНОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ МОНОАМИНОКСИДАЗЫ

Институт органического синтеза АН Латвийской ССР, Рига; Всесоюзный научно-исследовательский химико-фармацевтический институт им. С. Орджоникидзе, Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Активация окислительного дезаминации диаминов в тканях — один из перспективных, но мало изученных путей целенаправленного воздействия на обмен функционально важных субстратов данного типа в организме. Можно предположить, что изыскание синтетических активаторов ди- и полиаминоксидаз будет способствовать поиску препаратов не только с потенциальной психофармакологической значимостью, но также иммуномодуляторов и антиканцерогенных средств с новым биохимическим механизмом действия. На это указывает наличие прямой взаимосвязи между скоростью пролиферативного роста и содержанием биогенных ди- и полиаминов в клетках [8, 26, 29, 32].

В исследованиях, проведенных ранее [2], были получены указания на возможность стимулирующего влияния некоторых (хиноклидил-3)-диарилкарбинолов на дезаминацию гистамина диаминоксидазой (ДАО) легких [2]. Обнаружено свойство производных алкилгидразина и отдельных аралкиламинов наряду с ингибированием моноаминоксидаз (МАО) индуцировать в митохондриях ранее не присущую им каталитическую активность, обеспечивающую окисление гистамина и других азотистых соединений [3, 11, 20, 21]. Высказано предположение о возможной связи данного феномена с образованием из ингибирующих МАО веществ на этапе возникновения первичного комплекса с ферментом азометинсодержащего метаболита [1, 20], участвующего в последующем мягком окислении тиоловых групп МАО до обуславливающих ДАО-подобную активностью сульфеновых групп (SOH) [7, 22, 24]. На примере производных алкилгидразина была показана и роль опосредованного проявления этими соединениями окислительного влияния на тиолы —

путем стимуляции при торможении МАО перекисного окисления липидов митохондриальных мембран [5, 9].

В настоящей работе обсуждается значение в модификации каталитической активности митохондриальной МАО некоторых структурных и биохимических особенностей производных пирозидола [6, 13], синтезированных во Всесоюзном научно-исследовательском химико-фармацевтическом институте (ВНИХФИ) им. С. Орджоникидзе под руководством В. И. Шведова [14, 17]. Помимо сравнительного изучения способности модифицировать каталитическое действие МАО пирозидолом (8-метил-2,3,3а,4,5,6-гексагидро-1Н-пирозидо[3,2,1-j,k] карбазола гидрохлорид, I), его 3,3а-дегидропроизводным (8-метил-2,4,5,6-тетрагидро-1Н-пирозидо[3,2,1-j,k] карбазола гидрохлорид, II) и отдельными гомологами I мы исследовали возможность образования в этих же условиях из пирозидола, способного к электро-



ноакцепторным реакциям, его метаболита, а также возможность непосредственного участия подобных структур (без проявления промежуточного проокислительного влияния на липиды) в индуцировании диаминодезаминазной активности митохондрий.

### Методика

Изменения аминоксидазной активности исследовали при помощи изотермической дистилляции аммиака, освобождаемого при дезаминации серотонина и гистамина [10]. Электронные спектры поглощения и результаты полярографических исследований были использованы для сравнительной оценки основ-

ных структурных изменений, сопровождающих взаимодействие соединений I и II с МАО. Влияние соединений на перекисное окисление липидов исследовались в условиях метилолеатной окислительной модели [4], по накоплению в тканях реагирующего с тиобарбитуровой кислотой малонового диальдегида [12], а также методом УФ-спектрофотометрии по степени свертывания суспензии митохондрий в связи с возможными изменениями их механических свойств [27, 28].

Митохондриальные фракции выделяли дифференциальным центрифугированием гомогенатов мозга мышц-самцов линии ВА1.В/с (средняя масса 20 г) в растворе 0,01 М фосфатного буфера рН 7,4 [31]. Содержание белка в суспензиях митохондрий определяли спектрофотометрически биуретовым методом [25]. Содержание митохондриального белка в пробе составляло 4 мг, продолжительность инкубации суспензии митохондрий с исследуемым агентом при 37 °С — 15 мин, продолжительность инкубации данной системы с серотонином (в виде креатининсульфата, 1 мМ) — 30 мин, с гистамином (в виде дигидрохлорида, 10 мМ) — 45 мин. После окончания инкубации в пробы добавляли 50 % раствор трихлоруксусной кислоты, осадок отделяли центрифугированием. В надосадочной жидкости после изотермической отгонки по Конвею и неселеризации аммиак определяли спектрофотометрически.

Электронные спектры поглощения были сняты на спектрофотометре «Hitachi-577» (Япония), полярограммы — на саморегистрирующем электронном полярографе ОН-102 («Radelix», Венгрия) с ртутным капельным электродом ( $t=1,77$  с,  $m=1,062$  г/с); электродом сравнения служил насыщенный каломельный электрод. Исследуемые в среде 0,01 М фосфатного буфера рН 7,4, варианты проб: I — пиразидол, II — пиразидол + суспензия митохондрий, III — 3,3а-дегидропроизводное пиразидола, IV — 3,3а-дегидропроизводное пиразидола + суспензия митохондрий. Концентрации соединений при спектрофотометрических исследованиях представлены в подписях под рис. 1, применяемые для снятия полярограмм — 1 мМ. Содержание белка митохондрий мозга мышей — 4 мг/мл (пробы II и IV). Перед снятием спектров и полярограмм пробы II и IV термостатировали при 37 °С в течение 15 мин. При полярографическом исследовании [16] помимо этого проводили предварительное дезаэрирование проб очищенным аргоном.

Для исследования воздействия на окисление метилолеата соединения вводили в систему в виде оснований и 4 % раствора в этаноле. Метилолеат окисляли в окислительных ячейках с припаянным капилляром продуванием при 50 °С очищенного от пыли воздуха со скоростью 10—12 л/ч. Содержание перекисей определяли нодометрически в периодически отобранных пробах. Для оценки влияния на перекисидацию в опытах на животных соединения вводили внутрибрюшинно мышам-самцам в дозе 100 мг/кг; продолжительность опыта 6 ч. Определение образующегося в печени малонового диальдегида (МДА) проводили в отсутствие индуктора перекисидации  $CCl_4$ , предусматриваемого методикой [12]. Пробы для оценки степени набухания митохондрий в аскорбатзависимой системе перекисидации [27, 28] содержали 4 мг митохон-

дриального белка на 1 мл 0,15 М КСl — 0,025 М трис-НСl буфера рН 7,5; катализаторами перекисидации служили 1 мМ аскорбиновая кислота (0,05 мл) и добавленная через 2 мин смесь (0,02 мл), в состав которой входили 4 мМ АДФ и 0,175 мМ  $FeSO_4 \cdot X(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$ ; температура среды 20 °С. Эффект указанной добавки регистрировали спектрофотометрированием при 520 нм в течение 10 мин.

## Результаты и обсуждение

Результаты исследования влияния соединений на серотонин- и гистаминдеаминазную активность митохондрий мозга мышей (табл. 1) показали, что значительная эффективность торможения ферментативного окисления серотонина, установленная нами у 3,3а-дегидропроизводного пиразидола (II,  $pI_{50}$  4,65), сама по себе еще не обеспечивает индуцирование в данном объекте ранее не присущего ему свойства дезаминировать гистамин, что было обнаружено в подобных условиях с применением пиразидола (I). При воздействии на МАО митохондрий мозга мышей этим агентом (I), содержащим в молекуле в отличие от II незатронутое пиперазиновое кольцо, наблюдалась достоверная интенсификация окислительного распада гистамина (1,4 нмоль  $NH_3$  на 1 мг белка в 1 мин по сравнению с обнаружи-

Таблица 1  
Влияние пиразидола (I) и его 3,3а-дегидропроизводного (II) на дезаминирование серотонина (5-ОТ) и гистамина (Гис) митохондриями мозга мышей в опытах *in vitro*

Соединение	Концентрация, мМ	Скорость дезаминирования, нмоль $NH_3$ на 1 мг белка в 1 мин		
		5-ОТ	—Δ%	Гис
I	1	0,45	85	1,40
	0,1	0,75	75	1,00
	0,01	1,70	43	0,30
II	1	0,00	100	0,30
	0,1	1,08	64	0,30
	0,01	1,95	35	0,30
Контроль	—	3,00	—	0,30

Примечание. Концентрация митохондриального белка в пробе 4 мг; продолжительность преинкубации митохондрий с соединениями I и II — 15 мин; инкубация при 37 °С проводили с 5-ОТ (1 мМ) в течение 30 мин, с Гис (10 мМ) — 45 мин. Представлены средние арифметические величины по данным 8—12 параллельных определений. Величины средних ошибок средних арифметических не превышали 10 %.

ваемым в отсутствие модификации MAO 0,3 нмоль  $\text{NH}_3$  на 1 мг белка в 1 мин). Модификация каталитической активности MAO пиперазидом оказалась более выраженной (2,5 нмоль  $\text{NH}_3$  на 1 мг белка в 1 мин) при использовании в качестве источника фермента митохондрии из стволовой части мозга быка [3]. Поскольку гистамин не является природным субстратом MAO, а относится к числу субстратов, инактивирующихся ДАО, полученные нами результаты свидетельствуют о возможном индуцировании соединением I качественной модификации каталитической активности исследуемого митохондриального фермента. Помимо этого можно предположить, что именно особенность строения молекулы I обуславливает потенциальную способность ее образовывать на этапе возникновения первичного комплекса с MAO типа А (путем частичного дегидрирования пиперазинового кольца) ненасыщенный структурный фрагмент, участвующий в мягком окислении важных для ферментативного катализа тиолов до остатков сульфеновой кислоты. Склонность к проявлению биохимического действия, подобного I, наблюдалась также у аналога с более разветвленным алкильным заместителем в положении 8. Однако дальнейшее усложнение строения такого заместителя, хотя и обеспечивало соединению антисеротониндезаминазную активность (по-видимому, в связи с изменением конформационных свойств молекулы и повышением липофильности), привело к потере у производного пиперазиноидола способности модифицировать активность MAO. В целом обнаруженные факты подтверждают прежние наши наблюдения, касающиеся критериев возможности модификации каталитических свойств митохондриальной MAO отдельными аминными ее ингибиторами других химических рядов [3].

Данные об электронных спектрах поглощения свидетельствуют о том, что соединение II в условиях измерения имеет отчетливую полосу поглощения при 344 нм, обусловленную содержащейся в нем азометиновой группой (рис. 1). Торможение митохондриальной MAO этим соединением (IIм), судя по спектральным данным, не приводит к существенным измене-

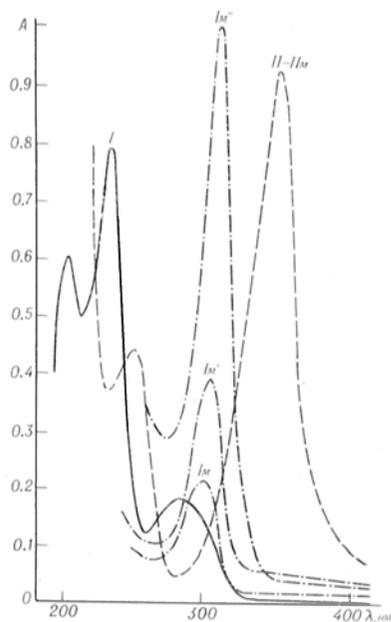


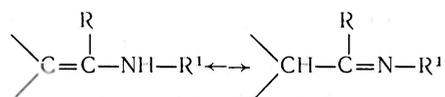
Рис. 1. Электронные спектры поглощения пиперазида (I), его 3-аза-дсгидропроизводного (II) и продуктов взаимодействия их с митохондриальным источником MAO (Im и IIм соответственно).

Концентрация соединений в растворе 0,01 М фосфатного буфера (рН 7,4): I, II, Im и IIм —  $5 \cdot 10^{-5}$  М, Im' —  $10^{-4}$  М, Im'' —  $10^{-3}$  М, содержание митохондриального белка на пробу Im и IIм — 4 мг; продолжительность инкубации соединений с суспензией митохондрии при 37°C 15 мин.

ниям в структуре, атакующей фермент молекулы (II). Учитывая сказанное и результаты биохимического исследования II, можно сделать вывод, что торможение MAO с переходом в новообразовавшийся комплекс (фермент... ингибитор) неизменной (содержащейся в положении 3—3а пиперазинового фрагмента) азометиновой связи не обеспечивает (по аналогии с гармином [3]) необходимого для модификации MAO окислительного превращения.

В отличие от соединения II пиперазидол (I), имея слабо выраженный максимум при 280 нм, практически не поглощает при 300 нм и выше. Длинноволновый сдвиг этого максимума, наблюдаемый в электронном спектре поглощения в присутствии митохондриальной MAO (Im), свидетельствует об образовании в продукте взаимодействия (MAO... ингибитор)  $\pi$ -электронной системы [18] и, следовательно, новой ненасыщенной связи, отличающейся, однако, от азометина в положении 3—3а, свойственного как соединению II, так и комплексу IIм. Об-

разование ненасыщенной связи подтверждается усилением упомянутого длинноволнового сдвига по мере повышения в пробе концентрации I — источника продуцирования на начальном этапе блокирования МАО способных к электроноакцепторному действию структур. Хотя и электронные спектры поглощения на первый взгляд не дали окончательного ответа на вопрос о характере и расположении ненасыщенной связи, образовавшейся при торможении МАО пиразидолом, появление азометина при дегидрировании пиперазинового фрагмента молекулы I является, однако, более вероятным, чем образование при подобных же условиях двойной связи C=C. В основе данного предположения лежит общая закономерность, согласно которой энамины, содержащие вторичный атом азота



существуют в основном в виде таутомерной иминоформы [23, 30]. Чтобы подтвердить применимость в данном случае вытекающего из теории вывода, мы обратились к полярографическому исследованию наших систем.

Сравнительное полярографическое изучение изменений окислительно-восстановительных свойств, атакующих митохондриальную МАО молекул пиразидола и его 3,3а-дегидропроизводного, подтверждало уже создавшееся представление об отличиях в механизме блокирования фермента этими ингибиторами. Показано, что соединение II и продукт взаимодействия его с митохондриями (IIм) характеризуются одинаковыми значениями потенциала полуволны  $E_{1/2}$  (—1,40 В). Это позволяет сделать заключение, что торможение МАО 3,3а-дегидропроизводным пиразидола (IIм) не сопровождается существенным изменением фрагмента, ответственного за проявление соединением окислительно-восстановительной активности.

Принципиально различные результаты были получены при изучении действия пиразидола на МАО митохондрий (Im). Если для раствора данного вещества (I) значение  $E_{1/2}$  составляло — 1,10 В, то в присутствии митохондрий (Im) имели место 2 полярографические волны со значения-

ми  $E_{1/2}$  —1,08 и —1,32 В. Можно считать, что первое из этих значений соответствует неиспользованной при торможении МАО доли соединения I, причем обнаруженное незначительное отклонение величины  $E_{1/2}$  вызвано примесью в пробе биологического материала. Источником другой полярографической волны, очевидно, является образующийся при торможении фермента метаболит, значение  $E_{1/2}$  у которого —1,32 В несколько превышает установленное для соединения II, содержащего в молекуле азометиновую связь в положении 3—3а. Учитывая тот факт, что анализ смеси растворов I и II (отношение концентрации 20 : 1) дал величины  $E_{1/2}$  соответственно —1,04 и —1,40 В, можно заключить, что появление второй волны в полярограмме приведенной выше системы Im является результатом образования при торможении МАО ненасыщенной структуры, близкой, но не идентичной содержащейся в 3,3а-дегидропиразидоле (II).

Таким образом, полярографические данные подтверждают возможность возникновения в исследуемом биохимическом процессе азометинсодержащего метаболита пиразидола, хотя и формально не уточняют расположение данной связи в пиперазиновом фрагменте.

Поскольку спектральные данные, по-видимому, исключают возникновение при метаболизации пиразидола производного с двойной связью в положении 3—3а (соединение II), была изучена возможность образования азометинпроизводных других типов, ненасыщенные связи в которых расположены между атомами 1—10б и 2—3 соответственно. При первом из таких вариантов (ониевое производное) за счет значительного эффекта конъюгации следовало ожидать на электронных спектрах поглощения bathochromного смещения [18] по отношению к максимуму, свойственному соединению II, что полностью противоречило бы обнаруженному в эксперименте гипсохромному эффекту. Именно поэтому, как свидетельствуют спектральные данные, более вероятным при торможении МАО пиразидолом является образование первичного комплекса, содержащего изомер соединения II с азометиновой связью между атомами 2 и 3 (8-метил-

Таблица 2  
Влияние пиразидола (I) и его 3,3а-дегидро-производного (II) на окисление метилолеата

Соединение	Концентрация, мМ	$\tau_0$ , ч	$\tau$ , ч	АОА
I	3	3,4	50,0	14,7
	0,3	4,1	4,1	1,0
	0,03	3,6	3,6	1,0
II	3	3,4	39,0	11,5
	0,3	4,1	4,5	1,1
	0,03	3,6	3,6	1,0

Примечание.  $\tau_0$  и  $\tau$  — периоды индукции, АОА — антиокислительная активность.

3а,4,5,6-тетрагидро-1Н-пиразино[3,2,1-j,k]карбазол). Принято считать [15], что электроноакцепторная способность подобных систем с нарушенным сопряжением двойных связей обычно ниже, чем в структурно близких им конъюгированных системах. Однако приведенные выше сведения лишь формально не согласуются с полученными нами полярографическими данными, свидетельствующими о том, что окислительные свойства, присущие комплексу Im, даже несколько выше, чем было установлено в случае IIм (значения величин  $E_{1/2}$  —1,32 и —1,40 В соответственно), и применимы для интерпретации наших биохимических наблюдений. Можно предположить, что окисляемость тиоловых групп MAO митохондриальных мембран до остатков сульфеновых кислот обусловлена не только общей электроноакцепторной способностью окислителя как элементарной структуры, но и специфическими стерическими факторами, определяющими вид взаимодействия производного пиразиноиндола с активной поверхностью MAO и следовательно, устойчивость и характер проявляемого соединением или его метаболитом (непосредственно

или опосредованно) электроноакцепторного действия во времени.

Результаты исследования влияния производных пиразиноиндола на перекисидацию липидов в отличие от установленного ранее у гидразинпроизводных [1, 11, 14] не подтвердили возможности опосредованного («через липиды») окислительного действия изучаемых веществ. Показано, что у пиразиноиндолов в условиях метилолеатной окислительной модели отсутствуют проокислительные свойства (табл. 2). Более того, при проведенных испытаниях соединений по данной методике в отсутствие митохондрий [4] установлено, что I и II в высоких концентрациях проявляют значительную, неспецифическую (и свойственную аминам вообще) антиокислительную активность [19], исчезающую, однако, при снижении концентрации этих агентов в пробах на порядок. Варьирование у соединения I разветвленности алкильного заместителя в положении 8 существенно не влияет на соответствующие показатели эталонного вещества. Изучение влияния пиразидола (I) в дозе 100 мг/кг (внутрибрюшинно через 6 ч) на перекисидацию липидов в мозге мышей, определяемую по концентрации МДА, образующегося в гомогенате, не позволяло установить достоверных различий между результатами подопытной серии и контролем (0,892 и 0,763 ед. экстинкции МДА на 1 мг белка для контроля и опыта соответственно;  $p_{АОА} > 0,05$ ). Использование митохондрий мозга мышей в качестве тест-объекта в условиях модели аскорбатзависимой перекисидации не позволяло отметить регистрируемое спектрофотометрически набухание митохондрий. Отсутствие достоверных различий между результатами серий контрольной (0,09  $A_{520}/\text{мин}$ ) и животных, получивших соединения I или II

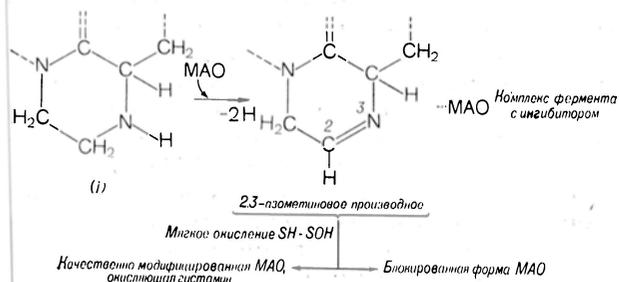


Рис. 2. Предполагаемая схема модификации активности MAO пиразидолом (I).

(0,10 A<sub>520</sub>/мин), отмечено и при использовании митохондрии печени мышей. В целом отсутствие проокислительных свойств у производных пирозидола и ближайших его аналогов, вызывающих, однако, качественную модификацию каталитической активности митохондриальной MAO, указывает на возможность непосредственного проявления азометинсодержащими их метаболитами специфического для данного биохимического феномена окислительного действия на тиолы (рис. 2).

При торможении активности митохондриальной MAO пирозидолом (I) и его 3,3а-дегидропроизводным (II) соединение II, очевидно, взаимодействует с ферментом, не претерпевая при этом существенных структурных изменений, в то время как соединение I при метаболизации образует не присутствующую ранее его молекуле π-электронную систему. Характер электронных спектров поглощения комплекса Im не свидетельствует о возможности образования азометинсодержащей связи в положении 3—3а, исключая также возможность образования данной связи в положении 1—10б. Одновременно подтверждается вероятность образования азометинсодержащей связи в положении 2—3.

По данным полярографических исследований, первичный комплекс, образующийся при взаимодействии пирозидола с митохондриальной MAO, несмотря на предполагаемое изолированное положение азометинсодержащей связи 2—3, обладает несколько повышенной окислительной способностью по сравнению с системой II, сохраняющей конъюгированное сочетание двойных связей, что, по-видимому, и способствует необходимому для изменения каталитических свойств MAO специфическому окислению тиолов.

Ввиду отсутствия у исследованных соединений выраженных проокислительных свойств вероятным механизмом проявления качественной модификации каталитической активности митохондриальной MAO пирозидолом следует считать прямое окисляющее тиолы действие азометинсодержащего его метаболита.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бауманис Э. А. // Изв. АН ЛатвССР. — 1981. — № 1. — С. 100—119.
2. Бауманис Э. А., Горкин В. З., Калнина И. Э. и др. // Фармакол. и токсикол. — 1980. — № 1. — С. 36—41.
3. Бауманис Э. А., Калнина И. Э., Иристе А. А., Горкин В. З. // Вопр. мед. химии. — 1981. — № 1. — С. 72—77.
4. Бурлакова Е. Б., Дзантиев В. Г., Зефирова А. К. и др. // Изв. Высш. учеб. зав. СССР; Химия и хим. технол. — 1960. — № 2. — С. 265—271.
5. Бурлакова Е. Б., Кайране Ч. Б., Молочкина Е. М., Хохлов А. П. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 1. — С. 66—72.
6. Вережкина И. В., Аснина В. В., Горкин В. З., Машковский М. Д. // Там же. — 1983. — № 5. — С. 118—123.
7. Горкин В. З. // Молекул. биол. — 1976. — № 4. — С. 717—736.
8. Залеток С. П., Бердинских Н. К., Драга Н. В. // Экспер. онкол. — 1984. — № 4. — С. 10—17.
9. Кайране Ч. Б., Бауманис Э. А., Бурлакова Е. Б. и др. // Вопр. мед. химии. — 1979. — № 6. — С. 776—781.
10. Калнина И. Э., Бауманис Э. А., Иристе А. А., Соминский В. Н. // Энзимология патологических процессов. — Рига, 1980. — С. 117—123.
11. Калнина И. Э., Бауманис Э. А., Кайране Ч. Б., Горкин В. З. // Вопр. мед. химии. — 1981. — № 6. — С. 773—779.
12. Майоре А. Я., Берман Э. С. // Гастроэнтерология. — Рига, 1972. — С. 162—165.
13. Машковский М. Д., Горкин В. З., Вережкина И. В. и др. // Бюл. экспер. биол. — 1981. — № 2. — С. 169—171.
14. Машковский М. Д., Гринев А. Н., Шведов В. И. и др. Лекарственное средство // А. с. 427713 СССР (1974).
15. Райд К. Курс физической органической химии: Пер. с англ. — М., 1972. — С. 279—284.
16. Рейхман Г. О., Страдынь Я. П. // Изв. АН ЛатвССР; сер. химия, № 1. — С. 23—33.
17. Шведов В. И., Алтухова Л. Б., Гринев А. Н. и др. Способ получения 1,10-триметил-8-метил-1,2,3,4-тетрагидропиразино-(1,2-а)индола (пирозидола) // А. с. 276061 СССР (1969).
18. Штерн Э., Тиммонс К. Электронная абсорбционная спектроскопия в органической химии: Пер. с англ. — М., 1974. — С. 92—139.
19. Эмануэль Н. М., Денисов Е. Т., Майзус Э. К. Ценные реакции окисления углеводов в жидкой фазе. — М., 1965. — С. 241—300.
20. Baumanis E. A., Kalnina I. E., Kaminka M. E. // Agents a. Actions. — 1981. — Vol. 11, N 617. — P. 146—153.
21. Baumanis E. A., Kalnina I. E., Moskvitina T. A., Gorkin V. Z. // Biochem. Pharmacol. — 1977. — Vol. 26, N 11. — P. 1059—1063.
22. Benitez L. B., Allison W. S. // J. biol. Chem. — 1975. — Vol. 249, N 19. — P. 6234—6243.
23. Enamine; Synthesis, Structure and Reactions / Ed. A. G. Fook. — New York, 1969. — P. 2: 254.

24. Gorkin V. Z. // Monoamine Oxidase and its Inhibition. — Amsterdam, 1976. — P. 61—81.
25. Gornall A. G., Bardawill C. J., David M. M. // J. biol. Chem. — 1949. — Vol. 177, N 2. — P. 751—766.
26. Henningsson A. Ch., Henningsson S., Nilsson O. // Advances in Polyamine Research/Ed. U. Bachrach. — New York, 1983. — Vol. 4. — P. 193—207.
27. Hunter F. E. Jr., Scott A., Hoffsten P. E. et al. // J. biol. Chem. — 1964. — Vol. 239, N 2. — P. 604—613.
28. Hochstein P., Ernster L. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1963. — Vol. 12, N 5. — P. 388—394.
29. Janne J., Alhonen-Hongisto L., Seppanen P. et al. // Polyamines: Basic and Clinical Aspects/Eds. Imahori et al. — 1985. — P. 263—275.
30. Opitz G., Hellmann H., Schubert H. W. // Lieb. Ann. Chem. — 1959. — Bd 623, N 1—3. — S. 117—124.
31. Schneider W. C., Högeboom G. H. // J. biol. Chem. — 1950. — Vol. 183, N 1. — P. 123—128.
32. Seiler N., Knodgen B., Bink G. et al. // Advances in Polyamine Research/Ed. U. Bachrach et al. — New York, 1983. — Vol. 4. — P. 135—154.

Поступила 19.05.86

#### ON THE MECHANISM OF QUALITATIVE MODIFICATION BY PYRAZIDOL OF MITOCHONDRIAL MONOAMINE OXIDASE ACTIVITY

E. A. Baumanis, I. A. Birska, G. O. Reikhtman, I. E. Kerule, V. I. Shvedov, V. Z. Gorkin

Institute of Organic Synthesis, Academy of Sciences of the Latvian SSR, Riga, S. Ordzhonikidze All-Union Chemico-Pharmaceutical Institute, Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Inhibitory effect of pyrazidol (I) on serotonin-deaminating activity in mice brain mitochondria, which was accompanied by induction in this source of monoamine oxidase (MAO) of a property to oxidize histamine, was distinct from the effect of 3,3a-dehydroderivative of pyrazidol (II), which did not induced the histamine deaminating activity. Analysis of electron absorption spectra and polarographic studies demonstrated that inhibition of MAO by pyrazidol resulted in dehydration of the piperazine ring in the molecule of the drug as well as in possible formation of azomethine bond at the 2-3 position, exhibiting high oxidizing activity. At the same time, marked alterations in the substance II structure were not found in the course of inhibition of serotonin-deaminating activity in mitochondria. As pyrazidol did not exhibit prooxidant activity, its azomethine group appears to have a direct oxidating activity, which was not mediated via lipid peroxides.

УДК 616.391-008.64:577.164.12]-092.9-07:[616.61+616.341]-008.93:577.161.22]-074

И. Н. Сергеев, Ким Рён Ха, Ю. П. Арханчев, В. М. Коденцова, И. А. Алексеева, А. А. Сокольников, О. А. Климова, В. Б. Спиричев

#### ОБМЕН 25-ОКСИВИТАМИНА D<sub>3</sub> В ПОЧКАХ И ЯДЕРНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ 1,25-ДИОКСИВИТАМИНА D<sub>3</sub> В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ТОНКОЙ КИШКИ У КРЫС ПРИ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ВИТАМИНА B<sub>2</sub>

Институт питания АМН СССР, Москва

В настоящее время представление о полиэтиологической природе рахита является общепризнанным [2, 3]. Большое число эпидемиологических и клинических наблюдений свидетельствует о том, что в развитии этого заболевания наряду с дефицитом витамина D существенное значение может иметь недостаточность ряда других нутриентов, в частности некоторых витаминов. В связи с этим возникает необходимость в изучении тонких механизмов, посредством которых тот или иной пищевой фактор может быть вовлечен в патогенез этого заболевания.

Новые данные об обмене и механизме действия витамина D, реализующего свои функции в виде образующих-

ся из него активных метаболитов [16, 17], позволяют объяснить эффект дефицита витамина B<sub>2</sub> возможным изменением активности флавопротеидсодержащих гидроксилаз, участвующих в образовании этих метаболитов.

Для проверки этого предположения в настоящей работе было изучено влияние различной обеспеченности крыс витамином B<sub>2</sub> на концентрацию в сыворотке крови основного циркулирующего метаболита витамина D — 25-оксивитамина D (25-ОНD), образующегося в печени при действии 25-гидроксилазы витамина D, а также на активность 1- и 24-гидроксилаз 25-ОНD<sub>3</sub> (1- и 2-ОНаз) в почках *in vitro*, продуцирующих активные мета-

болиты  $D_3$  — 1,25-диоксивитамин  $D_3$  ( $1,25(OH)_2D_3$ ), гормональная форма витамина  $D_3$  и 24,25-диоксивитамин  $D_3$  ( $24,25(OH)_2D_3$ , метаболит  $D_3$  с преимущественным действием на костную ткань). В связи с тем, что биологические функции  $1,25(OH)_2D_3$  реализуются через его взаимодействие со специфическим рецепторным белком, вероятно, *in vivo* имеющим ядерную локализацию [24], проведено отдельное количественное определение эндогенно (*in vivo*) занятых и незанятых ядерных рецепторов  $1,25(OH)_2D_3$  в слизистой оболочке тонкой кишки.

Для оценки функций активных метаболитов витамина D в условиях недостаточности витамина  $B_2$  были исследованы такие показатели, как концентрация кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови, транспорт кальция *in vitro* в тонкой кишке и активность зависимых от витамина D фосфатаз в мембранах щеточной каймы слизистой оболочки тонкой кишки.

### Методика

В опытах использовали крыс-самцов Вистар с исходной массой тела 50—60 г. Животные получали полусинтетический очищенный от витаминов D и  $B_2$  рацион, содержащий 0,6 % Са и 0,6 % Р [1]. Животные были разделены на 8 групп по 10—12 крыс в каждой. Животные 1-й группы были обеспечены витаминами D и  $B_2$  (+D+ $B_2$ ), 2-й — только витамином D (+D- $B_2$ ), 3-й — только витамином  $B_2$  (-D+ $B_2$ ), крысы 4-й группы не получали этих витаминов (-D- $B_2$ ). Животные 5-й группы (-D+ $B_2$ ) и VI (-D- $B_2$ ), а также аналогичных VII (-D+ $B_2$ ) и VIII (-D- $B_2$ ) групп получали витамин D за 24 ч или в течение последних 6 сут до забоя соответственно. Содержание рибофлавина («Sigma», США) в рационе составляло 5 мг/кг корма. Витамин  $D_3$  (холекальциферол, «Seriva», ФРГ) вводили перорально в 0,1 мл смеси этанол—пропиленгликоль (1:3) по 1,0 мкг (40 МЕ) через день, животным 7-й и 8-й групп — по 1,0 мкг каждый день. Продолжительность опыта составила 4 нед.

Метаболизм 25-оксивитамина  $D_3$  изучали *in vitro* с использованием срезов почек [4, 8]. После декаптации животного извлекали почки, промывали холодным 0,9 % раствором NaCl, удаляли капсулу и с помощью лезвия безопасной бритвы на пробке готовили срезы коры (во фронтальном плане) толщиной около 0,5 мм. Из каждой почки таким образом можно приготовить 3—4 среза общей массой 120—200 мг. Срезы от одной почки взвешивали и помещали в 1,0 мл инкубационной среды следующего состава (ммоль/л): NaCl 100,  $NaHCO_3$  25, KCl 3,5,  $KH_2PO_4$  1,2,  $CaCl_2$  2,5,  $MgSO_4$  1,2, Na ацетат 2,0, Na малат 2,0, глюкоза 10, HEPES 10, pH 7,4. В инкубационную среду в 50 мкл 95 % этанола добавляли раствор субстрата — 25-OHD $_3$  («The

Upjohn Co.», США), содержащий 0,02 мкКи 25-окси [26 (27) - метил- $^3H$ ] холекальциферола (удельная радиоактивность 20,6 Ки/ммоль, «The Radiochemical Centre, Amersham», Англия). Конечная концентрация 25-OHD $_3$  в пробе составляла 2,3 мкмоль/л. После добавления субстрата через раствор в течение 1 мин пропускали карбоген (96 %  $O_2$ , 4 %  $CO_2$ ), закрывали и инкубировали при встряхивании 60 мин. Реакцию останавливали добавлением 3,75 объема смеси хлороформ—метанол (1:2), гомогенизировали, добавляли 1,25 объема хлороформа и по 1000 нг  $1,25(OH)_2D_3$  и  $24,25(OH)_2D_3$  в этаноле (для определения выхода этих метаболитов  $D_3$ ). Метаболиты  $D_3$  экстрагировали, как описано ранее [6]. Разделение 25-OHD $_3$ ,  $1,25(OH)_2D_3$  и  $24,25(OH)_2D_3$  осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием системы фирмы «Beckman» [1]. Предварительную хроматографическую очистку экстрактов проводили на колонке (4,6×250 мм), заполненной силикагелем «Rsil Prep Silica-25-40 мкм» («Alltech Ass»,), элюирующая система — гексан — изопропанол (80:20). Фракцию, содержащую  $24,25(OH)_2D_3$  и  $1,25(OH)_2D_3$ , разделяли на колонке «Ultrasphere-ODS» 5 мкм, элюирующая система — вода (90:10). Радиоактивность во фракции 25-OHD $_3$  не превышала фоновую. Выход  $1,25(OH)_2D_3$  и  $24,25(OH)_2D_3$  после экстракции, предварительной хроматографической очистки и ВЭЖХ составил  $54,5 \pm 1,7$  и  $49,1 \pm 2,3$  % соответственно. Активность 1- и 24-гидроксилазы 25-OHD $_3$  выражали в пиколях на 1 г срезов почки за 1 ч с учетом процентного выхода этих метаболитов. Чувствительность метода составила 1 пмоль на 100 мг за 1 ч. Фоновая радиоактивность во фракциях  $1,25(OH)_2D_3$  и  $24,25(OH)_2D_3$  в среде инкубации составляла менее 1 % от их продукции срезами почек. Количество образующихся срезами  $1,25(OH)_2D_3$  и  $24,25(OH)_2D_3$  составляли менее 0,5 % от таковых, вносимых в качестве стандартов для определения процентного выхода метаболитов. В каждой группе использовали по 1 почке от 4—5 животных.

Раздельное количественное определение эндогенно (*in vivo*) занятых и незанятых рецепторов  $1,25(OH)_2D_3$  в грубой хроматиновой фракции слизистой оболочки тонкой кишки осуществляли с использованием описанных ранее методов с некоторыми модификациями [10, 11]. Проксимальный отрезок тонкой кишки длиной около 20 см промывали холодным 0,9 % раствором NaCl. Все последующие операции, если на это не указывается специально, проводили при 0—4 °С. Слизистую оболочку соскабливали, взвешивали и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе при скорости 100 об/мин 10—12 ходами пестика по 5—10 с в двух объемах гипотонического буфера следующего состава (ммоль/л): трис-НСl 10, ЭДТА 1,5, дитиотреитол 1,0, pH 7,4 (ТЭД-буфер). Гомогенат центрифугировали 10 мин при 5000 g, осадок промывали 3 раза ТЭД-буфером, содержащим 0,5 % триптона X-100, и ресуспендировали в таком же объеме ТЭД-буфера, содержащего 10 ммоль/л молибдата Na и 0,3 ммоль/л фенолметилсульфонилфторида (ТЭДМ-буфер).

При определении количества незанятых рецепторов  $1,25(OH)_2D_3$  аликвоты суспензии хроматина (100 мкл, 0,5 мг белка) инкубиро-

вали в пробирки из стекла «пирекс» (12×75 мм), содержащие в насыщающей концентрации (1,8 нмоль/л) 1,25-диоксен [23,24 (п)—<sup>3</sup>H]холекальциферол (удельная радиоактивность 107 Ки/ммоль, «The Radiochemical Centre, Amersham», Англия) в отсутствие (общее связывание) или в присутствии (неспецифическое связывание) 250-кратного молярного избытка 1,25-диоксивитамина D<sub>3</sub> («Hoffman—LaRoche», США) и инкубировали 4 ч при 0—4 °С. Для предупреждения взаимодействия 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> с витамином D-связывающим белком во все пробирки добавляли 25-OHD<sub>3</sub> в концентрации 500 нмоль/л. Меченый 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> добавляли в пробы через 15 мин после 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 25-OHD<sub>3</sub> — за 30 мин до окончания инкубации. Концентрация этанола в пробе составляла 15 %.

При определении уровня эндогенно занятых рецепторов 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> незанятые связывающие сайты блокировали преникубацией гомогената с L-1-тозиламид-2-фенилхлорметилкетонем (ТРСК, «Serva», ФРГ) при 0—4 °С [10]. К определенному количеству гомогената слизистой оболочки в ТЭДМ-буфере добавляли раствор ТРСК в этаноле (30 ммоль/л) до конечной концентрации 300 мкмоль/л, обеспечивающей полную блокаду незанятых рецепторов, и инкубировали 30 мин при 4 °С. Аликвоты (100 мкл, 0,5 мг белка) добавляли в пробирки, содержащие стероид, как описано выше, инкубировали 30 мин при 37 °С, перенесли на лед, добавляли 25-OHD<sub>3</sub> и продолжали инкубацию в течение 30 мин.

Разделение свободного и связанного гормона осуществляли по методу [25]. В пробирки добавляли по 250 мкл 50 % (по объему) суспензии гидроксиланатита («Calbiochem», США) в ТЭД-буфере, инкубировали 15 мин при 0—4 °С и постоянно встряхивали, добавляли 0,5 мл ТЭД-буфера — 0,5 % триоп X-100 и центрифугировали 5 мин при 1500 g. Осадок затем дважды промывали этим буфером. Радиоактивность из осадка экстрагировали смесью хлороформ — метанол (1:2) 2 раза по 1 мл, супернатант сливали во флаконы, упаривали досуха при 40 °С и добавляли 5 мл сцинтилляционной жидкости (4 г РРО и 100 мг РОРОР на 1 л толуола).

Количество рецепторов 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> рассчитывали в фемтомолях специфически связанного 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> на 1 мг ядерного белка. Концентрацию белка в гомогенате определяли биуретовым методом с использованием наборов реактивов фирмы «Instrumental Laboratories», (Италия). Чувствительность метода составила 1,5 фмоль на 1 мг ядерного белка. В каждой группе исследовали по 2 объединенных гомогената слизистой оболочки от 3—4 животных.

В мембранах щеточной каймы слизистой оболочки тонкой кишки, выделенных дифференциальным центрифугированием [5], измеряли активность Са-, Na-, К- и Mg-АТФаз (по нарастающей в среде инкубации Р<sub>n</sub> [21]). Активность Са-АТФазы определяли по разнице между АТФазной активностью, измеренной в среде инкубации в отсутствие (общая АТФазная активность) и в присутствии (Mg-АТФазная активность) 1 ммоль на 1 л ЭГТА. Среда инкубации имеет следующий состав (в ммоль/л): АТФ 2, КCl 80, MgCl<sub>2</sub> 5, СаCl<sub>2</sub> 0,2, трис-HCl 20, pH 7,4, 37 °С. Na-, К-АТФазную активность рассчитывали по

разнице между АТФазной активностью в отсутствие и в присутствии уабанна (1 ммоль/л) в среде инкубации следующего состава (ммоль/л): АТФ 4, MgCl<sub>2</sub> 5, NaCl 120, KCl 30, трис-HCl 20, pH 7,4, 37 °С. Активность Na-, К-АТФазы — маркерного фермента базолатеральных мембран — составляла менее 5 % от общей АТФазной активности препарата мембран щеточной каймы. Активность щеточной фосфатазы (ЩФ) определяли кинетическим методом по нарастающей *p*-нитрофенола в среде, содержащей следующие компоненты (в ммоль/л): *p*-нитрофенилфосфат 6, MgCl<sub>2</sub> 1, NaOH-глициновый буфер 100, pH 9,85, 25 °С. Активность ферментов выражали в микромолях на 1 мг белка в 1 мин. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [15].

Концентрацию общего кальция, Р<sub>n</sub> и активность ЩФ в сыворотке крови устанавливали ранее описанными методами [1]. В качестве показателей обеспеченности витаминами D и В<sub>2</sub> определяли концентрацию 25-OHD в сыворотке крови — методом радиоконкурентного белкового связывания с использованием наборов реактивов «Vitamin D<sub>3</sub> screening kit» («Bühlmann Laboratories», Швейцария), а также величину ФАД-эффекта и активность глутатионредуктазы (ГТР) в крови [23]. Транспорт кальция в тонкой кишке оценивали по способности дисков, вырезанных из двенадцатиперстной кишки, к поглощению <sup>45</sup>Са [12].

## Результаты и обсуждение

Пребывание крыс на рационе, лишенном витамина D, приводило к обычным биохимическим проявлениям дефицита этого витамина: уменьшение концентрации 25-OHD в сыворотке крови до следовых количеств, развитие гипокальциемии, гипофосфатемии, увеличению активности ЩФ в крови, значительному снижению активного транспорта кальция в тонкой кишке (табл. 1). Эти нарушения сопровождались характерными изменениями продукции диоксиметаболитов D<sub>3</sub> в почках *in vitro*, обусловленными увеличением активности 1-ОНазы и снижением активности 24-ОНазы (табл. 2). Количество занятых рецепторов 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> в хроматиновой фракции слизистой оболочки тонкой кишки уменьшалось до следовых количеств, при этом наблюдалась тенденция к снижению концентрации незанятых рецепторов этого гормона (см. табл. 2). Активность Са-, Mg-АТФаз и ЩФ в мембранах щеточной каймы слизистой оболочки тонкой кишки значительно снижалась (см. рисунок).

При недостаточности витамина В<sub>2</sub>, характеризовавшейся увеличением ФАД-эффекта и снижением активно-

Показатели сыворотки крови крыс при недостаточности витамина В<sub>2</sub>

Группа животных	Са, мг/100 мл	P <sub>II</sub> , мг/100 мл	25 (ОН) D, нг/мл	ЩФ, Е/л	ГТР, мЕ/л	ФАД-эффект
1-я	10,1±0,2	8,14±0,42	15,4±1,7	118±6	260±12	1,14±0,04
2-я	9,3±0,3 <sup>а</sup>	8,09±0,41	6,9±0,8 <sup>а</sup>	163±17 <sup>а</sup>	194±17 <sup>а</sup>	1,34±0,07 <sup>а</sup>
3-я	6,5±0,3 <sup>б</sup>	6,10±0,43 <sup>б</sup>	<2,5	205±16 <sup>б</sup>	292±27	1,13±0,03
4-я	6,1±0,2 <sup>б</sup>	6,43±0,65 <sup>б</sup>	<2,5	250±17 <sup>б</sup>	170±28 <sup>а</sup>	1,26±0,05 <sup>а</sup>
5-я	8,2±0,2 <sup>б</sup>	6,91±0,72 <sup>б</sup>	5,2±0,4 <sup>б</sup>	209±37 <sup>б</sup>	236±15	1,14±0,03
6-я	7,7±0,1 <sup>а,б</sup>	7,13±0,59	2,9±0,2 <sup>а,б</sup>	221±24	182±30	1,49±0,20 <sup>а,б</sup>
7-я	9,7±0,05	8,18±0,80	19,8±1,6	152±9 <sup>а</sup>	273±23	1,14±0,03
8-я	9,0±0,25 <sup>а</sup>	7,13±0,58	22,0±2,2 <sup>б</sup>	201±35	194±18 <sup>а</sup>	1,40±0,07 <sup>а</sup>

Примечание. Здесь и в табл. 2: а — достоверное отличие ( $p < 0,05$ ) от соответствующей группы животных, обеспеченных витамином В<sub>2</sub>, б — то же от животных 1-й и 2-й групп.

сти ФАД-зависимой ГТР в крови, у крыс выявлялись сходные, но значительно менее выраженные изменения обмена Са, что проявлялось в развитии умеренной гипокальциемии, слабкой тенденции к снижению всасывания Са в тонкой кишке и повышению активности ЩФ в сыворотке крови. В то же время продукция 1,25(ОН)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> в почках не изменялась, тогда как 24,25(ОН)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> — уменьшилась в 2,7 раза. Для дефицита витамина В<sub>2</sub> также оказались характерными значительное (в 2,2 раза) снижение концентрации 25-ОНD в сыворотке крови и уменьшение количества незанятых рецепторов 1,25(ОН)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> в слизистой оболочке, сопровождающееся менее выраженным снижением количества его занятых рецепторов. В мембранах щеточной каймы наблюдалось парадоксальное увеличение удельной активности ЩФ и АТФаз, однако их активность при расчете на массу слизистой оболочки снижалась в среднем в 2—2,4 раза.

Сочетанная недостаточность витами-

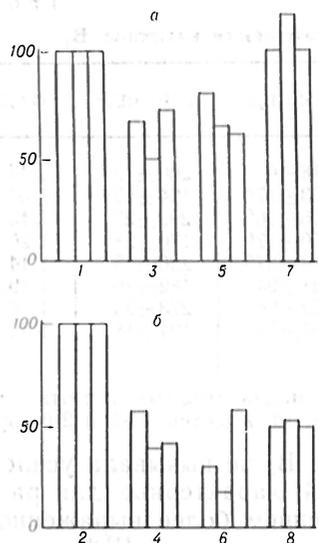
нов D и В<sub>2</sub> не вызывала усиления нарушений, характерных для рахита, за исключением более выраженного увеличения активности ЩФ в сыворотке крови и снижения активности этого фермента в мембранах щеточной каймы слизистой оболочки. Однако активность 24-ОНазы в почках этих животных была снижена по сравнению с таковой крыс, обеспеченных витамином В<sub>2</sub>, а увеличение активности 1-ОНазы, стимулируемое дефицитом витамина D, не было столь значительным. Преинкубация в течение 3 ч срезов почек от животных, лишенных витаминов D и В<sub>2</sub>, в среде с рибофлавином (5 мкг/мл) приводила к резкому увеличению активности 24-ОНазы (789±410 пмоль на 1 г в 1 ч), тогда как продукция 1,25(ОН)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> существенно не увеличивалась (162±43 пмоль на 1 г в 1 ч). Концентрация занятых рецепторов 1,25(ОН)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> в слизистой оболочке тонкой кишки оставалась на минимальном определяемом уровне.

Введение животным, лишенным витамина D, холекальциферола за 24 ч

Таблица 2

Активность 1- и 24-гидроксилаз 25-ОНD<sub>3</sub> в почках, ядерные рецепторы 1,25(ОН)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> в слизистой оболочке и активный транспорт Са в тонкой кишке крыс при недостаточности витамина В<sub>2</sub>

Группа животных	Метаболиты 25-ОНD <sub>3</sub> , пмоль на 1 г в 1 ч		Рецепторы 1,25(ОН) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> , пмоль на 1 мг ядерного белка		Транспорт <sup>45</sup> Са, пмоль Са на 1 см <sup>2</sup> за 20 мин
	1,25(ОН) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	24,25(ОН) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	незаняты	заняты	
1-я	136±16	479±99	83,2±24,0	20,0±2,5	257±23
2-я	120±24	176±36 <sup>а</sup>	48,7±8,4	16,3±3,3	229±17
3-я	297±23 <sup>б</sup>	144±15 <sup>б</sup>	63,2±21,5	3,7±0,5 <sup>б</sup>	104±8 <sup>б</sup>
4-я	214±13 <sup>а,б</sup>	86±11 <sup>а,б</sup>	44,6±10,6	4,2±1,1 <sup>б</sup>	111±10 <sup>б</sup>
5-я	284±27 <sup>б</sup>	237±21 <sup>б</sup>	65,0±8,5	20,1±3,3	235±37
6-я	226±29 <sup>б</sup>	133±17 <sup>а</sup>	54,3±7,7	15,2±3,9	202±23
7-я	230±25 <sup>б</sup>	293±44	73,2±9,3	22,4±1,4	269±31
8-я	151±22	227±47 <sup>а</sup>	52,9±18,3	17,4±2,8 <sup>а</sup>	221±9



Активность Са, Mg-АТФаз и ЩФ в мембранах щеточной каймы слизистой оболочки тонкой кишки у крыс при нормальной обеспеченности (а) и дефиците (б) витамина В<sub>2</sub>.

Арабскими цифрами обозначены группы животных. Столбики слева — Са-АТФаза, в середине — Mg-АТФаза, справа — ЩФ. Активность Са-, Mg-АТФазы и ЩФ у животных 1-й группы составляла  $0,68 \pm 0,05$ ,  $1,67 \pm 0,47$  и  $0,49 \pm 0,03$  мкмоль на 1 мг белка фракции в 1 мин. у животных 2-й группы —  $1,40 \pm 0,45$ ,  $3,8 \pm 0,56$  и  $1,18 \pm 0,20$  соответственно.

до забоя приводило к частичной нормализации всех исследованных показателей обмена Са. Существенным в этом случае представляется то обстоятельство, что у крыс при недостаточности витамина В<sub>2</sub> такое восстановление было менее полным. Это хорошо согласуется с состоянием гормональной системы витамина D таких животных: отсутствие увеличения концентрации 25-ОНД в сыворотке крови, менее значительная стимуляция 1-ОНазы и сниженное количество занятых рецепторов 1,25(ОН)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Следует также отметить, что активность 24-ОНазы возрастала в меньшей степени, а количество незанятых рецепторов 1,25(ОН)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> оставалось уменьшенным по сравнению с таковым животных, обеспеченных витамином В<sub>2</sub>. Активность Са- и Mg-АТФаз на фоне дефицита витамина В<sub>2</sub> не только не возрастала, но и еще более снижалась.

Недостаточность витамина В<sub>2</sub> не позволила достигнуть столь же полного восстановления параметров обмена Са при введении холекальциферола животным, лишенным витамина D, в течение 6 сут. Это сопровождалось «отставанием» в нормализации мета-

болизма 25-ОНД<sub>3</sub> в почках и специфического связывания 1,25(ОН)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> хроматиновой фракцией слизистой оболочки тонкой кишки, а также только незначительным увеличением активности исследованных АТФаз и ЩФ в мембранах щеточной каймы. В то же время введение холекальциферола в течение 6 сут полностью восстанавливало циркулирующую концентрацию 25-ОНД независимо от обеспеченности животных витамином В<sub>2</sub>.

Интересно отметить, что введение холекальциферола животным, лишенным витамина В<sub>2</sub>, приводило к некоторому возрастанию величины ФАД-эффекта, однако активность ГТР при этом не изменялась.

При анализе данных по метаболизму 25-ОНД<sub>3</sub> в почках животных всех групп была выявлена обратная корреляция между активностью 1- и 24-ОНаз ( $r_{cp} = -0,52$ ;  $p < 0,05$ ) и прямая — между продукцией 1,25(ОН)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> и количеством занятых рецепторов этого гормона у животных 5—7-й групп ( $r_{cp} = 0,43$ ).

Вопрос о роли недостаточности витамина В<sub>2</sub> в патогенезе рахита, а также о возможности наличия какой-либо связи между дефицитом этого витамина и состоянием кальциевого обмена до настоящего времени оставался практически не исследованным. Полученные нами данные позволяют предположить, что витамин В<sub>2</sub> играет определенную роль в обмене этого минерала, очевидно, опосредованную его влиянием на гормональную систему витамина D.

Такое влияние отчасти реализуется через изменение активности 1- и 24-ОНаз в почках. Для дефицита витамина В<sub>2</sub> характерным оказалось выраженное снижение активности 24-ОНазы, а также менее значительная стимуляция 1-ОНазы при введении холекальциферола животным, лишенным витамина D. Механизм реализации такого эффекта остается неясным. В том случае, если он обусловлен дефицитом ФАД-кофермента ренального флавопротеида (ферредоксинредуктазы), входящего в состав 1- и 24-ОНаз, можно было бы ожидать снижение интенсивности метаболизма 25-ОНД<sub>3</sub>. Не исключено, однако, что 1- и 24-ОНазы являются ферментами, в которых фосфорилированная форма специфического ренального цитохрома

P-450 функционирует как 1-ОНаза, а нефосфорилированная — как 24-ОНаза [7, 13]. В этом случае можно допустить, что дефицит ФАД снижает активность ферредоксинредуктазы, но фосфорилирование P-450 остается на достаточно высоком, скомпенсированном уровне. В пользу последнего предположения может свидетельствовать косвенно то обстоятельство, что у животных, лишенных витаминов D и B<sub>2</sub>, а также при введении таким животным холекальциферола, наблюдается «отставание» в стимуляции 1-ОНазы, тогда как у крыс, обеспеченных витамином D, отсутствие в рационе витамина B<sub>2</sub> не влияет на накопление 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Альтернативно можно предположить, что у животных, лишенных витамина B<sub>2</sub>, при введении им холекальциферола усиливается дефосфорилирование цитохрома P-450 до неактивного фермента.

Интересным представляется то обстоятельство, что длительная преинкубация срезов почки в среде с рибофлавином резко усиливает образование 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Не исключено, что это реализуется посредством усиления синтеза фермента de novo. Следует подчеркнуть, что в наших опытах в качестве дополнительного источника восстановительных эквивалентов использовался малат [18, 19]. Образование НАДФ·Н в этом случае возможно при участии малик-фермента и/или НАДФ—НАД-трансгидрогеназы [22]. В последнем случае при дефиците витамина B<sub>2</sub> такой путь может быть затруднен вследствие ограничения образования АТФ, необходимого для трансгидрогеназной реакции.

Значительный интерес представляют данные о снижении содержания 25-ОНD в сыворотке крови животных, лишенных витамина B<sub>2</sub>, а также о замедленном восстановлении его концентрации в крови в 1-е сутки после введения холекальциферола. Это может быть обусловлено уменьшением образования 25-ОНD в печени и/или усилением его деградации. Дефицит витамина B<sub>2</sub> может непосредственно снижать активность печеночной монооксигеназы витамина D, содержащей флавопротеид. Усиление неспецифического микросомального окисления при дефиците витамина B<sub>2</sub> представляется маловероятным, поскольку в этом случае следовало ожидать и увеличения

активности микросомальной монооксигеназы витамина D.

Полученные данные свидетельствуют также о том, что дефицит витамина B<sub>2</sub> влияет на рецепцию 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> в слизистой оболочке тонкой кишки крыс. Прежде всего обращает на себя внимание снижение концентрации рецепторов 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (занятых и незанятых) при недостаточности витамина B<sub>2</sub>, а также хорошее соответствие уровня занятых связывающих сайтов этого рецептора продукции 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> в почках и всасыванию кальция в тонкой кишке. Маловероятно, что такое снижение отражает гипотрофические изменения в слизистой оболочке тонкой кишки крыс при дефиците B<sub>2</sub>, поскольку оно выявляется как при расчете на массу слизистой оболочки, так и на количество белка в хроматиновой фракции. Следует отметить, что рецепторный белок 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, по-видимому, является ауторегулируемым по механизму положительной обратной связи [20], в этом случае снижение циркулирующего уровня 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> может приводить к уменьшению концентрации его рецепторов.

Неясным остается феномен более выраженного уменьшения концентрации незанятых рецепторов 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> при недостаточности витамина B<sub>2</sub>. В этой связи представляют интерес данные, указывающие на то, что 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> является аллостерическим эффектором специфического связывания 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> хроматиновой фракцией слизистой оболочки тонкой кишки, уменьшающим сродство и кооперативность при взаимодействии гормона с рецептором [26]. При дефиците витамина B<sub>2</sub> у крыс можно ожидать снижения циркулирующей концентрации 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Не исключено, что в этих условиях увеличивается сродство рецептора 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> к гормону и возрастает скорость образования гормон-рецепторного комплекса и/или замедляется его деградация, что приводит к относительному увеличению концентрации занятых рецепторов. Возможно также, что рибофлавин каким-то образом прямо изменяет кинетические характеристики рецептора 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, а не только его количество.

В аспекте рецептор-опосредованного взаимодействия, очевидно, можно

объяснить снижение образования  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  у животных, лишенных витамина  $\text{B}_2$ . Поскольку рецепторы  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  в почках идентичны рецепторам этого гормона в слизистой оболочке тонкой кишки [6], можно ожидать аналогичного уменьшения концентрации рецепторного белка  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  в этом органе. Взаимодействие  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  с его ренальным рецептором усиливает образование  $24\text{-ОНазы}$  [9]. В условиях дефицита витамина  $\text{B}_2$ , при сниженной концентрации рецепторов  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  продукция  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  в почках остается уменьшенной, тогда как образование  $1\text{-ОНазы}$  не изменяется. В этом случае стимуляция  $24\text{-ОНазы}$  рибофлавином может быть опосредована его влиянием на концентрацию рецепторов  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  в почках.

Данные, полученные при использовании препаратов мембран щеточной каймы слизистой оболочки тонкой кишки, позволяют отметить зависимость  $\text{Ca}$ -,  $\text{Mg}$ -АТФаз и ЦФ от обеспеченности витамина  $\text{D}$  и  $\text{B}_2$ . В то же время весьма очевидно, что эта зависимость прямо не опосредована изменением уровня рецепторов  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  слизистой оболочки, а скорее отражает пролиферацию энтероцитов при введении животным витамина  $\text{D}$ . Однако это обстоятельство не исключает возможности участия  $\text{Ca}$ -АТФазы и ЦФ щеточной каймы в процессах транспорта  $\text{Ca}$ , поскольку наблюдается определенное соответствие между активностью этих ферментов и всасыванием  $\text{Ca}$  в тонкой кишке.

Таким образом, необходимо подчеркнуть, что дефицит витамина  $\text{B}_2$  вызывает незначительные нарушения гомеостаза  $\text{Ca}$ , но не позволяет достигнуть столь же полного, как при нормальной обеспеченности этим витамином, восстановления параметров обмена этого минерала у рахитичных животных при введении им холекальциферола. Эффект недостаточности витамина  $\text{B}_2$ , очевидно, реализуется посредством изменения продукции активных метаболитов витамина  $\text{D}$  в почках (уменьшение образования  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , компенсированное функционированием  $1\text{-ОНазы}$ ), снижения рецепторного связывания его гормональной формы —  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  — в слизистой оболочке тонкой кишки и, возможно, уменьшения образования зави-

симых от витамина  $\text{D}$  белков в этой ткани.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Сергеев И. П., Арханчев Ю. П., Линберг Л. Ф. и др.* // Биохимия. — 1984. — Т. 49, № 4. — С. 590—598.
2. *Спиричев В. Б.* // Педиатрия. — 1977. — № 12. — С. 69—72; 1978. — № 1. — С. 70—72.
3. *Тажигаев Ш. С.* Значение питания в этиологии, патогенезе и профилактике рахита: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1984.
4. *Armbrecht H. J., Zenser T. V., Davis B. B.* // Endocrinology. — 1981. — Vol. 109. — P. 218—222.
5. *Del Castillo J. R., Robinson J. W. L.* // Biochim. biophys. Acta. — 1982. — Vol. 688. — P. 45—56.
6. *Chandler J. S., Pike J. W., Haussler M. K.* // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1979. — Vol. 90. — P. 1057—1063.
7. *Ghazarian J. G.* // Vitamin D: Basic Research and its Clinical Application. — Berlin, 1979. — P. 587—596.
8. *Gray R. W., Napoli J. L.* // J. biol. Chem. — 1983. — Vol. 258. — P. 1152—1155.
9. *Haussler M. R., Donaldson C. A., Kelly M. A. et al.* // Vitamin D: Chemical, Biochemical and Clinical Update. — Berlin, 1985. — P. 83—92.
10. *Hunziker W., Walters M. R., Norman A. W.* // J. biol. Chem. — 1980. — Vol. 255. — P. 9534—9537.
11. *Hunziker W., Walters M. R., Bishop J. E., Norman A. W.* // J. clin. Invest. — 1982. — Vol. 69. — P. 826—834.
12. *Kendrick N. C., Kabakoff B., De Luca H. F.* // Biochem. J. — 1981. — Vol. 194. — P. 178—186.
13. *Kulkowski J. A., Chan T., Martinez J., Ghazarian J. G.* // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1979. — Vol. 90. — P. 50—57.
14. *Levy F. O., Eikvar L., Frysa A. et al.* // Vitamin D: Chemical, Biochemical and Clinical Update. — Berlin, 1985. — P. 151—152.
15. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
16. *De Luca H. F.* // Biochem. Soc. Trans. — 1982. — Vol. 10. — P. 147—158.
17. *Norman A. W., Henry H. L.* // Ann. Rev. Nutr. — 1984. — Vol. 4. — P. 483—520.
18. *Paulson S. K., DeLuca H. F.* // J. biol. Chem. — 1985. — Vol. 260. — P. 11488—11492.
19. *Pedersen J. I., Shobaki H. H., Holmberg J. et al.* // Ibid. — 1983. — Vol. 258. — P. 742—746.
20. *Pike J. W.* // Vitamin D: Chemical, Biochemical and Clinical Update. — Berlin, 1985. — P. 97—106.
21. *Rathbun W. B., Bellach M. V.* // Analyt. Biochem. — 1969. — Vol. 28. — P. 436—442.
22. *Simpson E. K., Estabrook R. W.* // Arch. Biochem. — 1969. — Vol. 129. — P. 384—395.
23. *Tillotson J. A., Laubertlich H. E.* // J. Nutr. — 1971. — Vol. 101. — P. 1459—1466.
24. *Walters M. R., Hunziker W., Norman A. W.* // J. biol. Chem. — 1980. — Vol. 255. — P. 6799—6805.

25. Weckler W. R., Norman A. W. // *Analyt. Biochem.* — 1979. — Vol. 92. — P. 314—323.  
 26. Wilhelm F., Ross F. P., Norman A. W. // *Vitamin D: Chemical, Biochemical and Clinical Update.* — Berlin, 1985. — P. 129—130.

Поступила 22.05.86

METABOLISM OF 25-HYDROXYVITAMIN D<sub>3</sub> IN KIDNEY AND NUCLEAR RECEPTORS OF 1,25-DIHYDROXYVITAMIN D<sub>3</sub> IN SMALL INTESTINE MUCOSE OF RATS DEFICIENT IN VITAMIN B<sub>2</sub>

I. N. Sergeev, Kim Ren Kha, Yu. P. Arkhapchev, V. M. Kodentsova, I. A. Alexeeva, A. A. Sokol'nikov, O. A. Klimova, V. B. Spirichev

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

Effect of vitamin B<sub>2</sub> deficiency on metabolism, reception and biochemical functions of vi-

tamin D was studied in young rats. Deficiency in vitamin B<sub>2</sub> was shown to cause a moderate hypocalcemia as well as a decrease in the active transport of calcium in small intestine and in concentration of 25-OH D in blood serum, lowered formation of 24,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in kidney slices and decreasing content of nuclear receptors for 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (free and bound *in vivo*) in small intestine mucosa. After administration of cholecalciferol into the animals deficient in vitamins D and B<sub>2</sub> within 24 hrs or 6 days before death restoration of the calcium metabolism parameters was retarded as a result of less distinct stimulation of 1-hydroxylase and of low activity of 24-hydroxylase 25-OH D<sub>3</sub> in kidney as well as due to a moderate increase in content of bound receptors of 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in small intestine mucosa and, apparently, because of reduced production of the proteins dependent on vitamin D in the tissue (Ca<sup>2+</sup>-ATPase and alkaline phosphatase). The data obtained suggest the possible importance in rickets of vitamin B<sub>2</sub> deficiency mediated via its influence on metabolism and reception of vitamin D.

УДК 615.276.4:547.458].074

Н. Г. Синилова, А. П. Дуплищева, Е. И. Ромашевская, Е. Б. Мысякин, М. А. Туманян

**ХИМИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА И ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ**

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамален АМН СССР, Москва

В последние годы ведутся интенсивные поиски веществ, оказывающих иммуностимулирующее действие, среди соединений различной химической природы, в том числе среди полисахаридов [3—5, 7, 9, 11, 16, 17, 19].

В настоящем сообщении приведены результаты исследований по выяснению зависимости иммуностимулирующей активности от типа химической структуры полисахаридных молекул.

**Методика**

В работе использованы высокомолекулярные полисахаридные препараты, различающиеся по типу химической структуры (табл. 1). Декстраны SF-4 и 63-1 были получены из Института биологической и медицинской химии АМН СССР от М. Е. Преображенской; аубазидан, глюкан из *Candida albicans*, родэкман и фосфоманнан из Ленинградского химико-фармацевтического института от Н. И. Елинова, Г. А. Витовской, М. А. Капкниной, Г. Е. Аркадьевой; плантаглюцид и пектин яблочный из Киевского Института усовершенствования врачей от Н. П. Максютинной<sup>1</sup>. 0-полисахарид (0-ПС) выделен нами из бактерий брюшного

тифа (штаммы *S. typhi*<sub>2</sub> 4446 и *S. typhi* 0-901) методом, включавшим в себя водно-фенольную экстракцию и гидролиз в 0,1 N CH<sub>3</sub>COOH [18]. Препарат очищен пересаживанием из спирта гель-фильтрацией на сефадексе G-200 и ультрацентрифугированием (105 000 g 2 ч). Был отобран осадок, представляющий собой высокомолекулярную седиментационно гомогенную фракцию 0-ПС. Серологическую однородность устанавливали методом иммуноэлектрофореза в агаре [6] с антисыворотками к 0-антигену из *S. typhi* 0-901 и к живой культуре *S. typhi*<sub>2</sub> 4446.

Биологические испытания препаратов проводили на белых беспородных мышах и гибридах (СВА×С57В1)F<sub>1</sub>, самцах в возрасте 2—3 мес. Препараты вводили однократно внутрибрюшинно в дозе 100 мкг на 1 животное.

Имуностимулирующую активность препаратов оценивали по изменению уровня неспецифической резистентности к инфекции, влиянию на первичный иммунный ответ и по активации перитонсальных макрофагов.

Неспецифическую резистентность животных к инфекции определяли при заражении двумя видами микроорганизмов. Заражение мышей культурой *Klebsiella pneumoniae* (штамм K2) производили внутривенно через 2 сут после введения препаратов. Гибель животных учитывали в течение 10 дней после заражения. Заражение мышей бактериями брюшного тифа (штамм *S. typhi*<sub>2</sub> 4446) производили внутрибрюшинно через 3 сут после введения препаратов. Гибель животных учитывали в течение 5 сут после заражения. Для всех групп животных вычисляли количество бактерий, вызывающих гибель 50 % зараженных мышей — ЛД<sub>50</sub> [12] и индекс ре-

<sup>1</sup> Мы приносим благодарность коллегам, предоставившим указанные препараты, что дало возможность провести настоящее исследование.

Полисахариды, использованные в экспериментах

№№ п/п	Полисахарид	Продуцент	Основной тип структуры	Источник
I	Декстран SF-4	Deiconostos mesenteroides	Линейный $\alpha$ -глюкан С $\alpha \rightarrow 1,6$	[17]
II	Декстран 63-1	Deiconostos mesenteroides	Разветвленный $\alpha$ -глюкан основная цепь — С $\alpha \rightarrow 1,6$ боковая цепь — С $\alpha \rightarrow 1,2$	[17]
III	Глюкан	Candida albicans	Разветвленный $\alpha$ -глюкан С $\alpha \rightarrow 1,6$	[3]
IV	Аубазидан	Aureobasidium pullulans	Разветвленный $\beta$ -глюкан основная цепь — С $\beta \rightarrow 1,3$ ; боковая цепь — С $\alpha \rightarrow 1,4$	[3]
V	Родэкман	Rhodotorula rubra	Линейный $\beta$ -маннан; поочередно С $\beta \rightarrow 1,3$ ; С $\beta \rightarrow 1,4$	[3]
VI	Фосфоманнан	Hansenula holstii	Линейный $\alpha$ -фосфоманнан	[3]
VII	Плантоглоцид	Plantago major	Пектин основная цепь — полигалактуроновая кислота С $\alpha \rightarrow 1,4$ ; боковые цепи — d-галактоза, l-арабиноза, l-рамноза	[2]
VIII	Пектин яблочный		Пектин основная цепь — полигалактуроновая кислота С $\alpha \rightarrow 1,4$ ; боковая цепь — d-галактоза, l-арабиноза, l-рамноза	(10)
IX	О-полисахарид	S. typhi, 4446 S. typhi 0-901	Многокомпонентный, разветвленный фосфорсодержащий полисахарид	[12]

зистентности — ИР (отношение ЛД<sub>50</sub> животных опытной группы к ЛД<sub>50</sub> контрольной).

Влияние препаратов на формирование первичного иммунного ответа на эритроциты барана (ЭБ) оценивали по количеству антителообразующих клеток (АОК) в селезенках мышей [8]. Исследуемые препараты и ЭБ (200 × 10<sup>6</sup> клеток) вводили внутривенно одновременно. Контрольным животным вводили ЭБ и изотонический раствор хлорида натрия. При оценке результатов вычисляли индекс стимуляции — ИС (отношение среднего количества АОК в опытной группе к его количеству в контрольной).

Об активации макрофагов судили по уровню снижения активности эктоплазматической 5'-нуклеотидазы (ЕС 3.1.3.5) [13, 14, 20]. Перитонеальные макрофаги получали на 4-е сутки после введения полисахаридов. Активность 5'-нуклеотидазы устанавливали по методу [20] при pH 7,8 без предварительного разрушения клеток. Определение активности фермента проводили для каждого животного индивидуально. Активность 5'-нуклеотидазы выражали в молях фосфата на 1 мг белка макрофагов за 1 мин. Белок определяли по Лоури. Оценку результатов проводили по индексу подавления активности фермента — ИП (отношение активности 5'-нуклеотидазы в контрольной группе к таковой опытной группы).

#### Результаты и обсуждение

*Влияние полисахаридов на неспецифическую резистентность к инфекции.*

Как видно из табл. 2, при заражении мышей *Klebsiella pneumoniae* полиозиды — маннаны (V), глюканы (I, II, V) и пектины (VIII) либо обладали слабой способностью стимулировать неспецифическую резистентность к инфекции (ИР 2,0—4,0), либо были лишены иммуностимулирующей активности (IV, VII). При заражении мышей бактериями брюшного тифа были получены сходные результаты. Как маннаны, так и глюканы обладали слабой иммуностимулирующей активностью (ИР 2,3—3,1).

На уровень действия полисахаридов не сказывалось влияние типа связей ( $\alpha$ - и  $\beta$ -полигликозиды, соединенные по С—С 1,6; 1,4; 1,3; 1,2). Не отмечено и заметного усиления стимулирующего действия препарата в зависимости от степени разветвленности полисахаридной молекулы. Эффективность действия разветвленных полисахаридов (II, III и IV) не отличалась от такового линейных (I, V).

Наиболее высокая активность, на десятичный порядок и более превышающая действие других полисахаридов,

Таблица 2

Влияние полисахаридов различной химической структуры на резистентность мышей к заражению *Klebsiella pneumoniae* и бактериями брюшного тифа

№№ п/п	Полисахарид	Заражающая культура			
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>S. typhi</i> 4446	
		ЛД <sub>50</sub> ± <i>m</i> микробных клеток	ИР	ЛД <sub>50</sub> ± <i>m</i> млн. микробных клеток	ИР
I	Декстран SF-4	349,0 ± 170,0	3,0	100,0 ± 15,0	2,5
II	Декстран 63-1	990,5 ± 190,0	3,5	108,0 ± 20,0	2,7
III	Глюкан <i>S. albicans</i>	—	—	120,0 ± 30,0	3,0
IV	Аубазидан	249,0 ± 40,0	0,88	92,0 ± 20,5	2,3
V	Родэксман	11320,0 ± 150,0	4,0	124,0 ± 20,5	3,1
VI	Фосфоманнан <i>Hansenula holstii</i>	—	—	280,0 ± 35,5	7,0
VII	Плантаглюцид	408,0 ± 55,4	1,44	—	—
VIII	Пектин яблочный	586,0 ± 65,0	2,0	—	—
IX	О-полисахарид брюшного тифа	27112,0 ± 2000,0	96,0	1240,0 ± 80,0	31,0
	Контроль (интактные мыши)	283,0 ± 63,5	1,0	40,0 ± 5,0	1,0

Примечание. Каждая группа включала в себя 30 животных. Опыты проводили в 2—3 повторностях.

ридных препаратов, обнаружена только у полисахарида брюшнотифозных бактерий (IX).

Фосфорсодержащий полисахарид более упрощенной структуры — линейный α-фосфоманнан (VI) — обладал также выраженной активностью, хотя и в меньшей степени, чем О-ПС брюшнотифозных бактерий.

*Влияние полисахаридов на первичный иммунный ответ.* Как видно из табл. 3, препараты аубазидан (IV) и фосфоманнан (VI) оказались практически неактивными и не влияли на

антителогенез. Вместе с тем линейный маннан-родэксман (V) достоверно стимулировал образование АОК. Наиболее выраженные адьювантные свойства были обнаружены только у О-ПС бактерий брюшного тифа (IX).

*Влияние полисахаридов на активацию перитонеальных макрофагов мышей.* Все исследованные полисахариды вызывали активацию перитонеальных макрофагов мышей, о чем свидетельствует снижение активности фермента — эктоплазматической 5'-нуклеотидазы в этих клетках. При

Таблица 3

Влияние полисахаридов различной химической структуры на первичный иммунный ответ и активность 5'-нуклеотидазы перитонеальных макрофагов мышей

№ п/п	Полисахариды	Первичный иммунный			Активация макрофагов		
		число животных	количество АОК $M \pm m$	ИС	число животных	актуальность 5'-нуклеотидазы; моль/мин на 1 мг белка $M \pm m$	ИП
IV	Аубазидан	18	50290 ± 4677	1,2	6	54,4 ± 12,0	1,8
V	Родэксман	20	85215 ± 5403	2,1	6	33,7 ± 8,0	2,9
VI	Фосфоманнан	17	50991 ± 5147	1,0	6	48,9 ± 14,0	2,0
IX	О-полисахарид брюшного тифа	19	124427 ± 6460	3,1	6	17,3 ± 3,0	5,6
	Контроль (физиологический раствор)	18	40089 ± 5575	—	6	96,9 ± 12,9	

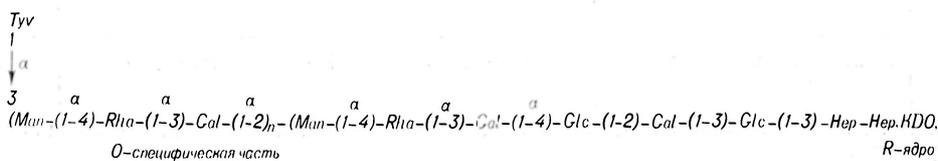
этом в группах, где животным вводили полисахариды — глюкоаны и маннаны как с линейной (V), так и с разветвленной (IV) структурой и фосфоманнан (VI), отмечали примерно одинаковое снижение активности фермента. Активность 5'-нуклеотидазы наиболее значительно снижалась при введении О-ПС брюшнотифозных бактерий (см. табл. 3).

Таким образом, в проведенном нами сравнительном изучении высокомолекулярных полисахаридов были использованы препараты с более упрощенной структурой — глюкоаны и маннаны с различными типами С—С связей и степени разветвленности мо-

муостимулирующей активностью, чем соответствующие препараты, лишённые ее, что связывают с наличием рецепторов к маннозе у макрофагов [15].

Многокомпонентные полисахариды пектинового типа, содержащие наряду с кислым фрагментом — полигалактуроновой кислотой, нейтральные сахара, были также малоэффективны.

Высокой иммуностимулирующей активностью из числа исследованных препаратов обладает только О-ПС бактерий брюшного тифа, который представляет собой высокомолекулярное, фосфорсодержащее, многокомпонентное углеводное соединение с сильно разветвленной структурой [12];



лекулы, и сложный многокомпонентный О-ПС бактерий брюшного тифа. Последний препарат был выбран нами как полисахарид, имеющий химическую структуру, характерную для О-специфических полисахаридов энтеробактерий.

Очевидно, однокомпонентные полисахариды-полиозиды, образованные гексозами (глюкозой и маннозой), обладали некоторой иммуностимулирующей активностью. В условиях наших опытов не удалось выявить четкой зависимости между уровнем стимуляции неспецифической резистентности к инфекции, типом связи и степенью разветвленности полисахарида. Все использованные препараты слабо повышали неспецифическую резистентность к инфекции. Невысокое иммуностимулирующее действие этих препаратов выявлено и при изучении таких показателей, как первичный иммунный ответ на эритроциты барана и активация перитонеальных макрофагов. Вместе с тем было отмечено, что препараты маннанов обладали несколько более выраженными адьювантными свойствами и в большей степени снижали 5'-нуклеотидазную активность перитонеальных макрофагов, чем препараты глюкоанов. Известно, что препараты, содержащие в своем составе ковалентно связанную маннозу, обладают более высокой им-

где Гув — тивелоза, Ман — d-манноза, Rha — L-рамиоза, Gal — галактоза, Glc — d-глюкоза, Нер — гептоза, КДО — 2-кето-3-дезоксиктанат.

Полученные данные позволили выявить зависимость между снижением активности фермента 5'-нуклеотидазы, уровнем стимуляции неспецифической резистентности к инфекции и количеством АОК при первичном иммунном ответе. Установлено, что препараты, в большей степени снижающие активность 5'-нуклеотидазы, оказывали наиболее выраженное иммуностимулирующее действие, что свидетельствует об активности клеток макрофагальной системы.

Таким образом, активация макрофагов является одним из ведущих механизмов иммуностимулирующего действия, обусловленного высокомолекулярными полисахаридами.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Лшмарин И. П., Воробьев А. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. — Л., 1962.
2. Горин А. Г. Химическое исследование подорожника большого: Автореф. дис. ... канд. хим. наук. — Киев, 1968.
3. Елинов П. П. Химия микробных полисахаридов. — Л., 1984.
4. Ермольева З. В., Вайсберг Г. Е. Стимуляция неспецифической резистентности организма и бактериальные полисахариды. — М., 1976.

5. Застрожнова Н. Н., Ляшенко В. А., Дрожженников В. А. // Иммунология. — 1980. — № 3. — С. 372.
6. Зильбер Л. А., Абелев Г. И. Вирусология и иммунология рака. — М., 1962.
7. Кашкина М. А. Влияние дрожжевых полисахаридов на иммунологическую реактивность макроорганизма. — Автореф. дис... канд. биол. наук. — Л., 1974.
8. Певницкий Л. А., Соловьев В. В., Фонталлин Л. П. // Бюл. экпер. биол. — 1965. — № 8. — С. 85.
9. Туманян М. А., Дуплищева А. П., Гордеева М. С., Синилова Н. Г. // Иммунология. — 1980. — № 4. — С. 29.
10. Эль-Коммос М. И. Исследование в области анализа флавоноидов и пектинов физико-химическими методами: Автореф. дис... канд. фарм. наук. — Киев, 1978.
11. Hashimoto K., Suzuki S., Suzuki M. // J. Pharmaco-Bio-Dyn. — 1984. — Vol. 7. — P. 943—948.
12. Hellerqvist C. G., Lindberg A. A. // Carbohydr. Res. — 1971. — Vol. 16. — P. 39—43.
13. Karnovsky M. L., Lazdins J. K. // J. Immunol. — 1978. — Vol. 121. — P. 809—813.
14. Moragan P. S., Edelson P. J., Gass K. // Ibid. — 1980. — Vol. 125. — P. 1312—1317.
15. Leclerc C., Joliet M., Chedid I. // Int. J. Immunopharmacol. — 1985. — Vol. 7. — P. 344—349.
16. Patchen M. L., MacVittie T. J. // Ibid. — P. 305—309.
17. Preobrazhenskaya M. E., Rozenfeld E. L., Kandra L. // Carbohydr. Res. — 1978. — Vol. 66. — P. 212—223.
18. Tumanjan M. A., Duplischeva A. P., Sinilova N. G. // Radiobiol. Radiother. — 1975. — Bd 16. — S. 697—703.
19. Tumanjan M. A., Duplischeva A. P., Sinilova N. G. // International Congress of Immunology: 4th: Abstracts. — Paris, 1980. — N 17.3.62.
20. Widnell C. C., Unkeless J. C. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1968. — Vol. 61. — P. 1050—1054.

Поступила 22.05.86

#### CHEMICAL STRUCTURE AND THE IMMUNOSTIMULATING ACTIVITY OF HIGH MOLECULAR POLYSACCHARIDES

N. G. Sinilova, A. P. Duplischeva, E. I. Romashevskaya, E. B. Mysyakin, M. A. Tumanyan

Institute of Epidemiology and Microbiology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

An immunostimulating activity of high molecular polysaccharides, dissimilar in their chemical structure, was studied. Inoculation of mice with bacteria of typhoid fever and *Kl. pneumoniae* demonstrated that O-polysaccharide from typhoid bacteria — multicomponent, branched, phosphorus-containing polysaccharide — exhibited the highest immunostimulating effect. Mannans and glucans, with linear and branched molecules, involving various types of C-C bonds, had lower stimulating properties, which did not correlate with the level of a molecule branching and the type of C-C bonds. These data were confirmed after evaluation of adjuvant properties of high molecular polysaccharides with sheep erythrocytes and their ability to activate macrophages.

УДК 615.849.1.015.25.015.4:616.155.36-008.931:577.152.3

Е. Э. Граевская, Н. Н. Ломакин, М. Ф. Минеева, Е. Н. Гончаренко

### ВЛИЯНИЕ β-МЕРКАПТОЭТИЛАМИНА НА ТРИПТОФАНГИДРОКСИЛАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ В ТКАНЯХ КРЫС

Биологический факультет Московского университета

За последние годы в связи с развитием представлений об опосредованном характере действия радиопротекторов все большее внимание привлекают биогенные амины. Согласно гипотезе эндогенного фона радиорезистентности, увеличение содержания биогенных аминов в радиочувствительных тканях в условиях радиопрофилактики относится к числу важнейших биохимических изменений, определяющих состояние повышенной радиорезистентности [1]. Уровень биогенных аминов увеличивается под влиянием радиопротекторов преимущественно путем активации ферментов синтеза в аминокобразующих тканях и перерас-

пределения из одних органов и тканей в другие. Ранее было показано, что в условиях противолучевой защиты в ряде тканей (печени, толстой кишке, тучных клетках) наблюдается активация декарбоксилазы ароматических аминокислот [2]. Однако оставалось невыясненным, изменяется ли при этом активность другого фермента, играющего значительную роль в биосинтезе серотонина, — триптофангидроксилазы, под действием которого происходит гидроксирование триптофана [20].

Из данных литературы известно, что экстракты слизистой оболочки тонкой кишки, печени и почек крыс, морских

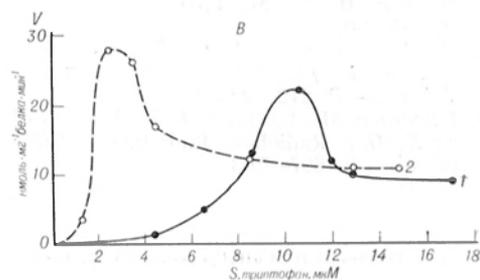
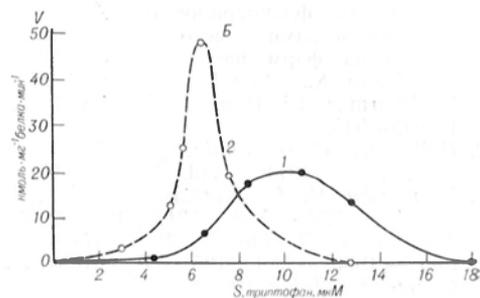
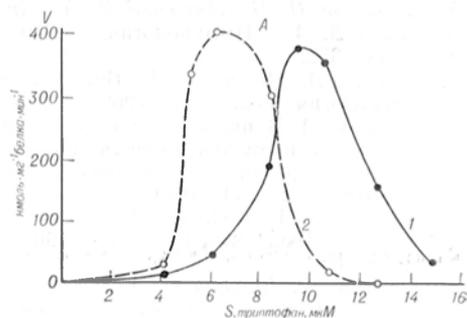
свинок, кроликов способны гидроксилировать триптофан [6, 8, 14, 16, 17]. Триптофангидроксилаза обнаружена и в малигнизированных тучных клетках мышей [9, 11—14, 18], что свидетельствует о возможности синтеза в них 5-окситриптофана. Отмечается, что в мастоцитоме мышей и мозге крыс триптофангидроксилаза представлена разными формами фермента [11] и что активность фермента в малигнизированных тучных клетках мышей в 100 раз выше, чем в мозге [14, 18], где этот фермент является лимитирующим [7, 10]. Не решен окончательно вопрос о наличии триптофангидроксилазы в тромбоцитах [14, 15]. Нет экспериментальных данных об активности фермента в тучных клетках крыс. Полностью отсутствуют сведения и о возможных изменениях триптофангидроксилазной активности в тканях в условиях противолучевой защиты. В настоящей работе приведены результаты экспериментов, поставленных с целью выяснения способности тучных клеток, печени, тонкой кишки крыс синтезировать 5-окситриптофан в условиях радиопрофилактики в плане участия этих тканей в создании эндогенного фона радиорезистентности.

### Методика

Объектом исследования служили тучные клетки перитонеальной жидкости, перфузванная печень, слизистая оболочка тонкой кишки самцов линии Вистар с массой тела 200—250 г. В качестве радиопротектора использовали β-меркаптоэтиламин дигидрохлорид (МЭА) в дозе 200 мг/кг. Препарат вводили интратрибуциально, животных забивали через 10 мин. Чистую фракцию тучных клеток выделяли центрифугированием перитонеальной жидкости в градиенте плотности фиколла [21]. Скорость триптофангидроксилазной реакции в тканях в норме и после введения МЭА измеряли прямым спектрофотометрическим методом по аналогии с методом, разработанным для тирозингидроксилазы [3]: по приросту поглощения в изобестической точке при 325 нм за счет окисления (ДМПН) 6,7-диметил-5,6,7,8-тетрагидроптерина при pH 7,4. Белок определяли методом [5, 19]. Достоверность различия между опытом и контролем оценивали по критерию Стьюдента методом «сравнения совокупностей с попарно связанными вариантами» [4].

### Результаты и обсуждение

Триптофангидроксилаза — фермент, для которого характерно субстратное торможение. Зависимость скорости реакции от концентрации триптофана



Зависимость скорости триптофангидроксилазной реакции от концентрации субстрата в тучных клетках (А), печени (Б) и тонкой кишке (В) крыс (репрезентативные кривые).

1 — контроль, 2 — после введения МЭА в количестве 200 мг/кг. По оси абсцисс — концентрация триптофана, мМ; по оси ординат — скорость гидроксилирования триптофана, нмоль·мг<sup>-1</sup> белка·мин<sup>-1</sup>.

характеризуется кривой с достаточно узким максимумом. Учитывая эту особенность кинетических свойств триптофангидроксилазы, в настоящей работе для оценки влияния МЭА на триптофангидроксилазную активность тканей определяли зависимость скорости реакции от концентрации триптофана.

На рисунке представлены типичные кривые, характеризующие зависимость скорости гидроксилирования триптофана от концентрации субстрата в различных тканях.

Наибольшая скорость гидроксилирования триптофана в тучных клетках

контрольных животных составляет около  $350 \text{ нмоль} \cdot \text{мг}^{-1} \text{ белка} \cdot \text{мин}^{-1}$  при концентрации субстрата  $10,4 \text{ мкМ}$ , которая является оптимальной. Введение животным серосодержащего радиопротектора МЭА вызывает снижение оптимальной концентрации субстрата до  $8,1 \text{ мкМ}$ .

Наибольшая скорость триптофангидроксилазной реакции в ткани печени контрольных животных, составляющая около  $20 \text{ нмоль} \cdot \text{мг}^{-1} \text{ белка} \cdot \text{мин}^{-1}$ , отмечается при концентрации триптофана в среде инкубации, равной  $10 \text{ мкМ}$ . В условиях противолучевой защиты организма животных в печени, как и в тучных клетках, наблюдается снижение оптимальной концентрации субстрата, однако в печени оно выражено сильнее: наибольшая скорость гидроксилирования триптофана в печени после введения животным МЭА регистрируется при концентрации субстрата  $5,2 \text{ мкМ}$ . В норме в тонкой кишке наиболее высокая скорость гидроксилирования триптофана составляет около  $22 \text{ нмоль} \cdot \text{мг}^{-1} \text{ белка} \cdot \text{мин}^{-1}$  при концентрации субстрата  $11,3 \text{ мкМ}$ . В условиях повышенной радиорезистентности организма в тонкой кишке оптимальная концентрация субстрата снижается до  $2,3 \text{ мкМ}$ .

В тучных клетках наиболее высокая скорость гидроксилирования триптофана в наших экспериментальных условиях на порядок выше, чем в тонкой кишке и печени. Наши данные согласуются с данными других авторов, изучавших скорость триптофангидроксилазной реакции в малигнизированных тучных клетках мышей [14, 18]. Высокая активность триптофангидроксилазы в тучных клетках объясняется, по-видимому, более высокой удельной активностью в связи с низким содержанием балластных белков (чистота фракции тучных клеток достигает  $95\text{--}99\%$ ).

В таблице приведены суммарные данные по влиянию МЭА, введенного животным, на оптимальные концентрации триптофана, при которых наблюдается наиболее высокая скорость триптофангидроксилазной реакции, в разных тканях крыс. Во всех исследуемых тканях в условиях противолучевой защиты отмечается статистически достоверный сдвиг концентрационного оптимума субстрата в область более низких концентраций, что мо-

#### Влияние МЭА на оптимальные концентрации субстрата триптофангидроксилазы в разных тканях крыс в условиях *in vivo*

Биологический объект	Оптимальные концентрации субстрата, мкМ	
	контроль	опыт
Тучные клетки	$10,4 \pm 0,8$	$8,1 \pm 0,6^*$
Печень	$10,0 \pm 0,3$	$5,2 \pm 0,5^{**}$
Тонкая кишка	$11,3 \pm 0,6$	$2,3 \pm 0,1^{**}$

\*  $P < 0,05$ .

\*\*  $P < 0,01$ .

жет свидетельствовать о возрастании сродства фермента к субстрату. При этом наибольший сдвиг оптимальной концентрации субстрата регистрируется в тонкой кишке и печени. В тучных клетках в условиях радиопрофилактики снижение оптимальной концентрации субстрата по сравнению с контролем проявляется в меньшей степени.

Из экспериментальных данных, представленных на рисунке, видно, что кинетика триптофангидроксилазной реакции достаточно сложна, четко выражено субстратное торможение. Кривые, описывающие зависимость скорости реакции от концентрации триптофана, имеют сигмовидный характер в области «активирующих» концентраций триптофана. Как видно из рисунка, кинетика реакции в использованных нами препаратах печени, тонкой кишки, тучных клеток в целом не подчиняется кинетике Михаэлиса — Ментен. Поэтому в рамках настоящей работы представлялось вполне корректным сравнить кинетические свойства фермента по отношению к субстрату в норме и в условиях радиозащиты по двум параметрам: оптимальной концентрации субстрата и скорости реакции при оптимальной концентрации субстрата. Следует отметить большую вариабельность величин скорости реакции у разных животных и хорошее совпадение формы кинетических кривых и значений оптимальных концентраций субстрата. Выявленные изменения оптимальных концентраций субстрата при введении животным тьюльного протектора указывают на повышение сродства фермента к субстрату. В сочетании с усилением декарбоксилазной активности в условиях радиопрофилактики повышение сродства

фермента к субстрату при гидроксигидроксилировании триптофана может способствовать усилению синтеза серотонина, что достаточно важно в радиобиологическом аспекте. Более подробное изучение кинетики триптофангидроксилазной реакции не входило в задачу настоящей работы.

На основании полученных нами экспериментальных данных можно заключить, что после введения животным серосодержащего радиопротектора МЭА в аминокислотных тканях (печени, тонкой кишке, тучных клетках) изменяются кинетические свойства триптофангидроксилазы, что проявляется в снижении оптимальной концентрации субстрата, которое в печени и тонкой кишке выражено в большей степени, чем в тучных клетках. Сопоставление этих результатов с ранее полученными данными относительно декарбоксилазной активности в тех же тканях [2] позволяет предположить, что основной вклад в общий синтез биогенных аминов не катехоламинового строения, в частности серотонина, принадлежит печени и тонкой кишке. Функция тучных клеток, хотя и обладающих способностью синтезировать эти амины, по-видимому, в основном заключается в депонировании и в способности при определенных условиях, в том числе в условиях радиопрофилактики, к мобилизации ранее накопленных запасов биогенных аминов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гончаренко Е. Н., Кудряшов Ю. Б. Гипотеза эндогенного фона радиорезистентности. — М., 1980. — С. 77—89.
2. Гончаренко Е. Н., Граевская Е. Э., Горская Т. Г., Ломакин Н. Н. // Науч. докл. высш. школы: Биол. науки. — 1985. — № 3. — С. 28—30.
3. Минеева-Вялых М. Ф. // Вопр. мед. химии. — 1976. — № 2. — С. 274—279.
4. Урбах В. Д. Биометрические методы. — М., 1964. — С. 155—157.
5. Bradford M. // Analyt. Biochem. — 1976. — Vol. 72. — P. 248—254.
6. Cooper J. R., Melcer J. // J. Pharmacol.

- exp. Ther. — 1961. — Vol. 132, N 3. — P. 265—268.
7. Deguchi T., Bakchas J. // Molec. Pharmacol. — 1972. — Vol. 8, N 6. — P. 770—779.
8. Grahame-Smith D. G. // Clin. Sci. — 1967. — Vol. 33, N 1. — P. 147—158.
9. Hosoda S. // Biochim. biophys. Acta. — 1975. — Vol. 397, N 1. — P. 58—68.
10. Knapp S. // J. Histochem. Cytochem. — 1982. — Vol. 30, N 8. — P. 847—850.
11. Kuhn D. M., Rosenberg R. C., Lovenberg W. // J. Neurochem. — 1979. — Vol. 13, N 9. — P. 1283—1290.
12. Levine R. J., Lovenberg W., Sjoerdsma A. // Biochem. Pharmacol. — 1964. — Vol. 13, N 9. — P. 1283—1290.
13. Lovenberg W., Levine R. J., Sjoerdsma A. // Ibid. — 1965. — Vol. 14, N 5. — P. 887—889.
14. Lovenberg W., Jequier E., Sjoerdsma A. // Advanc. Pharmacol. — 1968. — Vol. 6, Pt A. — P. 21—36.
15. Morrissey J., Walker M. N., Lovenberg W. // Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.). — 1977. — Vol. 154, N 4. — P. 496—499.
16. Naguchi T., Nishino M., Kido R. // Biochem. J. — 1973. — Vol. 131, N 2. — P. 375—380.
17. Renson J., Weissbach H., Udenfriend S. // J. biol. Chem. — 1962. — Vol. 237, N 7. — P. 2261—2264.
18. Sato T. L., Lequer E., Lovenberg W., Sjoerdsma A. // Europ. J. Pharmacol. — 1967. — Vol. 1, N 1. — P. 18—25.
19. Scharterle G. R., Pollack R. L. // Analyt. Biochem. — 1973. — Vol. 51, N 2. — P. 654—655.
20. Schwartz L. B., Austen K. F. // Progr. Allergy. — 1984. — Vol. 34. — P. 271—321.
21. Thon J. L., Uvnäs B. // Acta physiol. scand. — 1966. — Vol. 67, N 3—4. — P. 455—470.

Поступила 27.05.86

#### THE INFLUENCE OF $\beta$ -MERCAPTOETHYLAMINE ON TRYPTOPHANE HYDROXYLASE ACTIVITY IN RAT TISSUES

E. E. Graevskaya, N. N. Lomakin, M. F. Mineeva, E. N. Goncharenko

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

The ability of amine-producing tissues (liver tissue, small intestine, mast cells) of rats to synthesize 5-hydroxytryptophane in response to irradiation and their involvement in creation of endogenous radioresistance was studied. Administration of a thiol radioprotector  $\beta$ -mercaptoethylamine resulted in alteration of kinetic properties of tryptophane hydroxylase expressed as a decrease in the optimal concentration of the substrate; this decrease was more distinct in liver and small intestine as compared with mast cells.

*В. В. Соколовский, Л. Л. Гончарова, Н. Н. Киселева, И. Н. Макарова,  
Л. П. Родионова*

## АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА ОРГАНИЗМА ПРИ ШУМОВОМ СТРЕССЕ

Санитарно-гигиенический медицинский институт, Ленинград

Предпосылкой для проведения работы по выяснению биохимических механизмов действия шума на организм явилась концепция об участии антиоксидантной системы организма (АОС), в частности тиолдисульфидного звена, в неспецифических реакциях адаптации на воздействие стресс-факторов окружающей среды [4, 7, 9].

Неспецифические реакции адаптации, регулируемые нейроэндокринными гипофизарно-надпочечниковой и симпатико-адреналовой системами, направлены на мобилизацию ресурсов организма и сопряжены с возрастанием энергетических затрат. В свою очередь интенсификация обменных процессов связана с повышением потребления кислорода и усилением по типу цепной реакции процессов свободно-радикального окисления (СРО) и перекисного окисления липидов (ПОЛ). Продукты СРО и ПОЛ оказывают повреждающее действие на клетку, вызывая окисление различных биосубстратов, ингибирование ферментов, изменение структуры и свойств гормонов и их рецепторов, деструкцию белков и липидов клеточных мембран.

Естественной защитой от этого вредного действия служит многокомпонентная антиоксидантная система, которая обеспечивает связывание и модификацию радикалов, предупреждение образования и разрушение перекисей. В ее состав входят тканевые окислительно-восстановительные тиолдисульфидная и аскорбатная системы, ферменты, поддерживающие гомеостаз этих систем и обеспечивающие взаимосвязь их с основными путями поступления восстановленных форм нуклеотидов из пентозофосфатного пути, цикла Кребса, гликолиза и  $\beta$ -окисления жирных кислот; антиперекисные ферменты (каталаза, пероксидазы и супероксиддисмутаза), а также гидрофобные антиоксиданты — токоферол, полифенолы, стероидные гормоны, урбинон и др. [1, 7, 11].

Таким образом, функционирование

АОС направлено на поддержание неспецифической резистентности организма к действию патогенных факторов окружающей среды. Другими словами, АОС является универсальной адаптивной системой организма.

Целью данной работы явилось изучение состояния неферментативного и ферментативного звеньев АОС при длительном воздействии шума в условиях эксперимента.

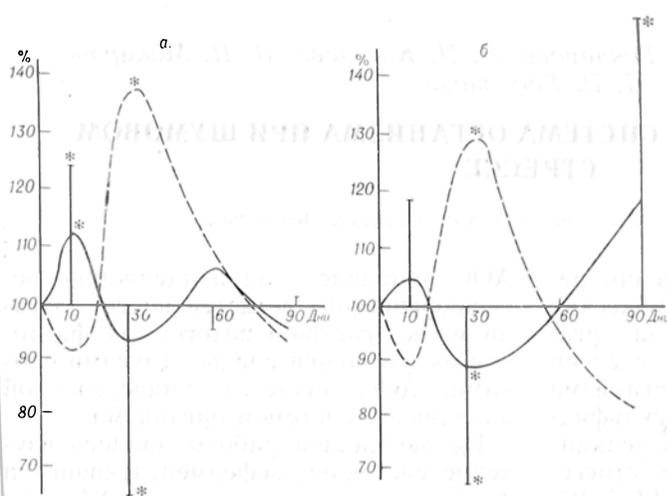
### Методика

Эксперимент проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 200—220 г. Животных подвергали действию шума (по 3 ч ежедневно в течение 3 мес). Стабильный шум с уровнем интенсивности 90 дБ создавали с помощью генератора типа Г-2-12, усилителей LV-102 и акустической системы, разработанной ВНИИ радиоприема и акустики (Ленинград). Акустические измерения проводили<sup>1</sup> с помощью акустической аппаратуры фирмы «Brüel, Kjaer» (Дания).

В крови и ткани мозга животных 5, 10, 30, 60 и 90 дней воздействия шума определяли состояние окислительно-восстановительного равновесия в тиолдисульфидной и аскорбатной системах. Для этого определяли методом обратного амперометрического титрования содержание сульфгидрильных и дисульфидных групп, рассчитывали редокс-коэффициент SH/SS [7], содержание аскорбиновой кислоты (АК) и ее окисленных форм (ОФ), редокс-коэффициент АК/ОФ [6]. Определяли активность ферментов глутатионредуктазы (ГР; КФ 1.6.4.2), лактатдегидрогеназы (ЛДГ; КФ 1.1.1.27) [2], глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ; КФ 1.1.1.49) [2] и каталазы (КФ 1.1.1.6) [10]. Для оценки интенсивности ПОЛ измеряли скорость образования малонового диальдегида по тиобарбитуровому тесту [3].

Части животных одновременно с воздействием шума в течение 30 дней вводили внутримышечно комплекс антиоксидантов — урбинол (50 мг/кг), аскорбиновую кислоту (15 мг/кг) и  $\alpha$ -токоферол (15 мг/кг). Синхронно с подопытными группами животных проводили исследования у контрольных. Данные обрабатывали статистически по методу Стьюдента и непараметрическому критерию Вилкоксона.

<sup>1</sup> Работу выполняли совместно с Е. Н. Кадьскиной; каф. гигиены труда Ленинградского санитарно-гигиенического медицинского института.



Изменение содержания тиоловых и дисульфидных групп небелковой фракции крови (а) и мозга (б) крыс при действии шума с уровнем интенсивности 90 дБ в течение 3 мес.

Пунктирная кривая — содержание SS-групп; сплошная — содержание SH-групп. Прямая линия — коэффициент SH/SS (в % к контролю, принятому за 100). Звездочкой обозначены статистически достоверные различия.

## Результаты и обсуждение

При длительном воздействии шума динамика изменения содержания окисленных и восстановленных форм низкомолекулярных тиолов, содержащихся в небелковой фракции ткани мозга и крови и представленных глутатионом, эрготионеином, цистеином и другими тиолами, имела выраженный фазовый характер (см. рисунок). Увеличение содержания одних форм сопровождалось снижением других, что свидетельствовало об их обратимой окислительной модификации под влиянием стресс-фактора.

Окислительно-восстановительное равновесие в тиолдисульфидной системе крови претерпевало изменения от сдвига в сторону восстановления в первые 10 дней эксперимента и последующего резкого сдвига в сторону окисления до постепенной нормализации к 90-му дню действия шума. Аналогичные изменения установлены и для тиолдисульфидной системы ткани мозга, однако увеличение тиолового редокс-коэффициента в 1,5 раза к 90-му дню воздействия шума свидетельствовало об активизации синтетических процессов, о чем позволяет думать увеличение суммарного содержания тиолов в небелковой фракции мозга до  $2,15 \pm 0,07$  ммоль/г против  $1,98 \pm 0,04$  ммоль/г в контроле ( $p=0,05$ ).

Длительное действие шума вызывало сходные колебания окислительно-восстановительного равновесия в аскорбатной системе крови и тканей крыс. Так, изменение коэффициента АК/ОФ для ткани надпочечников,

крови и мозга составляло соответственно 172,6, 124,0 и 171,0 % к 10-му дню действия шума, 69,0, 65,2 и 123,0 % к 30-му дню, 107,1, 142,5 и 87,5 % к 90-му дню относительно контроля, принятого за 100.

Таким образом, первоначальный общий для всех исследованных тканей сдвиг равновесия в аскорбатной системе в сторону восстановления сменялся противоположным эффектом с последующим подъемом аскорбатного редокс-коэффициента для ткани надпочечников и крови и продолжением снижения его для ткани мозга.

Характер изменений в тиолдисульфидной и аскорбатной системах организма при длительном действии шума свидетельствует об участии неферментативного звена АОС в неспецифических реакциях адаптации к действию фактора. Этот вывод подтверждается фазовым изменением активности ферментов, поддерживающих гомеостаз тканевых окислительно-восстановительных систем. Угнетение АОС при действии шума с уровнем интенсивности 90 дБ к 30-му дню, сдвиг окислительно-восстановительного равновесия в сторону окисления сопровождался в ткани мозга снижением активности каталазы, Г-6-ФДГ, ГР на фоне активации процессов ПОЛ. Сходные изменения наблюдались и в крови, за исключением ферментов ЛДГ и Г-6-ФДГ, функционирование которых обусловлено, по-видимому, особенностями обмена эритроцитов.

Одновременное с воздействием шума введение крысам комплекса антиоксидантов препятствовало проявлению

Изменение содержания компонентов АОС ткани мозга и крови крыс при сочетании действия шума и комплекса антиоксидантов

Показатель	Контроль	Шум	Шум + антиокси- данты
<b>Мозг</b>			
SH-группы, мкмоль/г	1,03±0,001	0,91±0,04*	1,04±0,02
SS-группы, мкмоль/г	0,27±0,004	0,35±0,04*	0,23±0,03
SH/SS	3,81	2,60	4,52
Каталаза, нмоль/(г·с)	15,83±0,50	12,50±0,67*	17,17±1,00
Г-6-ФДГ, нмоль/(г·с)	301,7±25,0	205,0±10,0*	236,7±8,3
ГР, нмоль/(г·с)	186,7±15,0	131,7±6,7	151,2±11,7
ЛДГ, мкмоль/(г·с)	6,99±0,17	6,27±0,34	7,31±0,37
ПОЛ, моль/(г·с)	19,8±1,5	25,0±1,3*	21,5±1,2
<b>Кровь</b>			
SH-группы, ммоль/л	1,20±0,00	1,12±0,06*	1,09±0,03
SS-группы, ммоль/л	0,29±0,02	0,41±0,05*	0,33±0,03
SH/SS	4,14	2,73	3,30
Каталаза	682,3±53,7	399,8±31,0*	546,3±48,5
Г-6-ФДГ	47,0±4,2	63,5±4,5*	63,5±4,5*
ЛДГ, нмоль/(г·с)	373,0±21,8	477,3±35,0*	436,7±49,8
ГР	33,0±3,3	22,0±3,0	27,0±2,0

\*  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

признаков угнетения АОС, что выразилось в тенденции к нормализации процессов ПОЛ и функционирования ферментных путей обеспечения АОС восстановленными формами нуклеотидов — пентозофосфатного пути, гликолиза (см. таблицу).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об участии ферментативных и неферментативных компонентов АОС в адаптивной реакции организма к действию шума. Это согласуется с данными о том, что окислительно-восстановительные процессы и АОС играют определенную роль в молекулярных механизмах неспецифической резистентности. Введение комплекса антиоксидантов, в частности унитиола и аскорбиновой кислоты, можно рассматривать как один из подходов к повышению неспецифической резистентности организма в условиях действия интенсивного шума.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Воскресенский О. Н., Жутаев И. А., Бобырев В. Н., Безуглый Ю. В. // *Вопр. мед. химии.* — 1982. — № 1. — С. 14—27.
2. Кочетов Г. А. *Практическое руководство по энзимологии.* — М., 1980.
3. Ланкин В. З., Гуревич С. Н., Бурлакова Е. Б. // *Биоантиоксиданты.* — М., 1975. — С. 73—78.
4. Меерсон Ф. З. *Адаптация, стресс и профилактика.* — М., 1981.
5. Методы биохимических исследований (ли-

пидный и энергетический обмен) / Под ред. М. И. Прохоровой. — Л., 1982.

6. Соколовский В. В., Лебедева Л. В., Лиэ-лун Т. Б. // *Лаб. дело.* — 1974. — № 3. — С. 160—162.
7. Соколовский В. В., Белозерова Л. А., Огурцова Р. Е. // Там же. — 1977. — № 1. — С. 26—27.
8. Соколовский В. В. // *Тиоловые соединения в биохимических механизмах патологических процессов.* — Л., 1979. — С. 3—9.
9. Соколовский В. В. // *Антиоксиданты и адаптация.* — Л., 1984. — С. 3—17.
10. Bergmeyer H. U. // *Methods of Enzymatic Analysis.* — New York, 1963. — P. 886—888.
11. Pandeya S. N. // *J. Sci. industr. Res.* — 1979. — Vol. 38. — P. 568—593.

Поступила 04.08.86

#### ALTERATIONS IN SOME PATTERNS OF THE ANTIOXIDANT SYSTEM UNDER CONDITIONS OF NOISE STRESS

V. V. Sokolovsky, L. L. Goncharova, N. N. Kiseleva, I. N. Makarova, L. P. Rodionova

Sanitary-Hygienic Medical School, Leningrad

Some patterns of the antioxidant system were altered in rat blood and tissues after treatment with noise of 90 dB. Phase alterations were found in content of SH- and SS-groups, in ascorbate-dependent redox balance as well as in activity of glutathione reductase, glucose-6-phosphate- and lactate dehydrogenases. These data suggest that the antioxidant system is of importance in the adaptation reactions. Administration of antioxidant drugs (unitol, ascorbic acid and tocopherol) normalized the antioxidant drugs (unitol, ascorbic acid and tocopherol) normalized the antioxidant system patterns studied. These drugs could be used to enhance the nonspecific body resistance to noise stress.

В. П. Голубев, В. Л. Козельцев, Г. А. Грибанов

## БИОДЕГРАДАЦИЯ ЛИПИДОВ УЛЬТРАСТРУКТУР КЛЕТОК ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ АУТОЛИЗЕ

НИЛ биологических структур Минздрава СССР, Москва, Кафедра органической и биологической химии Калининского университета

К настоящему времени достаточно полно изучены морфологические и электронно-микроскопические проявления аутолиза различных органов, тканей и их ультраструктур [10]. Биохимические исследования деградации отдельных химических компонентов клеток и их субклеточных структур в ходе аутолиза пока еще немногочисленны [10, 19].

Большой интерес проявляется к липидному компоненту клеток — важнейшему компоненту всех клеточных мембран, осуществляющих, как известно, компартиментализацию и интеграцию метаболизма внутри них [1, 12, 13]. В литературе имеются сведения о том, что характер посмертных изменений липидов в разных органах различен [19]. Ранее было показано, что катаболизм отдельных классов липидов в надпочечных железах, печени и некоторых их ультраструктурах протекает неоднотипно [2, 5—8].

В настоящей работе предпринята попытка проследить динамику катаболических изменений липидов в различных ультраструктурах печени крыс в ходе посмертного аутолиза.

### Методика

Эксперименты проведены на белых крысах-самцах. Получение и очистку субклеточных структур проводили по общепринятым методикам [11] из 10 % гомогената, приготовленного на трис-HCl сахарозном буфере pH 7,4. Липидный спектр субклеточных структур клеток печени анализировали сразу после выделения и через 3, 13, 22 и 48 ч инкубации в стерильных условиях при 37 °С. Экстракцию и очистку липидов от нелипидных примесей проводили по методу [17]. Изменения липидного профиля в ходе аутолиза анализировали с помощью микрометодов, описанных ранее [3, 4].

### Результаты и обсуждение

Как видно из табл. 1, количество общих липидов (ОЛ) во всех субклеточных структурах, кроме лизосом, несколько увеличивается к 3-му часу инкубации, что может отражать сохранение синтетического потенциала ульт-

раструктур в отношении липидов, а в некоторых случаях и его стимуляцию. Существуют указания на то, что лактат и ацетат, количество которых при аутолизе органов и тканей возрастает [9, 10], могут стимулировать синтез жирных кислот с включением их в фосфолипиды (ФЛ) и триглицериды (ТГ) [15, 18].

К 13-му часу инкубации содержание ОЛ снижается во всех органеллах, особенно значительно в микросомах и лизосомах, с постепенным нарастанием к концу 1-х суток. К концу 2-х суток количество ОЛ в ядрах существенно не изменяется, в митохондриях (МХ) — значительно возрастает, а в лизосомах и микросомах резко снижается. По-видимому, это объясняется выраженными катаболическими изменениями липидов в указанных фракциях.

Анализируя изменения отдельных липидных компонентов в различных ультраструктурах, можно отметить, что в ядрах клеток печени (табл. 2) выявлены все основные классы липидов с преимущественным содержанием ФЛ — около 60 % суммы липидов, свыше 20 % представлено холестерином (ХС) и его эфирами (ЭХС) с преимуществом свободного над этерифицированным. Сравнительно много в них определялось диглицеридов (ДГ) (около 11 %). ТГ составляли около

Таблица 1

ОЛ субклеточных структур печени крыс при аутолизе (в мкг на 1 мл суспензии)

Органеллы	Длительность аутолиза, ч		
	0	3—4	22
Ядра	370±28	490±31* (132)	470±29* (127)
МХ	975±53	1175±102	1075±98
Лизосомы	380±22	310±35	330±25
Микросомы	380±22	500±49	240±20* (63)

Примечание. Здесь и в табл. 2—5: за 100 % принято значение в нулевой точке. В скобках — изменения (в %). Одна звездочка —  $p < 0,05$ , две —  $p < 0,01$ .

Липиды ядер печени крыс при аутолизе

Липиды	Длительность аутолиза, ч					
	0	1	3-4	13	22	48
ФЛ	56,2±10,1	71,3±11,1	67,7±2,2	34,1±3,7* (60)	40,2±2,6	43,3±3,8
ДГ	11,2±2,0	10,7±1,5	10,5±1,3	3,4±0,9* (30,3)	6,6±1,0	4,2±1,1* (37,5)
ХС	13,4±2,5	8,8±1,3	9,3±0,9	7,1±2,0	8,1±1,5	4,6±0,8* (34,3)
СЖК	5,3±1,2	3,4±0,9	18,9±4,8* (339)	49,5±3,9** (934)	41,1±4,1** (775)	42,9±3,8** (809)
ТГ	6,9±1,8	1,9±0,4* (27,5)	3,6±1,0	1,9±0,3* (27,5)	2,2±0,3* (32)	2,5±0,2* (36,2)
ЭХС	7,0±1,4	3,9±0,8	1,4±0,2* (20)	4,0±0,8	1,8±0,6* (26)	3,0±0,8

7 %, свободные жирные кислоты (СЖК) — 5 %. В ходе аутолиза ядер на ранних сроках (3 ч) относительное содержание ФЛ и СЖК в них несколько возрастало при параллельном снижении концентрации ТГ и особенно ДГ. Количество других фракций липидов практически не изменялось. Во все другие сроки аутолиза концентрация ФЛ прогрессивно снижалась. Содержание ТГ оставалось крайне низким. Относительное количество СЖК резко возрастало уже к 13 ч аутолиза ядер и составляло 40 % и более от общего количества липидов. Содержание ХС резко снижалось лишь к концу 2-х суток инкубации, а начало интенсивного гидролиза ЭХС отмечалось уже к 22 ч аутолиза. Интересно отметить, что содержание ДГ резко снижалось к 13 ч инкубации и снова возрастало к концу 2-х суток аутолиза. Рассматривая представленные данные с точки зрения ацилгидролазной активности ядер в отношении эндоген-

ных субстратов (ФЛ, ТГ и ЭХС), можно отметить, что фосфолипазная активность наиболее выражена к 13 ч аутолиза и в поздние сроки его остается относительно высокой. В литературе имеются указания на возможность использования эндогенных субстратов для оценки фосфолипазной активности [16]. Триглицеридлипазная активность увеличивается уже к 3 ч аутолиза, холестеролэстеразная — к 22 ч аутолиза и позднее.

МХ клеток печени (табл. 3) содержат такой же набор липидов. В них определяется меньше ХС, но найдено более 13 % СЖК, что в 2 раза превышает их количество в ядрах. В процессе аутолиза в МХ содержание ФЛ, ХС и ЭХС в ранние сроки (3 ч) изменяется незначительно, тогда как количество ДГ и ТГ возрастает. В последующие сроки (13 и 22 ч) содержание ФЛ прогрессивно снижается с некоторым нарастанием их к 48 ч. Содержание ХС и ЭХС в ходе аутолиза изменяется

Таблица 3

Липиды МХ печени крыс при аутолизе

Липиды	Длительность аутолиза, ч				
	0	3	13	22	48
ФЛ	58,3±3,7	46,4±1,2* (79,6)	32,1±3,6* (55)	36,1±2,4* (62)	46,6±1,8* (79,9)
ДГ	6,7±0,8	10,0±1,5 (149)	3,3±0,4* (49)	10,2±1,7	8,3±0,9
ХС	6,6±1,4	3,6±0,3* (54,5)	8,8±1,2	6,9±0,9	3,2±0,3* (48)
СЖК	13,2±1,5	14,5±1,8	48±0,5** (363)	39,8±2,8** (301)	28,9±2,9* (218)
ТГ	7,2±0,8	21,8±3,2* (302)	2,7±0,3* (37,5)	3,3±0,3* (45)	3,9±0,4* (54,2)
ЭХС	8,0±1,2	3,7±0,4* (46,2)	5,1±0,3	3,7±0,6* (46,2)	9,1±2,1

Липиды лизосом печени крыс при аутолизе

Липиды	Длительность аутолиза, ч				
	0	4	13	22	48
ФЛ	50,8±1,0	50,8±4,9	45,7±4,6	43,1±4,2	26,4±3,1* (57,9)
ДГ	7,3±1,8	7,1±1,3	2,5±0,3* (34,2)	7,5±2,1	2,4±0,4* (32,9)
ХС	7,7±0,9	7,7±1,0	7,2±0,9	7,5±1,5	12,1±1,3
СЖК	10,4±0,9	13,5±1,8	21,5±2,5* (206,7)	29,2±2,6* (280)	42,8±4,8* (111)
ТГ	13,2±1,5	13,6±1,6	12,1±1,4	10,4±1,5	4,3±0,8** (32,6)
ЭХС	9,3±1,8	4,0±0,4* (43)	6,1±0,8	2,3±0,4* (25)	5,2±0,8 (56)
МЭ	1,3±0,3	3,3±1,2	4,9±0,5* (376)	—	6,8±0,8** (523)

мало, причем содержание ЭХС изменялось в колебательном режиме, что может указывать на устойчивость этих компонентов МХ в процессе их переживания. Содержание ТГ к 13 ч аутолиза и далее резко снижается с параллельным нарастанием количества СЖК, уровень которых к концу 2-х суток аутолиза вновь несколько уменьшается. Отмеченные изменения можно объяснить тем, что в МХ в ходе аутолиза наиболее быстро активируются фосфолипазы, а затем триглицеридлипазы. Активность ферментов системы  $\beta$ -окисления в первые часы аутолиза (по крайней мере до 13 ч) может сохраняться с последующим резким угнетением в более поздние сроки. Выраженной холестеролэстеразной активности в МХ печени по убыви ЭХС в ходе аутолиза не выявлено.

В интактных лизосомах (табл. 4), как и в других ультраструктурах, ФЛ составляют более половины всех липидов. Общее количество ХС+ЭХС составляло около 17%. В них обнаруживается также много нейтральных липидов (ДГ и ТГ), составляющих в сумме более 20% ОЛ. В процессе аутолиза лизосом фосфолипидный компонент их подвергается гидролизу, в отличие от ядер и МХ, значительно позднее — к концу 2-х суток, когда количество их составляет немногим более половины исходной величины. В первые часы аутолиза мало изменяется и содержание нейтральных липидов, СЖК, ХС. Концентрация ЭХС уменьшается примерно в 2 раза. В последующие сроки (13—22 ч) содержание ТГ, ФЛ и особенно ЭХС снижается и параллельно

нарастает количество СЖК. К концу 2-х суток количество ТГ снижалось более чем на 50%. Уровни ФЛ, ДГ и ЭХС также составляли не более половины исходных значений, но содержание СЖК возросло до 42% общей суммы липидов. Создается впечатление, что на ранних сроках аутолиза ФЛ и ТГ самих лизосом довольно стойки к действию соответствующих ацилгидролаз, но они резко активируются (в большей степени, чем в других ультраструктурах) к концу 2-х суток аутолиза, что может быть связано с разрушением структуры лизосом. Аналогичные данные были получены и другими авторами [14] для лизосом печени, а также в наших работах, выполненных ранее на лизосомных препаратах печени и некоторых эндокринных органов [8].

Липидный спектр микросомальной фракции (табл. 5) представлен теми же классами липидов, что и в других фракциях гомогената. Более 45% ОЛ в них представлено ФЛ. В микросомах, как и в ядрах, отмечено большее по сравнению с другими фракциями, содержание ХС и ЭХС (до 15 и 7% соответственно). В ходе аутолиза за первые 3 ч в микросомах, как и в ядрах, наблюдалось значительное накопление ФЛ (до 64% общей суммы липидов) и параллельно значительное снижение количества других ацилсодержащих липидов (ТГ). ДГ в этот период вообще не выявлялись. Поскольку обмен этих групп липидов тесно взаимосвязан, вполне вероятно, что СЖК, освобождающиеся при гидролизе ТГ и ЭХС, могут быть использована-

Липиды микросом печени крыс при аутолизе

Липиды	Длительность аутолиза, ч				
	0	4	13	22	48
ФЛ	45,3±2,2	64,6±2,1* (141)	45,3±3,1	47,4±5,2	39,3±2,9
ДГ	15,3±2,1	—	14,1±3,1	13,3±1,4	7,3±0,8* (47,7)
ХС	12,9±1,5	13,7±2,4	11,2±2,1	9,5±1,8	8,5±1,5
СЖК	8,3±0,9	11,1±0,2	16,9±1,8* (204)	22,1±2,9* (266)	33,2±4,1** (400)
ТГ	11,5±1,2	5,3±1,7* (46,1)	6,7±0,4* (58,3)	3,5±0,3* (30,4)	6,6±1,0* (57,4)
ЭХС	6,7±0,8	5,9±1,6	5,8±0,6	4,2±0,5* (62,7)	5,1±1,0

ны для новообразования ФЛ в мембранах микросом печени. К 13 ч аутолиза и далее содержание ТГ не превышало 50 % исходных значений. Концентрация ФЛ до конца 1-х суток аутолиза мало отличалась от первоначальных величин и несколько снижалась лишь к концу 2-х суток аутолиза. Содержание ДГ в последующие сроки снижалось. Количество ХС в ходе аутолиза изменялось незначительно, а уровень ЭХС, снизившись к 22 ч аутолиза, снова несколько возрос к концу 2-х суток инкубации. Содержание СЖК увеличивалось лишь к концу 1-х суток и достигло к концу 2-х суток аутолиза 33 % общей суммы липидов. Представляется возможным считать, что в первые 3 ч аутолиза в микросомах может происходить интенсивный синтез ФЛ с участием СЖК, освобождающихся при гидролизе ТГ и других ацилсодержащих липидов. Распад ФЛ начинается лишь к концу 2-х суток. Тогда же отмечается и нарастание количества СЖК. По сравнению с другими ультраструктурами липидный компонент микросом является более стойким к процессам биodeградации в ходе аутолиза. Более того, фосфолипидацилгидролазная активность в микросомальной фракции печени в отношении эндогенных ФЛ практически не нарастает до конца 2-х суток инкубации. В то же время ацилгидролазная активность в отношении эндогенных ТГ и частично ЭХС сохраняется.

Приведенные данные позволяют сделать вывод, что липидный компонент в изолированных аутолизующихся ультраструктурах печени, как и в других органах, подвергается неоднотип-

ным изменениям, характер которых определяется наличием соответствующих ацилгидролаз, трансацилаз, липопротеидлиаз, активирующихся в различные сроки аутолиза.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Влияние липидов мембран на активность ферментов / Бурлакова Е. Б., Джалябова М. И., Гвахария В. О. и др. — Черноголовка, 1978.
2. Голубев В. П., Грибанов Г. А., Володина Т. В., Козельцев В. Л. // Структура и функции лизосом. — Новосибирск, 1980. — С. 52.
3. Грибанов Г. А., Сергеев С. А. // Вопр. мед. химии. — 1975. — № 6. — С. 652—655.
4. Грибанов Г. А., Сергеев С. А., Алексенко А. С. // Лаб. дело. — 1976. — № 12. — С. 724—727.
5. Грибанов Г. А., Капитанов А. В. // Структура и функции лизосом. — М., 1976. — С. 47.
6. Грибанов Г. А. // Вопр. мед. химии. — 1977. — № 3. — С. 381—385.
7. Грибанов Г. А. // Липиды биологических мембран. — Ташкент, 1980. — С. 47.
8. Грибанов Г. А., Капитанов А. В. // Структура и функции лизосом. — Новосибирск, 1980. — С. 55.
9. Лопухин Ю. М., Коган Э. М. Критерии жизнеспособности органов и тканей перед трансплантацией. — М., 1974.
10. Лушников Е. Ф., Шапиро Н. А. Аутолиз. — М., 1974.
11. Методы практической биохимии / Под ред. Р. Уильямса, К. Уилсона: Пер. с англ. — М., 1978.
12. Поликар А., Бесси М. Элементы патологии клетки: Пер. с франц. — М., 1970.

13. Финейн Д., Колман Р., Мичелл Р. Мембраны и их функции в клетке: Пер. с англ. — М., 1977.
14. Beckman J., Owens K., Weglicki W. // *Lipids*. — 1981. — Vol. 16, N 11. — P. 796—799.
15. Beynen A., Buechler K., Van der Molen A. et al. // *Int. J. Biochem.* — 1982. — Vol. 14, N 3. — P. 165—169.
16. Bjørnstad P. J. // *J. Lipid Res.* — 1966. — Vol. 7, N 5. — P. 612—620.
17. Folch J., Lees M., Sloan-Stanley G. A. // *J. biol. Chem.* — 1957. — Vol. 226. — P. 497—509.
18. Gercken G., Trolz M. // *Pflügers Arch.* — 1981. — Bd 389. — Suppl. R-3.
19. Lindlar F. // *Z. klin. Chem. klin. Biochem.* — 1967. — Bd 5, N 5. — S. 251—253.

Поступила 05.06.86

## BIODEGRADATION OF LIPIDS IN CELL ULTRASTRUCTURES OF RAT LIVER TISSUE IN AUTOLYSIS

V. P. Golubev, V. L. Kozel'tseva, G. A. Gribanov

Laboratory of Biological Structures, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow, Chair of Organic and Biological Chemistry, State University, Kalinin

Dynamics of various lipids turnover was studied in ultrastructures of rat liver cells within various periods of autolysis *in vitro*. Under conditions of autolysis the lipid component in isolated liver cell ultrastructures was dissimilarly altered; the type of these alterations depended apparently on presence of corresponding acyl hydrolases, transacylases, lipoprotein lipases activated within various periods of autolysis.

УДК 616.132+616.124.2]-008.939.629-02:616.831.83-02:615.844

А. Д. Ибатов, Г. Е. Данилов

## ИЗМЕНЕНИЕ ФРАКЦИОННОГО СОСТАВА КОЛЛАГЕНА АОРТЫ И СТЕНКИ ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА ПРИ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ РЕТИКУЛЯРНОЙ ФОРМАЦИИ МОЗГА

Устиновский медицинский институт

Актуальной проблемой медицины является изучение нейрогуморальной регуляции обмена веществ. Большое значение в регуляции функции симпатико-адреналовой и гипофизарно-надпочечниковой систем принадлежит ретикулярной формации. Электрическая стимуляция ретикулярной формации среднего мозга сопровождается увеличением содержания катехоламинов [1] и кортикостероидов [7] в периферической крови, а также повышением артериального давления [3]. Это может привести к изменению обмена соединительной ткани и основного ее структурного компонента — коллагена.

Цель данной работы — изучение изменений фракционного состава коллагена в аорте и стенке левого желудочка в условиях многократной продолжительной электрической стимуляции ретикулярной формации среднего мозга.

### Методика

Опыты проведены на 24 взрослых кроликах массой 2,5—3 кг. Всем животным под местной повозканной анестезией имплантировали bipolarные никромовые электроды по стереотаксической методике в ретикулярное ядро покрышки среднего мозга (AP+6; V-15; S-2,5). Животных брали в опыт через 12—14 дней после операции. Электрическую стимуляцию осуществляли импульсным током прямоуголь-

ной формы (3—4 В, 0,5 мс, 70 Гц, 1 ч) через день в течение 30 и 90 дней. В конце эксперимента животных забивали воздушной эмболией под эфирным наркозом и проводили гистологический контроль локализации электродов. В крови, которую брали в динамике эксперимента, определяли катехоламины [5], 11-оксикортикостероиды (11-ОКС) [13], свободный и связанный оксипролин [9]. В стенке грудного отдела аорты и левого желудочка исследовали содержание свободного и суммарного оксипролина [8], нейтрально-солеорастворимой (СРК), цитраторастворимой (ЦРК) и нерастворимой (НРК) фракций коллагена [6].

### Результаты и обсуждение

В 1-й день электростимуляции ретикулярной формации среднего мозга концентрация адреналина и норадреналина (табл. 1) уменьшалась соответственно на 53,8 и 44,2 %, затем увеличивалась в течение 10—40 дней, превышая контрольные данные соответственно на 83,4 и 74,2 %. В последующем уровень адреналина и норадреналина снижался до нормального. Содержание 11-ОКС в первые 10 дней уменьшалось на 29,3 %, затем восстанавливалось до нормы. На 40-й и 60-й дни эксперимента уровень 11-ОКС повысился соответственно на 26,4 и 49,3 %, а к 90-му дню снизился до исходного уровня.

В ходе длительной электрической стимуляции содержание свободного

Таблица 1

Влияние электростимуляции ретикулярной формации среднего мозга на концентрацию гормонов надпочечников, свободного и связанного оксипролина в плазме крови

День опыта	Адреналин, нмоль/л	Норадреналин, нмоль/л	11-ОКС, мкг/л	Свободный оксипролин, мкмоль/л	Связанный оксипролин, мкмоль/л
Контроль	2,77±0,20	15,8±1,05	75,7±6,56	10,7±0,40	6,96±0,28
1-й	1,28±0,23*	8,83±1,30*	53,5±7,47*	8,93±0,65*	6,25±0,68
10-й	4,80±0,26*	27,5±1,57*	58,0±3,14*	10,1±0,78	7,53±0,93
20-й	5,06±0,17*	21,8±2,42*	67,6±12,43	9,72±1,00	10,4±1,15*
30-й	4,49±0,08*	14,5±1,85	85,4±9,16	9,67±0,92	8,68±0,57*
40-й	5,08±0,25*	27,0±3,91*	95,7±8,19*	12,0±0,21*	7,33±0,75
60-й	3,45±0,25	17,4±1,31	113±9,76*	13,8±0,23*	4,8±0,16*
90-й	2,82±0,33	18,4±1,16	84,3±6,68	12,4±0,30*	5,42±0,12*

Примечание. Здесь и в табл. 2 звездочкой отмечены показатели, достоверно ( $p < 0,05$ ) отличающиеся от контрольных.

оксипролина в плазме крови уменьшилось в 1-й день на 16 %, а на 40—90-й день возросло на 30 %; уровень связанного оксипролина повышался на 20—30-й день максимально на 50 %, затем снижался на 60—90-й день эксперимента на 30 %.

На 30-й день электрической стимуляции ретикулярной формации в ткани аорты (табл. 2) отмечалось увеличение содержания ЦРК, НРК и суммарного оксипролина соответственно на 42, 51 и 42 %; к концу 3-го месяца возрастал уровень свободного оксипролина и СРК соответственно на 49 и 58 %; содержание ЦРК, НРК и суммарного оксипролина оставалось повышенным. В стенке левого желудочка к 30-му дню электростимуляции достоверных изменений в содержании и фракционном составе коллагена не наблюдалось. К 90-му дню опытов уровень свободного оксипролина, СРК и ЦРК повышался соответственно на 25—30 %, а содержание НРК и суммарного оксипролина уменьшалось на 20 %.

Электрическая стимуляция ретикулярной формации среднего мозга приводит к прессорной реакции со стороны сердечно-сосудистой системы [3], которая сопровождается структурными изменениями в соединительной ткани стенки артерий, накоплению в них коллагена [15]. Однако увеличение концентрации глюкокортикоидов в периферической крови приводит к активации распада коллагена [4, 16]. В то же время гормоны мозгового слоя надпочечников нормализуют повышенный уровень продуктов катаболизма коллагена в крови [11], увеличивают степень агрегации этого биополимера [10].

Свободный оксипролин не включается в биосинтез коллагена, а образуется при распаде этого белка [4]. В то же время пептидосвязанный оксипролин является продуктом деградации растворимого коллагена [2, 14], который в свою очередь является предшественником зрелых форм основного биополимера соединительной ткани.

Таблица 2

Фракционный состав коллагена аорты и стенки левого желудочка при воздействиях на ретикулярную формацию среднего мозга (мг на 1 г сухой обезжиренной ткани)

Показатель	Аорта			Левый желудочек		
	контроль	30-й день	90-й день	контроль	30-й день	90-й день
Свободный оксипролин	0,158 ± 0,006	0,165 ± 0,010	0,236 ± 0,026*	0,078 ± 0,003	0,074 ± 0,013	0,101 ± 0,010*
СРК	1,30 ± 0,172	0,908 ± 0,077	2,06 ± 0,042*	0,403 ± 0,030	0,349 ± 0,041	0,527 ± 0,033*
ЦРК	0,27 ± 0,033	0,384 ± 0,027*	0,512 ± 0,057*	0,083 ± 0,006	0,066 ± 0,006	0,104 ± 0,005*
НРК	19,4 ± 1,52	29,2 ± 1,21*	25,7 ± 0,96*	6,53 ± 0,27	6,70 ± 0,24	5,25 ± 0,27*
Суммарный оксипролин	23,1 ± 2,19	32,7 ± 2,79*	28,9 ± 0,67*	8,62 ± 0,55	8,95 ± 0,99	6,83 ± 0,37*

Увеличение растворимых фракций коллагена в тканях говорит об активизации синтеза этого белка [12].

В условиях наших опытов в первые 30 дней электростимуляции ретикулярной формации происходит накопление коллагена в аорте, о чем свидетельствует увеличение НРК и суммарного оксипролина. В то же время увеличение пептидосвязанного оксипролина в крови говорит об усилении катаболизма растворимых фракций, однако этот процесс в значительной степени компенсируется синтезом основного белка соединительной ткани. Преобладание синтеза сохраняется и на 90-й день, несмотря на высокий уровень П-ОКС и усиление катаболизма зрелых форм коллагена, о чем свидетельствует повышение уровня свободного оксипролина как в стенке аорты, так и в плазме крови.

Со стороны соединительной ткани стенки левого желудочка наблюдается несколько иная реакция. На 30-й день электростимуляции выраженных изменений обмена коллагена не происходит. На 90-й день опытов высокое содержание свободного оксипролина и уменьшение НРК и суммарного оксипролина говорит о некомпенсированном усилении катаболизма коллагена в стенке левого желудочка, на фоне которого идет биосинтез, — это подтверждается ростом СРК и ЦРК.

В наших опытах увеличение концентрации П-ОКС в крови совпало с увеличением содержания свободного оксипролина — показателя катаболизма коллагена, что не противоречит данным литературы о направленности действия этих гормонов на обмен основного биополимера соединительной ткани. В то же время выявляется определенный параллелизм между подъемом уровня катехоламинов в крови и накоплением коллагена в аорте.

Таким образом, изменения обмена коллагена в стенке аорты и левого желудочка, вызванные многократной продолжительной электрической стимуляцией ретикулярной формации среднего мозга, связаны, по-видимому, с гипертензивной реакцией и изменением уровня гормонов надпочечников в периферической крови.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бару А. М., Воробьева Т. М. // Физиология и патофизиология лимбико-ретикулярной системы. — М., 1971. — С. 236—239.
2. Дормидонтов Е. Н., Баранова Э. Я., Коршунов П. И. // Вопр. ревмат. — 1979. — № 4. — С. 53—58.
3. Лодыгина Н. Д., Данилов Г. Е. // Физиол. журн. СССР. — 1974. — Т. 60, № 5. — С. 793—798.
4. Мазуров В. И. Биохимия коллагеновых белков. — М., 1974.
5. Матлина Э. Ш., Меньшиков В. В. Клиническая биохимия катехоламинов. — М., 1967.
6. Прошина Л. Я., Приваленко М. П. // Вопр. мед. химии. — 1982. — № 1. — С. 115—119.
7. Филаретов А. А. // Физиол. журн. СССР. — 1974. — Т. 60, № 8. — С. 1165—1169.
8. Шараяев П. П., Богданов П. Г., Ямолдинов Р. П. // Бюл. экспер. биол. — 1976. — № 6. — С. 665—666.
9. Шараяев П. П. // Лаб. дело. — 1981. — № 5. — С. 283—285.
10. Grant N. H., Alburn H. E. // Biochemistry (Wagh.). — 1965. — Vol. 4, N 7. — P. 1271—1276.
11. Kunz V., Kreher C., Braselmann H. et al. // Dtsch. Z. Verdau.- u. Stoffwechsellkr. — 1978. — Bd 58, N 5. — S. 227—229.
12. Lapiere C., Nusgens B. // Biochemistry of collagen. — New York, 1976. — P. 377—448.
13. Moor P. de, Steeno O., Raskin M., Hendrix A. // Acta endocr. (Kbh.). — 1960. — Vol. 33. — P. 297—307.
14. Negelschmidt M., Struk H. // Med. Welt. — 1977. — Bd 28, N 7. — S. 334—335.
15. Oshima A., Tuller G., Cardinale G. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1974. — Vol. 71, N 8. — P. 3019—3023.
16. Pinnel S. P. // J. invest. Derm. — 1982. — Vol. 79, N 1. — P. 73—76.

Поступила 10.06.86

### ALTERATION IN CONTENT OF VARIOUS COLLAGEN FRACTIONS UNDER CHRONIC ELECTROSTIMULATION OF THE BRAIN RETICULAR SYSTEM

A. D. Ibatov, G. E. Daniilov

Medical School, Ustinov

Concentration of catecholamines, П-hydrocorticosteroids, free and bound hydroxyproline in blood, free and total hydroxyproline, fractions of collagen were studied in left heart ventricular wall and aorta of rabbits after long-term electrostimulation of the mesencephalic reticular system. Alterations of collagen metabolism in left heart ventricular wall and aorta, caused by electrostimulation of reticular system, occurred due to hypertension and to change in content of adrenal hormones in peripheral blood stream.

А. М. Тырышкин, Э. В. Сапрыкина, Б. Ю. Сальник

## ПРОНИЦАЕМОСТЬ И ФОСФОЛИПИДНЫЙ СОСТАВ МЕМБРАН МИТОХОНДРИЙ СЕМЕННИКОВ КРЫС ПРИ АЛЛОКСАНОВОМ ДИАБЕТЕ

Томский медицинский институт

Количественные изменения содержания фосфолипидов сопровождаются расстройством микроструктуры, физико-химических свойств и основных функций биологических мембран. Есть сведения об изменении при аллоксановом диабете соотношения отдельных фракций фосфолипидов в митохондриях печени крыс [5, 7].

Ранее нами были обнаружены существенные нарушения функциональной активности митохондрий тестикул крыс при аллоксановом диабете [10]. Не исключено, что одной из причин этих нарушений явились изменения соотношений фосфолипидов в мембранах органелл и как следствие повышение протонной проводимости внутренней мембраны митохондрий, рассеяние электрохимического градиента протонов и повреждение сопряжения процессов переноса электронов по дыхательной цепи и фосфорилирования АДФ.

Задача настоящей работы — изучение фосфолипидного состава и проницаемости мембран митохондрий тестикул крыс для протонов и цитохрома С в условиях аллоксанового диабета.

### Методика

Исследования проводили на бестарых белых крысах-самцах массой 180—220 г. Диабет вызывали однократным подкожным введением аллоксана (200 мг на 1 кг массы тела). В группе подопытных животных концентрация глюкозы в крови была равна  $21,5 \pm 1,2$  мМ, в контроле —  $6,3 \pm 0,5$  мМ. Митохондрии из ткани семенников выделяли по [14]. Среда выделения содержала 0,25 М сахарозы, 1 мМ ЭДТА pH 7,4. Скорость дыхания митохондрий регистрировали полярографическим методом при 26 °С в кювете емкостью 1 мл в среде следующего состава: 0,2 М сахарозы, 10 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 7 мМ  $\text{MgCl}_2$ , pH 7,4. Субстрат окисления — сукцинат (конечная концентрация 10 мМ). АДФ добавляли в конечной концентрации 200 мкМ,  $\text{FeSO}_4$  — 50 мкМ, цитохром С — 0,5 мг/мл. Среда выделения митохондрий для проведения проб с ионами  $\text{Fe}^{2+}$  вместо ЭДТА содержала 1 мМ ЭГТА. О проницаемости мембран митохондрий для ионов  $\text{H}^+$  судили по величине спонтанного набухания митохондрий в изотоничной аммонийной среде, со-

державшей 0,1 М  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 5 мМ трис-буфер pH 7,4 [11]. Изменение оптической плотности регистрировали спектрофотометрически (СФ-26) при длине волны 546 нм в течение 15 мин.

Для экстракции липидов суспензию митохондрий (0,1 мл) обрабатывали хлороформ-метанолевой смесью (в соотношении 2 : 1). Отмывание липидного экстракта от нелипидных примесей проводили по [12]. В очищенном липидном экстракте определяли общее содержание фосфолипидов [9] и их отдельные фракции методом тонкослойной хроматографии на пластинках Silufol UV-254 (ЧССР). Для получения индивидуальных фосфолипидных компонентов использовали систему растворителей хлороформ — метанол — вода (в соотношении 65 : 25 : 4). Детектирование веществ на хроматограмме проводили 2 % спиртовым раствором фосфоромолибденовой кислоты с последующим проявлением пластинок при 80—100 °С. Количественную оценку хроматограмм осуществляли после элюции фосфолипидов хлороформ-этаноловой смесью (в соотношении 2 : 1) с добавлением концентрированной серной кислоты для усиления окраски.

Содержание митохондриального белка определяли биуретовым методом. Расчет дефицита цитохрома С в митохондриях проводили, как описано [1]. Результаты обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента, а также непараметрического критерия Вилкоксона — Манна — Уитни.

### Результаты и их обсуждение

Как видно на рис. 1, после добавления в полярографическую ячейку цитохрома С поглощение кислорода митохондриями тестикул крыс с аллоксановым диабетом в состоянии 3 по-

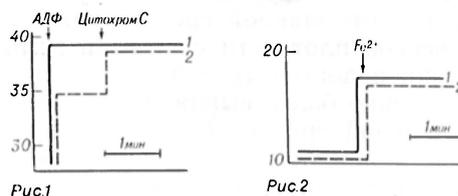


Рис. 1. Влияние экзогенного цитохрома С на скорость дыхания митохондрий тестикул крыс.

Здесь и на рис. 2 по оси ординат — скорость потребления кислорода в  $\text{нгА O}_2/\text{мин}/\text{мг}$  белка, по оси абсцисс — время; субстрат окисления сукцинат (10 мМ); 1 — контроль, 2 — диабет.

Рис. 2. Влияние ионов  $\text{Fe}^{2+}$  на скорость дыхания митохондрий тестикул крыс.

вышалось и достигало величины, характерной для митохондрий тестикул интактных животных. В то же время скорость дыхания митохондрий тестикул интактных крыс сохранялась в пределах исходных величин. Полученные данные позволяли предположить, что снижение скорости дыхания митохондрий тестикул крыс с диабетом при окислении сукцината в среде без экзогенного цитохрома С [10] в значительной степени было связано с уменьшением содержания в них эндогенного цитохрома С. Однако вопрос о том, когда происходило это изменение (в клетках тестикул диабетических крыс или на этапах выделения органелл), пока остается открытым. На основании полученных результатов можно лишь утверждать, что в митохондриях тестикул крыс с аллоксановым диабетом происходило по крайней мере ослабление прочности связывания эндогенного цитохрома С с внутренней мембраной митохондрий. В сочетании с повышением проницаемости наружной мембраны органелл для белковых молекул (о чем свидетельствовала активация дыхания изолированных митохондрий тестикул диабетических крыс экзогенным цитохромом С) это приводило, по-видимому, к «вымыванию» этого важного кофактора дыхательной цепи. В результате в митохондриях тестикул крыс с диабетом обнаруживался дефицит цитохрома С, который в наших экспериментах составил  $10,4 \pm 1,1$  %.

При исследовании протонной проводимости митохондриальных мембран нарушений исходной оптической плотности суспензии митохондрий тестикул диабетических крыс не установлено ( $0,445 \pm 0,018 E_{546}/\text{мг}$  белка в опыте и  $0,441 \pm 0,014 E_{546}/\text{мг}$  белка в контроле). Однако в процессе спонтанного набухания в аммонийной среде снижение оптической плотности суспензии митохондрий подопытных животных было значительно более выраженным, чем в контрольной группе. Так, уменьшение оптической плотности от исходной за 15 мин инкубации при диабете составляло  $10,9 \pm 0,9$  % против  $7,0 \pm 0,5$  % в контроле ( $p < 0,01$ ). Таким образом, при аллоксановом диабете повышалась проницаемость мембран митохондрий семенников крыс для протонов.

Одной из вероятных причин повы-

шения проницаемости мембран митохондрий для ионов и белковых молекул могла быть активация в них реакций перекисного окисления липидов (ПОЛ). Для выяснения роли процессов ПОЛ в механизмах повреждения структурной целостности мембран митохондрий тестикул крыс с аллоксановым диабетом было исследовано влияние на дыхание органелл ионов  $\text{Fe}^{2+}$ , являющихся, как известно, активаторами реакций ПОЛ. Увеличение потребления кислорода после добавления этих ионов в инкубационную среду, содержащую митохондрии, некоторые авторы рассматривают как показатель активности указанных процессов [3]. Как видно на рис. 2, добавление ионов  $\text{Fe}^{2+}$  в инкубационную среду, содержащую митохондрии, приводило к заметному увеличению скорости дыхания последних в присутствии сукцината. Это в равной степени относилось к митохондриям тестикул как крыс с аллоксановым диабетом, так и интактных крыс. Учитывая данные литературы о том, что в ткани семенников крыс при аллоксановом диабете происходит повышение активности каталазы [13], а также относительно высокое содержание в ткани семенников андрогенов, являющихся истинными антиоксидантами токоферольного типа [2], можно предположить, что в условиях экспериментального диабета активация процессов ПОЛ в ткани тестикул была, по-видимому, менее выражена, чем в ткани печени, для которой характерно значительное увеличение в этих условиях содержания гидроперекисей [4].

Важную роль в поддержании структурной целостности и нормального функционирования митохондрий тестикул, судя по результатам наших исследований, играет изменение фосфолипидного состава их мембран. При аллоксановом диабете значительно снижалось суммарное содержание фосфолипидов митохондрий, составляя  $3,24 \pm 0,45$  мкг Р/кг белка в опыте против  $6,64 \pm 0,57$  мкг Р/мг белка в контроле ( $p < 0,01$ ). Как видно из таблицы, выявленное нарушение происходило в результате резкого снижения содержания всех исследованных фракций фосфолипидов. На этом фоне установлено изменение соотношения отдельных фракций. Так, отмечено увеличение содержания лизофосфат-

Содержание фосфолипидов (в мкг липидного фосфора/мг белка) в митохондриальной фракции семенников крыс при аллоксановом диабете

Фракция фосфолипидов	Группа		P
	контрольная	опытная	
Лизофосфатидилхолин	0,79±0,074	0,45±0,077	0,01
Инозитфосфатид	0,53±0,045	0,27±0,042	0,01
Сфингомиелин	0,74±0,127	0,31±0,052	0,02
Фосфатидилхолин	1,69±0,267	0,70±0,118	0,01
Фосфатидилэтаноламин	1,47±0,166	0,69±0,114	0,01
Кардиолипин	0,76±0,080	0,45±0,074	0,05
Фосфатидные кислоты	0,65±0,083	0,32±0,039	0,01

идилхолина до  $15 \pm 1\%$  (в контроле  $12 \pm 1\%$ ;  $p < 0,05$ ) и кардиолипина до  $14 \pm 1\%$  (в контроле  $12 \pm 0,3\%$ ;  $p < 0,05$ ). Изменение содержания фосфолипидов могло быть связано с изменениями их биосинтеза. Не исключено также, что при недостатке утилизации глюкозы, наблюдавшемся при диабете, «центральные» метаболиты биосинтеза фосфолипидов — фосфатидные кислоты — через стадию образования диацилглицеринов превращались в триацилглицерины, которые могли служить в качестве дополнительного источника энергии. Повышение процентного содержания кардиолипина в митохондриальной фракции тестикул крыс при диабете, по-видимому, было обусловлено прочной связью с белками внутренней мембраны митохондрий. Известно, что кардиолипин обнаруживают в составе препаратов цитохромоксидазы [8], из которых его удается удалить лишь при самой жесткой экстракции. Накопление таких токсических продуктов деградации фосфолипидов, как лизоформы этих соединений, видимо, обусловлено действием эндогенной митохондриальной фосфолипазы  $A_2$ , активность которой при диабете повышена [6]. Можно также предположить, что повышение протонной проводимости внутренней мембраны митохондрий тестикул диабетических крыс было обусловлено увеличением относительного содержания лизофосфолипидов, которые могут выполнять функцию переносчиков одновалентных катионов [8].

Ранее нами было высказано предположение о наличии серьезных структурных повреждений в мембранах митохондрий тестикул крыс при аллоксановом диабете [10]. Представленные в настоящей работе данные свидетельствуют о нарушении барьерной функции мембран митохондрий тестикул крыс при этой патологии, что выразилось в повышении их проницаемости для ионов  $H^+$  и молекул цитохрома C. В результате могли происходить нарушение переноса электронов по дыхательной цепи и ухудшение сопряжения процессов дыхания и фосфорилирования АДФ в связи с рассеянием электрохимического градиента протонов на внутренней мембране митохондрий. Одной из основных причин отмеченных изменений, по-видимому, явилось нарушение количественного содержания фосфолипидов мембран органелл, а также соотношения их отдельных фракций.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Баласьявичюс Р. В., Толейкис А. И., Прашкявичюс А. К. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 2. — С. 130—132.
2. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М., 1972.
3. Владимиров Ю. А., Сулова Т. Б., Оленев В. И. // Митохондрии. — М., 1976. — С. 109—126.
4. Иванов В. В., Васенева И. В., Удинцев Н. А. // Пробл. эндокринологии. — 1984. — № 1. — С. 70—73.
5. Ишанходжаев Т. М., Борников В. Т., Зайнутдинов Б. Р., Саатов Т. С. // Там же. — № 6. — С. 56—59.
6. Карагезян К. Г., Вартамян Г. С., Паносян А. Г. // Бюл. eksper. биол. — 1981. — № 8. — С. 35—37.
7. Карагезян К. Г., Овсепян Л. М., Адонц К. Г. и др. // Вопр. мед. химии. — 1982. — № 5. — С. 56—60.
8. Микельсаар Х., Северина И. И., Скулачев В. П. // Успехи совр. биол. — 1974. — Т. 78, № 3. — С. 343—370.
9. Петрунькина Л. М. Практическая биохимия. — М., 1961.
10. Тырышкин А. М., Сальник Б. Ю., Долгих Е. В. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 3. — С. 82—85.
11. Brierley G. P., Stoner C. D. // Biochemistry (Wash.). — 1970. — Vol. 9, N 4. — P. 708—713.
12. Folch J. // J. biol. Chem. — 1957. — Vol. 226, N 1. — P. 497—509.
13. Malkovicz B., Varga Sz. I., Szabo L., Wilas H. // Horm. Metab. Res. — 1982. — Vol. 14, N 2. — P. 77—79.
14. Van der Vusse G., Kalkman M., van der Molen H. // Biochim. biophys. Acta. — 1974. — Vol. 348, N 3. — P. 404—414.

Поступила 30.06.86

Content of total phospholipids and their individual fractions was shown to decrease in testes mitochondria of rats with alloxane diabetes. These alterations appear to be responsible for an increase in permeability of the testes mitochondrial membranes for protons and cytochrome c under conditions of diabetes as compared with the control animals.

УДК 616.36-099-003.93-02:616.36-008.939.6

А. А. Чиркин, Н. Ю. Коневалова

## ДЕЙСТВИЕ ФАКТОРОВ, СТИМУЛИРУЮЩИХ ПРОЛИФЕРАЦИЮ, НА ЭСТЕРИФИКАЦИЮ ХОЛЕСТЕРИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС ПРИ ОСТРОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОМ

Кафедра биоорганической и биологической химии Витебского медицинского института

Через 48 ч после частичной гепатэктомии в цитозоле гепатоцитов обнаружены факторы, активирующие регенераторную гипертрофию печени. Предполагают, что эти факторы, стимулирующие пролиферацию (ФСП) гепатоцитов, являются набором термостабильных белков и низкомолекулярных веществ клеточного пула, которые имеются или появляются в печени после частичной гепатэктомии [1]. Показано, что ФСП активируют в 6 раз синтез ДНК в клетках регенерирующей печени через сутки после удаления части органа. В цирротически измененной печени аналогичный эффект проявляется позже — к 48-му часу наблюдения. При этом отмечаются продолжительное усиление синтеза ДНК в митохондриях, увеличение соотношения РНК/ДНК, повышение общего содержания РНК в печени [1, 2]. Это свидетельствует о целесообразности использования препарата ФСП для восстановления биосинтетических процессов в печени в условиях ее токсического поражения. В качестве токсического агента избран тетрахлорметан. Известно, что этот гепатотропный яд повреждает клетки печени за счет свободных радикалов, которые стимулируют реакции перекисного окисления фосфолипидов мембран [3, 7, 13]. Расщепление жирных кислот фосфолипидов сопровождается фрагментацией мембран, снижением активности микросомальных ферментов, торможением синтеза белков вследствие освобождения рибосом от мембран [9]. Повреждаются микросомальные гидроксилазные системы, катализирующие превращение холестерина в желчные кислоты, нарушается синтез компонентов

системы эстерификации холестерина в сыворотке крови [3, 6, 14]. Целью данной работы было изучение действия ФСП на процесс эстерификации холестерина в кровеносном русле при острой интоксикации тетрахлорметаном.

### Методика

Опыты поставлены на 145 белых крысах-самцах средней массой 150 г. Препарат ФСП получали из цитозоля клеток печени крыс через 48 ч после удаления  $\frac{2}{3}$  массы органа [1, 2]. Животные были разделены на 3 группы: 1-ю группу составили интактные крысы, 2-ю — животные, которым однократно внутривентрально ввели 0,2 мл смеси тетрахлорметана и оливкового масла в соотношении 1:1 (контрольная группа), 3-ю — крысы, которым однократно внутривентрально инъецировали 0,3 мл масляного раствора тетрахлорметана и 5 мл препарата ФСП (опытная группа). Исследованию подвергали сыворотку крови крыс, деканитированных через 1, 3, 7 и 15 сут после введения указанных препаратов. Кроме того, была поставлена контрольная серия исследований внутривентральным введением 5 мл физиологического раствора. Поскольку изменения у животных этой серии прослеживались лишь на протяжении 1-х суток, то данные этой группы в таблицах не приводятся. В сыворотке крови и липопротеидах высокой плотности (ЛПВП) определяли содержание общего и эфирно-связанного холестерина [11], оценивали уровень апо-В-содержащих липопротеинов и количество холестерина в них [12], исследовали эстерифицирующую холестерин активность сыворотки (ЭХАС) крови [19] и активность лецитинхолестеринацилтрансферазы (ЛХАТ, КФ 2.3.1.43) [16]. В качестве субстрата для определения активности ЛХАТ использовали протеиносомы, содержащие лецитин и холестерин в молярном отношении 250:12,5 и суммарный препарат апопротеинов — ЛПВП [4, 16]. Зависимость скорости ЛХАТ-реакции от концентрации субстрата определяли в диапазоне концентраций неэстерифицированного холестерина протеиносом от 125 до 2485 мкМ (8 концентраций). Полученный цифровой материал обработан методом вариационной статистики по Стьюдену — Фишеру.

Действие ФСП на содержание общего и эфирно-связанного холестерина (в мкМ) в сыворотке крови и ЛПВП крыс при острой интоксикации тетрахлорметаном

Срок наблюдения	Сыворотка крови				ЛПВП			
	общий холестерин		эфиры холестерина		общий холестерин		эфиры холестерина	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
До опыта	913 ± 48		447 ± 42		409 ± 22		206 ± 16	
Опыт, сутки:								
1-е	740 ± 32*	620 ± 68*	301 ± 62*	198 ± 8*	146 ± 30*	136 ± 38*	42 ± 8*	36 ± 5*
3-и	1365 ± 113*	1564 ± 169*	779 ± 85*	832 ± 18*	511 ± 83	370 ± 65	282 ± 37	117 ± 17**
7-е	1183 ± 85*	1530 ± 10**	770 ± 54*	983 ± 52**	520 ± 42*	675 ± 115*	305 ± 44*	106 ± 75**
15-е	1058 ± 137	1088 ± 65	558 ± 54	657 ± 58*	542 ± 166	528 ± 33*	189 ± 42	198 ± 78

Примечание. Здесь и в табл. 2 одна звездочка — различие достоверно по сравнению с исходными данными, две — по сравнению с контролем.

### Результаты и обсуждение

После однократного введения тетрахлорметана выявлены 3 фазы в динамике изменений содержания холестерина в сыворотке крови и ЛПВП (табл. 1). В первую фазу (24 ч) обнаружено уменьшение содержания общего холестерина и его эфиров, во вторую (3-и, 7-е сутки) — повышение общего и эфирно-связанного холестерина, в третью (15-е сутки) — нормализация этих показателей.

Известно, что у крыс 82 % холестерина образуется в печени, 10 % — в кишечнике и 8 % — в остальных органах [18]. Основная масса холестерина у крыс транспортируется в составе ЛПВП [5]. Следовательно, снижение уровня холестерина в первую фазу можно связать как с нарушением его биосинтеза поврежденной печенью, так и с резким уменьшением количества ЛПВП.

В начале второй фазы действия тетрахлорметана (3-и сутки) у контрольных и подопытных животных была выявлена одинаковая гиперхолестеринемия, связанная с повышением концентрации апо-В-содержащих липопротеидов: превышение исходного уровня у контрольных крыс на 52,9 %, у подопытных — на 47,5 %; увеличение содержания в них холестерина (1109 ± 89 мкМ у контрольных и 910 ± 37 мкМ у подопытных животных против 580 ± 58 мкМ у интактных крыс). При этом содержание холестерина в ЛПВП поднялось до исходного уровня. Следовательно, можно полагать, что на 3-и сутки наблюдения образование ЛПВП нормализуется, но рецепторно-опосредованный захват

апо-В-содержащих липопротеидов еще нарушен [17]. На 7-е сутки опыта гиперхолестеринемия сохранялась, вероятно, за счет накопления общего холестерина в ЛПВП. Вклад апо-В-содержащих липопротеидов в общую гиперхолестеринемию уменьшен, поскольку их количество нормализовалось, хотя содержание холестерина в них еще превышало исходный уровень (753 ± 53 у контрольных и 756 ± 34 мкМ у подопытных крыс). Поэтому можно считать, что на протяжении второй фазы действия тетрахлорметана происходила постепенная нормализация рецепторно-опосредованного захвата апо-В-содержащих липопротеидов печенью. Для подтверждения этого предположения необходимо проведение дополнительных исследований.

Третья фаза действия тетрахлорметана характеризовалась тенденцией к полной нормализации содержания холестерина в сыворотке и липопротеидах.

Таким образом, введение ФСП не изменило динамики холестеринемии по сравнению с таковой при введении одного гепатотропного яда. Имелось лишь количественное различие: на 7-е сутки наблюдения у подопытных крыс гиперхолестеринемия была выражена сильнее, чем у контрольных. При этом повышение уровня общего холестерина в сыворотке крови подопытных крыс по сравнению с контрольными (в среднем на 347 мкМ) происходило в основном за счет эфирно-связанного холестерина (в среднем на 213 мкМ) по сравнению с неэтерифицированным холестерином (в среднем на 134 мкМ). В то же время ЛПВП сыворотки крови подопытных крыс

Действие ФСП на ЭХАС крови крыс при острой интоксикации тетрахлорметаном

Срок наблюдения	ЭХАС				Активность ЛХАТ, мкмоль/л/ч	
	фракционная скорость, %		молярная скорость, мкмоль/л/ч		контроль	опыт
	контроль	опыт	контроль	опыт		
До опыта	7,5 ± 0,44		51,7 ± 5,15		46,7 ± 9,3	
Опыт, сутки:						
1-е	3,91 ± 1,14*	3,91 ± 0,53*	19,1 ± 4,94*	23,5 ± 3,56*	21,6 ± 8,0*	52,8 ± 10,5**
3-и	7,67 ± 0,53	11,48 ± 1,81*,**	66,0 ± 5,12	116,7 ± 14,8*,**	47,5 ± 4,4	43,3 ± 0,60
7-е	5,55 ± 0,58*	8,94 ± 0,96**	33,4 ± 4,79	73,5 ± 8,88*,**	80,4 ± 4,1*	94,9 ± 8,00*
15-е	3,74 ± 0,94	9,86 ± 2,39	43,7 ± 0,78	66,1 ± 19,6	43,4 ± 6,4	40,0 ± 5,70

Примечание. Активность ЛХАТ определяли при концентрации неэстерифицированного холестерина в протезолипосомах 6,2 нмоль на пробу, что соответствует содержанию неэстерифицированного холестерина в сыворотке крови 310 мкмоль/л (линейный участок кривой зависимости скорости реакции от концентрации субстрата).

были обеднены эфирами холестерина (содержание эфиров холестерина на 3-и сутки ниже исходных и контрольных значений, а на 7-е сутки — ниже контрольного уровня), хотя содержание общего холестерина в ЛПВП было нормальным (3-и сутки) или повышенным (7-е сутки). Известно, что такие частицы ЛПВП, приближающиеся по химическому составу к дискоидным или насцентным, проявляют лучшие субстратные свойства в ЛХАТ-реакции [20]. Поэтому можно предполагать, что после введения ФСП создаются условия для усиленного образования эфиров холестерина в кровеносном русле.

При прямых измерениях установлено, что в первую фазу действия тетрахлорметана выявлено снижение величины ЭХАС у крыс обеих групп (табл. 2). Активность ЛХАТ также достоверно уменьшилась у контрольных крыс, но осталась на исходном уровне у подопытных животных. С большой долей вероятности можно полагать, что снижение суммарной скорости эстерификации холестерина в сыворотке крови подопытных крыс при неизменной активности ЛХАТ следует связать с уменьшением количества ЛПВП.

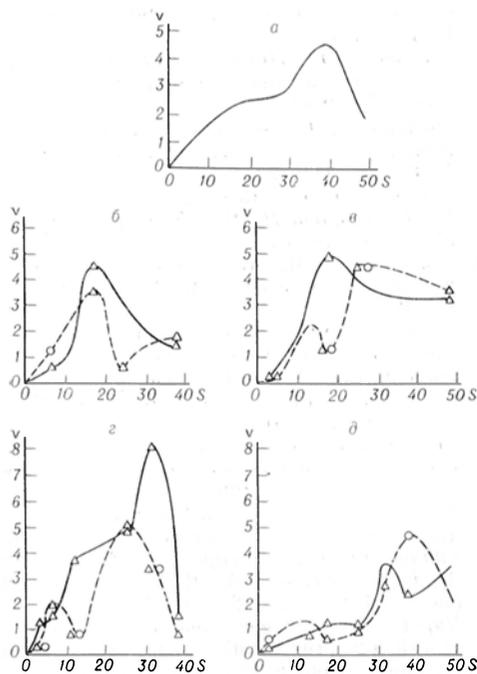
В начале второй фазы действия тетрахлорметана (3-и сутки) в сыворотке крови контрольных крыс нормализовались скорость эстерификации и активность ЛХАТ. При введении ФСП обнаружено увеличение ЭХАС по сравнению с исходными данными и контрольным уровнем, хотя активность ЛХАТ не отличалась от исходных данных. Повышенные суммарной скорости эстерификации холестерина в сыворотке крови подопытных крыс определяется, вероятно, увеличением доли

ЛПВП, обладающих лучшими субстратными свойствами (нормальное содержание общего холестерина и пониженное содержание эфиров холестерина). Образованные эфиры холестерина, вероятно, передаются на апо-В-содержащие липопротеиды, что ведет к увеличению содержания в них холестерина.

В конце второй фазы действия тетрахлорметана в сыворотке крови контрольных животных снижена величина ЭХАС, но достоверно повышена активность ЛХАТ. Это несоответствие можно объяснить тем, что в кровеносном русле накапливается ЛПВП (повышение уровня общего холестерина ЛПВП на 27,1 % по сравнению с исходными данными), обогащенные эфирами холестерина (повышение уровня эфиров холестерина в ЛПВП на 48,5 % по сравнению с исходными данными) и обладающими худшими субстратными свойствами в ЛХАТ-реакции [20]. В сыворотке крови подопытных крыс повышена как суммарная скорость эстерификации холестерина, так и активность ЛХАТ. При этом химический состав ЛПВП (соотношение свободного и эфирно-связанного холестерина) благоприятен для протекания ЛХАТ-реакции. В результате в крови подопытных животных накапливалось больше эфиров холестерина, чем у контрольных крыс.

В третью фазу действия тетрахлорметана (15-е сутки) в сыворотке крови контрольных и подопытных животных нормализовались показатели, характеризующие процесс эстерификации холестерина.

На наш взгляд, процесс эстерификации холестерина в кровеносном русле является первым этапом в многоступенчатом механизме регуляции холе-



Зависимость скорости ЛХАТ-реакции от концентрации неэстерифицированного холестерина на протеолипосом.

$V$  — скорость ЛХАТ-реакции (в нмоль на пробу в 1 ч);  $S$  — концентрация неэстерифицированного холестерина протеолипосом в пробе (в нмоль), треугольники — достоверное различие по сравнению с исходными данными, кружки — то же по сравнению с контролем. *а* — исходные данные; *б* — *в* — 1, 3, 7 и 15-е сутки наблюдения; сплошная линия — контроль, пунктирная — опыт.

стеринемии. Учитывая ключевую роль ЛХАТ в этом процессе, мы исследовали активность фермента при различных концентрациях неэстерифицированного холестерина в субстрате — протеолипосомах. Анализ зависимости скорости ЛХАТ-реакции от концентрации субстрата показал, что для сыворотки крови интактных крыс в диапазоне концентраций неэстерифицированного холестерина протеолипосом 2,5—12,4 нМ на пробу (соответствует 125—620 мкМ), имеется линейная зависимость, затем следует плато (18,6—31,1 нМ, или 930—1555 мкМ), сменяющееся пиком активности при концентрации неэстерифицированного холестерина протеолипосом 37,3 нМ на пробу (1865 мкМ). Дальнейшее повышение концентрации субстрата ведет к ингибированию ЛХАТ-реакции (см. рисунок). На рисунке горизонтальными отрезками показан реальный диапазон концентраций неэстерифицированного холестерина в сыворотке крови крыс с достоверным интервалом

$\varepsilon_{0,05}$ . Для удобства изображения эти величины приведены применительно к 0,02 мл сыворотки крови. Как видно из рисунка, плато и пик активности ЛХАТ проявляются при концентрациях неэстерифицированного холестерина, которые превышают верхнюю границу его содержания в сыворотке крови. Такой сложный характер кинетической кривой можно трактовать, если принять рабочую гипотезу о наличии в сыворотке крови смеси молекулярных форм ЛХАТ [10]. В соответствии с этой гипотезой имеется не менее двух молекулярных форм ЛХАТ. Первая характеризуется гиперболической зависимостью скорости реакции от концентрации субстрата и работает при физиологических концентрациях субстрата. Вторая характеризуется S-образной зависимостью и проявляет свое действие при повышении концентрации субстрата. Накладывание кинетических кривых этих двух молекулярных форм ЛХАТ вполне может дать приведенную на рисунке *а* кривую. По начальной части этой кривой определена константа Михаэлиса методом обратных величин Лайнуивера — Берка в модификации Хэйлса, равная 0,5 мМ, что соответствует данным литературы [15]. К сожалению, сложный характер кривых у контрольных и подопытных животных не позволил вычислить соответствующие константы, в результате чего мы вынуждены ограничиться формальным их обсуждением.

Установлено, что в 1—7-е сутки на кинетических кривых ЛХАТ-реакции как у контрольных, так и у подопытных крыс отсутствует плато. Пик активности ЛХАТ сдвигается в область концентраций субстрата, следующих за верхней границей реального содержания неэстерифицированного холестерина в сыворотке крови. Резкое ингибирование фермента проявляется при более низких концентрациях холестерина. Для сыворотки крови контрольных крыс характерна колоколообразная форма кинетической кривой, что свидетельствует, вероятно, об отсутствии или слабой выраженности одной из молекулярных форм ЛХАТ. Лишь на 15-е сутки в кинетической кривой появляются признаки присутствия двух молекулярных форм ЛХАТ. В сыворотке крови подопытных крыс, начиная с 3-х суток наблюдения, кинетическая кривая приобретает вид, характерный для смеси двух молекулярных форм ЛХАТ.

тические кривые имеют 2 максимума, что может расцениваться как присутствие обеих молекулярных форм фермента. На 15-е сутки наблюдения в сыворотке крови подопытных крыс форма кинетической кривой совпадает с исходной, с той лишь разницей, что в районе плато зарегистрирована более низкая, чем у интактных крыс, активность ЛХАТ.

Итак, восстановление поврежденной тетрахлорметаном печени протекает через фазу гиперхолестеринемии. Эта фаза сохраняется у животных обеих групп. Введение ФСП на фоне острой интоксикации тетрахлорметаном обеспечивает более интенсивный процесс образования эфиров холестерина в кровеносном русле. Учитывая тот факт, что большинство тканей организма не имеет систем окислительного превращения холестерина, то основным путем удаления избытка холестерина из крови может явиться его транспорт в виде эфиров в составе липопротеидов в печень, где и происходит окисление [8]. Следовательно, в результате введения ФСП достигается более эффективный контроль холестеринемии. Механизм положительного действия ФСП связан, вероятно, с сохранением или стимуляцией биосинтеза ЛХАТ и ее молекулярных форм в печени, а также с выбросом в кровь насыщенных ЛПВП из регенерирующей печени.

Авторы выносят благодарность А. А. Никифоровой (ИЭМ, Ленинград) и И. Н. Озеровой (ВКНЦ, Москва) за ценные консультации и представленные реактивы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Абакумова О. Ю., Котиев А. Ю., Караголян С. Р. и др. // *Вопр. мед. химии.* — 1985. — № 5. — С. 95—97.
2. Абакумова О. Ю., Сванидзе Н. Л., Караголян С. Р. и др. // *Сравнительные аспекты изучения регенерации и клеточной пролиферации.* — М., 1985. — Ч. 1. — С. 1—3.
3. Губский Ю. И., Смалько П. Я. // *Вопр. мед. химии.* — 1983. — № 6. — С. 54—60.
4. Иванова Е. Н., Никифорова А. Л., Алкс-

- нис Е. Г. // Там же. — 1985. — № 6. — С. 123—127.
5. Климов А. Н., Никульчева Н. Г. Липопротеиды, дислипидопротеидемии и атеросклероз. — Л., 1984.
  6. Логинов А. В., Молостова Л. В., Акованцева Н. А. // *Бюл. экспер. биол.* — 1983. — № 6. — С. 33—35.
  7. Логинов А. С., Матюшин Б. П., Ткачев В. Д., Павлова Н. М. // *Тер. арх.* — 1985. — № 2. — С. 63—67.
  8. Лопухин Ю. М., Арчаков И. А., Владимиров Ю. А., Коган Э. М. Холестериноз. — М., 1983.
  9. Мусил Я. Основы биохимии патологических процессов: Пер. с чеш. — М., 1985.
  10. Никифорова А. Л., Иванова Е. М., Алкснис Е. Г. // *Бюл. экспер. биол.* — 1985. — № 2. — С. 158—161.
  11. Современные методы исследования липопротеидов высокой плотности: Метод. рекомендации. — М., 1983.
  12. Покровский А. А. // *Биохимические методы исследования в клинике.* — М., — 1969.
  13. Тринус Ф. П., Писарев А. А., Губенко А. В., Стефанов А. В. // *Бюл. экспер. биол.* — 1985. — № 12. — С. 714—715.
  14. Чиркин А. А., Коневалова Н. Ю. // Всесоюзный биохимический съезд, 5-й: Тезисы стендовых сообщений. М., 1986. — Т. 3. — С. 145—146.
  15. Bartholome M., Niedmann D., Wieland H., Seidel D. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1981. — Vol. 664. — P. 327—334.
  16. Chen C. H., Albers J. J. // *J. Lipid Res.* — 1982. — Vol. 23. — P. 680—691.
  17. Goldstein J., Brown M. // *Metabolism.* — 1977. — Vol. 26. — P. 1257—1275.
  18. Robins S. J., Fasulo J. M., Collins M. A., Patton G. M. // *J. Lipid Res.* — 1985. — Vol. 26. — P. 1230—1240.
  19. Stokke K. J., Norum K. R. // *Scand. J. clin. Lab. Invest.* — 1971. — Vol. 27. — P. 21—27.
  20. Yao J. Y., Chang S. C. S., Ryan R. Y., Dyck P. J. // *Biochem. biophys. Res. Commun.* — 1980. — Vol. 95. — P. 738—744.

Поступила 09.07.86

#### EFFECT OF FACTORS STIMULATING PROLIFERATION ON ESTERIFICATION OF CHOLESTEROL IN RAT BLOOD SERUM IN ACUTE INTOXICATION WITH $CCl_4$

A. A. Chirkin, N. Yu. Konvalova

Chair of Bioorganic and Biological Chemistry, Medical School, Vitebsk

Three phases of cholesterolemia were detected in rats after single administration of  $CCl_4$  at a dose of 0.3 ml of oil solution per 100 g of body mass. Factors, stimulating proliferation of hepatocytes and isolated from regenerating liver tissue, did not affect the type of cholesterolemia whereas they stimulated cholesterol esters formation in circulation.

## ВЛИЯНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ДИСЛИПОПРОТЕИДЕМИИ АТЕРОГЕННОГО ХАРАКТЕРА НА ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ МИОКАРДА И ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ КРОЛИКОВ

Кафедры патологической физиологии и госпитальной терапии Калининского медицин-  
ского института

Невозможность прямого исследования обмена липидов сердечной мышцы человека определяет значение поиска путей косвенной оценки липидного обмена миокарда у больных атеросклерозом.

Существует мнение о возможности использования лейкоцитов периферической крови в качестве своеобразного индикатора нарушений липидного обмена, возникающих в клетках некоторых тканей при атеросклерозе [12]. В то же время в доступной литературе отсутствуют исследования, в которых изучалась бы возможность существования общих закономерностей изменения липидного состава лейкоцитов крови и клеток миокарда в процессе атерогенеза. Поэтому мы провели сравнительное исследование липидограмм миокарда, мононуклеарных и полиморфно-ядерных лейкоцитов (соответственно МНЛ и ПЯЛ) периферической крови кроликов при экспериментальной дислиппротеидемии (ДЛП), характеризующейся длительным повышением содержания в крови атерогенных липопротеидов (АЛП) очень низкой и низкой плотности. Следует также указать, что имеющиеся в литературе сведения о липидном составе лейкоцитов периферической крови при экспериментальном атеросклерозе были получены с помощью цитохимических методов [4], позволяющих провести количественную оценку содержания липидных фракций в этих клетках.

### Методика

Исследования проведены на 65 кроликах породы шиншилла массой 2—2,5 кг: 40 подопытным животным вводили внутривенно суммарную фракцию липопротеидов очень низкой и низкой плотности соответственно (ЛПОНП и ЛПНП). 25 интактных животных использовали в качестве контроля. В течение 2—2½ мес 2—3 раза в неделю из 10—15 мл сыворотки крови нормальных кроликов-доноров выделяли АЛП [3], растворяли в 5 % NaCl и вводили внутривенно животному-реципиенту. До введения ЛП, в ходе эксперимента и по его окончании в сыворотке крови подопытных кроликов определяли концентрацию суммарной фракции ЛОНП и ЛНП [9], а также количество свободных жирных кислот (СЖК) и холестерина (ХС).

Количество крови выделяли из 30 мл венозной крови, которую брали из ушной раковины и стабилизировали 2,7 % ЭДТА. МНЛ и ПЯЛ выделяли в растворе фикола-верографина [8] с последующей 3-кратной отмывкой в физиологическом растворе в течение 5 мин при 800 об/мин и 0 °С. В случае примеси эритроцитов во взвеси лейкоцитов клетки очищали гемолитическим методом [2]. Подсчитывали общее количество клеток [5]. Клеточный состав контролировали микроскопией мазков, окрашенных по методу Романовского — Гимзы.

Миокард левого желудочка подопытных и контрольных животных отмывали от крови ледяным физиологическим раствором и гомогенизировали с KCl-трис рН 7,4.

Из сыворотки крови, лейкоцитов и гомогенатов миокарда получали отмывый от липидных примесей общий липидный экстракт [11]. Липиды фракционировали методом проточной горизонтальной тонкослойной хроматографии [6] в системе н-гексан — диэтиловый эфир — ледяная уксусная кислота (75 : 15 : : 1,25) и определяли содержание липидных фракций спектрофотометрически [16]. Количество липидов в лейкоцитах относили к 10<sup>12</sup> клеток, в гомогенате миокарда — к 1 г белка, содержание которого определяли по Лоури [15].

Т а б л и ц а 1

Содержание общих липидов и липидных фракций (в мг на 1 г белка) в миокарде левого желудочка у интактных кроликов и у животных с экспериментальной ДЛП атерогенного характера ( $M \pm m$ )

Условия эксперимента	Фосфолипиды	СЖК	Триглицериды	Свободный ХС	Эфиры ХС	Общие липиды
Контроль (25)	108 ± 10,6	2,59 ± 0,49	13,6 ± 2,34	2,96 ± 0,45	2,16 ± 0,40	129 ± 12
Опыт (40)	138 ± 10,4	6,64 ± 1,36*	23,2 ± 3,58*	6,67 ± 0,88*	4,63 ± 0,86*	118 ± 13,3*

Примечание. Здесь и в табл. 2 звездочка —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

Таблица 2  
Содержание общих липидов (в г) и липидных фракций (в ммоль) в МНЛ и ПЯЛ периферической крови (на  $10^{12}$  клеток) у интактных кроликов и у животных с экспериментальной ДЛП атерогенного характера ( $M \pm m$ )

Лейкоциты	Условия эксперимента	Общие липиды	Фосфолипиды	ХС			СЖК	Триглицериды
				общий	свободный	эфиры		
Полиморфно-ядерные	Контроль (10)	13,9±0,25	12,7±0,36	5,56±0,24	3,40±0,30	2,16±0,17	3,07±0,23	1,23±0,09
	Опыт (14)	15,2±0,30*	14,6±0,35*	5,30±0,22	3,48±0,18	1,82±0,09	3,05±0,19	1,07±0,08
Мононуклеарные	Контроль (10)	9,21±0,35	7,64±0,45	4,33±0,15	2,58±0,13	1,75±0,17	2,29±0,026	0,83±0,10
	Опыт (14)	10,3±0,33*	7,81±0,41	5,96±0,21*	3,52±0,21*	2,44±0,11*	3,79±0,16*	0,96±0,06

## Результаты и обсуждение

Длительное внутривенное введение АЛП вызывало повышение в сыворотке крови животных концентрации суммарной фракции ЛПОНП и ЛПНП со  $181 \pm 15,8$  до  $574 \pm 72,5$  мг/100 мл ( $p < 0,001$ ), ХС с  $67,63 \pm 6,07$  до  $156 \pm 15,2$  мг/100 мл ( $p < 0,001$ ) и СЖК с  $24,2 \pm 4,6$  до  $53,5 \pm 9,85$  мг/100 мл ( $p < 0,05$ ).

Результаты исследования липидного состава миокарда левого желудочка приведены в табл. 1. В сердечной мышце кролика с экспериментальной ДЛП обнаружено статистически значимое повышение концентрации фосфолипидов, свободного ХС, его эфиров и триглицеридов. Как показало ранее проведенное исследование, подобным же образом при развитии атеросклероза изменяется липидограмма и других отделов сердечной мышцы: правого желудочка, предсердий и межжелудочковой перегородки [1].

Результаты исследования липидного состава МНЛ и ПЯЛ периферической крови представлены в табл. 2. В МНЛ и ПЯЛ крови кроликов присутствуют те же липидные фракции, что и в миокардиоцитах. Развитие экспериментальной ДЛП приводило к статистически значимому нарастанию в ПЯЛ содержания фосфолипидов ( $p < 0,001$ ). Содержание других липидных фракций в этих клетках существенно не отличалось от контрольных величин. Отмеченное увеличение количества общих липидов в ПЯЛ подопытных животных ( $p < 0,01$ ), по-видимому, связано с нарастанием содержания в них фосфолипидов.

Более выраженные изменения липидного состава, индуцированные ДЛП, характерны для МНЛ (см. табл. 2). Увеличение содержания общих липидов в этих клетках ( $p < 0,05$ ) обусловлено повышением концентрации в них свободного ХС ( $p < 0,01$ ), его эфиров ( $p < 0,01$ ), а следовательно, и общего ХС ( $p < 0,001$ ), а также СЖК ( $p < 0,001$ ). В содержании фосфолипидов и триглицеридов в МНЛ периферической крови подопытных и интактных животных не обнаружено статистически значимых различий.

Можно заключить, что длительное повышение содержания АЛП в крови кроликов приводит к нарушению липидного состава как миокардиоцитов,

как и лейкоцитов периферической крови. Изменения липидограммы миокарда были выражены, безусловно, более значительно, чем нарушения липидного состава клеток крови. Так, если в миокардиоцитах подопытных животных возрастало содержание всех липидных фракций, то в МНЛ периферической крови увеличивалось только количество ХС и СЖК, а в ПЯЛ нарастало лишь количество фосфолипидов.

Наблюдавшиеся нами изменения количества липидов в миокарде и лейкоцитах периферической крови кроликов отражают нарушения липидного обмена, возникающие в условиях атерогенеза. Так, увеличение количества СЖК и ХС в сердечной мышце подопытных кроликов, по-видимому, связано с повышением экстракции миокардом этих веществ в крови [10, 14], а нарастание содержания фосфолипидов и триглицеридов — с усилением их синтеза [17]. Накопление липидов в лейкоцитах периферической крови при экспериментальном атеросклерозе рассматривается как компенсаторное явление, возникающее в ответ на ДЛП [7]. Не исключено также, что увеличение количества ХС в МНЛ при ДЛП связано и с усилением его синтеза в этих клетках [13]. Обращает на себя внимание тот факт, что при ДЛП в клетках миокарда и МНЛ увеличивается количество именно тех липидных фракций, которые имеют в основном плазматное происхождение, т. е. СЖК и ХС.

Полученные нами данные указывают на отсутствие прямого параллелизма нарушений липидного состава миокардиоцитов и лейкоцитов периферической крови при ДЛП атерогенного характера. Это, по всей вероятности, свидетельствует о невозможности использования лейкоцитов крови в качестве индикатора расстройств липидного обмена миокарда при атеросклерозе. По-видимому, изменения липидного состава лейкоцитов периферической крови могут дать лишь приблизительное представление о состоянии обмена липидов миокарда в условиях атерогенеза.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Калинин М. Н. // Кардиология. — 1978. — № 4. — С. 127—129.
2. Калыев В. Д. // Вопросы переливания крови и клинической медицины. — Киров, 1965. — Вып. 3. — С. 194—196.
3. Климов А. Н., Ловягина Т. Н., Баньковская Э. Б. // Лаб. дело. — 1966. — № 5. — С. 276—289.
4. Комарова Л. И., Луканева А. М. // Врач. дело. — 1975. — № 6. — С. 134—137.
5. Николаев Н. М. // Сов. мед. — 1954. — № 4. — С. 38.
6. Покровский Е. А., Каргаполов А. В. // Лаб. дело. — 1972. — № 6. — С. 337—341.
7. Раскин И. М. Липидсодержащие лейкоциты при ишемической болезни сердца. — М., 1977.
8. Bøyum A. // Scand. J. clin. Lab. Invest. — 1968. — Suppl. 97.
9. Burstein M., Samaille J. // Presse méd. — 1958. — Vol. 66. — P. 974—975.
10. Evans T. R., Opie L. H., Shipp T. C. // Amer. J. Physiol. — 1963. — Vol. 205, N 4. — P. 766—770.
11. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. // J. Biol. Chem. — 1957. — Vol. 226, N 1. — P. 497—509.
12. Goldstein J. L., Brown M. S. // Metabolism. — 1977. — Vol. 26, N 11. — P. 1257—1275.
13. Hiramatsu K. // Okayama-igakkaizasshi. — 1976. — Vol. 88, N 5—6. — P. 373—381.
14. Ho Kang-Jey, Pang Leon-Chuan, Lin L. et al. // Exp. Molec. Path. — 1974. — Vol. 21, N 2. — P. 194—203.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.
16. Marsh J. B., Weinstein D. B. // J. Lipid Res. — 1966. — Vol. 7. — P. 574—576.
17. Wood J. M., Hutchings A. E., Brachfeld N. // J. Molec. Cell. Cardiol. — 1972. — Vol. 4, N 2. — P. 97—111.

Поступила 23.12.86

## EFFECT OF ATHEROGENIC DISLIPOPROTEINEMIA ON LIPID COMPOSITION IN RABBIT MYOCARDIUM AND PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTES

L. S. Zhukhorov, M. N. Kalinkin

Medical School, Kalinin

Content of total lipids, phospholipids, total-, free- and ester-bound cholesterol, free fatty acids and triglycerides were increased in myocardium of left ventricle of rabbits with atherogenic dislipoproteinemia as compared with intact animals. In polymorphonuclear leukocytes content of total lipids and phospholipids was increased only, while in mononuclear leukocytes concentration of total lipids, free-, total- and ester-bound cholesterol and of free fatty acids was elevated.

# МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 611-018.26:576.314-086.122

Г. Г. Езуткин

## МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ КРЫС БЕЗ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ОБРАБОТКИ КОЛЛАГЕНАЗОЙ

Сектор геронтологии АН БССР, Минск

Исследование структуры и функций биологических мембран занимает важное место в изучении жизнедеятельности клетки. Способы получения фракций, обогащенных поверхностными мембранами, описаны для самых разных тканей и типов клеток [5]. Важное значение и разнообразие функций жировой ткани, участвующей в регуляции углеводного и липидного обмена, обуславливает большой интерес к изучению поверхностной мембраны жировых клеток.

В описанных методах выделения плазматических мембран (ПМ) адипоцитов [4, 11] или их «теней» (лишенные жирового содержимого клетки) [12] использовали жировые клетки, полученные после предварительной обработки ткани коллагеназой. В ряде случаев применение коллагеназы нежелательно, так как содержащиеся в препарате примеси протеаз способствуют дезагрегации ткани и могут вызывать разрушение белковых структур ПМ [9]. Метод, предложенный Ю. В. Бездробиным [1], позволяет получить ПМ жировых клеток из жировой ткани без применения коллагеназы. Полученные ПМ характеризуются высокой удельной активностью ферментов-маркеров и высокой способностью специфически связывать инсулин. Однако общий выход ПМ в результате одного выделения довольно ограничен, что затрудняет дальнейшие исследования с полученным препаратом.

Предложенные нами изменения в режимах гомогенизации и центрифугирования позволяют получить в 8—10 раз большее количество высокоочищенных препаратов ПМ жировых клеток.

### Методика

Опыты проводили на крысах-самцах линии Вистар массой 250—300 г стандартного разведения, содержащихся на стандартном рационе вивария. Животных забивали декапитацией, эпидидимальную жировую ткань извлекали, очищали от соединительной ткани, кровеносных сосудов и помещали в раствор А (0,25М сахароза; 1 мМ ЭДТА; 10 мМ трис-НСl, рН 7,4). Все последующие операции проводили при 4—6 °С.

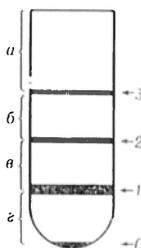
Эпидидимальные жировые подушки от 6 животных измельчали ножницами, продавливали сквозь пресс-сито из нержавеющей стали с отверстиями диаметром 1 мм и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком с зазором 0,2—0,3 мм (800—900 об/мин, 5—6 ходов пестика) с 8 объемами раствора А. Гомогенат центрифугировали 10 мин при 1000 g. Осадок (неразмельченные кусочки ткани, кровеносные сосуды, ядра) отбрасывали, промежуточной слой собирали в колбу, а жировую лепешку, образовавшуюся сверху, гомогенизировали с 8 объемами раствора А в том же режиме. Гомогенат центрифугировали 2 мин при 500 g. Образовавшуюся жировую лепешку подвергали повторной гомогенизации и центрифугированию. Процедуру повторяли 3—4 раза до тех пор, пока жировая лепешка не уменьшалась в 2—3 раза.

Объединенные промежуточные слои фильтровали через 4 слоя марли и центрифугировали 20 мин при 25 000 g и 4 °С. При этом микросомы оставались в надосадочной жидкости, а плазматические мембраны, митохондрии и ядра осаждались на дно (фракция грубых плазматических мембран).

Дальнейшую очистку мембран проводили методом флотации в градиенте, содержащем различные концентрации сахарозы (44—22 %),

Разделение материала грубых мембран на фракции после центрифугирования в градиенте плотности сахарозы (центрифуга «Beckman», ротор SW-28, 2 ч при 105 000 g и 4 °С).

Стрелками показаны фракции № 1, 2 и 3; О — осадок. Состав градиента: а — 14 мл 5 мМ трис-НСl, 1 мМ ЭДТА, рН 7,4; б — 7 мл 22 % сахарозы ( $\rho=1,10$  г/см<sup>3</sup>); в — 7 мл 33 % сахарозы ( $\rho=1,14$  г/см<sup>3</sup>); г — 7 мл 44 % сахарозы ( $\rho=1,20$  г/см<sup>3</sup>).



5 мМ трис-НСl, 1 мМ ЭДТА рН 7,4 (см. рисунок). Растворы сахарозы готовили в день опыта, концентрацию проверяли с помощью рефрактометра. Фракцию грубых мембран ресуспендировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком с зазором 0,4 мм (300 об/мин, 2—3 хода пестика) в растворе Б (5 мМ трис-НСl, 1 мМ ЭДТА рН 7,4), содержащем 44 % сахарозу ( $\rho=1,20 \text{ г/см}^3$ ).

Ресуспендирование осадка грубых мембран, так же как и исходная гомогенизация ткани, является ответственным этапом, поэтому в процессе выделения необходимо придерживаться строго определенного режима гомогенизации. Действительно, изменение гетерогенности фрагментов ПМ и образующихся из них везикул (при изменении режима гомогенизации) в наших опытах приводило к перераспределению активности 5'-нуклеотидазы в изучаемых фракциях и уменьшению общего выхода ПМ.

Приготовленный градиент центрифугировали 2 ч при 4°C и 105 000 g. В процессе центрифугирования материал грубых мембран разделялся на 3 фракции в градиенте и осадок на дне пробирки (см. рисунок). Собранный материал фракций № 1—3 разводили в 80 мл раствора Б и центрифугировали 30 мин при 4°C и 30 000 g. Полученные осадки ресуспендировали в небольших объемах раствора Б (конечная концентрация 1 мг/мл) и использовали для исследования с целью идентификации содержащихся в них субклеточных фракций.

Идентификацию субклеточных фракций проводили путем определения в них активности маркерных ферментов: 5'-нуклеотидазы (КФ 3.1.3.5) [7] (маркер ПМ); сукцинатдегидрогеназы — СДГ (КФ 1.3.99.1) [8] (маркер митохондрий); глюкозо-6-фосфатазы — Г-6-Ф (КФ 3.1.3.9) [13] (микросомный маркер). Кроме того, определяли содержание во фракциях РНК [3], также являющуюся маркером эндоплазматической сети (ЭС).

Неорганический фосфор определяли описанным ранее методом [6], белок — методом Лоури в модификации Марквелла [10].

### Результаты и обсуждение

В табл. 1 показано распределение активности 5'-нуклеотидазы, наиболее широко применяемого маркера ПМ. При центрифугировании в градиенте

плотности сахарозы, основная часть активности фермента локализуется во фракции № 2 (фракция ПМ).

Аврух и Валлах [4], а также Маккил и Джаретт [11], выделявшие ПМ из обработанной коллагеназой жировой ткани, не смогли определить 5'-нуклеотидазную активность. Таким образом, либо 45-минутная инкубация ткани при 37°C, либо действие протеолитических ферментов, загрязняющих препарат коллагеназы, либо то и другое одновременно воздействует на активность 5'-нуклеотидазы. Бездробный и Евдокимова [1] обнаружили высокую активность фермента во фракции ПМ, однако полный баланс 5'-нуклеотидазы при очистке мембран рассчитан не был из-за очень большого исходного разведения гомогената. В нашем методе фракция ПМ была обогащена 5'-нуклеотидазой примерно в 12 раз по сравнению с гомогенатом.

Наибольшие затруднения при очистке ПМ обуславливают гладкие пузырьки, происходящие из ЭС. Последняя неоднородна по плотности, диапазон которой перекрывает диапазон плотности поверхностных мембран, что делает практически невозможным полное разделение этих фракций на основании данного свойства [2].

В целях уменьшения содержания микросомных примесей в препарате ПМ мы проводили гомогенизацию жировой ткани в мягких условиях. Это обстоятельство позволило осажать и разделять мембраны при более низкоскоростном центрифугировании, чем в описанном методе [1].

В полученных нами ПМ содержание РНК составляет  $7,5 \pm 0,8$  мкг на 1 мг

Таблица 1

Распределение активности 5'-нуклеотидазы в процессе выделения ПМ

Режим обработки	Фракция	Распределение, %		Относительное обогащение
		белок	5'-нуклеотидаза	
25 000 g, 20 мин	Супернатант	88	83	0,7
	Осадок (грубые мембраны)	12	17	3,9
105 000 g, 2 ч	№ 1. 33—44% сахароза	51	17	1,8
	№ 2. 22—33% сахароза	37	78	11,3
	№ 3. Трис-буфер — 22% сахароза	12	5	2,3

Примечание. Относительное обогащение определяли как отношение удельной активности 5'-нуклеотидазы во фракции к удельной активности в исходном гомогенате. В режиме обработки 105 000 g в течение 2 ч при расчете распределения белка и 5'-нуклеотидазы осадок на дне центрифужной пробирки не учитывали.

Ферментативная активность и содержание РНК во фракциях, получаемых при выделении ПМ и жировой ткани крыс ( $n=3$ )

Режим обработки	Фракция	5'-нуклеотидаза	Г-6-Ф	СДГ, нмоль восстановленного индофенола за 1 мин на 1 мг белка	РНК, мкг на 1 мг белка
		мкмоль Ф за 1 ч на 1 мг белка			
1000 g 25 000 g, 20 мин	Гомогенат	1,08±0,15	2,24±0,49	18,4±1,5	14,5±1,5
	Осадок (грубые мембраны)	4,24±0,78	0,54±0,11	18,9±1,2	9,8±0,3
05 000 g, 2 ч	Супернатант	0,74±0,11	1,72±0,28	—	12,0±0,9
	№ 1. 33—44% сахараза	1,95±0,65	0,46±0,14	42,8±2,4	8,3±1,1
	№ 2. 22—33% сахараза	12,25±2,25	0,76±0,16	6,3±1,0	7,5±0,8
	№ 3. Трис-буфер — 22% сахароза	2,46±1,30	1,8±0,24	—	35,0±5,0

белка, тогда как в препаратах ПМ, полученных Маккилом и Джареттом, эта величина составила  $23,9 \pm 1,5$  мкг на 1 мг белка [11]. В работе [1] РНК во фракции ПМ не была обнаружена, на основании чего авторы делают вывод об отсутствии микросомных примесей в указанном препарате.

Учитывая биохимическую гетерогенность ЭС, наряду с содержанием во фракциях РНК мы определили удельную активность другого микросомного маркера — Г-6-Ф. Как видно из табл. 2, основная часть микросом после центрифугирования при 25 000 g остается в надосадочной жидкости. В процессе центрифугирования в градиенте плотности сахарозы образуются 3 основные фракции: митохондриальная ( $\rho=1,14-1,20$  г/см<sup>3</sup>) фракции ПМ ( $\rho=1,10-1,14$  г/см<sup>3</sup>) и микросомная ( $\rho < 1,10$  г/см<sup>3</sup>).

Выход ПМ из обработанных коллагеназой жировых клеток составлял 1,0—1,5 мг белка ПМ из 20—25 мг белка гомогената [11] и 400 мкг белка ПМ из 25 мг гомогената [4]. С помощью описанного здесь метода мы получали 600—800 мкг белка ПМ из 20—25 мг гомогената. Количество мембран, которое может быть получено за один опыт, составляет 4—5 мг, что значительно превышает общий выход ПМ при использовании метода, предложенного Ю. В. Бездробным [1], — 448 мкг.

Таким образом, описанный метод позволяет без применения коллагеназы получить с высоким выходом ПМ жировых клеток, характеризующиеся высокой активностью 5'-нуклеотидазы

и содержащие незначительные примеси митохондрий и элементов ЭС.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бездробный Ю. В., Евдокимова Н. Ю. // Вопр. мед. химии. — 1979. — № 3. — С. 354—358.
2. Невилл Д. // Биохимическое исследование мембран: Пер. с англ. — М., 1979. — С. 30—53.
3. Спиринов А. С. // Биохимия. — 1958. — Т. 23. — С. 656.
4. Avruch J., Wallach D. F. H. // Biochim. biophys. Acta. — 1971. — Vol. 233, N 2. — P. 334—347.
5. De Pierre J. W., Karnovsky M. L. // J. cell Biology. — 1973. — Vol. 56, N 2. — P. 275—303.
6. Eibl H., Lands W. E. M. // Analyt. Biochem. — 1969. — Vol. 30. — P. 51—57.
7. Emmelot P., Bos C. J. // Biochim. biophys. Acta. — 1966. — Vol. 120. — P. 369—382.
8. Greem D. E., Mii S., Kohout P. M. // J. Biol. Chem. — 1955. — Vol. 217. — P. 551—567.
9. Kahn R. // Methods in membrane biology. — New-York—London, 1975. — Vol. 3. — P. 81.
10. Markwell M. A. K., Haas S. H., Bieber G. G., Tolbert N. F. // Analyt. biochem. — 1978. — Vol. 87, N 1. — P. 206—210.
11. McKeel D. W., Jarett L. // J. Cell Biology. — 1970. — Vol. 44, N 2. — P. 417—432.
12. Rodbell M. // J. Biol. Chem. — 1967. — Vol. 242, N 24. — P. 5744—5750.
13. West G. R. // Nature. — 1965. — Vol. 205. — P. 799.

Поступила 27.06.86

#### A METHOD FOR ISOLATION OF PLASMATIC MEMBRANES FROM RAT ADIPOSE TISSUE WITHOUT COLLAGENASE TREATMENT

G. G. Yegutkin

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

A rapid procedure has been described for preparation of a relatively pure fraction of plas-

matic membranes from adipose tissue without treatment with collagenase. Gentle homogenization of rat fatty tissue in a buffered sucrose solution yielded membrane fractions that could be separated from the bulk of contaminating mitochondria and microsomes by a series of diffe-

rential and isopycnic centrifugations. The preparation obtained was enriched 12-fold with 5'-nucleotidase as compared with the initial homogenate and contained minimal contaminations with mitochondria or elements of endoplasmic reticulum.

## РЕЦЕНЗИЯ

УДК 616.853-092:616.831-008.9(049.32)

К. И. Погодаев. Эпилептология и патохимия мозга. — М.: Медицина, 1986. — 288 с.

Широкое распространение, тяжелое течение и сложности, возникающие при лечении эпилепсии, определяют необходимость совершенствования ее терапии и диагностики на основе современных представлений о патохимии данного заболевания. Именно этому и посвящена рецензируемая монография, состоящая из 5 глав. Содержание их следующее: биохимия мозга при судорогах, химические основы эпилептической активности, биоэнергетика и мембраны нейронов при эпилептогенезе, экспериментальное биохимическое обоснование терапии, теория патологии эпилепсии.

Книга подводит итог многолетнему изучению патохимии экспериментальной эпилепсии, в результате которого автором, его учениками и сотрудниками получены приоритетные данные. Обнаружены нарушения энергетического и белкового обмена в тканях мозга животных при эпилептогенезе, объясняющие судорожную активность. Выявлены молекулярные основы экспериментальной эпилепсии преимущественно на уровне митохондрий и плазматических мембран нейроглиального комплекса, где нарушается взаимосвязь между интермедиарным метаболизмом и энергетическим его обеспечением из-за ухудшения сопряжения окислительного фосфорилирования с тканевым дыханием. Это сопровождается специфическими для эпилептогенеза изменениями энергетического, белкового, медиаторного обмена и обмена потенциалобразующих ионов на сопрягающих и плазматических мембранах нейроглиального комплекса. В итоге возникают изменения биоэлектрохимических мембранных потенциалов эпилептических нейронов, обеспечивающих характерные для эпилептических разрядов электрофизиологические феномены. Указанные изменения однозначны и не зависят от природы эпилептогенного агента, вида животного и изучаемого отдела головного мозга. При стойкой эпилептической активности описанные явления усиливаются. Устойчивость эпилептической судорожной активности обусловлена не только предрасположенностью к эпилепсии и постоянным действием эпилептогенных факторов, но и самим эпилептогенезом, самозакреплением и развитием эпилептического процесса на всех уровнях ЦНС. Однако базисным является нейроглиальный уровень с характерными физико-химическими, биохимическими и ультраструктурными изменениями, благодаря которым эпилептический процесс становится хроническим. По-

казано, что эпилептическая активность разного генеза формируется на основе пароксизмально-го возбуждения, возникающего в результате действия различных эпилептогенных факторов на нейроглиальный комплекс.

В книге обобщаются данные о разных уровнях регуляции энергетического, белкового, медиаторного и ионного обмена головного мозга животных при эпилепсии. Патохимия эпилептизируемого мозга рассматривается с учетом ряда новых сведений о физиологии, морфологии ЦНС, современных представлений о гомеостазе, электрохимических свойствах биомембран, молекулярно-биохимических основах жизнедеятельности нервных клеток и их субклеточных оргanelл. В эксперименте разработана биохимически обоснованная поэтапная метаболическая внутритрубная профилактика и терапия апатальной патологии с предрасположенностью к эпилепсии. Разработана и начата применяться в клинике новая, комбинированная, патогенетически обусловленная противосудорожная терапия, основанная на коррекции нарушенного метаболизма в головном мозге больных эпилепсией.

Выдвигаемые в монографии положения по этиологии, патогенезу и терапии эпилепсии в известной мере подтверждаются лечебной практикой. Автор логично развивает представления о роли метаболизма митохондрий, плазматической и митохондриальной мембран, энерготранспортной системы нейрон — глион — миоцит (Н — Г — М) гладких мышц артериол (эффекторов) в эпилептогенезе и его купировании. Детально рассматриваются физико-химические основы процесса зарядки и разрядки эпилептических нейронов как самого существенного явления при эпилепсии. Описываются возможные механизмы действия противосудорожных средств. Обосновывается ведущая роль эндогенных факторов в этиологии и патогенезе изучаемой патологии. Высказывается мнение о единой метаболической причине и возможной роли церебральных митохондрий в наследственно обусловленной предрасположенности к эпилепсии.

У автора сложилось новое представление об эпилептогенезе и лечении эпилепсии. Эпилепсия, по К. И. Погодаеву, — хроническое, моноэтиологическое, метаболически обусловленное заболевание головного мозга, характеризующееся специфической эпилептической активностью избирательно расположенных морфофункциональных микроструктур нейроглиального комплекса, метаболически связанных через астроциты с микроциркуляторной системой,

обеспечивающей локальное, адекватное метаболизму кровоснабжение ткани мозга. Следовательно, по данному определению этиологическими факторами эпилепсии служат метаболиты с энлептогенным эффектом, например ионы аммония, калия, «среднемолекулярные» полипептиды (3—5 кД). Они накапливаются в ответ на воздействие разнообразных факторов внешней и внутренней среды в тканях мозга в связи с усиленным протеолизом, который, по данным автора, имеет место при пароксизмальном возбуждении. При этом метаболическая в своей основе причина влияет на уровни митохондрий, плазматических мембран пароксизмальной морфофункциональной системы Н—Г—М и ее фрагментов, которые, по представлению автора, детерминируют эпилептическую активность.

Эпилепсия, по К. И. Погодаеву, является полипатогенетическим заболеванием со сложным механизмом, разнообразными судорожными и безсудорожными пароксизмами, эмоциональными и психическими расстройствами. Полипатогенез эпилепсии обуславливается разнообразной по интенсивности и экстенсивности эпилептической активностью, динамической локализацией в головном мозге пароксизмальной системы Н—Г—М и ее фрагментов разной степени сложности и эпилептической активности, с которыми и связана диффузная и очаговая эпилепсия.

Рецензируемая книга не лишена недостатков. Ряд разделов написан излишне подробно.

Представления об эпилепсии как о моноэтиологическом, но полипатогенетическом заболевании интересны, но отнюдь не бесспорны. Накопленные к настоящему времени факты показывают, что в происхождении эпилепсии играют роль расстройства генерации АТФ и изменение баланса ингибиторных и возбуждающих интермедиагов, конвергирующих на критический элемент конечного общего звена, ответственного за развитие эпилептической активности. Этим звеном является обмен ионов, в частности энергозависимый калий-натриевый насос. Указанные нарушения метаболизма сами являются следствием генетических или различных патогенных экзогенных воздействий и могут рассматриваться как первые звенья в патогенезе заболевания, но не как его этиология. Вместе с тем эти представления показывают определенный пробел в монографии — отсутствие современных исчерпывающих данных о нарушениях при эпилепсии обмена возбуждающих и тормозных интермедиагов и соответственно об изменениях в системе вторичных мессенджеров.

Предложенные автором методы антенатальной профилактики эпилепсии, хотя и обоснованные теоретически по результатам биохимических исследований, могут получить подтверждение только на клиническом материале. Что касается рекомендации использовать с лечебной целью при эпилепсии средства, стимулирующие синтез АТФ, то такие попытки делались клиницистами еще в 50—60-х годах, однако признаны неэффективными.

К сожалению, в книге не всегда указаны авторы и принципы использованных методов. Иногда это приводит к недоразумению. Так, на с. 46 указано, что содержание АТФ в коре головного мозга равно 4,4 мг/100 г. В действительности оно в десятки раз выше. Уровню 4,4 мг/100 г соответствует количество лабильного фосфора АТФ, а не самого АТФ. В последние годы энзимными, хроматографическими и другими методами определяют общее содержание АТФ, а не лабильный фосфор АТФ.

Иногда текст не соответствует данным таблиц. Например, на с. 57 указывается, что в белке митохондриальной фракции головного мозга крысы при судорогах заметно снижается содержание серина и повышается количество изолейцина и других гидрофобных аминокислот и приводится ссылка на табл. 12. Однако, по данным этой таблицы, уровень серина не снижается, а достоверно увеличивается в несколько раз, а содержание изолейцина уменьшается в несколько раз, хотя количество других гидрофобных аминокислот действительно повышается.

Есть замечания редакторского плана. В частности, следовало заменить мкМ на г/ткани и нМ на г/мг белка (с. 33, 58, 159 и др.) на рекомендуемые по системе СИ мкмоль на г/ткани, нмоль на г/мг белка. Согласно современным номенклатурным правилам ИЮПАК, следовало отделить символ изотопной метки аминокислот квадратными скобками с массовым числом в левом верхнем индексе: [<sup>3</sup>H]-лизин, [<sup>14</sup>C]-валин.

Имеются опечатки. Например, содержание остаточного азота в коре головного мозга не 0,179 мг/100 г (с. 27), а на три порядка выше: концентрация калия в митохондриях не 100 М (с. 159) и не 10 М (с. 158), а около 100 мМ.

Высказанные замечания не снижают в целом положительную оценку рецензируемой монографии, которая окажется полезной биохимикам, патологам и клиницистам, в круг интересов которых входят проблемы биохимии и патохимии нервной системы.

Проф. Ю. А. Петрович,  
проф. В. А. Карлов (Москва)

## УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ, ПОМЕЩЕННЫХ В ЖУРНАЛЕ «ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ» В 1987 ГОДУ

Кривобокова С. С. Медицинская химия в СССР (К 70-летию Великой Октябрьской революции). 5, 2.  
Алексеев Л. П., Орехович В. П. Новое в проблеме сердечно-сосудистой регуляции: эндокринная функция сердца (Обзор). 3, 2.  
Аникеева С. П., Панченко Л. Ф., Штернберг Ю. М. Биохимические и регуляторные аспекты функции кетоновых тел в организме (Обзор). 6, 11.  
Белицер В. А., Мусялковская А. А., Платоно-

ва Т. Н., Ена Я. М. Антитромбин III. Функциональная роль и методы определения (Обзор). 4, 8.  
Большакова Т. Д., Шендерович М. Я. Физиологическая роль и клиническое значение 3-метокси-4-оксифенилэтиленгликоля, метаболита нордреналина (Обзор). 6, 3.  
Вельтищев Ю. Е., Юрьева Э. А., Воздвиженская Е. С. Биологически активные метаболиты мембранных глицерофосфолипидов в норме и при патологии (Обзор). 2, 2.

- Гусев В. А., Даниловская Е. В. Роль активных форм кислорода в патогенезе пневмокопозов (Обзор). 5, 9.
- Меграбян З. Б., Палбандян Р. М. Медьсодержащие аминоксидазы кровеносных сосудов (Обзор). 1, 13.
- Соковнина Я. М., Вотрин И. И. Тромбоциты — объект исследований энзимопатий при заболеваниях крови (Обзор). 3, 15.
- Черников М. П. Потенциальная биологическая ценность пивцевых белков и принцип Митчелла (Обзор). 2, 9.
- Чернядьева И. Ф., Титов В. Н. Апопротеины эфферентного транспорта холестерина в крови (Обзор). 1, 2.
- Шпикитер В. О. Роль модификаций липопротеидов в атерогенезе (Обзор). 4, 2.
- 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 фибриногена в синовиальной жидкости. 4, 101.
- Агуреев А. П., Терехина А. И. Особенности действия 2-пирролидонацетамида (парацетама) на энергетическое сопряжение в митохондриях скелетных мышц крыс в условиях холодового стресса. 2, 14.
- Азарян А. В., Галоян А. А. Катепсин В головного мозга как дипептидилкарбокисептидаза, превращающая провазопрессорные, проопиоидные и модельные пептиды. 5, 78.
- Антоненков В. Д., Гусев В. А., Краскова С. П. Влияние этанола и ингибитора каталазы аминотриазола на активность ферментов антиокислительной защиты в печени и сердце крыс. 6, 59.
- Арион В. Я., Хроменков Ю. И., Тагирова А. К., Караулов А. В., Бреусов Ю. П., Санина И. В. Влияние Т-активина на ферменты метаболизма ксенобиотиков. 6, 56.
- Архипенко Ю. В., Джапаридзе Л. М., Гуткин Д. В., Рожницкая И. И., Спиричев В. Б. Сравнительная оценка влияния недостаточности витамина Е на перекисное окисление липидов и транспорт  $Ca^{2+}$  в сердечной и скелетной мышцах. 1, 122.
- Бабижаев М. А., Деев А. И. Модификация мембранных структур при катаракте. 2, 125.
- Басис В. Ю., Бумялис В.-А. В., Котова Т. С. Очистка  $\alpha$ -1-ингибитора протеаз человека и получение антисыворотки, пригодной для его иммунохимического определения. 1, 54.
- Бауманис Э. А., Бирска И. А., Рейхман Г. О., Кируле И. Э., Шведов В. И., Горкин В. З. О механизме качественной модификации пирозидолом активности митохондриальной моноаминоксидазы. 6, 90.
- Беленький Д. М. Химическое галактозилрование кислой  $\alpha$ -глюкозидазы с целью направленного транспорта ее в лизосомы паренхиматозных клеток печени. 5, 15.
- Бельченко Д. И., Ханина Н. Я., Калинин М. Н. О влиянии гиперлипопротеидемии, индуцированной введением атерогенной фракции липопротеидов, на некоторые показатели липидного обмена у кроликов. 3, 42.
- Богданова И. А., Герасимов А. М., Комаров О. С. Активность глутатион: дегидроаскорбат оксидоредуктазы в тканях глаза кролика. 3, 104.
- Болдырев А. А., Орлов С. П., Свинухова И. А., Стецюк Н. У. NaK-АТФаза наружной мембраны почки спонтанно гипертонических крыс в онтогенезе. 4, 56.
- Булычев А. Г., Ассиновская О. А., Семенова Е. Г. Лизосомотропные агенты как регуляторы активности лизосомных гидролаз. 5, 20.
- 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. 4, 93.
- Васильев А. В., Коновалова Л. С., Плещитый К. Д., Пономарова Л. Г., Тутельян В. А. Активность лизосомальных гидролаз в печени, селезенке и тимусе крыс при антигенной стимуляции и введении витамина А. 5, 81.
- Бидершайн Г. Я. Особенности биогенеза и субстратной специфичности лизосомных гликозидаз человека в норме и при гликозидах. 5, 24.
- Виру А. А., Тендзегольскис Ж. Л., Карельсон К. М., Алев К. П., Смирнова Т. А. Взаимоотношения между изменениями содержания  $\beta$ -эндорфина и ряда гормонов в крови во время мышечной работы. 3, 28.
- Володина Т. В., Колоскова Е. Е., Шишкин С. С., Козельцев В. Л. Изучение белков митохондрий печени крыс методом двумерного электрофореза. 4, 25.
- Ворончихина Л. Д., Демьянова В. Т., Манжаров Н. В. Экскреция полиаминов с мочой у больных с термическими ожогами. 6, 23.
- Гаврилов В. Б., Гаврилова А. Р., Мажуль Л. М. Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой. 1, 118.
- Гаскина Т. К., Долгов А. В., Курилович С. А. Активность лецитин-холестерол-ацилтрансферазы при хронических заболеваниях печени. 4, 96.
- Герасимов К. Е., Цырлов И. Б. Индукция микросомных монооксигеназ изопропиловым производным амниопиррина. 2, 96.
- Гильмиярова Ф. Н., Сидоренков И. В., Радомская В. М., Виноградова Л. П., Михайлова Н. П., Малышева Л. В., Жданова З. М., Колпакова Т. И., Еникеева С. А. Нарушения метаболизма углеводов при алкогольном поражении печени в эксперименте. 5, 131.
- Голиков П. П., Давыдов Б. В., Матвеев С. Б. Механизмы активации перекисного окисления липидов и мобилизации эндогенного антиоксиданта  $\alpha$ -токоферола при стрессе. 1, 47.
- Голубев В. П., Козельцев В. Л., Грибанов Г. А. Биодegradация липидов ультраструктур клеток печени крыс при аутолизе. 6, 114.
- Горошинская И. А., Аканья А. А., Могилиничкая Л. В., Шугалей В. С. Биохимические показатели дифференцировки холодового стресса и адаптации. 4, 62.
- Граевская Е. Э., Ломакин П. П., Минеева М. Ф., Гончаренко Е. Н. Влияние  $\beta$ -меркаптоэтиламина на триптофангидроксилазную активность в тканях крыс. 6, 51.
- Давлетов Э. Г., Салыхова Р. М., Камшилов Ф. Х. Влияние ретаболила и оксиметацила на белковый обмен при экспериментальной ожоговой болезни у неполовозрелых крыс. 6, 51.
- Давыдов Б. В., Голиков П. П. Влияние дибурола на перекисное окисление липидов и уровень  $\alpha$ -токоферола в печени крыс при инфаркте миокарда. 4, 70.
- Дегтярь В. Г., Кушлинский Н. Е., Хотченкова П. В. Очистка радиоактивных половых стероидов как лигандов рецепторов. 2, 71.

- Демина Т. Ю. Распределение дипептидаз в тонкой кишке крыс. 2, 104.
- Десятниченко К. С., Балдин Ю. П., Шрейнер А. А., Бахлыков Ю. Н., Изотова С. П. Влияние высокомолекулярной фракции неколлагенового белка костной ткани на остеогенез и кроветворение при удлинении конечности в эксперименте. 1, 79.
- Дзодзуашили В. У. Активность протосолитических ферментов лизосом в слизистой оболочке желудка крыс при действии контрикала. 5, 84.
- Дмитриев А. Д., Теннов А. В., Цуцукловская М. Я., Беляев Б. С., Кизим Е. А., Дмитриева О. Ф. Радноиммунологическое определение содержания  $\alpha$ - и  $\gamma$ -эндорфинов в плазме крови здоровых доноров и больных эндогенными депрессиями. 1, 88.
- Добротина Н. А., Казацкая Ж. А., Емельянова Г. Ю. Лизоцим как модулятор иммунологических реакций. 4, 66.
- Долгих В. Т. Влияние острой смертельной кровопотери на перекисное окисление липидов сердца в пострестраумационном периоде. 6, 31.
- Долгов А. В., Душкин М. И. Активность холестероластераз в аорте и печени крысы при стимуляции и блокаде  $\beta$ -адренорецепторов. 3, 92.
- Доценко В. Л., Серова Н. Б., Логунов А. И., Лебкова И. П., Яровая Г. А. О механизме активирования калликреин-кининовой системы плазмы крови человека при язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки. 4, 104.
- Доценко В. Л., Памазова И. К., Нешкова Е. А. Псевдоэкзофоллиативный синдром. Возможное участие С-реактивного белка и аутоантител в патогенезе заболевания. 5, 125.
- Дятловицкая Э. В., Синицына Е. В., Ключарева Т. Е., Матвеева В. А., Бергельсон Л. Д. Ингибирование цитотоксической активности естественных киллеров гликофинголиндами. Влияние структуры олигосахаридных цепей. 3, 95.
- Ермолаев А. В., Гукасян И. А., Огарков В. И. Выделение поверхностных антигенов *Candida maltosa*, ответственных за кандидосенсибилизацию, и их иммунохимическая характеристика. 4, 42.
- Ершиков С. М. Интенсивность глюконеогенеза и содержание углеводов в ткани печени крыс при гипокинезии. 2, 87.
- Жмуров В. А., Крылов В. И., Петрушина А. Д. Влияние антиоксидантов и мисклерона на процессы дестабилизации клеточных мембран при нефритах у детей. 1, 40.
- Жухоров Л. С., Калинин М. Н. Влияние экспериментальной дислипидемии атерогенного характера на липидный состав миокарда и лейкоцитов периферической крови кроликов. 6, 129.
- Зарембский Р. А., Беляков Н. А., Шершнев Л. К., Оболенский С. В. Состояние калликреин-кининовой системы крови при острых легочных повреждениях. 1, 43.
- Зверихановский Ф. А., Симонян М. А., Вайнштейн С. Г., Гривенко Г. П. Протективное действие супероксиддисмутазы на поражение слизистой оболочки желудка крыс при эмоционально-болевым стрессе. 3, 49.
- Зилова И. С., Шатров Г. Н. Активность лизосомальных гидролаз в печени и сыворотке крови крыс в зависимости от качества белкового компонента рациона. 5, 86.
- Златопольский А. Д., Зайденберг М. А., Берман А. Е., Мазуров В. И., Карелин А. А. Фрагментирование фибронектина десмаскирует активность, стимулирующую синтез ДНК и РНК в клетках грануляционной ткани *in vitro*. 1, 116.
- Зорькина Т. А., Казуева Т. В., Ассур М. В. Состояние энергетического обмена в печени крыс при острой однократной кровопотере. 4, 31.
- Ибатов А. Д., Данилов Г. Е. Изменение фракционного состава коллагена аорты и стенки левого желудочка при электрической стимуляции ретикулярной формации мозга. 6, Казуева Т. В., Коврижных Э. Е., Кузьмина Р. И., Ассур М. В. Энергетический обмен в скелетной мышце при экспериментальном травматическом шоке. 4, 40.
- Карпицкий В. В., Якубовская Р. И., Пасхина Т. С. Контакт-активируемый и иммунореактивный прекалликреин в плазме крови больных гипертонической болезнью. 2, 116.
- Климов А. П., Терюкова Н. П., Поликарпова Л. И., Иоффе Д. В., Калашикова И. М., Попов А. В., Виноградов А. Г., Лозовский В. Т. О катаболизме нативных и модифицированных липопротеидов высокой плотности в организме кролика. 2, 106.
- Ковалева Г. Г., Карманский И. М. Характер взаимодействия макрофагов с сывороточными липопротеидами низкой плотности, частично гидролизованными пенисином. 2, 83.
- Козлов С. А., Киселев Е. П., Зиновьев Ю. В. Сравнительное исследование ряда биохимических и физиологических показателей изолированной перфузируемой печени кроликов, морских свинок и крыс. 2, 68.
- Козлов С. А., Киселев Е. П., Зиновьев Ю. В. Влияние противоишемической защиты на биохимические показатели изолированной перфузируемой печени. 6, 67.
- Коленда Ю. В., Вансович В. Е., Вовчук С. В., Левицкий А. П. Влияние трипсина и калликреина (андекалина) на активность протеолитических ферментов и их ингибиторов при остром экспериментальном панкреатите. 5, 122.
- Колесниченко Л. С., Манторова И. С., Шапиро Л. А., Ольховский И. А., Барон А. В., Кулинский В. И. Влияние эмоционального стресса на активность ферментов метаболизма глутатиона. 3, 85.
- Колпакова С. Е., Виноградова Е. В., Молчанова Л. В., Кирсанова А. К., Коровкин Б. Ф. Особенности активации ферментов лизосом печени крыс при умирании и после оживления организма. 5, 89.
- Комар С. И., Коробейникова Э. П. Динамика  $\alpha_1$ -антитрипсина и  $\alpha_2$ -макроглобулина у больных остротекущей и затяжной пневмонией. 4, 46.
- Комарин А. С., Азимова Ш. А. Состояние монооксигеназной ферментной системы печени крыс при гипокинезии. 4, 75.
- Коннов Б. А., Заргарова О. П., Коннова Л. А., Мелькишев В. Ф. Метаболический фонд свободных аминокислот крови и спинномозговой жидкости у больных аденомой гипофиза до и после протонной терапии. 2, 32.
- Коровкин Б. Ф., Полякова Э. Д., Стволинская И. С., Колпакова С. Е., Иванова Т. П. Активность кислых гидролаз и проницаемость мембран лизосом кардиомиоцитов и гепатоцитов при экстремальных состояниях. 5, 33.

- Короленко Т. А., Пупышев А. Б., Мудраковская А. В. Исследование внутрилизосомного катаболизма белка с использованием лизосомотропных препаратов — ингибиторов протосолиза и протеиназ. 5, 93.
- Корф И. И., Мещерякова В. А., Самсонов М. А., Чепурненко Н. В., Кошечкин В. А., Левачев М. М. Изменение состава жирных кислот мембран эритроцитов и тромбоцитов под влиянием диетотерапии у больных гиперлиппротеидемией II типа. 3, 73.
- Косенко Е. А., Каминский Ю. Г., Гончаренко М. С. Адениннуклеотиды и аденилатный энергетический заряд в эритроцитах при неориазе. 6, 37.
- Косовский М. И. Участие простагландинов в активировании транспорта сахаров в диафрагму крыс. 2, 52.
- Котловский Ю. В., Гуткина Н. И., Гуляева Л. М., Довгий А. И., Андрианов Н. В., Мишин В. М., Иванов В. В. Влияние акрилатов на содержание и изоформный состав цитохрома Р-450 микросом печени крыс. 1, 96.
- Крауцалис К. И., Дзярлюс А. П., Улинскаяте А. П. Анализ взаимодействия глюкокортикоидов с рецепторами клеток печени крыс при росте карциносаркомы Уокера. 1, 33.
- Кричевская А. А., Лукаш А. И., Пушкина Н. В., Шенотинская И. В., Жданов А. Ю. Влияние голодания на интенсивность протосолиза и амидированность белков тканей крыс разного возраста. 3, 45.
- Крылов В. И., Петрушина А. Д., Морева Г. В., Гранник Г. К., Дурьгин А. Н., Журавлева Т. Д., Портнягина Г. В. Роль нарушений структуры клеточных мембран в формировании гормонорезистентных вариантов заболеланий почек у детей. 4, 22.
- Кузнецов И. Г., Суслова С. К., Расулов М. М., Гукасов В. М., Каплан Э. Я. Влияние метилурацила на перекисное окисление липидов в плазме крови и гомогенатах тканей язвенного дефекта стенки желудка крыс. 3, 77.
- Кузнецов В. А., Мелконян С. Г., Лисовская И. Л., Волкова Р. И. Изменение микровязкости плазматической мембраны и чувствительности к ПГЕ<sub>1</sub> тромбоцитов, хранящихся при 22 и 4 °С. 4, 28.
- Кузьмина Н. С., Акопов С. Б., Бульдьева Т. В., Збарский И. Б. Влияние актиномицина D, циклогексимида, пурамицина и митомицина C на новообразование белков теплового шока ядерного матрикса фибробластов китайского хомячка. 6, 79.
- Кулинский В. И., Ольховский И. А., Ковалевский А. Н. Исследование биохимико-фармакологических механизмов и взаимосвязи антикалоригенного, гипотермического и антигипоксического эффекта адепозина. 3, 107.
- Кульчицкий О. К. Влияние гепатэктомии на аденилатциклазную систему печени крыс разного возраста. 1, 19.
- Левицкий А. П., Козлянина Н. П., Скляр В. Е. Процессы перекисного окисления липидов и антиоксидантные системы в тканях пародонта кошек. 1, 107.
- Лелевич В. В. Влияние этанола и метронидазола на гликолиз в некоторых отделах головного мозга крыс. 5, 139.
- Литвинов Н. Н., Долинская С. И., Астахова Л. Ф., Бурмантова Н. П. Влияние низких концентраций нитрозодиметилamina на функциональное состояние ферментных систем эндоплазматической сети печени крыс. 6, 85.
- Локшина Л. А., Соловьева Н. И., Орехович В. И. Роль лизосомных протеиназ в деструкции ткани. 5, 38.
- Лужников Е. А., Трушин А. М., Кабанов О. В. Закономерности адсорбции барбитуратов на активированных углях. 6, 64.
- Лызлова С. П. Лизосомальные белки нейтрофилов — факторы антимикробной защиты клеток. 5, 43.
- Ляпина Л. А., Аммосова Я. М. Комплексообразование генарина с ингибитором неферментативного фибринолиза, выделенным из ткани селезенки. 3, 88.
- Ляпина Л. А., Кудряшов Б. А., Баратова Л. А. Характеристика белка, выделенного из альбуминовой фракции крови в норме и при диабете. 6, 69.
- Мажуль Л. М. Некоторые показатели перекисного окисления липидов в крови крыс разного возраста при аллоксановом диабете. 2, 41.
- Макаров В. К., Каргаполов А. В. Липидный состав сыворотки крови больных алкоголизмом и хроническим персистирующим гепатитом. 2, 25.
- Мареева Т. Б., Соковнина Я. М., Вотрин И. И. Значение исследования адениннуклеотидов в функциональной активности тромбоцитов при гемофилии А. 2, 100.
- Маркова О. А., Калашников В. В., Хватов В. Б. Выделение и характеристика антитромбина-III из плазмы крови человека. 3, 62.
- Маслов Л. Н. Нарушение энергетического метаболизма мозга при экспериментальном внутримозговом кровоизлиянии. 1, 59.
- Маянский Д. Н., Цырендоржиев Д. Д., Рупакова С. А. Лизосомальные ферменты фагоцитирующих клеток в патогенезе воспаления. 5, 48.
- Меерсон Ф. З., Явич М. П. Роль цитоплазматических факторов в постстрессорных изменениях синтеза РНК в сердце и печени. 2, 90.
- Меликсетян Г. О., Мкртчян З. С., Акопян Ж. И. Очистка и некоторые свойства изофермента ММ креатинкиназы из сердечной мышцы человека. 2, 112.
- Микаелян Э. М., Овакимян С. С., Карагезян К. Г. Мембраностабилизирующий эффект  $\alpha$ -токоферола при остром стрессе. 4, 109.
- Мирошников В. М., Габукова Т. В. Характеристика ферментов гликолиза при биостимуляции репаративного остеогенеза. 4, 73.
- Монастырская А. Р., Фролова В. М., Востряков А. П., Гуткин В. С., Горбатов В. А., Дейгин В. И., Ярова Е. П., Роговин В. В. Влияние *in vitro* [Д-аза-4]-дсрморфина на люминолзависимую хемилюминесценцию цельной крови мышей при фагоцитозе. 3, 56.
- Мосолов В. В. Ингибиторы протееолитических ферментов в растениях. 5, 52.
- Мохов В. М., Блюдзин Ю. А. Жирнокислотный состав липидов печени при хронических гепатитах, циррозах печени и жировом гепатозе. 3, 38.
- Мхитарян Л. С. Ионтранспортная система и некоторые компоненты структуры сарколеммы в условиях острой ишемии миокарда. 1, 21.
- Наджимурдинов К. П., Азимов М. И., Краковский М. Э., Аширметов А. Х. Состояние мик-

- росомальной окислительной системы печени крысы с острым остеомиелитом нижней челюсти. 3, 101.
- Никандров В. Н., Пыжова И. С., Вотяков В. И.* Влияние органических растворителей на иницируемый стрептокиназой фибринолиз. 1, 84.
- Никандров В. Н., Вотяков В. И., Наумович С. А., Воробьева Г. В., Цыманович С. Г., Янковская Г. С.* Исследование образования комплексов стрептокиназы и гепарина и их свойств. 2, 54.
- Никифоровская Л. Ф., Иванова Л. И.* Гликозаминогликазы и гликогидролазы в почке крысы с наследственным песахарным диабетом. 1, 91.
- Обросова И. Г., Ларин Ф. С., Ефимов А. С., Тронько Н. Д., Цырук В. Л., Павленя А. К.* Изучение гиполипидемического действия антивитамина В<sub>1</sub>-окситиамина — у диабетических мышшей (db/db). 6, 47.
- Оглоблина Т. А., Литинская Л. Д., Векслер А. М.* Пространственная и временная неоднородность лизосом различных типов культивируемых клеток *in situ* по величине рН. 5, 56.
- Опарин Д. А., Зиматкина Т. И., Островский Ю. М.* Преимущества окситиаминабромиды как специфического ингибитора активности тиаминазависимых ферментов. 1, 70.
- Панин Т. Е.* Роль кооперативного эффекта липопротеннов и гормонов в регуляции лизосомального аппарата клеток. 5, 96.
- Петрович Ю. А., Терехина Н. А., Гольдфельд Н. Г.* Активность оксидоредуктаз лимфоцитов периферической крови больных герпетическим кератитом. 4, 59.
- Петрович Ю. А., Трусова Н. Ф.* Роль модификации молекулы пуринового циклонуклеотида в регуляции активности кислой гликозидазы тромбоцитов. 5, 102.
- Петушкова Н. А., Цветкова И. В., Фукс М. А., Доронин Г. Л., Якубович Д. В.* Пренатальный диагноз маннозидоза с использованием ворсин хориона. 4, 99.
- Плотникова Е. К., Головенко Н. Я., Зиньковский В. Г., Лукьяненко Н. Г., Жук О. В., Басок С. С.* Транспорт и метаболизм мембраноактивного комплекса в организме мышшей. 1, 62.
- Подосинников И. С., Зозулякова С. В., Чухловина М. Л., Полушкина Л. И., Залкинд Л. Г.* Влияние тимэктомии на активность ключевых ферментов глюконеогенеза в печени крысы. 1, 29.
- Полякова Н. Е., Громова О. А., Цырлов И. Б.* Влияние различных инактивирующих агентов на микросомные цитохромы Р-450 и Р-448. 6, 27.
- Попова М. П., Попов Ч. С.* Влияние некоторых противовоспалительных препаратов на стабильность лизосом и пероксисом и на общую активность каталазы и кислой фосфатазы. 5, 105.
- Потапенко Р. И.* Влияние вазопрессина на активность Na, К-АТФазы синаптических мембран головного мозга взрослых и старых крысы. 2, 122.
- 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. 4, 86.
- Прозоровская Н. П., Глиняная С. В., Дельвиг А. А., Рудиков С. С., Воронцов Ю. П.* Экскреция оксипролина с мочой при воронкообразной деформации грудной клетки. 3, 59.
- Пушкина Н. В., Цыбульский И. Е., Лусан А. И.* Амидированность белков крови в условиях гипергликемии при экспериментальном сахарном диабете. 4, 52.
- Рахимов М. М., Горбатая О. П., Пенькова Л. П.* Изменение фосфолипидного состава мембран митохондрий печени крысы при введении им этанола. 2, 93.
- Рогаева 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<sub>r</sub> 15 кД и ингибирующим действием сыворотки на Na, К-АТФазу? 4, 34.
- Розанов В. А., Карпович Г. А., Сергеева О. Н., Копелевич В. М., Гунар В. И.* Влияние многократных инъекций ГАМК на ГАМК-шунт и некоторые связанные с ним реакции в головном мозге крысы. 6,
- Рыженков В. Е., Прокопьев А. А., Персиян Г. Г., Каменева И. Ю., Шава А. Г.* Гиполипидемическое действие рацемического метилового эфира 16,16-диметил-19-гомо-8-изоэстрола. 2, 65.
- Саломатин В. В., Лифшиц Р. И.* Связывающая способность сывороточного альбумина при термических ожогах. 2, 73.
- Санфиорова В. М., Титов В. Н., Громядова М. Ф.* Влияние этинилэстрадиола и эстрадиола динпропионата на этерификацию насыщенных и ненасыщенных экзогенных жирных кислот в печени крысы. 2, 77.
- Селевич М. И., Островский Ю. М.* Включение 1-6-<sup>14</sup>C-глюкозы в липидные фракции печени и головного мозга крысы с различной алкогольной мотивацией. 4, 89.
- Сергеев И. П., Блажевич Н. В., Каплянский А. С., Швец В. П., Белаковский М. С., Спиричев В. Б.* Сравнительное изучение влияния 1,25-дигидроксиэстрола и 24,25-дигидроксиэстрола на гомеостаз кальция и состояние костной ткани у крысы при гипопаратиреозе. 1, 100.
- Сергеев И. П., Ухина Т. В., Черных П. С., Матюшин А. И., Ницого В. Д., Кан А. М.* Стероидные гормоны и лизосомы. 5, 60.
- Сергеев И. П., Ким Рён Ха, Арханчев Ю. П., Коденцова В. М., Алексеева И. А., Сокольников А. А., Климова О. А., Спиричев В. Б.* Обмен 25-оксидовитамина Д<sub>3</sub> в слизистой оболочке тонкой кишки у крысы при недостаточности витамина В<sub>3</sub>. 6, 96.
- Сидорова В. Е., Варвашевич Т. П., Тимченко П. Ф.* Экзоферменты псевдотуберкулезного микроба. 2, 44.
- Синилова П. Г., Дуплишева А. П., Ромашевская Е. И., Мысякин Е. Б., Туманян М. А.* Химическая структура и иммуностимулирующая активность высокомолекулярных полисахаридов. 6, 103.
- Сокирко Т. А.* Влияние туберкулоостатических препаратов и сукцината натрия на функциональное состояние митохондрий печени при туберкулезе. 4, 83.
- Соковина Я. М., Пестина Т. И., Туркина А. Г., Вотрин И. И.* Сравнительная характеристика каталитических свойств аденозиндезаминазы тромбоцитов в норме и при хроническом миелолейкозе. 6, 71.
- Соколовский В. В., Гончарова Л. Л., Киселева Н. П., Макарова И. П., Родионова Л. П.*

- Антиоксидантная система организма при шумовом стрессе. 6, 111.
- Соловьева Н. А., Гинзбург Э. Х., Казаринова Ф. С., Кандауров В. В., Салганик Р. И.* Повышенный транспорт галактозы в клетки как причина развития наследственной галактоземии у крыс. 6, 41.
- Соркин В. М., Борисенко С. Н., Касимова Г. А.* Фукозилирование белков сыворотки крови при раке желудка. 4, 49.
- Стан Е. Я., Екимовский А. П.* Пептидный биорегулятор из коровьего к-казина. 1, 111.
- Стров Е. А., Дмитриев А. В.* Гормональные аспекты регуляции катепсина Д семенных пузырьков. 5, 107.
- Судовцов В. Е., Жармухамедова Т. Ю.* Физико-химические характеристики сорбитолдегидрогеназы из цитоплазмы клеток печени быка. 3, 81.
- Сумароков Д. Д.* Влияние кислотной экстракции на остеониндуктивную активность костной ткани. 1, 51.
- Сээнэ Т. П., Алев К. П., Пэхме А. Я.* Влияние повышенной функциональной активности скелетных мышц на скорость обновления тяжелых и легких цепей миозина. 1, 75.
- Табагари С. И., Шубитидзе Т. М., Абдушелишвили Г. В.* Влияние глюкогаона на активность лизосомальных протеиназ при введении тетраметилтиурамдисульфида. 5, 112.
- Тишенина Р. С.* Содержание соединений, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой, в плазме крови здоровых людей и больных некоторыми эндокринопатиями. 1, 72.
- Ткаченко А. В.* Взаимодействие билирубина, альбумина и синтапсомной мембраны. 6, 74.
- 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. 4, 112.
- Тремасова Г. Я.* Митохондриальное окисление в печени кроликов при острой кровопотере. 3, 33.
- Троицкий Г. В., Касимова Г. А., Борисенко С. И.* Степень модификации сывороточного альбумина как токсикологический тест. 2, 38.
- Тутельян В. А., Васильев А. В.* Ферментные системы лизосом в реализации клеточного питания. 5, 65.
- Тырышкин А. М., Сальник Б. Ю.* Обмен аденинуклеотидов в ткани семенников крыс в условиях аллоксанового диабета. 3, 98.
- Тырышкин А. М., Сапрыкина Э. В., Сальник Б. Ю.* Проницаемость и фосфолипидный состав мембран митохондрий семенников крыс при аллоксановом диабете. 6, 121.
- Ушакова И. А., Казлас Е. В., Бельный Д. М., Лукомская И. С.* Использование апител для дифференциального определения нейтральной и кислой  $\alpha$ -глюкозидаз мочи человека в норме и при патологии. 6,
- Федуров В. В., Беломар Л. Б.* Зависимость скорости биосинтеза убихинона от активности холестериногенеза в печени и почках крыс. 5, 134.
- Федуров В. В.* Влияние холестерина и желчных кислот на обмен убихинона в органах крыс. 6, 82.
- Феоктистов И. А., Балденков Г. Н., Меньшиков М. Ю., Ларионов Н. П.* Использование фармакологических соединений для изучения взаимодействия кальмодулина с ферментами. 2, 27.
- Филановская Л. И., Того А. В., Цвейбах А. С., Блинов М. П., Алексеев Н. А., Ушакова Е. А.* Аденозиндезаминидаза, пуринопуринозидфосфорилаза и экто-5'-нуклеотидаза — маркеры вариантов острого лейкоза. 4, 16.
- Фишер А. А., Калюжная Е. П., Саха С. К.* Особенности синтеза простаноидов у больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки с геморрагическими осложнениями в анамнезе. 3, 66.
- Фролов В. А.* Хронобиология лизосом. 5, 74.
- Хакимов З. З., Мавлянов И. Р., Карабанович А. К.* Функциональное состояние цитоплазматической сети гепатоцитов у крыс с термическим ожогом. 2, 48.
- Хохлов А. П., Баскаева Т. С., Хрусталева Н. А., Завалишин И. А., Мозжечков В. Т.* Выделение и некоторые свойства специфической лейцинаминопептидазы из биологических жидкостей больных рассеянным склерозом. 2, 58.
- Чайковский В. С., Башарина О. Б., Шалыпина И. В., Рогозкин В. А.* Влияние физической нагрузки на содержание миоглобина и тропомиозина в скелетных мышцах и миоглобина в крови крыс. 4, 79.
- Чернова И. А., Шатаева Л. К., Абрашев И., Велчева П., Самсонов Г. В.* Использование гликомакропептида  $\alpha$ -казина в качестве субстрата нейраминидазы. 3, 53.
- Чиркин А. А., Коневалова Н. Ю.* Действие факторов, стимулирующих пролиферацию, на эстерификацию холестерина в сыворотке крови крыс при острой интоксикации тетрахлорметаном. 6, 124.
- Щербак И. Г., Никандров Н. П., Фаенкова В. П., Кирпиченок Л. П.* Исследование продуктов протеолитического действия катепсина В на некоторые белковые субстраты. 5, 115.
- Ягвдик П. З., Федорова Т. А., Детинкин О. Н.* Характеристика ассоциации белка и ДНК в хроматине клеток эпидермиса при псориазе. 2, 62.
- Ягодкин Г. А., Юртов Е. В., Гусева Т. В.* Извлечение компонентов липопротеидов эмульсиями. 1, 66.
- Якушев В. С., Миронова Е. В., Курипка В. И.* Баланс кальция при некрозе миокарда и значении стресса в его нарушении. 1, 25.
- Якушев В. С., Курипка В. И., Шкопинский Е. А., Бушуева В. В., Давыдов В. В., Крисанова И. В., Скурыгин В. П., Жежа В. В., Макоед О. Б.* Инсулин крови и особенности азотистого обмена органов при воспроизведении некроза миокарда после перенесенного эмоционального стресса. 2, 18.

#### МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

- Ажицкий Г. Ю., Загоруйко Г. В., Троицкий Г. В.* Методика изоэлектрического фокусирования в борат-полнолной системе в градиенте рН от 4,0 до 5,6 в тонком слое ПААГ. 4, 124.
- Ахунов В. С., Краснополянская К. Д.* Идентификация  $G_{m2}$ -ганглиозидов с помощью нагрузочного теста *in vitro*. 4, 115.
- Белоусова Л. В., Федосов С. П., Москвитина Е. Л., Гриню Л. П., Рафанов В. С.* Потенциометрический метод определения активности креатинкиназы в сыворотке крови. 1, 138.

- Лукашева Е. В., Смирнов В. П. Вопрос об определении активности L-аминокислот. 1, 127.
- А. Г., Лахина Л. В., Панкратов З., Теплицкий Б. И., Чумакова Г. П. Симметрический метод последовательного определения активности нескольких дездрогеназ в одном мазке из лейкоцитов человека. 3, 118.
- Ончаров И. П., Качия Г. В., Бутнев В. Ю., Воронцов В. И., Хагундокова Л. Б., Веземан Р. Применение радиоиммунного метода определения 11-дезоксикортизола для оценки функции системы гипофиз—кора надпочечников в условиях метопиронового теста. 6.
- Дегтярь В. Г., Милосердов Ю. В. Статистическая обработка результатов определения рецепторов стероидных гормонов. 3, 121.
- Дыгало И. И. Простая чувствительная модификация флюориметрического метода определения активности тирозингидроксилазы в ткани головного мозга. 4, 126.
- Бегукин Г. Г. Метод выделения плазматических мембран из жировой ткани крыс без предварительной обработки коллагеназой. 6, 132.
- Загоруйко Г. В., Ажицкий Г. Ю., Троицкий Г. В. Двухмерный электрофорез продуктов ограниченного гидролиза сывороточного альбумина человека с использованием изоэлектрического фокусирования в борат-полиольной системе. 2, 136.
- Костюк В. А., Потапович А. И. Определение продуктов перекисного окисления липидов с помощью тиобарбитуровой кислоты в анаэробных условиях. 3, 115.
- Лебедева Т. В., Одиноква О. П., Краснопольская К. Д., Фрейдин М. И. Использование флюорометрического титрования в методе метаболической кооперации для дифференциации мукополисахаридоза. 6.
- Лунец Е. Ф., Сперанская Е. Ч., Сперанский С. Д. Определение активности NADH-метгемоглобинредуктазы с помощью аминокислотных ортобензохинона. 3, 126.
- Оглоблина О. Г., Белова Л. А., Малахов В. П. Эффективный метод выделения кислотостабильного ингибитора протеиназ из мочи человека. 4, 119.
- Розанов В. А., Карпович Г. А., Мулюкина Н. А. Об использовании пиридоксаль-5-фосфата при определении аминотрансферазной активности в ткани головного мозга. 3, 129.
- Таранова Н. П., Говорова Л. В. Микрометод определения общих липидов в лимфоцитах и другом биологическом материале. 2, 132.

- Тогузов Р. Т., Тихонов Ю. В., Пименов А. М., Новикова Т. Е., Мейснер И. С. Определение пуриновых и пиримидиновых производных в составе кислоторастворимых фракций органов и тканей методом высокоэффективной жидкостной обращенно-фазной ион-парной хроматографии. 1, 133.

## ДИСКУССИИ

- Березов Т. Т. Некоторые итоги дискуссии по преподаванию биохимии в медицинских институтах. 3, 134.
- Табагари С. И., Кокичавили М. С. Нерешенные вопросы преподавания биохимии в медицинских институтах. 3, 132.

## РЕЦЕНЗИИ

- Видершайн Г. Я. Рецензия на книгу Молекулярные основы лизосомных болезней накопления (Molecular Basis of Lysosomal Storage Disorders). 4, 129.
- Касавина Б. С. Рецензия на книгу Р. А. Тиграняна. Метаболические аспекты проблемы стресса в космическом полете. М., Наука, 1985, 224 с. 3, 138.
- Коровкин Б. Ф. Рецензия на книгу С. Н. Голикова, В. Б. Долго-Сабурова, Н. Р. Еласва и В. И. Кулешова. Холинэргическая регуляция биохимических систем клетки. 3, 137.
- Петрович Ю. А., Карлов В. А. Рецензия на книгу К. И. Погодаева. Эпилептология и патохимия мозга. 6.
- Чиркин А. А. Рецензия на книгу Е. А. Строева. Биологическая химия. М., Высшая школа, 1986. 4, 131.

## ХРОНИКА

- Васильев А. В. III Всесоюзный симпозиум «Структура и функции лизосом». 5, 119.
- Ившикова В. М., Агабабава И. С. О 8-м пленуме Научного совета по биологической и медицинской химии. 2, 140.
- Слепушкин В. Д. О I Всесоюзной конференции «Нейропептиды: их роль в физиологии и патологии». 2, 138.

## НЕКРОЛОГ

- Памяти заслуженного деятеля науки РСФСР профессора И. В. Сидоренкова. 1, 140.
- Владимир Ильич Мазуров. 4, 135.

## СОДЕРЖАНИЕ

- Большакова Т. Д., Шендерович М. Я. Физиологическая роль и клиническое значение 3-метокси-4-оксифенилэтиленгликоля, метаболита норадrenalина (Обзор)
- Аникеева С. П., Панченко Л. Ф., Штернберг Ю. М. Биохимические и регуляторные аспекты функции кетонных тел в организме (Обзор)

11

## CONTENTS

- Bol'shakova, T. D., Shenderovich, M. Ya. Physiological and clinical importance of 3-methoxy-4-hydroxyphenyl ethyleneglycol, metabolite of noradrenaline
- Anikeeva, S. P., Panchenko, L. F., Shternberg, Yu. M. Biochemical and regulatory aspects of the ketone bodies function in the host (a review)

- 23 *Ворончихина Л. Д., Демьянова В. Т., Манжаров Н. В.* Экскреция полиаминов с мочой у больных с термическими ожогами
- 27 *Полякова Н. Е., Громова О. А., Цырлов И. Б.* Влияние различных инактивирующих агентов на микросомные цитохромы P-450 и P-448
- 31 *Долгих В. Т.* Влияние острой смертельной кровопотери на перекисное окисление липидов сердца в пострессуационном периоде
- 37 *Косенко Е. А., Каминский Ю. Г., Гончаренко М. С.* Аденинуклеотиды и аденилатный энергетический заряд в эритроцитах при псориазе
- 41 *Соловьева Н. А., Гинзбург Э. Х., Казаринова Ф. С., Кандауров В. В., Салганик Р. И.* Повышенный транспорт галактозы в клетки как причина развития наследственной галактоземии у крыс
- 47 *Обросова И. Г., Ларин Ф. С., Ефимов А. С., Тронько Н. Д., Цырук В. Л., Павленя А. К.* Изучение гиполлипидемического действия антивитамина B<sub>1</sub> окситиамина — у диабетических мышей (db/db)
- 51 *Давлетов Э. Г., Салихова Р. М., Камиллов Ф. Х.* Влияние ретаболила и оксиметацила на белковый обмен при экспериментальной ожоговой болезни у неполовозрелых крыс
- 56 *Арион В. Я., Хроменков Ю. И., Тагирова А. К., Караулов А. В., Бреусов Ю. П., Санина И. В.* Влияние Т-активина на ферменты метаболизма ксенобиотиков
- 59 *Антоненков В. Д., Гусев В. А., Краснова С. П.* Влияние этанола и ингибитора каталазы аминотриазола на активность ферментов антиокислительной защиты в печени и сердце крыс
- 64 *Лужников Е. А., Трушин А. М., Кабанов О. В.* Закономерности адсорбции барбитуратов на активированных углях
- 67 *Козлов С. А., Киселев Е. П., Зиновьев Ю. В.* Влияние противоишемической защиты на биохимические показатели изолированной перфузируемой печени
- 69 *Ляпина Л. А., Кудряшов Б. А., Баратова Л. А.* Характеристика белка, выделенного из альбуминовой фракции крови в норме и при диабете
- 71 *Соковнина Я. М., Пестина Т. И., Туркина А. Г., Вотрин И. И.* Сравнительная характеристика каталитических свойств аденозиндеаминазы тромбоцитов в норме и при хроническом миелолейкозе
- 74 *Ткаченко А. В.* Взаимодействие билирубина, альбумина и синантосомной мембраны
- 79 *Кузьмина С. П., Акопов С. Б., Бульдьева Т. В., Збарский И. Б.* Влияние актиномицина D, циклогексимида, пуromицина и митомицина C на новообразование белков теплового шока ядерного матрикса фибробластов китайского хомячка
- 82 *Федуров В. В.* Влияние холестерина и желчных кислот на обмен убихинона в органах крыс
- 85 *Литвинов П. П., Долинская С. И., Астахова Л. Ф., Бурмантова Н. П.* Влияние низких концентраций нитрозодиметилamina на функциональное состояние ферментных систем эндоплазматической сети печени крыс
- Бауманис Э. А., Бирска И. А., Рейхман Г. О., Кируле И. Э., Шведов В. И., Горкин В. З.* О механизме качественной модифи-
- Voronchikhina, L. D., Demyanova, V. T., Manzharov, N. V.* Excretion of polyamines with urine in patients with thermic burns
- Polyakova, N. E., Gromova, O. A., Tsyrllov, I. B.* Influence of various agents on the microsomal cytochromes P-450 and P-448
- Dolgikh, V. T.* Effect of acute lethal hemorrhage on lipid peroxidation in heart during postresuscitation period
- Kosenko, E. A., Kaminsky, Yu. G., Goncharenko, M. S.* Adenine nucleotide and adenylate energy charge in erythrocytes under conditions of psoriasis
- Solovyova, N. A., Ginsburg, E. H., Kazarinova, F. S., Kandaurov, V. V., Salganik, R. I.* High galactose transport into the cells as the cause of hereditary galactosemia in rats
- Obrosova, I. G., Larin, F. S., Ejinov, A. S., Tron'ko, N. D., Tsyruk, V. L., Pavlenuya, A. K.* Hypolipidemic effect of antivitamin B<sub>1</sub> oxythiamine in mice with diabetes
- Davletov, E. G., Saliakhova, R. M., Kamilov, F. Kh.* Retabolyol and oxymetacyl influence on protein metabolism in experimental burns of preadolescent rats
- Arion, V. Ya., Chromenkov, Yu. I., Tagirova, A. K., Karaulov, A. V., Breusov, Yu. N., Sanina, I. V.* Effect of T-activin on the xenobiotic metabolizing enzymes
- Antononkov, V. D., Gusev, V. A., Krasnova, S. N.* Effects of ethanol and catalase inhibitor aminotriazole on activity of enzymes participating in the antioxidation system in rat liver and heart tissues
- Luzhnikov, E. A., Trushin, A. I., Kabanov, O. V.* Patterns of barbiturates adsorption on activated charcoal
- Kozlov, S. A., Kiselev, E. N., Zinov'ev, Yu. V.* Effect of antiischemic drugs on biochemical patterns in isolated perfused liver tissue
- Lyapina, L. A., Kudrjashov, B. A., Baratova, L. A.* Properties of a protein isolated from blood albumin fraction under normal conditions and in diabetes
- Sokovnina, Ya. M., Pestina, I. I., Turkina, A. G., Votrin, I. I.* Catalytic properties of adenosine deaminase from thrombocytes under conditions of chronic myeloleukosis and in normal state
- Tkachenko, A. V.* Interaction between bilirubin, albumin and synaptosomal membrane
- Kuz'mina, S. N., Akopov, S. B., Bul'dyeva, T. V., Zbarsky, I. B.* Effect of actinomycin D, cycloheximide, puromycin and mitomycin C on biosynthesis of thermal shock proteins in fibroblast nuclear matrix of chinese hamster
- Fedurov, V. V.* Effect of cholesterol and bile acids on ubiquinone metabolism in rat tissues
- Litvinov, N. N., Dolinskaya, S. I., Astakhova, L. F., Burmantova, N. P.* Effect of nitrosodimethylamine at low concentrations on the functional state of enzymatic systems in rat liver endoplasmic reticulum
- Baumanis, E. A., Birska, I. A., Reikhman, G. O., Kerule, I. E., Shvedov, V. I., Gorkin, V. Z.* On the mechanism of qualitative mo-