

ТОМ XXXIV

ВЫПУСК 1

ЯНВАРЬ — ФЕВРАЛЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

ВОПРОСЫ
МЕДИЦИНСКОЙ
ХИМИИ



Москва · Медицина · 1988



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БЛЕВ А. А. (Москва)
БЕЛЕНЦЕР В. А. (Киев)
БЫЧКОВ С. М. (Москва)
КОНОСТАНТИНОВ А. А. (Хабаровск)
КУДРЯШОВ Б. А. (Москва)
ЛЯЛОВИЧ В. В. (Новосибирск)
ПАСХИНА Т. С. (Москва)

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

Т. И. Торховская, Э. М. Халилов

ЛИПИДПЕРЕНОСЯЩИЕ БЕЛКИ ПЛАЗМЫ КРОВИ (ОБЗОР)

НИИ физико-химической медицины Минздрава РСФСР, Москва

Исследование белков плазмы крови, связывающих липиды и осуществляющих их транспорт между биопверхностями, привлекает внимание многих исследователей. Наиболее распространенным объектом изучения являются апопротеины липопротеинов (ЛП), ответственных за многие процессы (как в норме, так и при патологии) в организме животного и человека, в том числе и за развитие атеросклеротического повреждения сосудов [1, 31]. Несмотря на значительные успехи в изучении структуры и функции ЛП плазмы, детальное исследование этих вопросов затруднено тем, что многие компоненты ЛП находятся в динамическом равновесии как между отдельными их классами, так и с клеткой. Получены данные [45, 53], подтверждающие, что быстрому обмену подвергаются липиды, содержащие полярные группы — свободные жирные кислоты, моноацилфосфолипиды (лизолецитин) и неэтерифицированный холестерин. Особенно много работ по изучению транспорта последнего между ЛП и клеткой и между ЛП отдельных классов [22, 53]. Некоторые авторы полагают, что механизм такого перехода, часто называемого в литературе физико-химическим обменом, связан с происходящими в процессе циркуляции в кровяном русле столкновениями («collision») мембранных структур с возможной диффузией липидных компонентов [52]. Однако в последнее время большинство исследователей сходится в том, что этот обмен осуществляется через водную фазу — сыворотку крови [41]. Несмотря на низкую водную растворимость (10^{-6} — 10^{-8} М [41]) и поэтому низкую концентрацию в сыворотке, не регистрируемую с помощью обычных анализаторов, большой объем циркулирующей крови обуславливает в целом переход через

сыворотку значительных количеств неэтерифицированного холестерина [3]. При этом лимитирующей скоростью стадией является выход молекулы липида в водную фазу. Установлено [43], что различные фосфолипиды — фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилглицерин — с разным жирно-кислотным составом также могут подвергаться транспорту через водную фазу, что было показано с помощью флюоресцентно-меченых пиренсодержащих фосфолипидов. Авторы [43] отмечают низкую скорость и высокую энергию активации этого транспорта — 23—26 ккал/моль (в зависимости от гидрофобности фосфолипидов).

Еще более затруднен транспорт неполярных липидов — эфиров холестерина и триглицеридов, локализующихся в ядре ЛП. Спонтанный выход их в водную фазу, затрудненный необходимостью преодоления поверхностного фосфолипидного монослоя, невозможен из-за высокого энергетического барьера. Однако, несмотря на это, в общей схеме метаболизма ЛП [1, 14, 50] существуют стадии, связанные с транспортом всех указанных липидов между ЛП различных классов. Это переход фосфолипидов и частично триглицеридов от липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) к липопротеинам высокой плотности (ЛПВП), а также обратный транспорт эфиров холестерина.

Как же осуществляется такой транспорт? Естественно, что он может происходить только при участии каких-либо белков-переносчиков. В плазме крови основные липидтранспортные функции несут апопротеины. Однако транспорт липидов между ЛП отдельных классов в процессе их трансформации осуществляется, как показано серией работ последних лет из ряда лабораторий, другими специфическими

белками, присутствующими в плазме крови после удаления всех ЛП в плотности выше 1,21 г/мл. Существование такого транспорта впервые предсказал около двух десятилетий назад один из крупнейших специалистов в области изучения липопротеинов плазмы крови А. Николе [49]. Наблюдая транспорт эфиров холестерина от ЛПВП к ЛПОНП, он высказал предположение, что такой переход — в обмен на триглицериды — может обеспечиваться специальными транспортными белками, отличающимися от апопротеинов. Спустя десятилетие Зильверсмитом впервые было показано присутствие в плазме крови кролика во фракции с плотностью более 1,25 г/мл специфического белкового фактора, осуществляющего обмен эфиров холестерина между ЛП низкой плотности (ЛПНП) и ЛПОНП [70]. Подобный белковый фактор, катализирующий обратимый переход меченых эфиров холестерина между ЛПНП и ЛПВП, обнаружен и в плазме крови человека, в то время как у крыс он отсутствовал [9, 58]. На основании того, что в опытах по инкубации ЛП с плазмой общая масса эфиров холестерина в каждом классе ЛП не менялась, а наблюдалось только перераспределение радиоактивности, авторы пришли к выводу о равновесном характере транспорта эфиров холестерина, осуществляемого белковым фактором.

Эти работы способствовали появлению нового направления исследования ЛП — выделению и изучению свойств липидпереносящих белков плазмы крови.

Следует отметить, что к этому времени в литературе была накоплена значительная информация о липидпереносящих белках печени. В ряде лабораторий изучены и активно применяются в модельных исследованиях специфические фосфолипидпереносящие белки цитозоля печени [68]; имеются данные о белке, способном связывать холестерин [22]. В то же время изучение липидпереносящих белков плазмы крови внесло в литературу представление о белках, способных переносить гидрофобные, неполярные липиды — эфиры холестерина и триглицериды.

В 1978 г. Патнек и соавт. выделили из плазмы крови человека в плотности выше 1,25 г/мл белок, катализиру-

ющий обмен эфиров холестерина между ЛПНП и ЛПВП [51]. Для его выделения была применена комбинация хроматографических методов и ультрацентрифугирования с последующим отделением от лецитин-холестерин-ацилтрансферазы (ЛХАТ) колоночной хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе. Выделенный белок отличался по всем характеристикам от апопротеинов и представлял собой гликопротеин с мол. массой 80 000 и изоэлектрической точкой 5,0. В опытах по одновременной инкубации этого белка и ЛХАТ с препаратами ЛП было показано, что функциональная активность каждого из указанных белков не зависит от присутствия другого. Исходя из обратимости обмена, катализируемого «эфир холестерина-переносящим (ЭХП) белком», авторы разработали метод определения его активности в плазме, основанный на транспорте меченых эфиров холестерина от ЛПНП к ЛПВП [51].

Попытки выделить и охарактеризовать ЭХП-белок с помощью комбинации различных видов хроматографии предприняли многие исследователи, причем если результаты работ до 1982 г. были весьма противоречивы и включали широкий спектр данных о его молекулярной массе — от 35 000 до 150 000 [9, 13, 34], то в последние годы появились более четкие данные о существовании в плазме крови двух отдельных липидтранспортных белков: ЛТБ-1 и ЛТБ-2 с мол. массой 63 000—69 000 и 55 000—58 000. Они близки по свойствам, так как элюируются совместно при всех видах хроматографии, кроме гепарин-сефарозы, и даже соосажаются при иммунопреципитации с антисывороткой к ЛТБ-1 [6]. Оба белка катализируют перенос эфиров холестерина [7], в то время как, по другим данным, ЛТБ-2 переносит другие липиды и только белок с большей мол. массой обладает ЭХП-активностью [7, 65].

Противоречивыми были также данные в вопросе о том, какой же процесс катализирует этот белок (или белки) — молекулярный обмен или направленный транспорт. В ранних работах отмечался обратимый обмен эфиров холестерина между ЛП [9, 13, 42, 51]. В то же время наблюдался неравновесный характер обмена с преимущественным транспортом от

ЛПВП к другим классам ЛП [13, 42]. Были продемонстрированы максимальная скорость переноса в этом направлении [42], а также различный характер ее зависимости от концентрации различных ЛП: повышение уровня ЛПНП увеличивало, а ЛПВП — уменьшало транспорт [13]. Это указывало на роль ЛПВП как основного донора эфиров холестерина для ЭХП-белка.

В последующих работах [11, 15, 19, 48] основное внимание уделяется транспорту эфиров холестерина с участием ЭХП-белка от ЛПВП к апо-В-содержащим ЛП, что соответствует естественному пути метаболизма ЛП. Показано, что преимущественным акцептором эфиров холестерина при этом являются ЛПОНП [11, 48]. В этой фракции наряду с увеличением в процессе инкубации радиоактивности вследствие переноса меченых эфиров холестерина наблюдался также и транспорт их общей массы [55].

По мнению Бартера [15], это сопряжено с максимальной скоростью катаболизма ЛПОНП, вдвое превышающей скорость транспорта эфиров холестерина, вследствие чего равновесие не успевает установиться. Подобное явление наблюдали Нестель и Риардон, вводя добровольцам внутривенно ЛПВП, содержащие меченые эфиры холестерина [48].

Особое внимание уделялось в литературе вопросу о взаимоотношении ЭХП-белка и фермента ЛХАТ в плазме крови. Несмотря на самостоятельную функциональную активность этих белков [51], близкие величины скоростей катализируемых ими процессов [42, 48] указывают на их возможную сопряженность. Было предположено, что ЛХАТ и липидпереносящие белки могут существовать в плазме крови в виде малоустойчивого комплекса, функционирующего в липидном гомеостазе [36]. По данным Филдинг и соавт. [25], в него входят в стехиометрическом отношении 2 : 1 : 1 ЛХАТ, апопротенин А₁ и белок, переносящий эфиры холестерина, по мнению авторов, апопротенин D. Согласно гипотетической схеме Бартера [15], физиологически активный комплекс может *in vivo* взаимодействовать со всеми классами ЛП, осуществляя этерификацию холестерина, в отличие от показанной Филдингом *in vitro* специфичности к

ЛПВП₃ для выделенных препаратов ЛХАТ [23]. Для взаимодействия с этерифицирующим комплексом существенную роль играет частота столкновений с ЛП, максимальная для наиболее мелких ЛПВП₃ [15, 17]. Поэтому в отсутствие ЭХП-белка большая часть эфиров холестерина остается в ЛПВП. ЭХП-белок способствует их распределению между классами ЛП с образованием другого, короткоживущего комплекса с ЛП [55], особенно с ЛПВП [51]. В его возникновении существенную роль играет кривизна поверхности фосфолипидного монослоя ЛПВП₃, обуславливающая особую конформацию фосфолипидных полярных головок [5], что может способствовать проникновению ЭХП-белка в ядро ЛП-глобулы для захвата эфиров холестерина [20]. Необходимость фосфолипидного бислоя для функционирования ЭХП-белка продемонстрирована при изучении транспорта эфиров холестерина от лецитиновых везикул к ЛПВП [39].

Существенным при изучении ЭХП-белка плазмы крови является вопрос о возможной идентичности его с другим белком — апопротенином D, минорным белком ЛПВП, также способствующим переносу эфиров холестерина из ЛПВП [46]. Хотя молекулярная масса апопротенина D (22 000) значительно ниже, чем ЭХП-белка (от 35 000 до 150 000 [11, 13, 15, 55, 56]), тем не менее нельзя было исключить того, что последний мог быть ассоциатом нескольких молекул апо-D. Четкий ответ на этот вопрос дан авторами [46], которым удалось путем комбинации ряда хроматографических процедур разделить эти два белка. Основной пик ЭХП-активности при хроматографии на КМ-целлюлозе (рис. 1) не совпадает ни с пиком элюции общего белка, измеренного по поглощению при 280 нм, ни с фракциями, взаимодействующими со специфической антисывороткой к апопротенину D. При этом, как видно из рис. 1, а, фракция апо-D также обладала незначительной ЭХП-активностью, однако это было обусловлено не свойствами самого апо-D, а лишь примесями остатка ЭХП-белка (см. рис. 1, б), так как при осаждении апопротенина D специфической антисывороткой ЭХП-активность фракции сохранялась. Таким образом, было доказано, что ЭХП-

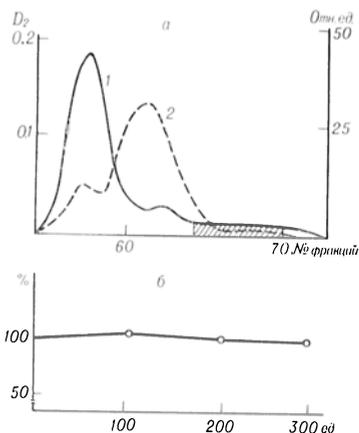


Рис. 1. Идентификация белка-переносчика эфиров холестерина и апопротенина D [46].

a — профиль элюции при хроматографии на КМ-целлюлозе. 1 — оптическая плотность при 280 нм; 2 — ЭХП-активность. Штриховкой показаны фракции, реагирующие с антисывороткой к апопротенину D; *b* — сохранение ЭХП-активности этой фракции при добавлении специфической антисыворотки к апопротенину D.

белок не идентичен апопротенину D. Не исключено, что в описанном ранее [24, 25] каталитическом комплексе присутствовал также ЭХП-белок. Объединение его с ЛХАТ и апопротенином A₁ или ЛПВП [38] в такой малоустойчивый, короткоживущий комплекс создает, по всей вероятности, условия для сопряжения процессов акцепции холестерина с помощью ЛПВП, этерификации его и последующего транспорта образовавшихся эфиров холестерина к апо-В-содержащим ЛП [7]. В то же время данные исследователей [24, 25], идентифицировавших в составе транспортно-трансферного комплекса именно апопротенин D, все же не позволяют исключить роль этого белка в этерификации холестерина и распределении образовавшихся эфиров между ЛП. Возможно, что апопротенин D, не обладающий сам по себе ЭХП-активностью [46], может обеспечивать таковую для специфического белка, способствуя «узнаванию» и объединению в реакционноспособный комплекс растворимых компонентов плазмы крови.

Существование этого комплекса создает, по всей вероятности, условия для такого специфического процесса, как извлечение с помощью ЭХП-белка гидрофобных молекул эфиров холестерина из «ядра» ЛПВП [1, 20, 33]. Показано, что транспорту подвергаются

именно эти, «внутренние» эфиры холестерина, а не вновь образованные с помощью ЛХАТ на поверхности ЛПВП и «не успевшие» погрузиться в ядро [33]. Об этом свидетельствовали опыты по преинкубации плазмы крови с ЛПОНИ в присутствии ингибитора ЛХАТ. После снятия ингибирования активность ЛХАТ повышалась в большей степени, чем при непосредственном добавлении ЛПОНИ. Авторы заключили, что в течение преинкубации часть эфиров холестерина ЛПВП транспортировалась с помощью ЭХП-белка к ЛПОНИ, освобождая места для новых молекул, образующихся при реакции ЛХАТ. Если же ЭХП-белок удалял бы из ЛПВП вновь образованные эфиры холестерина, то добавление ЛПОНИ и без преинкубации оказывало бы такое же активирующее действие [33].

Взаимодействие ЭХП-белка с различными классами ЛП отражено в математической модели [16] (рис. 2), согласно которой с ЛПВП связано вдвое больше, а с ЛПОНИ в 3 раза меньше ЭХП-белка по сравнению с его долей в свободном состоянии. При этом вероятность захвата эфиров холестерина с ЛПВП, ЛПНП и ЛПОНИ относится как 28,9:4,7:1. Захваченные ЭХП-белком молекулы эфиров холестерина могут быть затем внедрены в другую ЛП-частицу как другого, так и того же класса ЛП или возвращены в ту же ЛП-частицу. Таким образом, ЭХП-белок обеспечивает равновесие эфиров холестерина не только между различными классами ЛП,

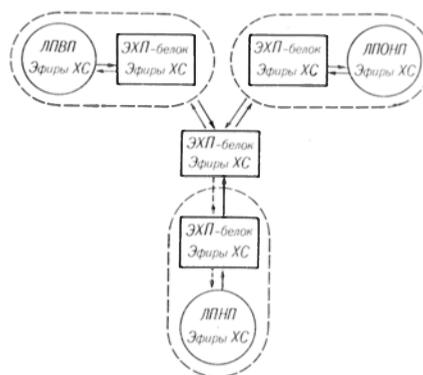


Рис. 2. Математическая модель взаимодействия ЭХП-белка с различными классами липопротенинов [15].

но и между отдельными ЛП-частицами внутри каждого класса [16], на основе чего было предположено его участие в превращении ЛПВП₃ в более легкие подфракции ЛПВП [16, 29]. Об этом свидетельствовало повышенное образование легких фракций ЛПВП при добавлении к инкубируемому *in vitro* ЛПВП лишенной ЛП кроличьей плазмы в качестве источника ЭХП-белка [14]. Наряду с этим Норкинс и соавт. [35] наблюдали образование дискретной популяции частиц ЛПВП, в том числе еще более мелких, чем ЛПВП₃ (3,7—3,8 нм), содержавших главным образом белки и фосфолипиды.

Возможно, это были частицы ЛПВП₃, отдавшие весь этерифицированный холестерин, что авторы объяснили совместным действием ЛХАТ и ЭХП-белка. В то же время Rue и Barter [56, 57] сообщили о присутствии в плазме крови человека [56], а затем и частичной очистке [57] другого специального белка, названного ими «ЛПВП-превращающим фактором». По их мнению, только он ответствен за превращение ЛПВП₃ во фракции с плотностью ЛПВП₂, и ни ЭХП-белок, ни ЛХАТ, ни липопротеинлипаза в этом процессе не участвуют, что несколько неожиданно в свете представлений о роли указанных ферментов в метаболизме ЛП [1, 4, 50]. Предположение Rue и Barter [57] опровергается данными Knipring и соавт., добавлявших к инкубируемой плазме свиньи в различных сочетаниях и в отдельности все указанные компоненты и показавших, что для превращения ЛПВП во фракцию, аналогичную ЛПВП₂, необходимо присутствие ЛХАТ, ЭХП-белка и частиц, богатых триглицеридами. Присутствия дополнительного плазменного фактора эти авторы не обнаружили [40]. Добавление же одного ЭХП-белка вызывает только слабый сдвиг плотности до ЛПВП_{2a}. Эти данные являются косвенным подтверждением необходимости ЭХП-белка в трансформации ЛПВП. Взаимоотношение его в этом процессе с «превращающим фактором» [56, 57], по всей вероятности, может получить объяснение в дальнейшем.

В работах других авторов [14, 28] была показана корреляция между активностью ЭХП-белка плазмы крови различных животных (кролик, свинья,

крыса) и человека и их восприимчивостью к атеросклерозу, максимальной — у кролика, минимальной — у крысы. С другой стороны, восприимчивость к атеросклерозу в этом ряду животных находилась в обратной корреляции с уровнем у них антиатерогенных ЛП — ЛПВП. На этом основании авторы сделали предположение, что активность ЭХП-белка в сочетании с концентрацией ЛПОП как акцентора эфиров холестерина может быть существенной для общего уровня ЛПВП в плазме [28]. Действительно, повышение хотя бы одного из этих факторов может активизировать отток этерифицированного холестерина из ЛПВП, снижая относительную долю холестерина этой фракции в плазме крови.

Примером сказанного может служить состояние системы ЛП плазмы у кролика, где низкая концентрация ЛПВП сопряжена со значительной активностью ЭХП-белка. При алиментарном атеросклерозе она еще более повышена [59], к тому же происходит и резкое увеличение концентрации акценторных частиц — ЛПОП, что в целом должно резко активировать общий транспорт эфиров холестерина из ЛПВП; действительно, уровень холестерина ЛПВП в этом случае крайне низок [60]. Сходное явление недавно обнаружено у больных с гиперлипипротемией, сопряженной с повышением ЭХП-активности [27].

Противоположным примером является гипер- α -липипротемия, сопряженная у человека с низким уровнем акцентора эфиров холестерина (ЛПОП), а у крысы — с отсутствием ЭХП-белка [10, 12, 14]. В обоих случаях удаление эфиров холестерина из ЛПВП ослаблено, и происходит накопление этих ЛП в плазме.

Таким образом, известный факт обратной корреляции между концентрацией ЛПВП и богатых триглицеридами ЛП находит объяснение также и с позиций, рассматривающих транспорт эфиров холестерина, катализуемый белком-переносчиком.

Изучение видовых различий активности ЭХП-белка у животных 16 видов подтвердило выше тенденцию к взаимосвязи ЭХП-активности с уровнем ЛПВП в плазме и чувствительностью к возникновению атеросклероза [28]. При этом ЭХП-

активность коррелировала с концентрацией эфиров холестерина только фракции ЛПОНП. Приведенные результаты согласуются с данными, полученными недавно той же группой авторов [30], введивших крысам экзогенный ЭХП-белок. При этом наблюдалось увеличение концентрации эфиров холестерина в ЛПОНП наряду с потерей больших, богатых эфирами холестерина и апопротеином Е части ЛПВП₁ [30]. В свою очередь липолиз ЛПОНП липопротеинлипазой увеличивает транспорт эфиров холестерина от ЛПВП и ЛПОНП [66].

Возможную причину влияния активности ЭХП-белка на атерогенез Wagner и соавт. [15] видят в том, что этот белок переносит большую часть эфиров холестерина в состав наиболее атерогенных ЛПНП. Именно в таком виде они взаимодействуют с тканями, в том числе и с сосудистой стенкой, способствуя ее поражению. Наряду с транспортом ЛПНП с участием апоВ- и Е-рецепторов или по рецепторному пути [2] недавно отмечен и другой, ранее неизвестный путь проникновения эфиров холестерина, продемонстрированный на фибробластах и культуре клеток сердца быка. При этом лигандом для связывания эфиров холестерина с клеткой является локализуемая на их поверхности липопротеинлипаза. Таким образом, этот белок наряду со своей известной и, по всей вероятности, основной функцией — гидролизом триглицеридов ЛПОНП — осуществляет также транспорт в клетку эфиров холестерина ЛПНП и ЛПОНП [61].

Таким образом, ЭХП-белок плазмы крови в процессе атерогенеза несет как бы две противоположные функции на отдельных этапах метаболизма ЛП. С одной стороны, он в сочетании с ЛХАТ освобождает от холестерина частицы ЛПВП (в основном ЛПВП₃), способствует возобновлению и поддержанию их холестерин-акцепторных свойств. Кроме этого, недавно были получены данные и о способности ЭХП-белка стимулировать выход холестерина не только из ЛПВП, но и из интерстиция сосудов, особенно в присутствии богатых триглицеридами частиц — «интралипида» или ЛПОНП [62]. По мнению авторов, он может играть существенную роль в этом процессе в норме и при патологии. Такая

функция ЭХП-белка также является указанием на его возможное «антиатерогенное» значение. С другой стороны, активность этого белка сопряжена, как отмечалось выше, со снижением уровня ЛПВП.

Следует отметить, что авторы в работах по ЭХП-белку крайне осторожно касаются вопроса о его роли в атерогенезе. Так, Y.-S. Son на основе данных о повышении его активности при гиперлипипротенемии у человека [27] и при экспериментальном атеросклерозе [59] пишет, что «высокая липид-транспортная активность в сочетании с гиперхолестеринемией может быть связана с атерогенезом [59]». В то же время Fielding и соавт. [26] отмечают отсутствие изменений общего транспорта эфиров холестерина в «гиперлипемической» плазме. Остальные авторы лишь констатируют наблюдаемые изменения в системе ЛП плазмы под влиянием ЭХП-белка и обсуждают его роль в метаболизме ЛП. Вопрос о возможности участия ЭХП-белка как компонента этой системы в процессах, связанных с атерогенезом, получит, по-видимому, освещение в дальнейших исследованиях.

Наряду с транспортом эфиров холестерина наблюдался также перенос других липидов: триглицеридов и фосфолипидов. Так, еще в первой работе Nichols по транспорту липидов между ЛП отмечалось, что одновременно с транспортом эфиров холестерина от ЛПВП к ЛПОНП происходит перенос массы триглицеридов в обратном направлении [49]. При этом предполагалось, что обмен эфиров холестерина и триглицеридов между ЛПВП и ЛПОНП носит эквивмолекулярный характер [49]. С этим трудно согласиться в отношении транспорта указанных липидов *in vivo*, так как содержание триглицеридов в ЛПВП, как известно, очень низко и составляет 4—5% [1], т. е. намного ниже, чем эфиров холестерина в ЛПОНП. Такое противоречие может быть связано с тем, что *in vivo* транспорт триглицеридов к ЛПВП менее интенсивен. Другим объяснением может быть то, что не все эфиры холестерина присутствуют в этой фракции в результате перехода из ЛПВП с помощью белка-переносчика [55]. Это соответствует сообщению Barter и соавт. [10] о двух путях появления эфиров холестерина в

ЛПОНИ: один из них связан с их переходом из ЛПВП; другой — прямой путь, без участия ЛПВП, состоит в непосредственной этерификации холестерина в ЛПОНИ.

В этом случае обмен триглицеридов и эфиров холестерина действительно может быть эквимолекулярным. В работе Chajek и Fielding [19] был выделен и частично охарактеризован белок с мол. массой 35 000, катализирующий эквимолекулярный транспорт этих липидов. Подтверждение того, что один и тот же белок плазмы крови обладает и ЭХП-, и триглицеридпереносящей (ТГП) активностью, получено и в ряде последующих работ [10, 12]. Этот белок является гликопротеином с изоэлектрической точкой 9, кинетика его взаимодействия с ЛП подобна таковой ЭХП-белка. Возможность связывания его с ЛПВП показана путем фракционирования на колонке с сефадексом G-200; в присутствии ЛПВП ТГП-активность вымывается двумя пиками, соответствующими белку в свободном и связанном с ЛПВП состоянии. В транспорте триглицеридов принимали участие не только ЛПОНИ, но и ЛПНП: наблюдался обратимый транспорт триглицеридов между ЛПНП и ЛПОНИ [12], а также между ЛПНП и ЛПВП; последний был пропорционален концентрации ЛПНП [54]. Rajagat и соавт. [54] очистили в 500 раз ТГП-белок из плазмы крови кролика. По их данным, активная фракция содержала также гликопротеин с изоэлектрической точкой 9, но с более высокой молекулярной массой: 100 000—115 000. Несмотря на то что транспорт эфиров холестерина и триглицеридов осуществляется одним и тем же белком, эти два процесса не зависят друг от друга. Так, связывание сульфгидрильных групп ингибирует перенос триглицеридов белковым фактором, не влияя на транспорт эфиров холестерина [32]. Кроме того, скорость транспорта триглицеридов меньше, чем для эфиров холестерина [3], поэтому, по мнению Бартера [15], транспорт общей массы триглицеридов от ЛПОНИ к ЛПВП *in vivo* не успевает достигнуть равновесия. Предполагается, что за транспорт этих двух классов липидов ответственны разные участки молекулы белка [7]. Выделенные недавно липидтранспортные белки — ЛТБ-1 [6, 7, 47] и, возможно,

ЛТБ-2 [7] также обладали совместной и ЭХП-, и ТГП-активностью. Не исключено, что описанные в более ранних работах ТГП-белки представляли собой ассоциаты или, наоборот, фрагменты четко охарактеризованного ЛТБ-1 [7] с мол. массой 63 000—69 000.

Те же белки, по данным ряда авторов, способны транспортировать и фосфолипиды. В 1980 г. Iim и Nagano [36] с помощью хроматографии на фенол-сефарозе, КМ-целлюлозе, конканавалин А-сефарозе и изоэлектрического фокусирования очистили в 4829 раз белок плазмы крови человека с мол. массой 150 000. Белок амфипатный, содержит углеводную часть, способен транспортировать с равными скоростями эфиры холестерина и фосфолипиды в стехиометрическом соотношении 1:1 между ЛПВП и ЛПНП. Белок образовывал комплекс с ЛХАТ. Авторы предположили, что ими выделен белок, способный к эквимолекулярному транспорту фосфолипидов и эфиров холестерина, или что в их препарате присутствуют по крайней мере два разных белка, катализирующих транспорт этих липидов в отдельности. Следует отметить, что в отличие от триглицеридов и эфиров холестерина фосфолипиды способны к переходу между ЛП и без белка-переносчика: последний лишь ускоряет транспорт фосфолипидов. В последующем той же группой авторов [37] проведена дальнейшая очистка этого белка из плазмы крови человека и крысы. При этом был получен белковый комплекс с мол. массой 61 000, который переносит, помимо фосфолипидов, еще и эфиры холестерина: у человека в соотношении 1:1; у крысы — 15:1. Обсуждая причины указанных видовых различий, авторы отмечают, что транспорт фосфолипидов не зависит от присутствия эфиров холестерина, в то время как перенос последних зависит от присутствия фосфолипидов в ЛП-доноре. Приводятся данные, согласно которым транспортный белок способен удалять эфиры холестерина из фосфатидилхолиновых липосом, содержащих 6 % эфиров холестерина, а из аналогичных липосом на основе сфингомиелина эфиры холестерина не транспортируются [37]. В то же время неизбежность спаренного характера обмена фосфолипидов и эфиров холестери-

на в ЛП опровергается тем, что липидпереносящий белок из печени при инкубации с ЛП катализирует только обмен фосфолипидов, не затрагивая эфиры холестерина [68]. Согласно мнению Им и соавт. [36], липидпереносящие белки из плазмы крови человека и крысы различаются по специфичности, обуславливающей неспособность к переносу эфиров холестерина для «крышного» белка. В то же время Albers на основе представлений о существовании двух отдельных липидтранспортных белков [7, 37, 47, 65] считает, что в плазме крови крысы отсутствует белок, способный к переносу обоих классов липидов (ЛТБ-1), и циркулирует один белок-переносчик, специфичный только для фосфолипидов [7].

Tall и соавт. [64] показано, что фосфолипидпереносящий (ФЛП) белок катализирует переход фосфатидилхолина из липосом к подфракции ЛПВП₃, образуя при этом частицу большего размера, подобную ЛПВП_{2a}. Авторы выделили белок с мол. массой 81 000, размер белковой глобулы которого напоминал ЛПВП₂, а плотность была несколько выше; белок содержал гликолипиды. В более поздних работах ФЛП-активность плазмы крови приписывается двум упомянутым выше липидтранспортным белкам: термостабильному ЛТБ-1 и термочувствительному ЛТБ-2, разделяющимся при хроматографии на гепарин-сефарозе [7].

В ряде работ изучался механизм действия ФЛП-белков плазмы крови. Так, Tall и соавт. отмечают, что в отличие от ФЛП-белка печени, который «срезает» с мембраны единичную фосфолипидную молекулу [68], соответствующие белки плазмы крови действуют по другому механизму [64]. Они (или по крайней мере один из них) изменяют поверхность донорных частиц (ЛП или липосом), способствуя десорбции индивидуальных молекул фосфолипидов в водную фазу с последующим транспортом к ЛПВП [64]. Такая модификация поверхности может при последующих столкновениях с ЛПВП вызывать захват последними фосфатидилхолина. Этот механизм подтвержден возможностью адсорбции ФЛП-белка на липосомах [63]. Было показано также, что сфингомиелин транспортируется из соответствующих

липосом в 3,5 раза медленнее, чем фосфатидилхолин, а при использовании липосом из холестерина и фосфатидилхолина транспорт последнего протекает в двух направлениях [21]. Подробно роль структуры донорных и акцепторных частиц в транспорте фосфолипидов с помощью плазматического белка-переносчика исследовалась в недавней работе Sweeney и Jones [63]. Было показано, что транспорт ¹⁴C-дипальмитонилфосфатидилхолина от липосом к ЛПВП ингибировался при включении в липосомы сфингомиелина и особенно (в 5 раз) при включении холестерина, причем ингибирующее влияние этих липидов коррелировало с их воздействием на жидкость фосфолипидов: выход фосфатидилхолина с помощью ФЛП-белка из твердых липосом затруднен, как было показано ранее для ЭХП-белка [38]. Другим существенным фактором является кривизна поверхности донора: из крупных везикул фосфатидилхолин вообще не удалялся. Авторами было впервые показано также влияние свойств акцепторных частиц [63]: модификация поверхности ЛПВП введением отрицательного заряда путем ацетоацетилирования увеличивала транспорт в 1,7 раза. Более активный транспорт наблюдался при использовании ЛПВП быка [63]. Таким образом, транспорт фосфолипидов, катализируемый ФЛП-белком плазмы, как и другими транспортными белками, зависит от свойств и донора, и акцептора, что согласуется с предположением о возможном образовании комплекса этих частиц с ФЛП-белком [38]. В этом состоит также отличие его от спонтанного транспорта фосфолипидов, зависящего только от концентрации и свойств доноров [43]. Massey и соавт. [44] с использованием модифицированных пирепом фосфолипидов показали возможность переноса с помощью ФЛП-белка и других фосфолипидов: фосфатидилсерина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидной кислоты, сфингомиелина [44], а также дилицерида и гликолипидов [69] между ЛПНП и ЛПВП. Процесс также зависит от концентрации акцепторов. Авторы считают, что ФЛП-белок плазмы, подобно ФЛП-белку печени быка [68], функционирует как фосфолипидный переносчик, обменивающий фосфолипиды между мембранными по-

верхностями, однако отличается от последнего более широкой специфичностью.

Существует ряд предположений о физиологической роли ФЛП-белка плазмы. Одной из его функций, видимо, является удаление фосфатидилхолина с поверхности ЛПОНП как избыточного поверхностного компонента при гидролизе триглицеридов «ядра» липопротеинлипазой, сопровождающемся уменьшением размера ЛП [1, 7]. Действительно, недавно было показано, что добавление ФЛП-белка в 2—3 раза стимулирует переход меченого фосфолипида из ЛПОНП к ЛПВП₃ в процессе липолиза [67]. Таким образом, он способствует катаболизму богатых триглицеридами ЛП в плазме крови. Кроме того, транспорт фосфолипидов к ЛПВП может обеспечить дополнительный субстрат для ЛХАТ. Albers и соавт. удалось показать возрастание скорости этерификации холестерина при добавлении к плазме выделенного ЛТБ-1 [7]. На наш взгляд, такое активирующее действие может быть связано и с ЭХП-активностью этого белка [6].

Следует отметить, что в работах последних лет свойства липидпереносящих белков плазмы (стимуляция переноса эфиров холестерина, триглицеридов и фосфолипидов) изучались в комплексе, что помогло пролить свет на их взаимоотношения. Так, Albers считает [7], что транспорт этих липидов в плазме крови опосредуется плазменными белками, различающимися по термостабильности и связываемости с гепарином, причем один из них (ЛТБ-1) переносит и эфиры холестерина, и триглицериды, и фосфолипиды, а другой (ЛТБ-2) — только фосфолипиды. В то же время в других работах сообщается о способности обоих белков к переносу всех липидов [18]. Первый белок имеет мол. массу 67 000—70 000 и изоэлектрическую точку 4,9—5,2, а второй — 55 000 и 4,7—4,9 соответственно. Эти белки имеют общие структурные черты и, как полагают [18], один из них может быть предшественником другого. Их активность по переносу различных классов липидов связана с различными участками молекулы, так как они по-разному реагируют на действие тиолсвязывающих реагентов: у обоих белков ТГП-активность понижается при этом

на 10 %, ФЛП-активность возрастает на такую же величину, в то время как ЭХП-активность не меняется [18].

Из приведенных данных о свойствах липидпереносящих белков плазмы крови и их взаимоотношений с ЛП видно, что место этих белков в общей схеме метаболизма ЛП в настоящее время не представляется достаточно ясным. В целом можно считать, что липидпереносящие белки вместе с апопротеинами липопротеинов способствуют распределению соответствующих липидов между отдельными классами ЛП. Различия в специфичности по отношению к определенным классам ЛП, вероятно, сопряжены с разными свойствами последних, обусловленными физико-химическими свойствами их липидных и белковых доменов. Можно предположить, что процессы транспорта липидных молекул между ЛП с помощью липидпереносящих белков, с одной стороны, и оптимальные, термодинамически устойчивые сочетания определенного количества липидных и белковых молекул, ассоциирующих в ЛП-комплексе, — с другой, являются строго сопряженными как друг с другом, так и с основными процессами трансформации ЛП. При каких-либо нарушениях последних, в том числе связанных с атерогенезом дислипидопротеинемиях, возможна разбалансировка всей системы и, в частности, липидпереносящих функций плазменных белков.

Таким образом, липидпереносящие белки плазмы крови, присутствующие во фракции с плотностью больше 1,25 г/мл, в настоящее время рассматриваются как существенное звено в обмене липопротеидов. Лишь несколько лабораторий занимаются их изучением; многое в их функционировании пока недостаточно ясно — как на структурно-молекулярном, так на физиологическом и клинико-патологическом уровнях. Гипотетическими являются пока представления о молекулярном механизме взаимодействия липидтранспортного белка с ЛП-частицей, особенно в отношении захвата и удаления из ЛП локализующихся в гидрофобном «ядре» неполярных липидов; неясно разграничение функций ЭХП-белка и апопротеина D в распределении эфиров холестерина между ЛП. Что касается значения липидпереносящих белков плазмы с точки зрения

нарушений липидного обмена, в частности в плане атерогенеза, то для выяснения этого необходимо определение транспортной активности в специальных клинических исследованиях. Даже единого названия для этих белков в литературе пока нет, их называют по-разному: или «липидпереносящий белок» (lipid transfer protein — ЛТР или «эфир холестерина — транспортно-обменный белок» — «esterified cholesterol transfer/exchange protein» (ЕСТЕР) — и т. д. Тем не менее несомненно, что достаточно глубокое понимание проблем, связанных с метаболизмом ЛПН, невозможно без учета каталитической активности липидпереносящих белков плазмы крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Климов А. И. // Биохимия липидов и их роль в обмене веществ. — М., 1981. — С. 45—47.
2. Климов А. И., Нагорнев В. А. // Стенка сосудов в атеро- и тромбогенезе. — М., 1983. — С. 116—122.
3. Лопухин Ю. М., Арчаков А. И., Владимиров Ю. А., Коган Э. М. Холестериноз. — М., 1983. — С. 101—148.
4. Перова Н. В., Усагенько М. С. // Липопротеиды высокой плотности и атеросклероз. — М., 1983. — С. 200—212.
5. Рудф Г. И., Георгалли И. И. // Федерация Европейских биохимических о-в. Конф. 16-я: Тезисы. — М., 1984. — С. XV—170.
6. Abbey M., Sasliras S., Calvert G. // Biochim. biophys. Acta. — 1985. — Vol. 833. — P. 25—33.
7. Albers J. J., Tollefson J. H., Chen G.-H., Steinmetz A. // Arteriosclerosis. — 1984. — Vol. 4. — P. 49—58.
8. Backer M., Davidovicz E. // Biochemistry (Wash.). — 1981. — Vol. 20. — P. 3805—3810.
9. Barter P. I., Lally J. I. // Biochim. biophys. Acta. — 1978. — Vol. 531. — P. 233—236.
10. Barter P. I., Gooden J. M., Rajaram O. V. // Atherosclerosis. — 1979. — Vol. 33. — P. 165—169.
11. Barter P. I., Lally J. I. // Metabolism. — 1979. — Vol. 28. — P. 230—236.
12. Barter P. I., Gorjatschko L. M., Calvert G. D. // Biochim. biophys. Acta. — 1980. — Vol. 619. — P. 436—439.
13. Barter P. I., Jones M. E. // J. Lipid Res. — 1980. — Vol. 21. — P. 238—249.
14. Barter P. I., Ha J. S., Calvert G. D. // Atherosclerosis. — 1981. — Vol. 38. — P. 165—175.
15. Barter P. I., Hopkins G. J., Calvert G. D. // Biochem. J. — 1982. — Vol. 208. — P. 1—7.
16. Barter P. I., Hopkins G. J., Gorjatschko L. M., Jones M. E. // Atherosclerosis. — 1982. — Vol. 44. — P. 27—40.
17. Barter P. I., Hopkins G. J., Gorjatschko L. M. // Biochim. Biophys. Acta. — 1984. — Vol. 792. — P. 1—5.
18. Calvert G. D., Abbey M. // Atherosclerosis VI. — Berlin, 1983. — P. 428—431.
19. Chajeck T., Fielding C. J. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1978. — Vol. 75. — P. 3445—3449.
20. Damen J. // Biochim. biophys. Acta. — 1980. — Vol. 620. — P. 90—94.
21. Damen J. // Ibid. — 1981. — Vol. 665. — P. 277—289.
22. Erickson S., Meper D. J., Gould E. G. // J. biol. Chem. — 1978. — Vol. 253. — P. 1817—1826.
23. Fielding C. J., Fielding P. E. // FEBS Lett. — 1971. — Vol. 15. — P. 355—358.
24. Fielding C. J., Fielding P. E. // J. biol. Chem. 1981. — Vol. 256. — P. 2102—2104.
25. Fielding C. J., Fielding P. E. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1980. — Vol. 77. — P. 3327—3330.
26. Fielding P. E., Fielding C. J. // J. clin. Invest. — 1983. — Vol. 71. — P. 449—460.
27. Groener J. E. M., Van Rozen A. J., Erkelens D. W. // Atherosclerosis. — 1984. — Vol. 50. — P. 261—266.
28. Ha Y. C., Barter P. I. // Comp. Biochem. Physiol. Ser. B. — 1982. — Vol. 71. — P. 265—269.
29. Ha Y. C., Gorjatschko L. M., Barter P. I. // Atherosclerosis. — 1983. — Vol. 48. — P. 253—263.
30. Ha Y. C., Chang L. B. F., Barter P. I. // Biochim. biophys. Acta. — 1985. — Vol. 833. — P. 203—210.
31. Haffner S. M., Applebaum-Bowden D., Wahl R. W. et al. // Arteriosclerosis. — 1985. — Vol. 5. — P. 169—177.
32. Hopkins G. J., Barter P. I. // Metabolism. — 1980. — Vol. 29. — P. 546—550.
33. Hopkins G. J., Barter P. J. // Biochim. biophys. Acta. — 1982. — Vol. 712. — P. 152—160.
34. Hopkins G. E., Barter P. I. // Metabolism. — 1982. — Vol. 31. — P. 78—81.
35. Hopkins G., Chang L. B. F., Barter P. I. // J. Lipid Res. — 1985. — Vol. 26. — P. 218—229.
36. Ihm J., Harmony J. // Biochim. biophys. Res. Commun. — 1980. — Vol. 93. — P. 1114—1120.
37. Ihm J., Ellsworth J. L., Chaling B., Harmony J. // J. biol. Chem. — 1982. — Vol. 257. — P. 4818—4827.
38. Ihm J., Quinn D. M. // J. Lipid Res. — 1982. — Vol. 23. — P. 1328—1341.
39. Joung I., Brecher I. // Ibid. — 1981. — Vol. 22. — P. 944—954.
40. Knipping G., Zechner R., Kostner G. M., Holasek A. // Biochim. biophys. Acta. — 1985. — Vol. 835. — P. 244—252.
41. Lund-Katz S., Hammerschlag B., Phillips M. C. // Biochemistry (Wash.). — 1982. — Vol. 21. — P. 2946—2969.
42. Marcel Y. C., Vezina C. // Atherosclerosis. — 1980. — Vol. 35. — P. 127—133.
43. Massey J. B., Gotto A. M., Pownall H. J. // Biochemistry (Wash.) — 1982. — Vol. 21. — P. 3630—3636.
44. Massey J. B., Hickson-Bick D., Via D. P. et al. // Biochim. biophys. Acta. — 1985. — Vol. 835. — P. 124—131.
45. McLean L. R., Phillips M. C. // Biochemistry (Wash.). — 1981. — Vol. 20. — P. 2893—2900.
46. Morton R. E., Zilversmit D. V. // Biochim. biophys. Acta. — 1981. — Vol. 663. — P. 350—355.

47. Morton R. E., Zilversmit D. S. // *J. Lipid Res.* — 1982. — Vol. 23. — P. 1058—1067.
48. Nestel P. I., Reardon M. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1979. — Vol. 573. — P. 403—407.
49. Nichols A. V., Smith L. // *J. Lipid Res.* — 1965. — Vol. 6. — P. 206—210.
50. Nikkila E. A. // *High Density Lipoproteins and Atherosclerosis* / Ed. A. M. Gotto. — Amsterdam, 1978. — P. 177—178.
51. Pattnaik N. M., Montes A., Hughes L. B., Zilversmit D. B. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1978. — Vol. 530. — P. 428—438.
52. Petrie G. E., Jonas A. // *Biochemistry (Wash.)*. — 1984. — Vol. 23. — P. 720—725.
53. Pownall H. J. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1982. — Vol. 712. — P. 169—176.
54. Rajaram O. V., Berter P. I. // *Ibid.* — 1980. — Vol. 620. — P. 483—488.
55. Rajaram O. V., Barter P. I. // *Ibid.* — 1985. — Vol. 835. — P. 41—49.
56. Rye K. A., Barter P. I. // *Ibid.* — 1984. — Vol. 795. — P. 230—237.
57. Rye K. A., Barter P. I. // *Ibid.* — 1986. — Vol. 875. — P. 429—438.
58. Sniderman A., Teng B., Vezina C., Marcel Y. L. // *Atherosclerosis.* — 1978. — Vol. 31. — P. 327—333.
59. Son Y.-S. C., Zilversmit D. B. // *Arteriosclerosis.* — 1986. — Vol. 6. — P. 345—351.
60. Stange E., Agostini B., Papenberg J. // *Atherosclerosis.* — 1975. — Vol. 22. — P. 125—129.
61. Stein O., Friedman G., Chajek-Shane T. et al. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1983. — Vol. 750. — P. 306—316.
62. Stein Y., Stein O., Olivecrona T., Halperin G. // *Ibid.* — 1985. — Vol. 834. — P. 336—345.
63. Sweeney S. A., Jonas A. // *Ibid.* — Vol. 835. — P. 279—290.
64. Tall A. R., Forester L. R., Bongiovanni G. L. // *J. Lipid Res.* — 1983. — Vol. 24. — P. 277—289.
65. Tall A. R., Abbreu E., Shuman J. // *J. biol. Chem.* — 1983. — Vol. 258. — P. 2174—2180.
66. Tall A. R., Olivecrona T. // *Ibid.* — 1984. — Vol. 259. — P. 9587—9584.
67. Tall A. R. // *J. Lipid Res.* — 1985. — Vol. 26. — P. 842—851.
68. Wirtz K. // *Lipid Protein Interaction* / Ed. P. Jost. — New York, 1982. — Vol. 1. — P. 151—232.
69. Via D. P., Massey J. B., Vignale S. et al. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1985. — Vol. 837. — P. 27—31.
70. Zilversmit D. B., Hughes B., Balmer J. // *Ibid.* — 1975. — Vol. 409. — P. 393—398.

Поступила 29.10.86

УДК 612.822.2.018:577.175.82|015.1

О. А. Гомазков

РОЛЬ ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ В РЕГУЛЯЦИИ «ТРИГГЕРНОЙ» ФУНКЦИИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПЕПТИДОВ (ОБЗОР)¹

НИИ медицинской энзимологии АМН СССР

Исследование физиологически активных пептидов среди специалистов различного профиля приобрело необычайно широкую популярность. Принципиальная идея, которая появилась с открытием этого класса веществ, состоит, вероятно, в том, что комбинация аминокислотных последовательностей — длинных или коротких — может давать уникальное многообразие вариантов регулирования функций организма на всех этапах его интеграции. Начиная с регуляции отдельных процессов метаболизма в клетке и кончая генерализованными поведенческими реакциями, участие нейропептидов представляется всеобъемлющим и значительным. Особенное значение эти вещества приобрели при рассмотрении физиологических и патогенетических механизмов экстремальных и шоковых

состояний, острых эмоциотропных реакций, регуляции процессов памяти, сна, соматических функций, перехода от неонатальным состояниям организма.

Важной особенностью действия физиологически активных пептидов является их полифункциональность, т. е. способность одних и тех же пептидных молекул вызывать реакции, весьма различные как по характеру влияния, так и по месту проявления. Указанное обстоятельство служит источником многих недоумений — вплоть до признания неспецифической функции регуляторных пептидов, что, несомненно, является противоположной реакцией на бытовавшую некогда концепцию «один пептид — одно поведение». Особенно, казалось бы, непонятным является то, что определенный пептид может быть фактором регуляции как частных метаболических реакций организма, так и глобальных форм системного поведения. Такие примеры

¹ Доложено на V Всесоюзном симпозиуме по медицинской энзимологии в Махачкале (29.09 — 01.10.86).

можно привести для наиболее хорошо изученных пептидов — вещества Р, энкефалинов, веществ семейства ангиотензина, «пептида дельта сна», холецистокинина и др.

Можно выделить 2 причины, объясняющие полифункциональность регуляторных пептидов. Во-первых, в большинстве случаев каждый отдельный пептид является одним из элементов сопряженной цепи реакций, в которой участвует сразу несколько веществ (пептидного или непептидного происхождения). И. П. Аншарин постулировал идею о своеобразном «континууме» регуляторной функции нейропептидов [1]. Во-вторых, физиологически активной во многих случаях оказывается не только сама молекула пептида, но и ее фрагменты, образующиеся при ферментативном гидролизе. Различают, например, нейротропную и нейротропную части одиннадцатичленного полипептида — вещества Р [8]. Кроме того, важно отметить свойство отдельных фрагментов физиологически активных пептидов регулировать биохимические процессы, связанные с синтезом или деградацией других нейропептидов. Таким образом, деградация пептидной молекулы не обязательно означает полную потерю ее физиологической активности.

Постулирование функции пептидов в качестве регуляторов локальных и генерализованных нейрогенных процессов, осуществляемых с участием рецепторных систем, предполагает скоротечность синтеза, высвобождения и инактивации этих пептидов. В отличие от систем классических низкомолекулярных медиаторов процесс обратного захвата синансом пептидной молекулы представляется затруднительным. Общая мысль в этом направлении сводится к тому, что система оперативной информации (медиации и модуляции физиологической реакции) должна быть обеспечена быстрой инактивацией выполнивших свою миссию элементов — в данном случае молекул нейропептида.

Все вышесказанное выдвигает на первый план необходимость рассмотрения ферментов, участвующих в образовании и деструкции отдельных пептидов, как важного звена регуляции их физиологической активности.

Обращаясь к схеме, представленной на рис. 1, следует отметить, что в

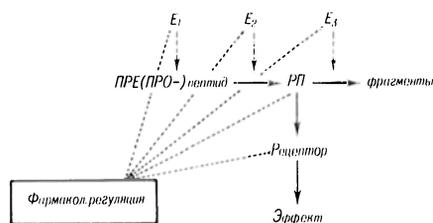


Рис. 1. Соотношение энзиматического и эффекторного звеньев в системе регуляторных пептидов (пояснения в тексте).

большинстве случаев в центре внимания исследователей находится система РП (регуляторный пептид) — рецептор — эффект. При этом подразумевается, что пептид возникает в данном локусе и существует в количестве, необходимом для осуществления физиологической реакции. Следствием такого предположения, очевидно, является требование корреляции между количеством определяемого в ткани пептида и проявлением его физиологического эффекта. Однако рассмотрение представленной схемы по горизонтали позволяет оценить принципиальный по своей сущности фактор динамики — образования и деструкции вещества. Для физиологически активных пептидов этот момент оказывается своеобразным, нетипичным для привычного рассмотрения метаболизма классических медиаторных систем (моноаминов, ацетилхолина, ГАМК и др.).

Физиологически активные пептиды образуются из белковой молекулы предшественника (пре-пропептида) путем последовательного протеолиза. Первичная регуляция синтеза пептидов осуществляется на уровне транскрипции (E_1), о чем свидетельствует корреляция содержания проэнкефалин-А-кодирующей мРНК в тканях мозга, гипофиза, надпочечников и концентрации опиоидных пептидов в этих тканях [10]. Известно также, что содержание в тканях мозга мРНК, кодирующей белковые предшественники нейропептидов, изменяется при некоторых хронических заболеваниях и после сильного электрошокового воздействия [5, 6, 12].

На последующем этапе из молекулы предшественника в результате последовательного процессинга при участии энзимов различных классов (E_2) образуется пептид, непосредственно несущий функцию физиологического ре-

гулятора. Строгость этого положения относительно, поскольку промежуточные пептиды — продукты процессинга — сами могут обладать определенной физиологической активностью. Так происходит с молекулой β -эндорфина, из которой при последующем гидролизе, катализируемом SH-зависимый эндопептидазой, может возникать мет-энкефалин [3]. Несомненно важным и относительно изученным является процесс гидролиза молекулы нейропептида при участии соответствующих пептидаз (E_3). Этот процесс сопровождается прекращением его физиологической активности, хотя образующиеся при гидролизе пептидные фрагменты могут также обладать физиологическим или биохимическим действием. Существенным в рассмотрении этой схемы является представление единой системы синтеза — деградации — рецепции пептида, важной для понимания *процесса* его регуляторной функции. Можно считать в принципе, что при высокой скорости образования и деградации пептида фактически действующее число его молекул будет значительно большим, чем измеряемое количество, за счет более высокого оборота метаболического процесса.

Кроме того, акцентирование ферментативного звена указывает на возможность мобильной регуляции уровня присутствующего в ткани пептида за счет активации его синтеза или торможения деградации (увеличение содержания) и, наоборот, — за счет торможения активации или потенцирования процессов деструкции пептида (снижение содержания вещества). Следует при этом заметить, что для ряда нейропептидаз синтезированы и успешно апробированы специфические ингибиторы — такие, как тнорфан, келаторфан и фосфорамидон для энкефалиназы (эндопептидаза 24.11), каптроприл, метиоприл, эналаприл — для ангиотензинпревращающего фермента, гуанидиноэтилмеркаптоантарная кислота — для энкефалинообразующей карбоксипептидазы.

Рассмотрение ферментов, участвующих в метаболизме нейропептидов, показывают, что одно и то же вещество может быть подвержено гидролитическому действию различных пептидаз. И в то же время каждый из таких ферментов может участвовать в деструкции различных по своей структуре и

функциональной значимости пептидов. Более детально этот аспект был рассмотрен нами ранее [2]. Современный уровень энзимологии регуляторных пептидов позволяет рассматривать вполне конкретные пептидазы, охарактеризованные с точки зрения их субстратной специфичности, физико-химических свойств, ингибиторного спектра [2, 3, 9, 11].

Учитывая большую важность регуляторных пептидов, а также значительную концентрацию и разнообразие, особенно в нервной ткани, как самих нейропептидов, так и соответствующих нейропептидаз, необходимо попытаться определить условия закономерного, упорядоченного образования и гидролиза этих пептидов. Иными словами, подмеченная закономерность, формулируемая как фермент-субстратная поливалентность, нуждается в конкретизации, поскольку логика функционирования живых систем исходит из того, что образование, действие и деструкция соответствующего регуляторного пептида происходят в должное время и в должном участке нервной или другой ткани организма. Это имеет особое значение при рассмотрении ситуаций, связанных с развитием патологического процесса, имеющих свою регионарную и временную характеристики, когда функция регуляторного пептида не может быть понята однозначно и когда — при определенном ходе патологического процесса — вещество-регулятор становится фактором, усугубляющим эту патологию.

При рассмотрении роли определенных пептидаз при различных функциональных и патологических реакциях организма необходимо учитывать 3 обстоятельства.

Во-первых, следует иметь в виду субстратную специфичность фермента, гидролизующего определенную связь в аминокислотной последовательности пептида. Так, пролилэндопептидаза, именуемая также «постпролинрасщепляющим энзимом», имеет широкий спектр пептидных субстратов, где уязвимой оказывается пептидная связь, в образовании которой участвует карбоксил пролинового остатка. Субстраты этого фермента — вещество Р, нейро-тензин, ангиотензин II, брадикинин, люлиберин и др. Из числа ферментов, участвующих в гидролизе мет- или

лей-энкефалина, важны, в частности, аминоксиптидазы, катализирующие отщепление 1 или 2 аминоксиптичных остатков с N-конца пептидной молекулы, или эндопептидаза 24.11, именуемая также собственно «энкефалиназой». Эти 2 группы ферментов имеют не только различную субстратную специфичность, но и различную регионарную и субклеточную локализацию. Было найдено, что если активность энкефалиндеградирующих аминоксиптидаз тормозится бестатином, пурамицином и кноторфином, то в отношении эндопептидазы 24.11 специфическими ингибиторами оказались тиорфан, ретро-тиорфан, фосфорамидон. С помощью этих ингибиторов было доказано участие эндопептидазы 24.11 в гидролизе регуляторных пептидов — холецистокинина, брадикинина, β -цепи инсулина.

Во-вторых, важно учитывать тканевую, регионарную и субклеточную локализацию фермента и изменение его активности в этих регионах, соответственно характеру физиологического (патологического) процесса. Сложно утверждать существование каких-то нейроспецифических пептидаз. Скорее, это вопрос большей или меньшей изученности объекта, хотя при изучении ряда ферментов выявлены изоформы, характерные для мозговой ткани. Другой вопрос — о происхождении в мозге определенных пептидаз и соответствующих пептидных субстратов. Долгое время дискутировалась проблема «центральной» и периферической ренин-ангиотензиновой системы. Теперь можно считать доказанным независимое происхождение и существование их с полным набором ферментов, предшественников, активных пептидов [7]. Вероятно, к подобному выводу следует прийти и в отношении калликрен-кининовой системы, выполняющей в мозге иные функции, чем в крови или железистых образованиях на периферии.

Другое дело — вопрос о функциональной специфичности определенных пептидаз, связанной с их регионарной активностью. Выявлено неравномерное распределение ферментов, более того — неодинаковое изменение активности определенных пептидаз в зонах мозга или отдельных ядрах мозга в процессе физиологических или патологических перестроек в организме.

В-третьих, несомненно существенной при определении функциональной значимости пептидаз является оценка изменений активности в *динамике* физиологического (патологического) процесса. Регуляторные пептиды и сопряженные с их функцией ферменты следует рассматривать как сложную *адаптивную* систему организма, организующую реализацию приспособительных реакций на всех уровнях его интеграции. Поэтому понятна мысль о том, что выполнение регуляторной функции определенного рода и в определенном локусе нервных или периферических образований носит ограниченный во времени характер. Функция энзимов образования и деградации самих пептидов сводится в этих случаях к наработке и деструкции веществ, выполняющих регуляторную миссию, регламентированную во времени.

Таким образом, для понимания описанного выше феномена полифункциональности физиологически активных пептидов и определения условий их упорядоченного образования и инактивации при различных функциональных состояниях организма может быть предложен условно формулируемый принцип «что — где — когда». В соответствии с этим триединством на основании данных нашей лаборатории будет рассмотрен ряд примеров, которые характеризуют триггерную («включающую») роль ферментов, участвующих в метаболизме ангиотензина II и брадикинина, в динамике наследственно обусловленной гипертонии и при формировании выраженных эмоциотропных форм поведения.

На рис. 2 представлены данные об изменениях регионарной активности дипептидилкарбоксипептидазы (ангиотензинпревращающего фермента — АПФ) в годичной динамике развития наследственной гипертонии у крыс линии Окамото — Аоки (эксперименты Н. В. Комиссаровой, В. В. Карпицкого, Н. И. Владимировой). Следует выделить 3 момента. Во-первых, факт увеличения активности АПФ у нормотензивных животных, особенно заметный в 2—3-месячном возрасте. Такие изменения характерны для всех исследованных регионов мозга. Во-вторых, резкое (многократно превышающее норму) возрастание активности АПФ у животных гипертензивной ли-

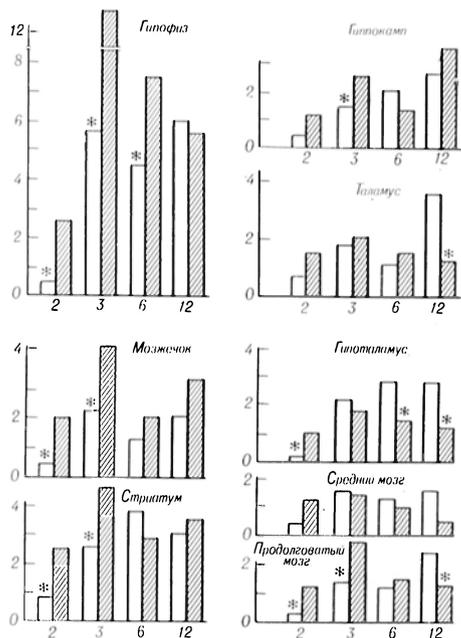


Рис. 2. Активность ангиотензинпревращающего фермента в мозге крыс в динамике наследственно обусловленной гипертензии.

По оси абсциссе — время (в мес); по оси ординат — активность фермента (в нмоль гис-лей/мин/мг белка). Светлые столбики — нормотензивные крысы (Вистар — Кьюто); заштрихованные — гипертензивные крысы (Окамото — Локи).

нии, особенно выраженное в гипофизе, мозжечке, стриатуме, продолговатом мозге, но менее заметное в таламусе, гипоталамусе и среднем мозге. Важно заметить, что повышение активности фермента, ответственного за образование прессорного фактора — ангиотензина II, происходит в период, предшествующий стадии стабильного подъема артериального давления. Т. е. резкое увеличение активности АПФ выполняет роль своеобразного триггера, связанного с повышенным образованием ангиотензина II. В дальнейшем (и это третий существенный момент) активность АПФ в большинстве регионов мозга снижается и, несмотря на стабильно высокий уровень артериального давления, не отличается от активности фермента у нормотензивных животных [4]. Иными словами, поддержание гипертензивного состояния осуществляется на этом этапе за счет иных биохимических и физиологических механизмов.

Исследование активности кининдеградирующих ферментов в тех же регионах мозга выявляет иную динамику. Разница для гипертензивных и

нормотензивных животных выглядит значительной для крыс 6-месячного возраста, и она особенно заметно выражена в гипофизе, таламусе и среднем мозге (эксперименты О. П. Петрий). Учитывая сведения о том, что «центральный» брадикинин в отличие от «периферического» действует как прессорный фактор, отмеченное увеличение общей кининдеградирующей активности у гипертензивных животных среднего срока можно рассматривать как компенсаторную реакцию на развивающуюся патологию гипертензивного состояния.

Другой пример относится к выявлению роли тех же ферментных систем — участвующих в метаболизме ангиотензина II и брадикинина — у животных с агрессивным поведением. Данная модель, получаемая у бесплодных лабораторных крыс путем локального повреждения септальной зоны среднего мозга или отбора подвергнутых изоляции индивидуумов, может быть использована для изучения физиологических механизмов немотивированных форм острых эмоциотропных состояний организма, а также для отбора фармакологических препаратов, корригирующих такое поведение.

На рис. 3 приведены результаты для мурцидных животных (агрессивные крысы-мышевуицы), полученных оперативным путем. У крыс 2-месячного возраста (3 нед после операции — выраженное мурцидное поведение) об-

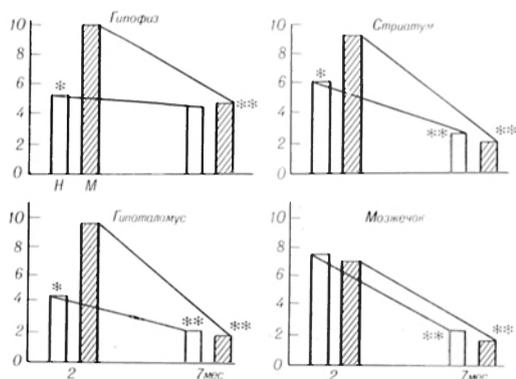


Рис. 3. Общая кининдеградирующая активность в зонах мозга мурцидных крыс (возрастные изменения).

По оси ординат — ферментативная активность (в нмоль брадикинина/мин/мг белка); 1 крестик — разница, достоверная для мурцидных/немурцидных животных ($p < 0,05$); 2 крестика — разница, достоверная для крыс 2- и 7-месячного возраста; здесь и на рис. 4 светлые столбики — немурцидные крысы; заштрихованные — мурцидные крысы.

пая кининдеградирующая активность оказалась в 1,5—2 раза выше, чем у немурцидных. Эти изменения касаются прежде всего гипофиза, гипоталамуса, стриатума, но не мозжечка, среднего мозга, обонятельных луковиц. Следует полагать, что формирование активного эмоционального поведения у «сенсальных» животных связано с пониженным уровнем кининов в перечисленных регионах мозга. Однако у таких же животных, взятых в эксперимент через полгода, выявляется характерное, связанное с возрастом, снижение кининазной активности. Для немурцидных крыс такое заметно в гипоталамусе, стриатуме и мозжечке, для мурцидных — кроме того, в гипофизе. Таким образом, у этих животных отсутствует теперь разница в активности кининдеградирующих систем мозга. Это означает, что сохранение мурцидности у 7-месячных крыс осуществляется, по-видимому, за счет механизмов, не связанных с активностью кининовой системы мозга (исследование О. П. Петрий и А. Д. Панфилова). На этом примере можно говорить о сниженном уровне брадикинина (увеличение активности кининдеградирующих ферментов) в инициировании мурцидного поведения, вызванного оперативным воздействием.

Третий пример также представляет результаты для животных с активным эмоциональным поведением: крысы получены путем изолированного содержания и отбора по признаку мурцидности. Четкие и стабильные показатели реакции (время атаки на жертву, повторная атака и умерщвление этой жертвы) отмечаются уже через 2—3 нед после начала эксперимента. Исследование тотальной кининдеградирующей активности в зонах мозга не выявило разницы между мурцидными и немурцидными животными этой модели. Разница была обнаружена для ангиотензинпревращающего фермента, наиболее четко представленная в среднем мозге и гипоталамусе (рис. 4). Активность АПФ в гипофизе и мозжечке (эти зоны были «задействованы» у крыс первой модели) оказалась неотличимой от контроля. Таким образом, ясная по своему генезу модель активного эмоционального поведения связана с вовлечением других пептидных систем и других регио-

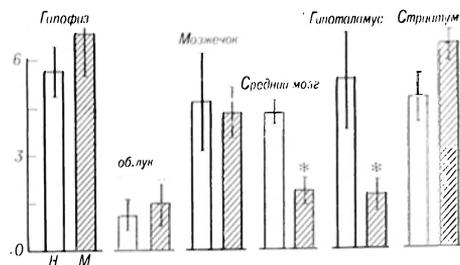


Рис. 4. Активность ангиотензинпревращающего фермента в зонах мозга спонтанно мурцидных крыс.

По оси ординат: активность фермента (в $\mu\text{моль/мин/мг}$ белка); крестик — поменена разница, достоверная для мурцидных/немурцидных животных ($p < 0,05$).

нов мозга. Этот интересный факт имеет место, несмотря на единую конечную форму физиологической реакции (мурцидность) у крыс 2 рассматриваемых моделей.

Логическим развитием исследования обнаруженного нами снижения активности фермента, генерирующего ангиотензин II, явилась попытка модулировать само проявление мурцидной реакции путем интрацеребрального введения этого пептида или антисыворотки к нему. Такие эксперименты были успешно выполнены. Ангиотензин II, вводимый в желудочки мозга путем однократной аппликации в дозе 7 нг на животное, тормозил проявление мурцидности по всем исследуемым тестам. Длительность тормозящего действия ангиотензина II достигла 24—48 ч в зависимости от дозы пептида. Введение очищенной антисыворотки к ангиотензину II животным со слабой мурцидной активностью приводило к потенцированию такого поведения. У 65 % крыс после введения антисыворотки сохранялись стойкие реакции в течение месячного срока. Наконец, одновременное введение ангиотензина II (внутрибрюшинно) и антисыворотки (интрацеребрально) приводило к ослаблению действия пептида в отношении мурцидного поведения (А. Д. Панфилов, Н. В. Комиссарова).

Общим для обеих описанных моделей активного эмоционального поведения является то, что индуцирование мурцидности было связано с понижением уровня активного пептида — ангиотензина II или брадикинина. Этот факт заставляет думать, что в организации данной сложной формы поведенческой реакции участвуют и другие нейрохимические и физиологиче-

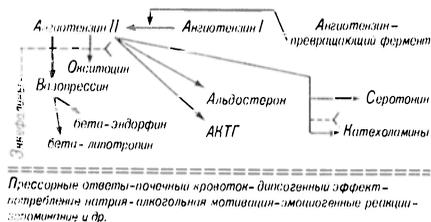


Рис. 5. Мультифункциональность «центрального» ангиотензина II и его связи с другими биологически активными соединениями. Сплошная стрелка — потенцирование активности; пунктирная — торможение активности.

ские системы. В самом деле, для описанных моделей мультицидности есть данные об участии серотониновой системы, ГАМК и др. И хотя эти сведения не выстраиваются в определенную концепцию, они позволяют полагать, что не отдельный пептид, а целая система функционально связанных пептидов и других нейромодуляторов ответственна за регуляцию функционального состояния в норме и патологии.

Можно рассмотреть и другую грань этой же проблемы: как понять, что реализации столь различных физиологических функций организма, как регуляция артериального давления и регуляция активных эмоциональных реакций, участвует одна и та же система ангиотензина? Более того, известно, что этот пептид причастен к осуществлению и других функций организма: питьевое поведение, алкогольная мотивация, консолидация памятного следа и др. Схема, представленная на рис. 5, дает частичный ответ на этот вопрос. Имеется множество данных о сопряженности эффектов ангиотензина II с эффектами вазопрессина, альдостерона, АКТГ, опиоидных пептидов — β-эндорфина и энкефалинов, непептидных медиаторов — серотонина и катехоламинов. Понимание взаимоотношений этих регуляторных систем невозможно без четких представлений о закономерностях энзиматического образования и деструкции отдельных веществ, об элементах перекрестной регуляции, осуществляемой на уровне отдельных звеньев ферментативного процесса.

Общим для всех описанных случаев является постулированное выше представление о целостной ферментативной системе образования и деградации нейропептидов — регуляторов простых биохимических или сложных поведен-

ческих реакций организма. Наконец, следует еще раз подчеркнуть значение принципа временной и регионарной оценки, связанной с образованием, действием (реценцией) и инактивацией регуляторных пептидов, в реализации которых первостепенная роль принадлежит определенным пептидазам. Для выяснения функциональной значимости этих ферментов в норме и патологии необходима еще большая работа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лишарин Н. П. // Всесоюзный биохимический съезд, 5-й: Тезисы симпозиумных докладов. — М., 1985. — Т. 1. — С. 81.
2. Гомазков О. А. // Науч. докл. вып. школы: Биол. науки. — 1986. — № 2. — С. 13.
3. Григорьянц О. О., Гомазков О. А. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 3. — С. 15.
4. Комиссарова Н. В., Гомазков О. А., Карпицкий В. В., Владимиров Н. И. // Бюл. экспер. биол. — 1985. — № 12. — С. 682.
5. Comb M. I. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1982. — Vol. 79. — P. 360.
6. Feder J. M. // Amer. J. Hum. Genet. — 1985. — Vol. 37. — P. 286.
7. Canten D., Lang R., Lehmann E., Unger T. // Biochem. Pharmacol. — 1984. — Vol. 33. — P. 3523.
8. Oehme P., Bergmann J., Bienert M. // Substance P. / Ed. M. Euler, B. Pernov. — New York, 1977. — P. 327.
9. Orłowski M. // Molcc. Cell. Biochem. — 1983. — Vol. 52. — P. 49.
10. Pittius C. W. // EMBO J. — 1985. — Vol. 4. — P. 1257.
11. Turner A. J., Matsas R., Kenny A. J. // Biochem. Pharmacol. — 1985. — Vol. 34. — P. 1347.
12. Yoshikawa K. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1985. — Vol. 82. — P. 589.

Поступила 30.12.86

ROLE OF ENZYMATIC SYSTEMS IN REGULATION OF PHYSIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDES TRIGGER FUNCTION

O. A. Gomazkov

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

Studies of enzymes, involved in metabolism of biologically active peptides, showed that the same substance may be used as a substrate of hydrolysis catalized by various peptidases. This principle should be applied for elucidation of polyfunctional properties of regulatory peptides, their ability to participate in dissimilar physiological responses. Investigation of the enzymatic step indicated also the pathways of possible neuropeptide level regulation within the definite regions of nervous tissue. The following principles are involved in evaluation of neuropeptides regulating functions: substrate specificity of particular peptidases, specificity of these enzymes in relation to their regional localization in brain or peripheric tissues, estimation of enzymatic activity in dynamics of

physiological (pathophysiological) process. The examples are considered, which illustrate these points (principle "what-where-when") as well as data are discussed, which enabled to postu-

late the "trigger" function of neuropeptides (angiotensin II and bradikinin) in some long-term behavioral and somatic responses of a body.

УДК 612.766.2-08:[612.123+612.352.2]:547.915-39].015.1:577.152.1

*В. К. Кухта, Т. С. Морозкина, Л. П. Лисицына, И. В. Захаренко,
И. Г. Мальковец, И. П. Карпова*

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ СИСТЕМА ИНИЦИИ И ЗАЩИТЫ ОТ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ПЕЧЕНИ И КРОВИ КРЫС ПРИ ГИПОКИНЕЗИИ

Кафедра биоорганической и биологической химии Минского медицинского института

Несмотря на актуальность проблемы гипокинезии, метаболические аспекты отрицательного влияния ограничения мышечной подвижности остаются неясными. Установлено [1, 5], что при гипокинезии в тканях повышается содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Это может явиться одной из основных причин повреждения клеточных мембран и нарушения процессов внутриклеточного метаболизма.

Цель настоящей работы — изучение содержания продуктов ПОЛ и активности микросомальных оксидоредуктаз, принимающих участие в инициации ПОЛ, а также активности супероксиддисмутазы (СОД), церулоплазмينا, каталазы, глутатионредуктазы, ферментов, препятствующих избыточному образованию и накоплению продуктов ПОЛ, при гипокинезии длительностью 1 и 2 мес.

Методика

При создании гипокинезии мы отказались от строгой изоляции животного (жесткой иммобилизации, гипсования) во избежание стресса «от одиночества» и потерь тепла. Группы белых крыс-самцов массой 150—180 г помещали в разделенные на 3 части деревянными перегородками клетки (по 6 животных в клетке) на 60 сут. В каждом отсеке могло поместиться только 2 крысы. Контрольную группу помещали в обычные свободные клетки. В опыте использовали 30 крыс, в контроле — 10.

Митохондрии печени получали общепринятым методом дифференциального центрифугирования при 1—3 °С в среде выделения, содержащей 0,25 М сахарозу, забуференную трис-НСl, рН 7,4 [3]. Освобожденную от митохондрий надосадочную жидкость подвергали дальнейшему центрифугированию для осаждения мембран цитоплазматической сети в ультрацентрифуге ВЛК-602 при 105 000 g в течение 90 мин. Осадок мембран цитоплазматической сети суспендировали в указанной среде выделения из расчета 1 мл среды на 1 г сырой массы печени (при этом суспензия микро-

сомальной фракции содержит около 10 мг белка в 1 мл). Белок определяли по Лоури [10].

При определении ферментативной активности оксидоредуктаз микросом применяли искусственные акцепторы электронов: 2,6-дихлорфенолиindoфенол (ДХФIDФ), феррицианид калия ($K_3Fe(CN)_6$), нитротетразольный синий (нитро-СТ) [12]. Метод основан на определении изменения степени поглощения электронов указанными акцепторами при переходе последних из окисленной формы в восстановленную (в качестве донора не использовали НАДФН·Н⁺ и НАДН·Н⁺).

Активность СОД (КФ 1.15.1.1) определяли по методу [7], основанному на способности супероксидного аниона-радикала восстанавливать обесцвеченные тетразолиевые соли, которые при этом превращаются в окрашенные соединения формазана с максимумом поглощения света в видимой области. Изучали суммарную активность СОД. Для этого митохондрии разводили дезоксихолатом натрия до концентрации 1:100 (в 0,2 мл пробы содержится примерно 1 ед. фермента). Из эритроцитарной массы, трижды отмытой от плазмы крови физиологическим раствором, готовили гемолизат в отношении 1:500. В опыт брали 0,2 мл разведенных митохондрий или гемолизата эритроцитов. Активность фермента рассчитывали при помощи калибровочных кривых, предварительно построенных для различных разведений митохондрий и гемолизата эритроцитов.

Активность каталазы (КФ 1.1.1.66) определяли либо общепринятым методом по количеству распавшейся H_2O_2 , либо по продукту реакции — количеству образовавшегося O_2 [8]. Полученные результаты записывали в виде кривых, характеризующих количество миллилитров кислорода, выделяющегося в ходе реакции при ферментативном разложении перекиси водорода.

Определение активности церулоплазмينا основывалось на том, что он, являясь единственным компонентом плазмы крови, обладающим окислительными свойствами, способен окислять некоторые полиамины, в том числе *n*-фенилэтиламины. В результате окисления образуется сине-фиолетовый комплекс, степень окисления которого пропорциональна концентрации церулоплазмينا [6].

Активность глутатионредуктазы (КФ 1.6.4.2) определяли по [13] в свежих эритроцитах, отмытых от гемарина. В основе реакции лежит восстановление окисленного глутатона НАДФН·Н⁺, уменьшение экстинкции которого

Таблица 1

Содержание продуктов ПОЛ (в мкмоль/мг белка) в митохондриях печени крыс при гипокинезии различной длительности

Исследуемые показатели	Контроль	Длительность гипокинезии, мес	
		1	2
Дневные конъюгаты	0,224±0,01 (9)	0,27±0,01 (8)	0,28±0,01 (8)
<i>p</i>		<0,01	<0,01
МДА	0,20±0,003 (9)	0,26±0,01 (10)	0,28±0,02 (10)
<i>p</i>		<0,01	<0,001

Примечание. Здесь и в табл. 2—3 представлены средние арифметические величины и средние ошибки средних арифметических, в скобках — число животных, *p* — достоверность различий с животными контрольной группы.

измеряли спектрофотометрически в течение 5 мин при 340 нм. Результаты исследований обработаны методом вариационной статистики. Содержание дневных конъюгатов определяли в митохондриях печени по методу [4], малонового диальдегида (МДА) — по методу [11].

Результаты и обсуждение

По нашим данным (табл. 1), содержание продуктов ПОЛ — дневных конъюгатов и МДА — при гипокинезии увеличивается в среднем на 30% уже через 1 мес ограничения подвижности животных. Эти результаты соответствуют данным литературы [1].

Активность микросомальных НАДН·Н⁺- и НАДФН·Н⁺-оксидоредуктаз в печени увеличивается уже в первые 30 дней ограничения подвижности животных более чем в 1,5 раза (табл. 2). В более поздние сроки (2 мес гипокинезии) активность НАДФ·Н⁺-зависимой оксидоредуктазы — конечного участка микросомальной цепи окисления увеличивается в

1,6 раза по сравнению с контрольными животными. Активность ферментов начальных участков микросомальной редокс-цепи не изменяется (см. табл. 2).

В отличие от оксидоредуктаз микросом, принимающих участие в инициации ПОЛ, активность основного фермента антиоксидантной защиты клеток — СОД при 2-месячной гипокинезии снижается в митохондриях печени на 30%, а в эритроцитах существенно не изменяется (табл. 3).

Наряду с СОД функцию обезвреживания супероксидного аниона кислорода выполняет церулоплазмин [9], однако в отличие от мембраносвязанного фермента СОД он функционирует в крови. По нашим данным, активность церулоплазмينا в сыворотке крови увеличивается при гипокинезии длительностью 1 мес с 312,5±11,9 мг/л (*n*=13) до 418,8±6,1 г/л (*n*=6) (*p*<0,001), а при 2-месячной гипокинезии возвращается к норме (342,0±17,8 г/л, *n*=11, *p*>0,05).

Таблица 2

Активность НАДН·Н⁺- и НАДФН·Н⁺-оксидоредуктаз микросом печени крыс (в мкмоль/мин/мг белка) при гипокинезии в течение 1 и 2 мес

Исследуемый фермент	Контроль	Длительность гипокинезии, мес	
		1	2
НАДН·Н ⁺ —нитро-СТ-оксидоредуктаза	76,0±5,81 (10)	119,9±9,89 (8)	81,4±7,07 (8)
<i>p</i>		<0,002	<0,05
НАДФН·Н ⁺ —нитро-СТ-оксидоредуктаза	42,8±1,42 (10)	68,6±5,45 (6)	68,6±9,55 (6)
<i>p</i>		<0,001	<0,02
НАДН·Н ⁺ —ДХФИФ-оксидоредуктаза	27,5±2,03 (10)	22,7±1,68 (6)	26,0±2,58 (8)
<i>p</i>		>0,05	>0,05
НАДФН·Н ⁺ —ДХФИФ-оксидоредуктаза	8,08±0,40 (10)	10,3±1,65 (7)	7,5±0,58 (5)
<i>p</i>		>0,05	>0,05
НАДН·Н ⁺ —K ₃ Fe(CN) ₆ -оксидоредуктаза	300,0±19,1 (9)	334,0±28,8 (6)	248,0±34,0 (6)
<i>p</i>		>0,05	>0,05

Активность каталазы митохондриальной фракции (в мл O_2 /мг белка) и СОД в митохондриях печени (в ед/мг белка) и в гемолизатах эритроцитов (в ед/мг Нв) при гипокнезии

Группа животных	Каталаза печени	СОД	
		печень	эритроциты
Контрольная	$1,44 \pm 0,08$ (9)	$18,72 \pm 0,73$ (7)	$24,94 \pm 1,09$ (7)
После гипокнезии в течение:			
1 мес	—	$18,87 \pm 1,43$ (7)	$23,76 \pm 1,17$ (6)
<i>p</i>		$>0,05$	$>0,05$
2 мес	$1,08 \pm 0,10$ (13)	$13,04 \pm 1,26$ (6)	$20,94 \pm 1,59$ (6)
<i>p</i>	$<0,01$	$<0,01$	$>0,05$

Супероксидный радикал кислорода O_2^- , обезвреживаемый СОД и церулоплазмином, является предшественником H_2O_2 в клетке. Взаимодействуя с перекисью водорода, O_2^- может способствовать образованию еще более активных свободных радикалов, повреждающих клеточные структуры. Поэтому катаболизм перекиси водорода, осуществляемый каталазой, является важным звеном антиоксидантной защиты клетки. По нашим данным, активность каталазы митохондриальной фракции печени при ограничении подвижности животных до 2 мес снижается на 33% по сравнению с таковой у интактных животных (см. табл. 3).

Активность еще одного фермента антиоксидантной защиты клеток — глутатионредуктазы в эритроцитах при гипокнезии длительностью 1 и 2 мес статистически достоверно не изменяется: в норме она составляет $0,21 \pm 0,04$ мкмоль/ч/л ($n=8$), при гипокнезии в течение 1 мес — $0,25 \pm 0,07$ мкмоль/ч/л ($n=6$, $p>0,05$), при гипокнезии в течение 2 мес — $0,21 \pm 0,049$ мкмоль/ч/л ($n=8$, $p>0,10$).

Таким образом, из 4 ферментов, выполняющих функцию защиты клетки от активных форм кислорода (СОД, церулоплазмин, каталаза, глутатионредуктаза), наиболее уязвимым оказался СОД. Однако и каталазная активность при длительной гипокнезии снижается.

В результате угнетения каталазной активности может накапливаться токсичная для клеток H_2O_2 , которая в свою очередь является ингибитором СОД [2].

Таким образом, ослабление ферментативной антиоксидантной защиты ге-

матоцитов при ограничении подвижности животных может служить важной причиной повышенного накопления продуктов ПОЛ (днеловых конъюгатов, гидроперекисей липидов, МДА) в печени этих животных. Вместе с тем нами обнаружено и увеличение активности некоторых микросомальных НАДФН·Н⁺- и НАДН·Н⁺-зависимых оксидоредуктаз печени, что способствует интенсификации свободно-радикального окисления липидов клеточных мембран и, следовательно, приводит к усилению образования продуктов ПОЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коваленко Е. А., Гуровский Н. П. Гипокнезия. — М., 1980.
2. Комов В. П., Рахманина Т. Ф., Александрович Д. Г., Тархунов И. В. // Экспер. онкол. — 1981. — № 4. — С. 18—20.
3. Кондрашова М. Н., Ананенко А. А. // Руководство по изучению биологического окисления полиграфическим методом. — М., 1973. — С. 106—129.
4. Костюк В. А., Потапова А. Н., Лунец Е. Ф. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 4. — С. 125—127.
5. Морозкина Т. С., Кухта В. К., Полякова З. И., Лисицына Л. П. // Механизмы адаптации и компенсации, методы их тренировки, контроля и стимуляции. — Минск, 1985. — С. 29.
6. Определение церулоплазмينا в сыворотке крови по Равину. // Биохимические методы исследования. — М., 1969. — С. 950.
7. Чумаков В. Н., Осинская Л. Ф. // Вопр. мед. химии. — 1979. — № 3. — С. 261—263.
8. Штерн А. С. // Методы химического анализа крови. — М., 1953. — С. 590—591.
9. Juresky L., Uhlíkova E., Krizo J. // Biologia. — 1983. — Vol. 38, N 4. — P. 377—385.
10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Bandall L. I. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.
11. Onkova H., Olishi N., Yagi K. // Analyt. Biochem. — 1979. — Vol. 95, N 2. — P. 351—358.

12. Roering D. L. // Цит. по кн.: Современные методы в биохимии. — М., 1977. — С. 57.
 13. Wendel P. L. // Biochim. biophys. Acta. — 1968. — Vol. 159. — P. 179—181.

Поступила 17.09.86

ENZYMATIC SYSTEM FOR INITIATION AND PROTECTION FROM LIPID PEROXIDATION IN RAT LIVER TISSUE AND BLOOD UNDER CONDITIONS OF HYPOKINESIA

V. K. Kukhta, T. S. Moroskina, L. P. Lisitsina, I. V. Zakharenko, I. Y. Malkovez, I. N. Karпова
 Chair of Bioorganic and Biological Chemistry, Medical School, Minsk

Content of lipid peroxidation products in liver mitochondria, enzymatic system of the peroxidation initiation (NADPH-H⁺- and

NADH-H⁺-dependent oxydoreductases) at the early and final steps of liver microsomal redox-chain as well as the activity of protective enzymes superoxide dismutase, ceruloplasmin, catalase and glutathione reductase, preventing the excessive accumulation of lipid peroxidation products in liver mitochondria and erythrocytes were studied in rats with hypokinesia within 1 and 2 months. An increase in content of diene conjugates and malonic dialdehyde as well as in activity of NADPH-H⁺- and NADH-H⁺-nitroblue tetrazolium-oxydoreductases in liver microsomes, a decrease in activity of catalase and superoxide dismutase in liver mitochondria were observed in the animals within two months of their mobility restriction. These alterations were among the essential mechanisms responsible for an increase in content of lipid peroxidation products under conditions of hypokinesia.

УДК 616.127-005.4-07:616.127-008.939.15-39-02:[616.45+616.839]-008.1

Л. К. Бахова, Т. К. Фадеева

АКТИВНОСТЬ МИКРОСОМАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СИМПАТИКО-АДРЕНАЛОВЫХ ВЛИЯНИЙ ПРИ ИШЕМИИ МИОКАРДА У КРЫС

Харьковский филиал Киевского НИИ кардиологии им. акад. Н. Д. Стражеско

В последние годы постулирована ведущая роль в повреждении клеток сердца механизмов, ответственных за транспорт кальция и адренореактивность [8, 10, 11]. Эффект катехоламинов связан с воздействием на резервные функционально неактивные кальциевые каналы мембран кардиомиоцитов и увеличением транспорта кальция в клетку [14]. Этот механизм опосредован через синтез циклических нуклеотидов и фосфорилирование белковых компонентов кальциевых каналов.

При стрессе высокие концентрации катехоламинов могут активировать перекисное окисление липидов (ПОЛ); образующиеся при этом в избытке гидроперекиси липидов становятся факторами, повреждающими биомембраны, в функционировании которых важную роль играют липид-липидные и липид-белковые взаимодействия [3].

В последнее время широко изучается липидозависимость моноаминоксидазы (МАО: КФ 1.4.3.4), катализирующей окислительное дезаминирование биогенных аминов и локализованной в основном в наружной мембране митохондрий [2].

Целью настоящей работы является попытка найти критерии коррелятивной зависимости показателей функци-

онального состояния симпатико-адреналовой системы (САС) с прямым повреждающим действием ПОЛ в сердце крыс в условиях экспериментально вызванной перегрузки кардиомиоцитов кальцием.

Методика

В работе были использованы крысы-самцы Вистар массой 160—220 г, содержащиеся на общепитательном рационе. Перегрузку кардиомиоцитов кальцием [12] вызывали введением адреналина (А) в дозе 300 мкг на 100 г массы. При этом исследовали содержание катехоламинов (А, норадrenalина — НА) и диоксифенилаланина (ДОФА), ферментативную активность митохондриальной МАО, активность микросомального окисления в сердце и нейрональный захват ³H—НА тканью правого и левого предсердий крыс. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор. Инъекции производили внутривенно. Через 15—16 ч животных декапитировали под эфирным наркозом.

При выделении митохондриальной фракции сердце крыс промывали охлажденным физиологическим раствором, гомогенизировали в 10-кратном объеме 0,25 М сахарозы и центрифугировали 10 мин при 1000 г для осаждения ядер и неразрушенных клеток; надосадочную жидкость центрифугировали 15 мин при 10 000 г. Полученный осадок ресуспендировали в 10 мМ фосфатном буфере pH 7,4 и осаждали 15 мин при 12 000 г. Осадок представлял собой митохондриальную фракцию. Для определения ферментативной активности

Содержание катехоламинов, ДОФА и активность МАО в сердце крысы в условиях перегрузки кардиомиоцитов кальцием ($M \pm m$)

Показатель	Контроль	Перегрузка кардиомиоцитов кальцием
А, нг/г	351 ± 16	480 ± 26**
НА, нг/г	298 ± 24	368 ± 24*
ДОФА, нг/г	565 ± 19	507 ± 24*
МАО, мкг NH ₃ на 1 мг белка	0,28 ± 0,05	0,15 ± 0,02*

Примечание. Представлены данные 14 параллельных экспериментов. Одна звездочка — $p < 0,05$, две — $p < 0,001$.

МАО готовили суспензию 2 мг/мл 0,1 М фосфатного буфера pH 7,4.

Надосадочную жидкость использовали для выделения микросомальной фракции. С этой целью к надосадочной жидкости добавляли 0,1 мл 1 М CaCl₂. Через 5 мин центрифугировали 10 мин при 13 000 g. Осадок дважды ресуспендировали в 5 мл 0,15 М KCl и центрифугировали 10 мин при 13 000 g. Фракцию микросом суспендировали в 1 мл среды, содержащей 125 мМ KCl и 25 мМ трис pH 7,4.

Содержание белка в полученных фракциях митохондрий и микросом определяли по методу Лоури и соавт. [13] с использованием в качестве стандарта сывороточного альбумина.

В качестве субстрата МАО применяли тирамина гидрохлорид: активность фермента во фракции, обогащенной наружной митохондриальной мембраной, определяли методом изотермической отгонки выделившегося в результате реакции аммиака с последующей нesslerизацией [9].

Содержание малонового диальдегида (МДА) — одного из продуктов ПОЛ определяли в микросомальной фракции по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [3], используя коэффициент молярной экстинкции $\epsilon_{532} = 1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

Нейрональный захват в левом и правом предсердиях крыс устанавливали радиоизотопным методом [6]. В качестве радиоактивной метки использовали препарат DL-7 ³H-НА фирмы «Amersham» (Англия) с удельной радиоактивностью 34 Ки/ммоль. Препарат DL-7 ³H-НА (0,1 ммоль) добавляли в пробу, содержащую срезы ткани предсердий в растворе Тирода. В качестве специфического ингибитора нейронального мембранного транспорта НА использовали мелнипрамин в концентрации 10⁻⁵ М. Для учета поглощенной тканью радиоактивности применяли жидкостно-сцинтилляционный счетчик фирмы «Beckman LS7800» (Австрия).

Катехоламины и ДОФА в ткани сердца определяли флуоресцентным триоксинидоловым методом [7]. Спектры флуоресценции регистрировали на флуориметре «Specol-10» фирмы «Carl Zeiss» (ГДР).

Результаты и обсуждение

В условиях перегрузки кардиомиоцитов кальцием происходит активация

САС. При этом в миокарде крыс (см. таблицу) наблюдается увеличение содержания А и НА, снижение содержания ДОФА и отношения ДОФА/А + НА, а также повышение НА/ДОФА, что может свидетельствовать об активации ДОФА-декарбоксилазы и дофамин-β-гидроксилазы. В условиях перегрузки кардиомиоцитов кальцием наблюдали снижение активности митохондриальной МАО в сердце крыс. Поскольку субстратом МАО в этих опытах был тирамин, в данном случае речь идет о суммарной активности МАО типов А и Б [4].

Исследованиями на сердечной мышце было показано, что образующийся при окислении А адренохром способен вызывать некроз кардиомиоцитов и уменьшать сократительную активность миокарда.

По-видимому, снижение ферментативной активности МАО обусловлено качественным модифицированием каталитических свойств МАО типа А [5]. Вместе с тем имеются сведения о том, что активность МАО типа А в значительно большей мере, чем активность МАО типа Б определяется особенностями липидного микроокружения [4].

Исследовали состояние нейронального мембранного транспорта НА в предсердиях крыс (рис. 1).

Обнаружено уменьшение захвата DL-7³H-НА нейрональными мембранами в условиях вызываемой катехоламинами перегрузки кардиомиоцитов

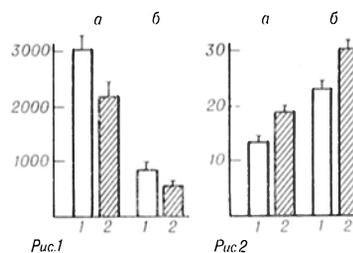


Рис. 1. Изменения нейронального мембранного транспорта DL-7 ³H-НА в предсердиях крыс в условиях перегрузки кардиомиоцитов кальцием.

Активность нейронального мембранного транспорта DL-7 ³H-НА (в нм. на 1 мг влажной ткани в 1 мин). Представлены данные 5—10 опытов. а — левое предсердие; б — правое предсердие. Здесь и на рис. 2: 1 — контроль; 2 — опыт.

Рис. 2. Изменение активности микросомальной ПОЛ в сердце крыс в условиях перегрузки кардиомиоцитов кальцием.

Представлены средние данные 15—20 опытов. По оси ординат — содержание МДА (в нмоль на 1 мг белка) сразу после индуцирования процесса добавлением Fe²⁺ + АК (а) и через 20 мин (б).

кальцием как в левом, так и в правом предсердиях. Снижение нейронального мембранного транспорта НА наряду с ингибированием активности МАО может рассматриваться как указание на активацию адренергических реакций в предсердиях крысы.

Для решения вопросов о характере взаимосвязи полученных показателей эффектов САС и процессов ПОЛ в биологических мембранах определяли в микросомальной фракции сердечной мышцы содержание МДА. В условиях перегрузки кардиомиоцитов кальцием отмечали нарастание активности ПОЛ в микросомальной фракции сердца, что выразилось (рис. 2) в повышении содержания МДА как сразу после инициации процесса ПОЛ ионами железа, так и (еще в большей мере) спустя 20 мин после начала процесса. Обнаруженный нами факт активации процессов ПОЛ в микросомальной фракции, вероятно, можно рассматривать в связи с повреждением кардиомиоцитов кальцием.

Правомочность такого предположения подтверждается данными литературы [1], согласно которым при активации ПОЛ ионами железа и аскорбиновой кислотой в мембранах саркоплазматического ретикулула, составляющего основу микросомальной фракции, значительно увеличивается проницаемость биомембран для кальция, снижается свойство мембран связывать кальций и создаются условия для повреждения мембранных механизмов, ответственных за транспорт кальция и адренореактивности.

Таким образом, в условиях перегрузки кардиомиоцитов кальцием, вызванных экзогенными катехоламинами, наблюдаются закономерные нарушения функционирования миокарда. Отмечена определенная взаимосвязь между увеличением содержания А и НА, угнетением нейронального мембранного транспорта НА, ингибированием МАО и процессами ПОЛ в микросомальной фракции сердца. Возможно, ингибирование МАО связано с накоплением продуктов ПОЛ в биомембранах.

В условиях перегрузки кардиомиоцитов кальцием, по-видимому, происходит накопление перекисей, модифицирование свойств МАО и затем закономерно развивается «перекисный синдром повреждения» — лавинооб-

разное накопление продуктов ПОЛ в биомембранах [5], сопровождающееся изменением проницаемости для кальция и адренореактивности. Таким образом, очевидно, может рассматриваться патогенетический механизм повреждения клеток миокарда в условиях его ишемии.

Авторы выражают благодарность члену-корреспонденту АН УССР А. М. Утевскому и сотрудникам лаборатории нейрогуморальных систем Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР В. А. Чуйко и Л. А. Назаровой за консультативную и методическую помощь в осуществлении этой работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Архипенко Ю. В.* Исследование механизмов модифицирующего действия молекулярного кислорода на систему транспорта Ca^{++} в мембранах саркоплазматического ретикулула: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 1977.
2. *Бурлакова Е. Б., Кайране Ч. Б., Молочкина Е. М., Хохлов А. П.* // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 1. — С. 66—72.
3. *Владимиров Ю. А., Арчаков А. П.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М., 1972.
4. *Горкин В. З.* Амноксидазы и их значение в медицине. — М., 1981.
5. *Каган В. Е., Смирнов А. В., Савов В. М., Горкин В. З.* // Вопр. мед. химии, 1984. — № 1. — С. 112—118.
6. *Манухин Б. П., Волна Е. В.* // Физиол. журн. СССР. — 1975. — № 5. — С. 785—787.
7. *Маглина Э. Ш., Рахманова Т. Б.* // Методы исследования некоторых систем гормональной регуляции. — М., 1967. — С. 136—143.
8. *Мверсон Ф. З.* Адаптация, стресс и пролактика. — М., 1981.
9. *Северина Н. С.* // Биохимия. — 1980. — Т. 45, № 10. — С. 1897—1908.
10. *Хелмрейх Э. Д., Пфайффер Т.* // Рецепторы клеточных мембран для лекарств и гормонов: междисциплинарный подход: Пер. с англ. — М., 1983. — С. 133—142.
11. *Чазов Е. И., Смирнов В. П., Сакс А. В.* // Кардиология. — 1976. — № 4. — С. 5—13.
12. *Fleckenstein A., Rona G.* // Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism. — Baltimore, 1975. — Vol. 6. — P. 158—171.
13. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
14. *Steer M. L., Levitzki A.* // Arch. Biochem. — 1975. — Vol. 167. — P. 371—375.

Overloading of cardiomyocytes with calcium, developed after administration of catecholamines, led to activation of lipid peroxidation in plasmatic membranes, which might cause the

myocardium destruction. Alteration of the monoamine oxidase activity appears to be of importance in myocardium impairment.

УДК 616.36-005.4-008.66-07:616.36-008.939.15

В. И. Шаранов, О. Р. Грек, А. А. Зыков

СТРУКТУРНЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ ЛИПИДНОГО КОМПОНЕНТА МЕМБРАН ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА В РАННИЕ И ОТДАЛЕННЫЕ ПЕРИОДЫ ПОСЛЕ ИШЕМИИ ПЕЧЕНИ

Кафедра фармакологии и ЦНИЛ Новосибирского медицинского института, НИИ
терапии СО АМН СССР

В повреждении мембран эндоплазматического ретикулума (ЭПР) при острой ишемии печени ведущую роль отводят деструкции их фосфолипидного компонента [1, 9]. Однако повреждения мембранных липидов, возникающие при острой ишемии и в раннем реоксигенационном периоде, не отражают постинемических сдвигов в структуре липидного компонента эндоплазматических мембран гепатоцитов, и в динамике восстановительного периода они остаются недостаточно изученными.

Показанное нами ранее ингибирование активности микросомальных ферментов в течение 3 нед постинемического периода [8] дает основание полагать, что в этом периоде происходят изменения жирнокислотного состава липидного матрикса ЭПР. Это предположение основывается на известной роли микросомальных фосфолипидов в структурной организации и регуляции активности монооксигеназной системы [10].

Цель настоящей работы — изучение влияния острой 30-минутной тотальной ишемии печени на жирнокислотный состав и гидрофобные свойства липидного компонента микросомальных мембран в ранние и отдаленные периоды после ишемического воздействия.

Методика

Эксперименты выполнены на 100 крысах-самцах Вистар массой 190—250 г. Тотальную 30-минутную ишемию печени создавали методом, описанным ранее [8]. Микросомы печени

выделяли дифференциальным центрифугированием [2]. Проведено 3 серии опытов.

В I серии изучали жирнокислотный состав липидов микросом, полученных на 1, 3, 7, 14-е и 21-е сутки постинемического периода. Общую фракцию микросомальных липидов экстрагировали по методу [15]. Относительное содержание индивидуальных жирных кислот определяли методом газовой хроматографии. Подготовка проб включала щелочной гидролиз (0,3 н. NaOH в 90 % метаноле, 90 мин при 80 °C), метилирование жирных кислот (1 % H₂O₄ в метаноле, 20 мин при 80 °C) [14]. Хроматографию осуществляли на приборе «Хром-4» ЧССР (стальные колонки 1,5 м, наполнитель «Reoplex-400», температура испарителя 230 °C, температура колонок 197 °C, скорость газа-носителя: N₂ 30,0 мл/мин, H₂ 26,0 мл/мин, O₂ 400,0 мл/мин). Содержание жирных кислот (в процентах) рассчитывали по формуле: время удержания пика · высота пика [13].

Во II серии экспериментов изучали параметры связывания гидрофобного флюоресцентного зонда 1-анилинонафталин-8-сульфоната (1,8-АНС⁻) с мембранами микросом в вышеуказанные периоды после ишемии. Рассчитывали константу связывания (K_c), концентрацию центров связывания (N) и суммарное сродство зонда (K_cN) методом двойных обратных величин [5]. Зонд готовили на 40 мМ трис-НСI-буфере рН 7,4. Мембраны (концентрация 0,5 мг/мл) титровали зондом в диапазоне концентраций 5—40 мкМ. Титрование 1,8-АНС⁻ (40 мкМ) мембранами микросом проводили в интервале конечных концентраций 0,1—0,6 мг/мл. Флюоресценцию 1,8-АНС⁻ регистрировали на флюоресцентном спектрофотометре MPF-4 «Hitachi» (Япония). Длина волны возбуждения 360 нм, флюоресценции 480 нм. В III серии экспериментов изучали активность спонтанного и НАДФ·Н-зависимого перекисного окисления липидов (ПОЛ) микросом *in vitro* на 3-й и 14-е сутки постинемического периода. Об интенсивности ПОЛ судили по накоплению малонового диальдегида (МДА). Инкубационная смесь содержала 40 мМ трис-НСI-буфера, рН 7,4, 1 мМ НАДФ·Н, 0,012 мМ FeSO₄·7 H₂O, 0,2 мМ

$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ и 1 мг белка микросом в 1 мл [4]. Оценивали исходные и через 10 мин инкубации показатели: концентрацию МДА [4], оптическую плотность микросомальной суспензии при 520 нм [21] и концентрацию цитохрома P-450 [20]. Цитохром P-450 регистрировали на двулучевом спектрофотометре «Hitachi» (Япония) с записью на самописце QPD-54. Концентрацию белка микросом определяли по [18]. Результаты экспериментов подвергнуты статистической обработке с использованием теста *t* Стьюдента.

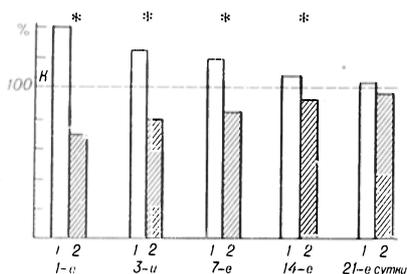
Результаты и обсуждение

Кратковременное выключение печени из кровотока вызывало увеличение насыщенности микросомальных липидов в восстановительном периоде продолжительностью до 3 нед. На 1-е сутки постишемического периода отмечались максимальные изменения соотношения насыщенных и ненасыщенных жирных кислот (см. рисунок). Индекс насыщенности (ИН) — отношение суммы насыщенных жирных кислот к сумме ненасыщенных — возрастал с 0,78 в контроле до 1,5 после ишемии. В последующие периоды после ишемии соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот изменялось в сторону увеличения содержания последних. На 3, 7-е и 14-е сутки ИН постепенно уменьшался и равнялся соответственно 1,2, 1,07 и 0,92, достигая показателя в контроле (0,82) на 21-е сутки после ишемического воздействия (см. рисунок).

Изменение относительного содержания индивидуальных жирных кислот в изученный период после ишемического воздействия было неоднозначным. С 1-х суток после возобновления кровотока в печени отмечалось стой-

кое увеличение относительного содержания пальмитиновой ($\text{C}_{16:0}$) и снижение арахидоновой ($\text{C}_{20:4}$) кислот с восстановлением их соотношения на 21-е сутки постишемического периода. Изменения содержания других кислот наиболее отчетливо проявлялись в раннем (1-е сутки) и отдаленном (14-е сутки) периодах восстановления. 1-е сутки постишемического периода характеризовались увеличением в микросомальных липидах относительного содержания миристиновой ($\text{C}_{14:0}$), пальмитиновой ($\text{C}_{16:0}$), стеариновой ($\text{C}_{18:0}$) и уменьшением концентрации олеиновой ($\text{C}_{18:1}$) и арахидоновой ($\text{C}_{20:4}$) кислот. Увеличение ненасыщенности общих липидов микросомальной фракции в отдаленные сроки постишемического периода происходило за счет повышения содержания мононенасыщенных жирных кислот — пальмитолеиновой ($\text{C}_{16:1}$) и олеиновой ($\text{C}_{18:1}$) и значительного снижения концентрации стеариновой ($\text{C}_{18:0}$) кислот. Относительное содержание полиненасыщенных жирных кислот — линолевой ($\text{C}_{18:2}$) и арахидоновой ($\text{C}_{20:4}$) на 14-е сутки постишемического периода оставалось значительно ниже контрольного (табл. 1).

Структурные перестройки в составе жирных кислот микросомальных липидов нашли отражение и в изменении параметров связывания флуоресцентного зонда мембранами ЭПР. В период ранних постишемических нарушений (1—3-и сутки) отмечалось существенное уменьшение сродства 1,8-АНС- к микросомальным мембранам, что выражалось в увеличении K_c для зонда соответственно на 39,3 и 23,8 %. Отдаленные сроки постишемического периода характеризовались переходом к значительному повышению сродства 1,8-АНС- к мембранам ЭПР с максимумом изменений на 7-е сутки и постепенным возвращением показателя к исходному на 21-е сутки постишемического периода (табл. 2). Двухфазный характер изменений структурной организации ЭПР обнаружен и при изучении суммарного сродства флуоресцентного зонда к микросомальным мембранам. В постишемическом периоде регистрировался также переход от низких в 1-е сутки значений K_cN к превышающим на 7-е сутки показатель в контроле в 3,4 раза. В последующие периоды пос-



Динамика восстановления соотношения суммарного содержания насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в липидной фракции микросом в постишемическом периоде (в % к контролю, принятому за 100).

1 — сумма насыщенных жирных кислот, 2 — сумма ненасыщенных жирных кислот. Звездочка — достоверность различий с контролем ($p < 0,05$).

Таблица 1

Жирнокислотный состав (в %) микросомальных липидов в постишемическом периоде ($M \pm m$)

Жирная кислота	Контроль	Постишемический период, сут				
		1-е	3-и	7-е	14-е	21-е
Миристиновая ($C_{14:0}$)	0,18±0,02	0,31±0,04*	0,19±0,02	0,18±0,02	0,45±0,04*	0,08±0,01*
Пентадекановая ($C_{15:0}$)	0,13±0,01	0,16±0,03	0,14±0,01	0,12±0,01	0,28±0,03*	0,07±0,01*
Пальмитиновая ($C_{16:0}$)	18,31±1,29	29,02±2,48*	24,0±1,85*	25,04±1,32*	24,5±0,59*	18,62±0,87
Пальмитолеиновая ($C_{16:1}$)	1,61±0,12	1,88±0,18	1,67±0,40	1,43±0,11	3,95±0,21*	1,74±0,15
Стеариновая ($C_{18:0}$)	25,09±0,75	30,5±1,72*	30,06±2,53	25,94±1,16	22,79±0,68*	26,28±0,51
Олеиновая ($C_{18:1}$)	10,95±0,25	8,23±0,94*	7,59±0,78*	11,94±0,78	15,31±0,77*	12,53±1,24
Линолевая ($C_{18:2}$)	15,33±0,53	13,61±0,73	14,56±0,59	10,73±0,55*	11,19±0,2*	15,68±0,98
Арахидоновая ($C_{20:4}$)	28,09±1,28	16,51±2,11*	20,57±2,58*	23,76±1,40*	20,31±0,75*	27,27±0,82

Примечание. $n=6-10$. Здесь и 2, 3: в табл. звездочка—достоверность различий с контролем ($p<0,05$).

ле ишемии величина K_cN постепенно уменьшалась, однако на 21-е сутки оставалась еще выше контрольной в 2,4 раза (см. табл. 2). Концентрация центров связывания зонда на мембране (N) уменьшалась в 1-е сутки на 17,2% и оставалась сниженной на 35—50% во все исследованные сроки постишемического периода, включая 21-е сутки.

Согласно литературным данным, уменьшение сродства 1,8-АНС⁻ к мембране и значительное снижение концентрации центров связывания для данного зонда отражают увеличение вязкости мембранных липидов [16]. Аналогичные изменения параметров связывания 1,8-АНС⁻ с «ишемизированными» микросомами, а также увеличение содержания насыщенных жирных кислот в липидах микросом позволяют предположить, что реакцией клетки на ишемическое воздействие является «уплотнение» мембран ЭПР

в раннем постишемическом периоде.

В механизме повышения вязкости микросомальных мембран, по-видимому, основную роль играет утилизация полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) в реакциях перекисного окисления [4, 19], интенсификация которых как при острой ишемии печени, так и в раннем реоксигенационном периоде показана рядом авторов [3, 9]. Возрастание плотности упаковки молекул фосфолипидов в мембранах ЭПР является одним из факторов регуляции активности перекисных процессов посредством уменьшения доступности двойных связей для кислорода [4, 10]. С этих позиций возникающие структурные перестройки мембран ЭПР в раннем постишемическом периоде, очевидно, должны ограничивать пероксидативные реакции и повышать таким образом устойчивость мембраносвязанных ферментов к дальнейшему повреждению.

Таблица 2

Параметры связывания флюоресцентного зонда 1,8-АНС⁻ микросомальными мембранами в разные сроки постишемического периода ($M \pm m$)

Показатель	Контроль	Постишемический период, сут				
		1-е	3-и	7-е	14-е	21-е
K_c , mM^{-1}	40,67±2,68	24,67±3,06*	31,00±2,02*	85,67±3,71*	56,17±2,30*	40,33±2,36
N , $\mu\text{моль/мг}$ белка	28,48±0,98	23,57±0,57*	15,21±0,85*	18,48±1,90*	13,51±1,26*	14,38±1,80*
K_cN , mM^{-1}	1,427±0,08	1,055±0,15*	2,046±0,22*	4,871±0,49*	4,350±0,42*	3,359±0,52*

Примечание. $n=6$. K_c — константа связывания, N — концентрация центров связывания. K_cN — суммарное сродство зонда к мембране.

Резистентность микросомальных мембран в постиншемическом периоде к повреждению *in vitro* в реакциях НАДФ-Н-зависимого ПОЛ ($M \pm m$)

Постиншемический период, сут	Исходные показатели		Через 10 мин НАДФ-Н-зависимого ПОЛ		
	цитохром P-450	МДА ₁	цитохром P-450	МДА ₂	ОП ₅₂₀
Контроль	1,11 ± 0,01	0,08 ± 0,001	0,65 ± 0,02	0,94 ± 0,02	17,5 ± 0,7
3-н 14-е	0,83 ± 0,02* 0,91 ± 0,02*	0,04 ± 0,002* 0,13 ± 0,010*	0,56 ± 0,05 0,11 ± 0,02*	0,37 ± 0,01* 2,63 ± 0,06*	13,7 ± 0,7* 37,6 ± 1,2*

Примечание. Цитохром P-450 выражен в нмоль/мг белка, МДА₁ — в нмоль/мг белка; МДА₂ — в нмоль/мин/мг белка, оптическая плотность (ОП) при 520 нм — в % убыли к исходной, принятой за 100.

Для подтверждения данного предположения проведено изучение содержания в микросомальной фракции одного из конечных продуктов ПОЛ — МДА, а также чувствительности цитохрома P-450 к повреждению *in vitro* при активации НАДФ-Н-зависимого ПОЛ в разные периоды после ишемии. На 3-и сутки постиншемического периода исходный уровень МДА во фракции микросом был в 2 раза ниже контрольного. Скорость образования МДА в НАДФ-Н-зависимой реакции ПОЛ также снижалась более чем в 2,5 раза. Ингибирование активности спонтанного и НАДФ-Н-зависимого ПОЛ при острой ишемии печени и в раннем постиншемическом периоде показано и другими авторами [6, 7, 12].

Резистентность микросомальных липидов в данном периоде к перекисидации препятствовала значительному повреждению цитохрома P-450 в НАДФ-Н-зависимой реакции ПОЛ. В препаратах микросом «ишемизированных» крыс концентрации гемопротенина падала на 31,9 % по сравнению с исходной, в то время как в контроле — на 41,3 % (табл. 3).

Однако «уплотнение» мембран ЭПР в результате потери ПНЖК уменьшает их проницаемость для эндогенных и экзогенных метаболитов и субстратов, ограничивает активность мембраносвязанных ферментов [11]. В отдаленные сроки постиншемического периода (7—21-е сутки) наряду со значительным повышением сродства 1,8-АНС⁻ к мембранам микросом, наблюдалось увеличение в 1,7 раза исходной концентрации МДА в микросо-

мальной фракции. Скорость образования МДА на 14-е сутки после ишемии в НАДФ-Н-зависимой реакции ПОЛ также возрастала в 2,8 раза по сравнению с контролем. Высокий уровень перекисидации микросомальных липидов на 14-е сутки постиншемического периода резко снижал устойчивость цитохрома P-450 к повреждению при активации ПОЛ. Концентрация гемопротенина снижалась на 87,4 % от исходной, что превышало более чем в 2 раза ее убыль в контроле (см. табл. 3).

Изменение сродства 1,8-АНС⁻ к мембране, как и повышение активности спонтанного и НАДФ-Н-зависимого ПОЛ в отдаленные периоды после ишемии, можно объяснить разупорядочиванием молекул мембранных фосфолипидов в результате отмеченного выше значительного увеличения в их составе для мононенасыщенных жирных кислот. Переход мембран ЭПР в состояние «разрыхления» повышает доступность ПНЖК для реакций перекисидации [17]. Преобладание процессов деструкции липидного компонента мембран ЭПР в отдаленные сроки после ишемии является одним из препятствий восстановления как ненасыщенности микросомальных липидов, так и функциональной активности связанных с мембранами ферментов монооксигеназной системы.

Таким образом, острая транзиторная ишемия печени сопровождается изменениями жирнокислотного состава и гидрофобных свойств микросомальных липидов, остающихся значимыми на протяжении 3 нед постиншемического периода.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алесенко А. В., Андреева Л. Б., Слесарева Л. Д. и др. // Структура, биосинтез и превращение липидов в организме животного и человека. — М., 1978. — С. 19.
2. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. — М., 1975.
3. Биленко М. В. // Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. — М., 1982. — С. 195—213.
4. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М., 1972.
5. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. — М., 1980.
6. Воронов Г. Г., Лукиенко П. И., Бушма М. И. // Фармакол. и токсикол. — 1982. — № 1. — С. 54—58.
7. Воронов Г. Г., Лукиенко П. И. // Там же. — № 4. — С. 55—58.
8. Грек О. Р., Шарпов В. И., Литвинов В. С. и др. // Там же. — 1984. — № 3. — С. 114—118.
9. Дудник Л. Б., Биленко М. В., Алесенко А. В. и др. // Бюл. экспер. биол. — 1980. — № 5. — С. 556—558.
10. Ляхович В. В., Цырлов И. Б. Структурные аспекты биохимии монооксигеназ. — Новосибирск, 1978.
11. Ляхович В. В., Цырлов И. Б., Мишин В. М. и др. // Бюл. экспер. биол. — 1973. — № 1. — С. 41—44.
12. Малюгин Э. Ф., Князева Т. А., Заринская С. А. и др. // Экспериментальная и клиническая хирургия печени. — М., 1973. — С. 67—76.
13. Митрука Б. М. Применение газовой хроматографии в микробиологии и медицине. Пер. с англ. — М., 1978. — С. 194.
14. Синяк К. М., Оргель М. Я., Крук В. И. // Лаб. дело. — 1976. — № 1. — С. 37—41.
15. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. H. // J. biol. Chem. — 1957. — Vol. 225. — P. 497—509.
16. Haynes D. H., Staerk H. // J. Membr. Biol. — 1974. — Vol. 17. — P. 313—340.
17. Hafeji Y., Hanstein W. G. // Arch. Biochem. — 1970. — Vol. 138. — P. 73—86.
18. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
19. Niehaus W. G., Samuelsson B. // Europ. J. Biochem. — 1968. — Vol. 6. — P. 126—130.
20. Omura T., Sato R. // J. biol. Chem. — 1964. — Vol. 239. — P. 2370—2378.
21. Tam B. K., McCay P. B. // Там же. — 1970. — Vol. 245. — P. 2295—2300.

Поступила 07.08.86

STRUCTURAL TRANSFORMATIONS OF LIPID COMPONENT IN ENDOPLASMIC RETICULUM MEMBRANES WITHIN EARLY AND DISTANT PERIODS AFTER LIVER TISSUE ISCHEMIA

V. I. Sharapov, O. R. Grek, A. A. Zykov

Medical School, Novosibirsk

Total ischemia of rat liver tissue within 30 min caused distinct alterations in lipid component of endoplasmic reticulum membranes, which occurred within three weeks of the post-ischemic period. During this period the rate of microsomal lipids saturation was elevated due to an increase in the relative content of saturated fatty acids. Two-step alterations were observed in the patterns of fluorescent probe binding (1-amino naphthalene-8-sulfonate) as well as in sensitivity of cytochrome P-450 to the impairment *in vitro* after induction of lipid peroxidation in microsomal membranes. Within 1-3 days after the ischemia affinity of the fluorescent probe to microsomes was decreased, while stability of cytochrome P-450 to impairment during lipid peroxidation induction was increased. Within 7-14 days affinity of the fluorescent probe to membranes was markedly elevated and stability of cytochrome P-450 to the impairment *in vitro* was lowered in the reactions of lipid peroxidation.

УДК 615.272:547.466.3:015.38.015.4:612.822.1

В. А. Розанов, Г. А. Карпович, О. Н. Сергеева, В. М. Копелевич,
В. И. Гунар

ВЛИЯНИЕ МНОГОКРАТНЫХ ИНЪЕКЦИЙ ГАМК НА ГАМК-ШУНТ И НЕКОТОРЫЕ СВЯЗАННЫЕ С НИМ РЕАКЦИИ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС

Одесский медицинский институт

γ -Аминомасляная кислота (ГАМК, аминалон, гаммалон) нашла применение в клинике как средство, улучшающее состояние сосудов головного мозга, устраняющее некоторые вестибулярные расстройства [4]. Используют главным образом такие свойства ГАМК, как способность оказывать влияние на метаболизм клеточных

элементов микрокапилляров мозга [5] и в связи с этим улучшать его кровоснабжение [2]. Метаболические эффекты ГАМК, в частности, влияние на транспорт и метаболизм глюкозы, стимулирующее воздействие на цикл Кребса, дыхание и окислительное фосфорилирование [12], используют в меньшей степени. Это связано глав-

α -КГДК-, ГАМК-Т- и ГДК- активность гомогенатов коры, мозжечка и стволовой части головного мозга крыс через 1 ч после серии инъекций ГАМК

Показатель	Мозжечок		Кора		Ствол	
	физиологический раствор	ГАМК	физиологический раствор	ГАМК	физиологический раствор	ГАМК
α -КГДК, мкмоль α -кетоглутарата на 1 г ткани за 1 мин	0,674 (8)	0,803 (6)	0,816 (7)	0,788 (6)	0,721 (8)	0,758 (5)
<i>P</i>	0,448—0,823	0,716—0,895	0,609—1,056	0,698—0,859	0,501—0,931	0,734—0,788
ГАМК-Т, мкмоль глутамата на 1 г ткани за 1 мин	0,375 (7)	0,413 (6)	0,286 (8)	0,358 (6)	0,299 (6)	0,495 (6)
<i>P</i>	0,306—0,495	0,265—0,527	0,232—0,423	0,297—0,492	0,207—0,363	0,278—0,577
ГДК, мкмоль ГАМК на 1 г ткани за 1 мин	0,495 (8)	0,301 (8)	0,238 (8)	0,239 (8)	0,270 (8)	0,277 (8)
<i>P</i>	0,317—0,525	0,195—0,366	0,159—0,341	0,090—0,302	0,153—0,368	0,171—0,448
		<0,05		>0,05		>0,05

Примечание. В данной и последующих таблицах представлены средние арифметические величины (в скобках — число опытов) и доверительные интервалы.

ным образом с тем, что ГАМК при пероральном применении метаболизируется в экстраневральных образованиях [16], вследствие чего головного мозга достигают преимущественно ее метаболиты. В связи с этим создание новых лекарственных препаратов на основе ГАМК осуществляется путем поиска активных ГАМК-производных и ГАМК-конъюгатов [3]. Однако с учетом низкой токсичности ГАМК, а также быстрого поглощения экзогенной ГАМК клеточными структурами нервной ткани [15] не исключена возможность использования инъекционных препаратов самой ГАМК для эндолумбального, интракраниального и внутривенного введения.

С другой стороны, введение ГАМК служит необходимым контролем при оценке влияния ряда ее новых витаминных производных, для которых не исключена возможность расщепления с освобождением свободной ГАМК.

В связи с изложенным выше возникает необходимость изучения метаболических эффектов ГАМК при ее парентеральном введении в дозах, соответствующих клиническим. В частности, представляет интерес влияние многократных инъекций ГАМК (ситуация, моделирующая клиническое применение) на взаимосвязь и соотношение реакций цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) и ГАМК-шунта, составляющих основу биоэнергетики нервной ткани.

Нами в эксперименте оценены влияние многократных инъекций небольших доз ГАМК (5 мг/кг, внутривенно, 5 инъекций в течение 2 сут) на активность одного из ключевых

ферментов ЦТК — α -кетоглутаратдегидрогеназы, а также интенсивность функционирования ГАМК-шунта в различных отделах головного мозга крыс в этих условиях.

Методика

Объектом исследования служили крысы линии Вистар, половозрелые самки, массой 200—240 г. ГАМК («Реапал») вводили животным внутривенно (на физиологическом растворе) в разовой дозе 5 мг/кг по следующей схеме: 1-е сутки: введение в 8, 14 и 20 ч, 2-е сутки: введение в 8 и 14 ч. Группе контрольных животных вводили физиологический раствор. Животных умерщвляли через 1 ч после последней инъекции. Головной мозг быстро извлекали, освобождали от мягкой мозговой оболочки и сосудистых сплетений и разделяли на мозжечок, кору и стволовую часть мозга. Ткани гомогенизировали при температуре 0—4°C. Гомогенаты (1:5) для определения глутаматдекарбоксилазной (ГДК) активности и содержания аминокислот готовили на К, Na-фосфатном буфере, 0,1 М, pH 6,6; для определения ГАМК- α -кетоглутаратаминотрансферазной (ГАМК-Т) активности — на триацетатном буфере, 0,05 М, pH 8,2; для определения α -кетоглутаратдегидрогеназной (α -КГДК) активности гомогенаты (1:10) готовили на К, Na-фосфатном буфере, 0,15 М, pH 7,4.

α -КГДК-активность оценивали по восстановлению феррицианида [10], интенсивность ГДК и ГАМК-Т реакций — по приросту соответственно ГАМК и глутамата (ГЛ) [8]. Содержание свободных аминокислот, в частности ГАМК и ГЛ, определяли методом хроматографии на бумаге. Аминотрансферазную активность оценивали по модифицированному методу [6]. Результаты обработаны статистически с применением критерия *U* (Вилкоксона — Манна — Уитни) [1].

Результаты и обсуждение

Влияние инъекций ГАМК проанализировано нами с использованием гомо-

АСТ- и АЛТ-активность гомогенатов коры, мозжечка и стволовой части головного мозга крыс через 1 ч после серии инъекций ГАМК

Показатель	Мозжечок		Кора		Ствол	
	физиологический раствор	ГАМК	физиологический раствор	ГАМК	физиологический раствор	ГАМК
АСТ, мкмоль пирувата на 1 г ткани за 1 мин <i>P</i>	6,00 (8) 3,34—9,15	6,62 (7) 4,23—8,80 >0,05	4,76 (8) 3,00—6,20	5,87 (7) 3,67—8,80 >0,05	5,36 (8) 3,10—6,90	5,37 (7) 3,67—7,37 >0,05
АЛТ, мкмоль пирувата на 1 г ткани за 1 мин <i>P</i>	1,20 (8) 0,85—1,99	1,43 (7) 1,11—2,17 <0,05	0,70 (8) 0,34—1,43	0,72 (7) 0,34—1,06 >0,05	0,70 (8) 0,45—0,90	0,92 (7) 0,65—1,55 <0,05

генатов трех крупных отделов головного мозга — коры, мозжечка и стволовой части. Подобное деление мозга часто используют в биохимических исследованиях [7]. Нами, как и в работе [7], в контрольной группе максимальная интенсивность окислительных процессов, связанных с утилизацией мозгом α -кетоглутарата, обнаружена в коре мозга животных, минимальная — в мозжечке, ствол занимал промежуточное положение (табл. 1). Максимальная глутаматдекарбоксилазная, ГАМК-трансаминазная, а также аспартат- и аланинаминотрансферазная активность выявлена в ткани мозжечка, минимальная — в коре, промежуточная — в стволе (см. табл. 1 и 2). При этом соотношение максимальных активностей ферментных систем, конкурирующих за утилизацию α -кетоглутарата и в определенной степени отражающих соотношение интенсивностей двух альтернативных путей обмена, составляет в мозжечке 1,8, а в коре мозга 2,9. Все это позволяет характеризовать мозжечок как отдел мозга с более высоким вкладом ГАМК-шунта в биоэнергетику. Подобные закономерности выявлены при исследовании интактных животных [9] с той разницей,

что у них в мозжечке отмечали еще и минимальное содержание ГАМК и ГЛ. В группе контрольных животных уровень ГАМК и ГЛ в мозжечке был выше, чем в коре (табл. 3). Вероятно, это связано с тем, что они находились в условиях стресса (фиксация и болевые воздействия во время инъекций физиологического раствора).

На фоне описанных метаболических особенностей, выявленных в различных отделах мозга, многократное введение малых доз ГАМК вызывало ряд закономерных сдвигов, неоднородных в изученных отделах мозга.

Так, α -КГДК-активность достоверно повышалась в мозжечке (на 20% от контроля) через 1 ч после последней инъекции ГАМК (см. табл. 1); в коре и стволе мозга существенных ее изменений не выявлено. Таким образом, введение ГАМК активирует утилизацию α -кетоглутарата тканью мозжечка, в котором интенсивность этого процесса ниже, чем в других отделах мозга.

Интенсивность ГАМК-трансаминазной реакции через 1 ч после серии инъекций ГАМК во всех отделах мозга была увеличена: в мозжечке на 10%, в коре и стволе на 22 и 52% соответственно (в последнем случае

Таблица 3

Содержание ГАМК и ГЛ в мозжечке, коре и стволовой части головного мозга крыс через 1 ч после серии инъекций ГАМК

Показатель	Мозжечок		Кора		Ствол	
	физиологический раствор	ГАМК	физиологический раствор	ГАМК	физиологический раствор	ГАМК
ГЛ, мкмоль на 1 г ткани	9,24 (10) 6,25—13,44	6,08 (10) 4,26—9,13 <0,01	8,73 (10) 7,16—9,76	8,70 (14) 4,88—13,58 >0,05	7,13 (13) 5,05—9,48	7,29 (12) 3,64—14,48 >0,05
ГАМК, мкмоль на 1 г ткани	2,63 (12) 1,05—5,26	2,37 (8) 1,00—3,12 >0,05	2,10 (12) 1,06—3,39	2,00 (13) 1,10—2,92 >0,05	2,89 (10) 2,03—3,73	2,53 (11) 1,06—4,80 >0,05

$p < 0,05$; см. табл. 1). Поскольку по условиям методики фактически мы оценивали максимальную активность ГАМК-Т, отражающую количество фермента, можно предположить индуцирующее воздействие многократно инъектируемой ГАМК на ферментную систему ее утилизации в ЦНС. Повышение ГАМК-трансаминазной активности было минимальным в мозжечке, где отмечен исходно высокий уровень, и значительно более выраженным и достоверным в коре и стволовой части мозга, где ее исходный уровень ниже.

Что же касается ГДК — фермента, продуцирующего ГАМК в мозге и регулируемого уровнем ГАМК по механизму обратной связи [13], то, как видно из табл. 1, в мозжечке отмечается достоверное торможение ГДК (на 40 %); в коре и стволе мозга существенных изменений ГДК-активности не выявлено.

Таким образом, при многократном парентеральном введении ГАМК в клинических дозах через 1 ч после последней инъекции отмечается активация утилизации эндогенной ГАМК (усиление функции ГАМК-шунта) преимущественно в отделах мозга с низкой интенсивностью функционирования ГАМК-шунта и усилением основного энергетического пути (α -кетоглутаратдегидрогеназного) в мозжечке. Активация утилизации эндогенной ГАМК согласуется с наблюдаемой во всех отделах мозга тенденцией к снижению уровня эндогенной ГАМК (см. табл. 3).

Наблюдаемые изменения сопровождаются активацией аминотрансферных реакций; при этом наиболее выражен рост активности АЛТ в мозжечке и стволовой части мозга (см. табл. 2). Уровень ГЛ в коре и стволе мозга практически оставался неизменным, а в мозжечке отмечалось достоверное понижение, на 40 % по сравнению с контролем, содержания ГЛ (см. табл. 3). Последнее приводило к заметному изменению соотношения ГЛ/ГАМК в ткани мозжечка. Так, если в контрольной группе это соотношение составляло в мозжечке, коре и стволе мозга соответственно 3,51, 4,16 и 2,47, то у животных, получавших ГАМК, эти величины составили 2,56, 4,35 и 2,88. Таким образом, вследствие снижения уровня ГЛ

в мозжечке соотношение между возбуждающим и тормозным медиатором в этом отделе мозга изменилось в пользу последнего.

Подводя итоги описанию нейрохимических сдвигов при парентеральном введении ГАМК, следует подчеркнуть выраженный и достоверный характер сдвигов при введении сравнительно малых доз препарата, причем характер и направленность изменений не противоречат возможности проникновения малых доз ГАМК в мозг. Разумеется, это не более чем предположение, не подкрепленное прямыми экспериментами, однако следует обратить внимание на тот факт, что в крови постоянно содержится небольшое количество ГАМК, продуцируемой кишечными бактериями [14] и, согласно последним данным, не исключена возможность проникновения неизменной ГАМК через гематоэнцефалический барьер без участия эндотелиальной ГАМК-Т [11]. Другим возможным механизмом возникновения наблюдаемых сдвигов может быть влияние инъектируемой ГАМК на гипофиз-адреналовую систему, тесно связанную с обменом ГАМК [11].

Независимо от механизмов реализации эффекта ГАМК можно констатировать, что парентеральное введение клинических доз ГАМК оказывает заметное влияние на обмен в ЦНС. Приведенные данные свидетельствуют о целесообразности использования ГАМК как средства для парентеральной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. — Л., 1973.
2. Ковалев Г. В., Косицына А. Ф. // Вопросы нервной регуляции мозгового кровообращения. — Кншинев, 1983. — С. 85—87.
3. Копелевич В. М., Сытинский И. А., Гунар В. И. // Хим.-фарм. журн. — 1981. — № 5. — С. 27—39.
4. Машковский М. Д., Плешаков М. Г., Альтшулер Р. А., Скачилова С. Я. // Там же. — 1975. — № 9. — С. 60—62.
5. Мирзоян С. А., Гаспарян Э. И., Акопян В. П. и др. // Кровообращение. — 1981. — № 4. — С. 3—6.
6. Осадчая Л. М. // Методы биохимических исследований. — Л., 1982. — С. 246—250.

7. *Промыслов М. Ш.* Обмен веществ в мозге и его регуляция при черепно-мозговой травме. — М., 1984.
8. *Розанов В. А.* // Вопр. мед. химии. — 1980. — № 1. — С. 42—46.
9. *Розанов В. А.* Особенности распределения и субцеллюлярной организации компонентов системы ГАМК и сопряженных реакций в некоторых отделах головного мозга крысы // Рукопись депонирована Укр. НИИИТИ 09.08.95, № 1776 Ук-85 Ден.
10. *Gubler C. J.* // J. biol. Chem. — 1961. — Vol. 236, N 12. — P. 3112—3120.
11. *Krantis A.* // Acta neuropath. — 1984. — Vol. 64, N 1. — P. 61—67.
12. *Lee L. W., Yatsu F. M.* // J. Neurochem. — 1974. — Vol. 23, N 4. — P. 721—724.
13. *Porter T., Martin D. L.* // Ibid. — 1984. — Vol. 43, N 5. — P. 1464—1467.
14. *Schafer D. F., Fowler J. M., Jones E. A.* // Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.). — 1981. — Vol. 167, N 3. — P. 301—303.
15. *Tapia R.* // Handbook of Neurochemistry / Ed. A. Laittha. — New York, 1983. — Vol. 3. — P. 423—466.
16. *Wu J.-Y., Moss L. G., Chude O.* // Neurochem. Res. — 1978. — Vol. 3, N 2. — P. 207—219.

Поступила 03.12.86

EFFECT OF MULTIPLE ADMINISTRATIONS OF γ -AMINO BUTYRIC ACID ON GABA SHUNT AND SOME RELATED TO THE SHUNT REACTIONS IN RAT BRAIN

V. A. Rozanov, G. A. Karpovich, O. N. Sergeeva, V. M. Kopelevich, V. I. Gunar
Medical School, Odessa

Effect of repeated administrations of γ -amino butyric acid (GABA) at doses corresponding to those which are used in clinical medicine, on the state of GABA-shunt and intensity of α -ketoglutarate dehydrogenase and aminotransferase reactions as well as on the level of GABA and glutamate was studied in cerebellum, cortex and *truncus cerebri* of rat brain. Administration of GABA (5 injections at a dose of 5 mg/kg) caused distinct alterations in central nervous system, which involved activation of GABA-transaminase, utilizing GABA, and inactivation of glutamate decarboxylase, producing the amine, as well as a decrease of GABA and glutamate levels and an increase in α -ketoglutarate utilization and activation of aminotransferase reactions. These alterations were especially distinct in cerebellum, where initial high intensity of GABA shunt functioning and minimal level of GABA were observed. The alterations observed suggest the existence of pronounced stimulating effect of GABA, even at low doses, on reactions of energy metabolism in brain.

УДК 616-036.882-08-036.82-06:616.127-008.93:577.121.7]-085.272.4.014.425

В. Т. Долгих

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ ПОСТРЕАНИМАЦИОННЫХ НАРУШЕНИЙ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА МИОКАРДА γ -ОКСИБУТИРАТОМ НАТРИЯ, ИОНОЛОМ И ГУТИМИНОМ

Омский медицинский институт

Независимо от причины, вызвавшей терминальное состояние, в раннем постреанимационном периоде формируется сердечная недостаточность [6, 15, 18]. Существенную роль в ее развитии, как нами ранее установлено [4, 5], играют активация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и повреждение образующимися в избытке перекисными соединениями мембранных механизмов ионного транспорта. Кроме того, развитие постреанимационной недостаточности сердца способствуют также нарушения энергетического обмена сердца. Однако эти нарушения биоэнергетики изучены лишь в первые часы восстановительного периода после оживления [19].

Цель настоящей работы — изучить нарушения энергетического обмена миокарда на протяжении месяца с

момента оживления и попытаться уменьшить эти нарушения с помощью γ -оксибутирата натрия (ГОМК), ионола и гутимиина, обладающих антигипоксантами и антиоксидантной активностью [3, 12, 16].

Методика

Опыты проведены на 1060 беспородных крысах-самцах массой 180—210 г под нембуталовым наркозом. Клиническую смерть длительностью 4 мин вызывали острой кровопотерей через сонную артерию, а оживление осуществляли центрипетальным нагнетанием выпущенной крови и искусственной вентиляцией легких. Эксперименты проводили в 2 этапа. На 1-м этапе изучали влияние острой смертельной кровопотери на выживаемость животных и нарушения энергетического обмена в миокарде. С этой целью в конце периода клинической смерти и через различные сроки после оживления извлекали сердца металлическими щипцами, охлажденными в жидком азоте, и определяли в них содержание АТФ,

АДФ и АМФ с использованием наборов Test-Combination фирмы «Boehringer Mannheim», а гликогена, неорганического фосфора, лактата и пирувата — ранее применявшимися методами [4]. Рассчитывали энергетический потенциал и потенциал фосфорилирования — ПФ [20]. На 2-м этапе оценивали эффективность использования ГОМК (300 мг/кг), инола (100 мг/кг) и гутимины (50 мг/кг) для уменьшения постреанимационных нарушений энергетического обмена в миокарде. Одни животные получали эти препараты за 1 ч до кровопотери внутрибрюшинно (взятие сердец для биохимических исследований у этих животных осуществляли через 1,5 и 6 ч после оживления — в сроки максимально выраженной недостаточности сердца), другие — как до кровопотери, так и в течение 5 сут после оживления; они и были использованы для оценки выживаемости. Результаты обработаны статистически с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В различные сроки постреанимационного периода погибли 66,7 % животных, причем летальность за 1-е сутки достигла 81,4 % от общего числа погибших. Выжившие крысы с учетом сроков восстановления функций жизненно важных органов и дефицита неврологического статуса [10] были распределены на 2 группы: с благоприятным (I) и неблагоприятным (II) течением постреанимационного периода.

Представленные в табл. 1 данные свидетельствуют об усиленном катаболизме адениловых нуклеотидов сердца во время умирания и клинической смерти: содержание АТФ понижается в 3 раза, а АДФ и АМФ увеличивается соответственно в 3 и 5 раз по сравнению с контролем, что в конечном итоге приводит к уменьшению в 1,8 раза энергетического потенциала клетки. Прогрессирующее снижение напряжения кислорода в крови и миокарде во время кровопускания и клинической смерти закономерно ингибирует ферменты цикла Кребса, разобщает окисление с фосфорилированием и уменьшает продукцию АТФ. Распад нуклеотидов сопровождается накоплением неорганического фосфора и значительным увеличением ПФ. Известно, что возросший ПФ ускоряет сопряженный с фосфорилированием процесс транспорта электронов в дыхательной цепи и активизирует дыхание митохондрий путем увеличения притока НАД·Н₂ в дыхательную цепь и активизирует гликогенолиз и гликолиз [11, 17]. Следствием

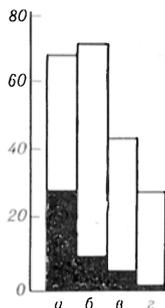
такой активации, как видно из табл. 1, является, с одной стороны, повышенный распад гликогена, что сопровождается образованием АТФ в гликолитическом фосфорилировании (однако выход АТФ при этом составляет 10 % от его образования при аэробном обмене), а с другой — накопление в сердечной мышце лактата и пирувата в концентрациях, превышающих контрольный уровень соответственно в 6 и 2 раза вследствие того, что они не успевают быстро утилизироваться митохондриями. Кроме того, увеличение ПФ смещает креатинкиназную реакцию в сторону образования АТФ. Значительная часть креатинфосфата передает свою макроэргическую фосфатную группу АДФ, и образуется некоторое дополнительное количество АТФ, но при этом уровень креатинфосфата в сердечной мышце понижается более чем в 4 раза. Таким образом, гликолиз и креатинкиназная реакция представляют собой резервные процессы, мобилизуемые во время умирания и клинической смерти для образования дополнительного количества АТФ.

Через 5 мин после восстановления самостоятельных сердечных сокращений в условиях искусственной вентиляции легких уровень АТФ и креатинфосфата значительно повышается, достигая почти контрольного, однако энергетический потенциал клеток увеличивается незначительно, поскольку одновременно с образованием АТФ по-прежнему идет усиленный его распад: концентрация АДФ и АМФ в сердечной мышце превышает уровень этих метаболитов, характерный для клинической смерти. По времени эти изменения биоэнергетики миокарда соответствуют развитию I стадии постреанимационного периода — гипердинамической [6, 15].

Однако через 15 мин после оживления содержание АТФ в миокарде уменьшается за счет дальнейшего усиления катаболических процессов, о чем свидетельствует повышение уровня неорганического фосфора, усиленно расходуется креатинфосфат. По-прежнему остается низким энергетический потенциал клетки. Не исключено, что эти изменения в энергетическом обмене миокарда являются следствием так называемого «кислородного парадокса», выявляемого

Влияние острой смертельной кровопотери и последующей реанимации на энергетический обмен в сердце ($M \pm m$)

Этап экспериментальной	Группа животных (в скобках — число животных)	МКМоль/г				Энергетический потенциал	ДФ	Неорганический фосфор, МКМоль/г	Гликоген, Мг %	МКМоль/г	
		Креатинфосфат	АТФ	АДФ	АМФ					Лактат	Пируват
Контроль Клиническая смерть Постреанимационный период:	(12)	6,72 ± 0,41	2,190 ± 0,102	0,484 ± 0,026	0,148 ± 0,009	0,862 ± 0,027	1,22 ± 0,051	5,52 ± 0,28	535 ± 28	2,26 ± 0,14	0,32 ± 0,03
	(11)	1,62 ± 0,35***	0,757 ± 0,122***	1,304 ± 0,157***	0,814 ± 0,096***	0,485 ± 0,017***	16,69 ± 1,71***	9,69 ± 1,33**	217 ± 38***	15,26 ± 0,58***	0,65 ± 0,07***
5 мин	(11)	5,99 ± 0,73	1,799 ± 0,159*	1,729 ± 0,187***	0,923 ± 0,152***	0,598 ± 0,06***	3,42 ± 0,15***	3,56 ± 0,13***	207 ± 29***	8,20 ± 0,80***	1,30 ± 0,18***
	(15)	2,84 ± 0,34**	1,260 ± 0,127***	1,101 ± 0,141**	0,774 ± 0,158***	0,377 ± 0,02***	6,37 ± 0,61***	7,29 ± 0,55*	270 ± 25***	7,68 ± 0,43***	0,82 ± 0,08***
15 мин	(13)	6,15 ± 0,84	1,350 ± 0,071***	1,392 ± 0,102***	0,816 ± 0,140***	0,570 ± 0,01***	4,60 ± 0,50***	4,75 ± 0,35	269 ± 22***	5,89 ± 0,68***	0,71 ± 0,09***
	(11)	2,01 ± 0,301***	0,786 ± 0,0631***	1,395 ± 0,132***	0,810 ± 0,072***	0,495 ± 0,017***	11,52 ± 1,121***	8,75 ± 0,951***	149 ± 221***	9,11 ± 1,181*	0,80 ± 0,17*
30 мин	(15)	3,05 ± 0,36**	1,685 ± 0,081***	1,110 ± 0,088**	0,675 ± 0,042**	0,613 ± 0,012***	4,91 ± 0,29***	7,08 ± 0,80	319 ± 51***	6,22 ± 0,43***	1,00 ± 0,14***
	(9)	1,79 ± 0,32+	0,854 ± 0,1051***	1,222 ± 0,130***	0,935 ± 0,1051*	0,677 ± 0,041***	17,79 ± 1,631***	12,28 ± 1,321+	166 ± 11+	6,13 ± 0,65***	1,22 ± 0,31*
3 ч	(15)	6,53 ± 0,55	2,046 ± 0,183	1,327 ± 0,102**	0,629 ± 0,078**	0,677 ± 0,041***	6,00 ± 0,65***	9,24 ± 1,22*	447 ± 61	5,01 ± 0,36***	0,96 ± 0,12***
	(11)	3,59 ± 0,401***	0,924 ± 0,0951***	1,418 ± 0,079**	0,875 ± 0,0811*	0,507 ± 0,0321+	18,52 ± 0,701***	12,16 ± 0,45***	225 ± 301+	7,11 ± 0,62*	1,59 ± 0,27**
6 ч	(12)	7,42 ± 0,44	1,713 ± 0,052**	1,441 ± 0,073**	0,258 ± 0,020**	0,712 ± 0,020**	6,01 ± 0,70**	7,19 ± 0,57*	330 ± 24	2,60 ± 0,35	1,13 ± 0,11**
	(15)	2,81 ± 0,301***	1,491 ± 0,126***	1,295 ± 0,096**	0,418 ± 0,0381+	0,667 ± 0,022***	8,87 ± 0,521+	10,22 ± 0,691+	306 ± 331+	4,03 ± 0,271+	1,80 ± 0,241+
1 сут	(15)	4,32 ± 0,56***	2,460 ± 0,175	1,781 ± 0,121**	1,051 ± 0,091**	0,663 ± 0,034***	3,45 ± 0,33***	4,76 ± 0,48	393 ± 61	3,24 ± 0,29**	1,67 ± 0,26**
	(12)	1,02 ± 0,211***	1,35 ± 0,0851***	1,527 ± 0,092***	0,916 ± 0,161***	0,533 ± 0,0311+	3,80 ± 1,761+	10,44 ± 1,631+	197 ± 131+	5,98 ± 0,811+	1,20 ± 0,18***
3 сут	(15)	5,58 ± 0,87	1,793 ± 0,115	1,729 ± 0,130**	0,701 ± 0,161***	0,628 ± 0,033***	5,15 ± 0,48**	5,32 ± 0,43	397 ± 49**	3,27 ± 0,33*	0,80 ± 0,08***
	(14)	1,74 ± 0,301***	1,080 ± 0,0551***	1,955 ± 0,115**	1,218 ± 0,0311+	0,463 ± 0,0311+	14,89 ± 0,211+	8,23 ± 0,531+	180 ± 191+	5,93 ± 0,401***	1,28 ± 0,011***
7 сут	(9)	5,27 ± 0,35*	2,351 ± 0,112	1,311 ± 0,105**	0,469 ± 0,033**	0,727 ± 0,033**	2,28 ± 0,25***	4,09 ± 0,35**	481 ± 43	3,02 ± 0,27*	1,05 ± 0,07***
	(14)	2,68 ± 0,231***	1,16 ± 0,0951***	1,416 ± 0,126***	0,975 ± 0,0811***	0,520 ± 0,0291+	9,81 ± 0,861***	8,52 ± 0,651***	218 ± 211+	5,58 ± 0,321***	1,33 ± 0,11**
14 сут	(10)	4,15 ± 0,30***	2,410 ± 0,135	1,394 ± 0,097***	0,719 ± 0,061**	0,691 ± 0,033**	3,39 ± 0,25***	6,01 ± 0,37	402 ± 40*	2,60 ± 0,23**	0,82 ± 0,09***
	(14)	1,83 ± 0,171***	1,415 ± 0,1071***	1,899 ± 0,1701+	0,880 ± 0,092***	0,563 ± 0,0371***	19,12 ± 1,081***	14,25 ± 1,031***	228 ± 261+	4,16 ± 0,371***	1,31 ± 0,141+
21 сут	(10)	3,15 ± 0,23**	2,08 ± 0,115	1,203 ± 0,210**	0,657 ± 0,034***	0,669 ± 0,031***	2,80 ± 0,34**	4,77 ± 0,30	288 ± 44**	3,15 ± 0,23**	0,71 ± 0,11**
	(10)	4,32 ± 0,38**	2,18 ± 0,211	1,270 ± 0,102	0,414 ± 0,037***	0,726 ± 0,032**	2,15 ± 0,10***	3,61 ± 0,22***	398 ± 47*	2,18 ± 0,16	0,89 ± 0,12***



Динамика неврологического статуса крыс в постреанимационном периоде.

По оси абсцисс — время после оживления: а — 1 сут., б — 3 сут., в — 7 сут., г — 14 сут.; по оси ординат — балльная оценка дефицита неврологического статуса. Темные столбцы — подгруппа животных с благоприятным, светлые — с неблагоприятным течением постреанимационного периода.

во время реоксигенации после гипоксии и ишемии, характерных для клинической смерти [4, 5, 14]. Образующиеся в больших количествах токсические перекисные соединения приводят, как известно, к разрыхлению мембран, появлению в них гидрофильных «пор», ингибированию липидзависимых ферментов, в том числе ферментов цикла Кребса, разобщению окисления с фосфорилированием и уменьшению продукции АТФ [8, 9]. В эти же сроки появляются первые признаки гиподинамии миокарда и депрессии его сократительной функции [6].

Через 30 мин по степени нарушения энергетического обмена в миокарде и дефициту неврологического статуса, оцениваемому по 100-балльной шкале (см. рисунок), отчетливо выявляются две подгруппы: примерно в $\frac{2}{3}$ случаев отмечаются более высокий уровень АТФ, креатинфосфата, меньший расход гликогена и умеренное накопление лактата (I — группа с благоприятным течением постреанимационного периода); в $\frac{1}{3}$ наблюдений отмечаются выраженные и длительные нарушения биоэнергетики миокарда, характеризующиеся повышенным расходом АТФ, креатинфосфата и гликогена, сохраняющимся на высоком уровне анаэробным гликолизом, что обуславливает накопление в миокарде избытка молочной кислоты (II — группа с неблагоприятным течением постреанимационного периода). Гиперметаболические процессы в миокарде сохраняются в течение 3 нед; к концу месяца появляется тенденция к нормализации энергетических процессов в миокарде.

На 2-м этапе экспериментов с целью уменьшения постреанимационных повреждений организма в целом и сердца в частности были использованы ГОМК, ионол и гутимин.

Наиболее эффективным из этих препаратов оказался ГОМК. Летальность среди животных, получавших его до клинической смерти, оказалась в первые 6 ч после оживления в 7 раз ниже, чем среди животных контрольной группы. Меньшими были и нарушения энергетического обмена в миокарде (табл. 2). Смертность среди животных, получавших ГОМК как до клинической смерти, так и в течение 5 сут после оживления, составила к концу месяца 40% (без препарата — 66,7%). Свойство предварительно введенного ГОМК предупреждать постреанимационные повреждения организма в целом и сердца в частности можно связать с антистрессорным действием этого соединения [12]. Существует и иная возможность — ГОМК в организме превращается в янтарный полуальдегид и далее в янтарную кислоту, которая является ФАД-зависимым субстратом окисления и может играть роль в обеспечении достаточного ресинтеза АТФ в сердечной мышце и других органах при нарушении использования НАД-зависимых субстратов [16].

Полученные данные свидетельствуют, что ГОМК защищает сердце при клинической смерти и последующем оживлении. Вместе с тем нет оснований думать, что этим вполне достоверным, но неполным защитным эффектом можно объяснить наблюдавшееся в наших опытах снижение летальности после клинической смерти в 7 раз. Можно полагать, что ГОМК, будучи тормозным метаболитом центрального действия, защищает в условиях клинической смерти и последующего оживления не только сердце, но и прежде всего головной мозг, состояние которого в высокой степени лимитирует выживаемость [15].

Синтетический антиоксидант ионол, вводимый за 1 ч до клинической смерти, способствовал более раннему восстановлению сердечных сокращений, дыхания и роговичного рефлекса, уменьшал на 28% летальность в первые 6 ч после оживления и улучшал энергетическое обеспечение сократительной функции миокарда. Энергетический потенциал кардиомиоцитов повышался за счет увеличения содержания АТФ в сердечной мышце и снижения уровня АДФ и АМФ. Сердца животных, «защищенных» ионо-

Влияние предварительного введения ГОМК, ионола и гутимина на постреанимационные нарушения энергетического обмена в сердце ($M \pm m$)

Показатель	Серия опытов	ГОМК	Ионол	Гутимин
Креатинфосфат, мкмоль/г	К	4,00±0,23	6,03±0,47	4,75±0,46
	О	5,30±0,38 ^{*†}	5,68±0,43 ^{*†}	5,19±0,42 ^{*†}
АТФ, мкмоль/г	К	2,503±0,136	1,932±0,094	2,243±0,127
	О	2,340±0,112 ^{*†}	1,836±0,099 ⁺	2,311±0,120 ^{*†}
АДФ, мкмоль/г	К	0,836±0,129	0,982±0,057	0,843±0,063
	О	1,263±0,137	1,053±0,066 ^{*†}	1,398±0,156
АМФ, мкмоль/г	К	0,519±0,063	0,175±0,009	0,448±0,047
	О	0,585±0,067 [*]	0,176±0,016 ^{*†}	0,698±0,068 ⁺
Энергетический потенциал	К	0,757±0,027	0,784±0,021	0,754±0,034
	О	0,709±0,022	0,770±0,013 ^{*†}	0,683±0,035 ⁺
Неорганический фосфор, мкмоль/г	К	4,23±0,044	8,29±0,37	5,56±0,37
	О	5,00±0,41 ^{*†}	8,03±0,41 ⁺	6,30±0,65 ⁺
ПФ	К	1,41±0,09	4,21±0,32	2,08±0,11
	О	2,70±0,16 ^{*†}	4,60±0,41 ^{*†}	3,81±0,23 ^{*†}
Гликоген, мг %	К	617±45	748±50	322±31
	О	607±48 ⁺	705±52 ^{*†}	420±56 ⁺
Лактат, мкмоль/г	К	2,02±0,16	2,38±0,21	2,59±0,21
	О	2,37±0,14 ⁺	2,49±0,17 ⁺	3,25±0,26 ^{*†}
Пируват, мкмоль/г	К	0,35±0,022	0,42±0,029	0,76±0,062
	О	0,47±0,031 [*]	0,60±0,045 ^{*†}	0,95±0,081

Примечание. К — животные контрольных групп, О — животные, получавшие до клинической смерти один из препаратов. Сердца для биохимических исследований у крыс, получавших гутимин, брали через 1,5 ч после оживления, а у получавших ГОМК и ионол — через 6 ч после оживления. Звездочками обозначены достоверные различия показателей по отношению к животным с благоприятным, плюсами — с неблагоприятным течением постреанимационного периода. Величины изучаемых показателей у контрольных и оживленных крыс представлены в табл. 1.

лом, отличались более высоким содержанием гликогена и более низким уровнем анаэробного гликолиза (см. табл. 2). Введение препарата до клинической смерти и в течение 5 сут после оживления понизило летальность до 53,3 % (в опыте — 66,7 %).

Благоприятное влияние ионола на течение постреанимационного периода обусловлено его высокой антирадикальной активностью, благодаря чему уменьшается накопление продуктов перекисного окисления липидов, особенно в раннем постреанимационном периоде [4, 14]. Кроме того, ионол способен улучшать тканевые окислительно-восстановительные процессы, устранять гипоксию тканей, усиливать сопряжение окисления с фосфорилированием, повышая эффективность системы аэробного синтеза АТФ [2, 13], и уменьшать детергентноподоб-

ное действие высоких концентраций ненасыщенных жирных кислот, характерных для постреанимационного периода [4, 5], путем образования с ними комплексов [7].

Предварительное введение гутимина, повышающего устойчивость организма к гипоксии [3], оказало благоприятное влияние как на исход реанимации, так и на течение постреанимационного периода. Летальность в раннем периоде оживления составляла 10 %, а среди «не защищенных» гутимином животных — 21,5 %. Препарат улучшал энергетический обмен в миокарде: содержание АТФ и креатинфосфата превышало уровень этих метаболитов в сердцах подопытных животных (см. табл. 2), более экономно расходовался гликоген. Содержание лактата, отражающего интенсивность гликолитических процессов

в миокарде, оказалось близким к контрольному уровню. Введение гутими-на до клинической смерти и после оживления понизило летальность среди животных этой группы до 43,3% (в опыте — 66,7%). Свойство гутими-на уменьшать постреанимационные повреждения организма в целом и сердца в частности связано с его основной фармакологической характеристикой: снижением кислородного запроса организма в целом и сердца в частности, активацией анаэробного и аэробного гликолиза, значительным ускорением утилизации лактата, торможением липолиза и усилением включения метаболитов в цикл Кребса, что способствует более полному окислению их в условиях дефицита кислорода [1, 3].

Результаты проведенных исследований свидетельствуют, что нарушения энергетического обмена в сердце сохраняются в течение длительного времени после оживления, определяя в известной мере течение постреанимационного периода (благоприятное или неблагоприятное), и могут быть уменьшены предварительным введением ГОМК, ионола и гутими-на. По эффективности использованные препараты располагаются в такой последовательности: ГОМК, гутимин, ионол.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александрова А. Е. // Фармакол. и токсикол. — 1972. — № 5. — С. 592—595.
2. Биленко М. В., Шеленкова Л. П., Дубур Г. Я., Велена А. Х. // Бюл. экспер. биол. — 1983. — № 9. — С. 8—11.
3. Виноградов В. М., Пастушков Л. В. // Труды Воен.-мед. акад. им. С. М. Кирова. — 1968. — Т. 178. — С. 98—102.
4. Долгих В. Т. // Пат. физиол. — 1984. — № 1. — С. 45—50.
5. Долгих В. Т. // Там же. — 1985. — № 1. — С. 18—23.
6. Долгих В. Т., Корпачев В. Г. // Анест. и реаниматол. — 1978. — № 2. — С. 37—44.
7. Ерин А. П., Скрипкин В. И., Прилепко Л. Л., Каган В. Е. // Бюл. экспер. биол. — 1984. — № 5. — С. 572—574.

8. Каган В. Е., Савов В. М., Диденко В. В. и др. // Там же. — 1983. — № 4. — С. 46—48.
9. Ланкин В. З. // Биохимия липидов и их роль в обмене веществ. — М., 1981. — С. 75—95.
10. Лисенков С. П., Корпачев В. Г., Тель Л. З. // Клиника, патогенез и лечение неотложных состояний. — Новосибирск, 1982. — С. 8—13.
11. Меерсон Ф. З. Адаптация сердца к большой нагрузке и сердечная недостаточность. — М., 1975.
12. Меерсон Ф. З. Адаптация, стресс и профилактика. — М., 1981.
13. Меерсон Ф. З., Красиков С. И., Боев В. М., Каган В. Е. // Бюл. экспер. биол. — 1982. — № 7. — С. 17—19.
14. Меерсон Ф. З., Долгих В. Т., Мержинский В. Е. // Там же. — 1983. — № 11. — С. 33—36.
15. Неговский В. А., Гурвич А. М., Золотокрылина Е. С. Постреанимационная болезнь. — М., 1979.
16. Островский В. Ю., Францев В. И., Петровская Э. Л. и др. // Экспер. хир. — 1972. — № 4. — С. 62—64.
17. Скулачев В. П. Аккумуляция энергии в клетке. — М., 1969.
18. Трубина Н. Е., Болякина Г. К., Новодержкина И. С. и др. // Современные проблемы реаниматологии. — М., 1980. — С. 120—127.
19. Хачатрян С. А., Адамян Г. Г., Казарян А. А. // Пат. физиол. — 1979. — № 5. — С. 45—48.
20. Atkinson D. E. // Biochemistry (Wash.). — 1968. — Vol. 7. — P. 4030—4034.

Поступила 27.02.86

PREVENTION OF POSTRESUSCITATION IMPAIRMENTS IN MYOCARDIUM ENERGY METABOLISM BY MEANS OF SODIUM γ -HYDROXYBUTYRATE, IONOL AND GUTIMINE

V. T. Dolgikh

Medical School, Omsk

Long-term impairments of energy metabolisms in myocardium were found in rats after clinical death caused by acute hemorrhage. Bioenergetics of myocardium tended to normalize within a month after resuscitation. Severity of postresuscitation period correlated with the level of deteriorations observed in energy metabolism. Preadministration of γ -aminobutyric acid, ionol and gutimine decreased these impairments as well as the postresuscitation lethality. Considering the final results of resuscitation the efficiency of the drugs studied might be arranged in a following order: γ -aminobutyric acid, ionol, gutimine.

Изменение скорости N-деметилирования амидопирина, р-гидроксилирования анилина и содержания цитохрома P-450 в микросомальной фракции печени крыс в присутствии никотинамида

Показатель	Контроль	Концентрация никотинамида, мМ	
		10	100
N-деметилирование амидопирина, нмоль НСНО/мин/мг <i>p</i>	5,70±0,05	4,65±0,11 (81,58 %) <0,001	2,59±0,12 (45,44 %) <0,001
р-гидроксилирование анилина, нмоль амино-фенола/мин/мг <i>p</i>	0,57±0,01	0,52±0,01 (91,23 %) <0,01	0,38±0,05 (66,67 %) <0,01
Цитохром P-450, нмоль/мг <i>p</i>	0,47±0,01	0,44±0,01 (93,62 %) >0,25	0,27±0,01 (57,45 %) <0,001

Результаты и обсуждение

При инкубации суспензии микросом с никотинамидом в конечной концентрации 10, 50, 100 мМ светосумма «быстрой» вспышки хемоллюминесценции уменьшается в сравнении с контролем соответственно на 24, 31 и 37 %. В этих условиях при концентрации никотинамида 100 мМ скорость образования конечного продукта ПОЛ — МДА в ферментзависимых реакциях уменьшается на 14 %, а в неферментных — на 36 % (табл. 1).

Одновременно с этим никотинамид в указанной концентрации значительно снижает активность монооксигеназной системы микросом, которая, как известно, наряду с гидроксилирующей функцией выполняет важную роль в процессах перекисного окисления. При этом скорость окислительного демети-

лирования амидопирина уменьшается на 18—55 % и гидроксилирования анилина — на 9—33 %. Содержание цитохрома P-450 (комплекса фермент — СО) снижается на 42 % (табл. 2).

Исследования взаимодействия никотинамида с цитохромом P-450 показали, что это соединение связывается с ферментом, образуя спектрально регистрируемый комплекс с максимумом поглощения при 428—425 нм и минимумом поглощения при 396—395 нм (рис. 1), что подтверждает принадлежность никотинамида к субстратам монооксигеназной системы II типа [14].

Результаты наших исследований подтверждают данные о том, что способность никотинамида тормозить окисление липидов в микросомах обусловлена

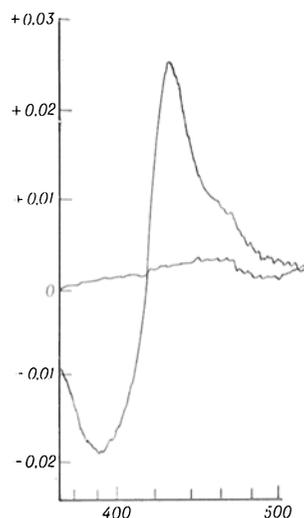


Рис. 1. Дифференциальный спектр связывания цитохрома P-450 с никотинамидом.

По оси абсцисс — длина волны (в нм), по оси ординат — оптическая плотность.

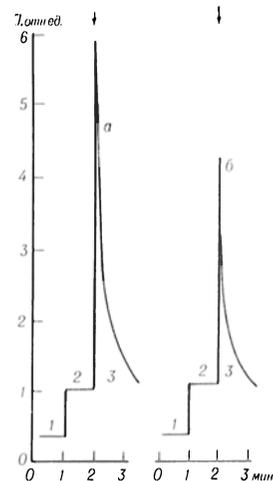


Рис. 2. Изменение интенсивности хемоллюминесценции 0,14 % спиртового раствора окисленной олеиновой кислоты (а) в присутствии 100 мМ никотинамида (б).

1 — темновой ток, 2 — спонтанная хемоллюминесценция, 3 — «быстрая» вспышка. Стрелками обозначено введение FeSO_4 (100 мкМ).

Таблица 3

Изменение светосуммы (S) и амплитуды (A) «быстрой» вспышки хемолуминесценции при инкубации никотинамида с плазмой крови и стандартной однофазной системой (0,14% спиртовой раствор окисленной олеиновой кислоты)

Концентрация никотинамида, мМ	Плазма	0,14% раствор окисленной олеиновой кислоты	
	S, тыс. имп/мин	S, тыс. имп/мин	A, отн. ед.
0	1,21±0,3	2,01±0,8	5,4±0,6
5	1,33±0,4	—	—
<i>p</i>	>0,25	—	—
50	0,92±0,1	—	—
<i>p</i>	<0,05	—	—
100	0,82±0,09	1,49±0,6	3,7±0,4
<i>p</i>	<0,05	<0,05	<0,01

взаимодействием его с цитохромом P-450 [2, 3]. Однако связывание цитохрома P-450 никотинамидом, по-видимому, не является единственным механизмом его антиокислительного действия. Об этом свидетельствует хотя бы то, что наряду с угнетением ПОЛ никотинамид тормозит и неферментное перекисление их. Кроме того, никотинамид способен в концентрациях 50 и 100 мМ значительно подавлять хемолуминесценцию не только в микросомальной фракции, но и в плазме крови, а также в растворе окисленной олеиновой кислоты (табл. 3, рис. 2).

На основании этих данных можно предположить, что одним из механизмов антиоксидантного действия никотинамида является его способность непосредственно взаимодействовать с гидроперекисями липидов с образованием в этих реакциях N-оксида никотинамида; образование последнего значительно увеличивается после введения животным никотинамида [9, 10]. Подобно никотинамиду антиоксидантные свойства обнаружены и у его близкого аналога — никомета [1].

ЛИТЕРАТУРА

1. Антипов Н. Г. // Труды Моск. о-ва испытателей природы. Отд. биол. — 1975. — С. 52. — С. 108—110.
2. Арчаков А. И. // Микросомальное окисление. — М., 1975.
3. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М., 1972.

4. Горгошидзе Л. Г., Ковь И. Я., Кулакова С. Н. и др. // Вопр. питания. — 1986. — № 5. — С. 45—50.
5. Карузина И. И., Арчаков А. И. // Современные методы в биохимии. — М., 1977. — С. 49—62.
6. Красновский А. А. // Всесоюзный биохимический съезд: Тезисы симпозиумных докладов. — М., 1986. — Т. 1. — С. 194.
7. Лукиенко П. И., Бушма М. И., Абакумов Г. З. и др. // Всесоюзная конф. «Биоантиоксидант»: Тезисы. — Черноголовка, 1986. — С. 14—15.
8. Сушко Л. И., Абакумов Г. З., Лукиенко П. И. и др. // Вопр. мед. химии. — 1985. — № 4. — С. 108—111.
9. Chaykin S., Dagani M., Johnson L. et al. // J. biol. Chem. — 1965. — Vol. 240, N 2. — P. 932—938.
10. Cowan D., Damani L., Corrod J. // Biomed. Mass Spectrometry. — 1978. — Vol. 5, N 9. — P. 551—556.
11. Crary E., McCarty M. // Med. Hypothes. — 1984. — Vol. 13, N 3. — P. 77—98.
12. Harada N., Takahashi Y. // Agricult. biol. Chem. — 1982. — Vol. 46, N 11. — P. 2645—2658.
13. Kato R., Gillette J. // J. Pharmacol. exp. Ther. — 1965. — Vol. 150. — P. 279—284.
14. Kato R., Takanaka A., Takahashi A. // J. Biochem. (Tokyo). — 1970. — Vol. 68. — P. 613—623.
15. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
16. Nasch T. // Biochem. J. — 1963. — Vol. 55. — P. 416—421.
17. Omura T., Sato R. // J. biol. Chem. — 1964. — Vol. 239. — P. 2370—2378.
18. Poli G., Biasi F., Canuto R. et al. // Biochem. Pharmacol. — 1985. — Vol. 34, N 3. — P. 443—444.

Поступила 22.07.86

EFFECT OF NICOTINAMIDE ON LIPID PEROXIDATION

G. Z. Abakumov, M. I. Bushma, P. I. Lukienko, L. F. Legon'kova, A. S. Schurinov

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

Nicotinamide (10-100 mM) caused a decrease in total "fast" flash of chemoluminescence, in rates of NADPH- and ascorbate dependent lipid peroxidation in microsomal fraction of rat liver tissue. Content of cytochrome P-450 (carboxyl complex) as well as rates of amidopyrime N-demethylation and aniline p-hydroxylation were also decreased in microsomal fraction. At the same time, inhibition of chemoluminescence was found after addition of 50, 100 mM nicotinamide to blood plasma or to solution of oxidized oleic acid. With an increase in nicotinamide concentration its inhibitory effect on lipid peroxidation was more distinct.

И. Д. Мансурова, У. К. Султанова

ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЫСШИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ТКАНИ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Отдел охраны и рационального использования природных ресурсов АН Таджикской ССР, Душанбе

В последние годы все большее значение придается алкоголю, как фактору, ведущему к развитию целого ряда заболеваний печени, которая имеет прямое отношение к взаимопревращениям ненасыщенных жирных кислот. Экспериментальные данные указывают на несомненное значение полненовых кислот для нормальной деятельности печени [3, 8, 13, 14, 16]. В связи с этим целью наших исследований было изучение влияния этанола на содержание высших жирных кислот в ткани печени крыс при хронической алкогольной интоксикации.

Методика

Работа выполнена на белых крысах-самцах массой 160—200 или 250—300 г, содержавшихся на обычной лабораторной диете. Исследовали гомогенаты ткани печени. При хроническом эксперименте определяли изменения содержания высших жирных кислот (ВЖК) в печени под влиянием 40 % этанола, который

вводили в течение 30, 90 и 180 дней 3 раза в неделю из расчета 0,7 мл на 100 г массы тела интрагастрально с помощью тонкого металлического зонда.

Гидролиз и метилирование ткани проводили по методу [6]. Разделение метиловых эфиров жирных кислот проводили на газовом хроматографе «Цвет-1066» с пламенно-ионизационным детектором. Стеклоянная колонка длиной 3 м и диаметром 3 мм была заполнена хроматоном N—AW—DMC (0,160—0,200 мм); температура испарителя 250 °С, температура колонки программатора от 125 до 270 °С с градиентом температуры 3 °С в минуту. Скорость подачи ленты самонисца 240 мм/ч, чувствительность усилителя $50 \cdot 10^{-10}$ А°. Газ-носитель — азот, расход азота и водорода 2 л/ч, воздуха 20 л/ч.

Для идентификации метиловых эфиров жирных кислот использовали чистые стандартные смеси жирных кислот (пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, линолевой, линоленовой и арахидоновой), пики идентифицировали по времени удерживания в сравнении со свидетелями и данными литературы [1]. Количественно хроматограммы оценивали путем измерения площадей пиков [5]. Статистическую обработку результатов выполняли методами [9, 11].

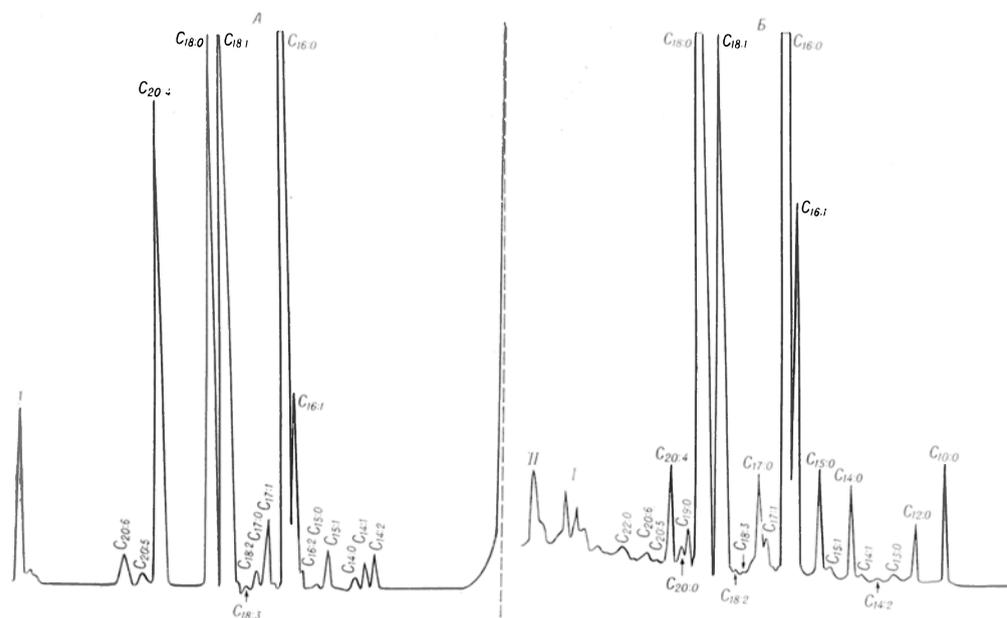


Рис. 1. Хроматограмма метиловых эфиров ВЖК в печени крыс.

А — контрольные животные, которым в течение 6 мес вводили воду; Б — подопытные животные, которым в течение 6 мес вводили 40 % этанол. I — стероиды; II — холестерин.

Таблица 1

Процентное содержание ВЖК в ткани печени крыс при хроническом введении этанола ($n = 12$; $\bar{X} \pm m$)

Название кислоты	Кодовое обозначение	30 дней		90 дней		180 дней	
		контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
Каприновая	C _{10:0}	Следы	0,40 ± 0,02	0,41 ± 0,02	0,56 ± 0,02	0,60 ± 0,03	0,82 ± 0,05
Лауриновая	C _{12:0}	0,30 ± 0,02	0,60 ± 0,03	0,40 ± 0,03	0,80 ± 0,05	0,53 ± 0,02	0,97 ± 0,09
Миристиновая	C _{14:0}	0,60 ± 0,03	0,79 ± 0,03	0,65 ± 0,06	0,95 ± 0,06	0,78 ± 0,06	1,16 ± 0,11
Миристолеиновая	C _{14:1}	2,02 ± 0,09	1,68 ± 0,05	2,90 ± 0,12	1,18 ± 0,07	2,76 ± 0,09	0,86 ± 0,07
Тетрадекадиеновая	C _{14:2}	0,65 ± 0,04	0,42 ± 0,03	0,59 ± 0,02	0,29 ± 0,01	0,50 ± 0,03	Следы
Пентадекановая	C _{15:0}	0,70 ± 0,03	0,84 ± 0,05	0,75 ± 0,05	0,93 ± 0,08	0,85 ± 0,07	1,18 ± 0,10
Пентадеценовая	C _{15:1}	2,10 ± 0,13	1,80 ± 0,09	1,60 ± 0,08	2,54 ± 0,13	0,84 ± 0,09	0,65 ± 0,03
Пальмитиновая	C _{16:0}	21,00 ± 0,36	26,04 ± 1,1	22,23 ± 1,2	29,63 ± 1,3	23,20 ± 0,92	33,55 ± 1,2
Пальмитоолеиновая	C _{16:1}	6,30 ± 0,15	7,20 ± 0,23	5,70 ± 0,13	12,43 ± 0,30	4,95 ± 0,12	7,35 ± 0,24
Гексадекадиеновая	C _{16:2}	0,55 ± 0,07	0,38 ± 0,02	0,46 ± 0,02	0,27 ± 0,01	0,34 ± 0,02	Следы
Маргаритовая	C _{17:0}	0,60 ± 0,05	1,56 ± 0,07	0,70 ± 0,06	2,15 ± 0,15	0,75 ± 0,06	2,97 ± 0,14
Гептадеценовая	C _{17:1}	0,93 ± 0,07	0,73 ± 0,04	0,87 ± 0,04	2,62 ± 0,18	0,79 ± 0,08	0,37 ± 0,02
Стеариновая	C _{18:0}	12,10 ± 0,39	19,59 ± 1,0	12,32 ± 0,56	20,60 ± 1,3	14,00 ± 0,42	22,38 ± 1,1
Олеиновая	C _{18:1}	23,54 ± 0,72	17,40 ± 0,83	22,80 ± 1,3	14,43 ± 0,76	21,70 ± 1,2	12,05 ± 0,92
Линолевая	C _{18:2}	8,93 ± 0,15	5,70 ± 0,20	8,16 ± 0,12	3,26 ± 0,19	7,27 ± 0,16	1,45 ± 0,09
Линоленовая	C _{18:3}	3,75 ± 0,09	2,50 ± 0,18	3,10 ± 0,15	1,24 ± 0,10	2,89 ± 0,14	0,58 ± 0,06
Нонадекановая	C _{19:0}	—	0,35 ± 0,03	—	0,52 ± 0,03	—	0,67 ± 0,05
Арахидиновая	C _{20:0}	—	1,08 ± 0,12	—	1,17 ± 0,08	—	1,48 ± 0,10
Эйкозеновая	C _{20:1}	—	0,54 ± 0,09	—	0,60 ± 0,05	—	0,72 ± 0,08
Арахидоновая	C _{20:4}	14,60 ± 0,56	9,73 ± 0,46	14,06 ± 0,45	7,56 ± 0,28	13,10 ± 0,35	6,0 ± 0,40
Эйкозапентаеновая	C _{20:5}	0,92 ± 0,07	0,78 ± 0,08	2,30 ± 0,07	0,50 ± 0,03	1,85 ± 0,06	0,27 ± 0,02
Эйкозагексаеновая	C _{20:6}	Следы	Следы	—	—	1,44 ± 0,05	0,19 ± 0,01
Бегеновая	C _{22:0}	→	0,52 ± 0,04	—	0,70 ± 0,08	—	0,89 ± 0,07
Σ насыщенных		35,25 ± 0,78	51,77 ± 2,49	37,46 ± 1,98	58,01 ± 3,15	40,71 ± 1,58	66,07 ± 3,01
Σ мононенасыщенных		34,89 ± 1,16	29,35 ± 1,33	33,87 ± 1,67	33,80 ± 1,49	31,01 ± 1,58	22,0 ± 1,36
Σ полиненасыщенных		29,40 ± 1,35	19,51 ± 0,97	28,67 ± 1,98	13,12 ± 0,62	27,32 ± 0,81	8,49 ± 0,58

Результаты и обсуждение

Нами идентифицировано 20 жирных кислот у контрольных крыс и 23 у подопытных (рис. 1).

При хроническом введении 40 % этанола заметно изменялся спектр жирных кислот в ткани печени крыс (табл. 1). На 30-й день опыта наблюдали по сравнению с контролем увеличение суммы насыщенных жирных кислот с 35,25 ± 0,78 до 51,77 ± 2,49 % и уменьшение суммы ненасыщенных жирных кислот с 64,29 ± 2,51 до 48,86 ± ± 2,30 % ($p < 0,001$). Из числа насыщенных жирных кислот на 30-й день опыта нарастало содержание в основном пальмитиновой (C_{16:0}) — с 21,00 ± ± 0,36 до 26,04 ± 1,1 % и стеариновой (C_{18:0}) кислоты с 12,10 ± 0,39 до 19,59 ± 1,0 %. Из числа ненасыщенных жирных кислот уменьшалось содержание олеиновой (C_{18:0}) с 23,54 ± 0,72 до 17,40 ± 0,83 %, линолевой (C_{18:2}) с 8,93 ± 0,15 до 5,70 ± 0,20 % и арахидиновой кислот с 14,60 ± 0,56 до 9,73 % ($p < 0,01$, $p < 0,001$). Хотя пальмитоолеиновая кислота относится к моно-

ненасыщенным жирным кислотам, ее содержание при хронической интоксикации этанолом несколько нарастало; одновременно обнаруживали такие жирные кислоты, как каприновая, нонадекановая, арахидиновая, эйкозеновая и бегеновая, которых не удавалось обнаружить в печени контрольных животных.

На 90-й день опыта нарастала сумма насыщенных жирных кислот — с 37,46 ± 1,98 до 58,01 ± 3,15 % и уменьшалась сумма ненасыщенных жирных кислот — с 62,54 ± 3,65 до 46,92 ± ± 2,11 % ($p < 0,01$, $p < 0,001$). Содержание пальмитоолеиновой кислоты достоверно возрастало с 5,70 ± 0,13 до 12,43 ± 0,30 % ($p < 0,001$).

Если после 30 дней алкогольной интоксикации содержание таких мононенасыщенных жирных кислот, как пентадеценовая и гептадеценовая, снижалось, то к 90-му дню опыта содержание этих кислот в печени резко возрастало — с 1,60 ± 0,08 до 2,54 ± 0,13 % и 0,87 ± 0,04 до 2,62 ± 0,18 % соответственно ($p < 0,001$, $p < 0,01$). После 6 мес алкогольной интоксикации со-

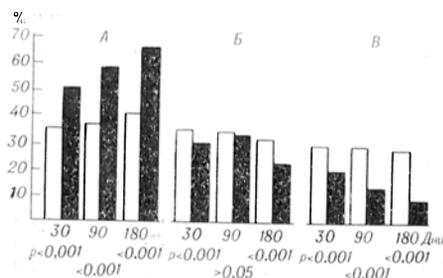


Рис. 2. Изменение содержания ВЖК в ткани печени крыс при хроническом введении этанола.

Светлые столбики — контроль ($\bar{X} \pm m$), темные — опыт ($\bar{X} \pm m$). А — насыщенные, Б — мононенасыщенные, В — полиненасыщенные жирные кислоты.

держанье этих жирных кислот снижалось незначительно.

К 180-му дню опыта в печени крыс нарастало содержание насыщенных жирных кислот с $40,71 \pm 1,58$ до $66,07 \pm 3,01$ % и снижалось содержание ненасыщенных жирных кислот с $58,33 \pm 2,39$ до $30,49 \pm 1,94$ % ($p < 0,001$).

При хроническом введении 40 % этанола в ткани печени крыс наблюдали увеличение содержания насыщенных и уменьшение содержания моно- и полиненасыщенных жирных кислот (рис. 2). Уровень мононенасыщенных кислот возрастал за счет увеличения содержания пентадециновой ($C_{15:1}$), пальмитоолеиновой ($C_{16:1}$) и гептадециновой ($C_{17:1}$) кислот. Возрастание мононенасыщенных и одновременно снижение концентрации полиненасыщенных жирных кислот рассматривают как компенсаторное явление [2].

Изменения в относительном составе жирных кислот ткани печени контрольных и подопытных групп крыс более четко обнаруживаются при использовании следующих показателей: $C_{18:1}/C_{18:2}$ (K_1), сумма насыщенных жирных

кислот + сумма мононенасыщенных жирных кислот/сумма полиненасыщенных жирных кислот (K_2), сумма насыщенных кислот/сумма полиненасыщенных кислот (K_3) и сумма насыщенных жирных кислот/сумма ненасыщенных жирных кислот (K_4) [4].

При экспериментальной алкогольной нитоксикации в течение 6 мес заметно изменяется жирнокислотный состав, судя по относительным показателям контрольных и подопытных групп животных.

По данным литературы [10], под влиянием этанола в печени крыс усилен биосинтез $C_{16:0}$ жирной кислоты, а биосинтез $C_{18:1}$ и $C_{18:2}$ жирных кислот снижен. Относительное количество их уменьшено. По-видимому, усиление синтеза ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав фосфолипидов, свидетельствует об ингибировании процессов элонгации и десатурации жирных кислот под влиянием этанола (табл. 2).

Было установлено [7, 12], что под влиянием этанола в печени крыс повышается уровень $C_{16:0}$ и $C_{16:1}$ жирных кислот и снижается содержание $C_{18:1}$. Предполагают, что эти изменения могут быть обусловлены особенностями катаболизма двууглеродных соединений в организме подопытных крыс, в результате чего уменьшается их использование в реакциях удлинения цепи жирных кислот. Считают, что этанол вызывает усиленный синтез жирных кислот из эндо- и экзогенного ацетата [15].

Результаты наших исследований показали, что содержание насыщенных жирных кислот возрастает под влиянием этанола, а полиненасыщенных — снижается, что может привести к развитию алкогольного цирроза печени.

Таблица 2

Относительные показатели содержания ВЖК в ткани печени крыс при хроническом введении этанола ($\bar{X} \pm m$)

Относительный показатель	30 дней		90 дней		180 дней	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
K_1	$2,38 \pm 0,25$	$3,05 \pm 0,26$	$2,63 \pm 0,28$	$4,43 \pm 0,38$	$2,51 \pm 0,26$	$8,31 \pm 0,72$
K_2	$2,39 \pm 0,25$	$4,16 \pm 0,32$	$2,49 \pm 0,26$	$6,99 \pm 0,61$	$2,62 \pm 0,28$	$10,37 \pm 0,90$
K_3	$1,20 \pm 0,13$	$2,65 \pm 0,23$	$1,31 \pm 0,14$	$4,42 \pm 0,38$	$1,49 \pm 0,16$	$7,78 \pm 0,68$
K_4	$0,55 \pm 0,06$	$1,05 \pm 0,09$	$0,60 \pm 0,06$	$1,24 \pm 0,11$	$0,70 \pm 0,07$	$2,17 \pm 0,19$

Примечание. Различия между контрольными и подопытными группами статистически достоверны ($p < 0,001$).

ЛИТЕРАТУРА

1. Берцифилд Г., Сторрс Э. Газовая хроматография в биохимии: Пер. с англ. — М., 1964.
2. Блюдин Ю. А., Мохов В. М. // Лаб. дело. — 1983. — № 7. — С. 30—33.
3. Карплюк И. А. Гигиена пищевых жиров. — М., 1981. — С. 3—30.
4. Кеда Б. И., Хомяков А. Е. // Лаб. дело. — 1975. — № 2. — С. 87—90.
5. Коган Л. А. Количественная газовая хроматография. — М., 1975.
6. Мансурова И. Д., Султанова У. К. // Лаб. дело. — 1985. — № 9. — С. 524—527.
7. Павления А. К. // Биохимия алкоголизма. — Минск. — 1980. — С. 108.
8. Прохорова М. И., Тушикова З. И. Большой практикум по углеводному и липидному обмену. — Л., 1965.
9. Сепетлиев Д. А. Статистические методы в научных медицинских исследованиях. — М., 1938.
10. Титов В. И., Пицин Д. Г. // Структура, биосинтез и превращение липидов в организме животного и человека. — М., 1978. — С. 142—143.
11. Урбах В. Ю. Математическая статистика для биологов и медиков. — М., 1963.
12. Chanussot F., Karsenty C., Debry G. // *Reprod. Nutr. Dev.* — 1983. — Vol. 23, N 4. — P. 717—725.

13. Di Zuzio N. R. // *Life Sci.* — 1965. — Vol. 4, N 14. — P. 1373—1382.
14. Goldstein D. B., Chein J. H. // *Fed. Proc.* — 1981. — Vol. 40, N 7. — P. 2073—2076.
15. Liber C. // *Lipids.* — 1974. — Vol. 9, N 2. — P. 103—113.
16. Tuma D. J., Sorrell M. F. // *Gastroenterology.* — 1981. — Vol. 80, N 2. — P. 273—279.

Поступила 19.06.86

GASCHROMATOGRAPHIC ESTIMATION OF HIGH FATTY ACIDS IN LIVER TISSUE OF RATS WITH CHRONIC ALCOHOL INTOXICATION

I. D. Mansurova, U. K. Sultanova

Laboratory of Human and Animal Biochemistry, Department of Rational Use of Native Resources, Academy of Sciences of the Tadzhik SSR, Dushanbe

In experimental alcohol intoxication of rats with 40 % ethanol content of higher fatty acids was altered in liver tissue. Content of saturated fatty acids was increased within 30-180 days of experiment, while the content of mono- and polyunsaturated fatty acids was simultaneously decreased.

УДК 616.858-008.6-07:[616.154:577.175.823]-074

М. Х. Каримова, Ш. А. Алеуов

ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ СЕРОТОНИНА В КРОВИ ПРИ ПАРКИНСОНИЗМЕ

ЦОЛИУВ, Москва

Нарушения медиаторного обмена в центральной нервной системе имеют большое значение в патогенезе такого широко распространенного заболевания, как паркинсонизм. Для лечения паркинсонизма используют препараты, направленные на коррекцию дисбаланса медиаторных систем: холинолитики и дофаминсодержащие препараты. Но хронически прогрессирующий характер заболевания, постепенное снижение эффективности препаратов, развитие побочных эффектов вынуждают искать новые пути патогенетической терапии.

Показано, что при паркинсонизме наряду с уменьшением содержания дофамина в базальных ганглиях головного мозга снижается синтез в тканях мозга другого медиатора — серотонина [4], отмечено снижение содержания его метаболита 5-оксиндолюксусной кислоты в цереброспинальной жидкости [5] и моче [1]. Однако введение больным предшественника серотонина триптофана [6], а также инги-

битора триптофангидроксилазы п-хлорфенилаланина [5] не вызвало существенных изменений в состоянии больных. Особенности обмена серотонина при паркинсонизме остаются неизученными. В связи с этим перед нами была поставлена задача изучить содержание серотонина в крови у больных паркинсонизмом в зависимости от клинико-физиологических показателей.

Методика

Содержание серотонина в крови определяли у 81 больного на фоне отмены и через 3—4 нед после назначения препаратов, содержащих L-диоксифенилаланин (ДОФА). Возраст больных варьировал от 36 до 76 лет, длительность заболевания — от 1 года до 15 лет. Клиническое обследование больных проводили на кафедре невропатологии ЦОЛИУВ (зав. — проф. Л. С. Петелин). Среди больных было 60 мужчин и 21 женщина. У 48 из них паркинсонизм был атеросклеротической этиологии, у 28 постэнцефалитической. Акинетико-ригидная форма заболевания констатирована у 25 человек, преимущественно ригидная — у 32, преимущественно дрожательная — у 24.

Содержание серотонина (в нмоль/л) в крови у больных паркинсонизмом и практически здоровых лиц в зависимости от возраста и пола ($X \pm m$)

Показатели	Группа обследованных			
	здоровые	больные паркинсонизмом		
		до лечения	после лечения	прирост. %
В целом по группе	596±5,67 (31)	329±5,67 (81)	403,28±5,66 (81)	22
Возраст, годы:				
до 50	619±5,67 (16)	306,7±11,35 (15)	380,56±17,01 (15)	24
51—60	591±11,35 (9)	318,08±11,36 (26)	386,24±11,36 (26)	21
61 и старше	551±11,36 (6)	352±11,36 (40)	420,32±11,35 (40)	19
Мужчины	602±5,67 (18)	340,8±11,36 (60)	408±11,36 (60)	20
Женщины	591±17,01 (13)	306,72±17,01 (21)	380,56±17,01 (21)	24

Примечание. В скобках — число обследованных.]

В работе использовали статистически достоверные показатели с достоверностью ошибки менее 0,05.

Концентрацию серотонина в крови определяли флюоресцентным методом [3] на спектрофлюорометре «Hitachi».

Одновременно изучали содержание серотонина в крови практически здоровых 18 мужчин и 13 женщин в возрасте от 28 до 65 лет, составивших контрольную группу.

Результаты и их обсуждение

Содержание серотонина в крови лиц контрольной группы соответствовало данным литературы [2, 3].

Концентрация серотонина в крови больных паркинсонизмом была достоверно ниже, чем в контрольной группе. После проведенного в стационаре курса лечения, включавшего L-ДОФА-содержащие препараты, при улучшении состояния большей части больных отмечалось достоверное нарастание концентрации серотонина в крови (см. таблицу). Однако в целом она оставалась ниже уровня в группе практически здоровых лиц. Как видно из таблицы, уровень серотонина в крови больных паркинсонизмом повышался по мере увеличения возраста, тогда как в контрольной группе отмечено снижение содержания серотонина в крови с увеличением возраста обследованных.

Снижение содержания серотонина в крови здоровых лиц с увеличением возраста описано и другими авторами [2, 3]. Таким образом, при паркинсонизме возрастная динамика изменений содержания серотонина в крови отличалась от характерной для контрольной

группы. У больных паркинсонизмом женщин содержание серотонина в крови было ниже, чем у мужчин в отличие от здоровых лиц.

Лечение препаратами L-ДОФА приводило к достоверному увеличению концентрации серотонина в крови. В целом по группе больных прирост составил 22 % по сравнению с содержанием серотонина до приема препаратов. Прирост содержания серотонина в крови был одинаков как у мужчин, так и у женщин. Не выявлено достоверных различий в приросте серотонина под влиянием лечения в зависимости от возраста больных.

При сопоставлении изменения содержания серотонина в крови у больных паркинсонизмом под влиянием L-ДОФА-содержащих препаратов с клиническим состоянием оказалось, что степень нарастания содержания серотонина в крови коррелировала с клиническим состоянием и эффективностью лечения. Так, у больных с хорошим и удовлетворительным результатами лечения прирост содержания серотонина в крови составил 28 и 27 %, у больных с незначительным улучшением и без изменения состояния прирост был равен 20 и 14 % соответственно.

Приведенные результаты свидетельствуют о связи содержания серотонина в крови при паркинсонизме с клиническим состоянием больных и о взаимодействии серотонинергической и дофаминергической медиаторных систем в патогенетических механизмах заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Камбарова Д. К., Илюхина В. А., Матвеев Ю. П., Поздеев В. К. // Лечение паркинсонизма. — М., 1977. — С. 15—27.
2. Маньковский П. В., Кузнецова С. М. // Журн. невропатол. и психиатр. — 1972. — № 9. — С. 1292—1297.
3. Ashcroft G., Crawford T. B., Binns J. K. // Clin. chim. Acta. — 1964. — Vol. 9. — P. 364—367.
4. Chase T. N. // Advanc. Neurol. — 1974. — Vol. 5. — P. 31—39.
5. Coppen A., Metcalfe M., Carroll J. D., Morris J. G. // Lancet. — 1972. — Vol. 1. — P. 654—658.
6. Jenner P., Sheehy M., Marsden C. D. // Brit. J. clin. Pharmacol. — 1983. — Vol. 15. — P. 277S—289S.

Поступила 03.12.86

ALTERATIONS OF SEROTONIN CONTENT IN BLOOD OF PATIENTS WITH PARKINSONISM

M. Kh. Karimova, Sh. A. Aleuov

Central Institute for Postgraduate Training of Physicians, Moscow

Content of serotonin was studied in blood of 81 patient with parkinsonism and of 31 practically healthy person. Content of serotonin was distinctly decreased in blood of the patients with parkinsonism. With ageing concentration of the amine was increased in blood of the patients and decreased in control group.

УДК 616.899-053.2-06:616.89-008.481-07:616.634:[577.175.82+577.175.52]

Н. Ф. Турова, Э. Ю. Мисионжник, Л. А. Ермолина, А. В. Азявчик,
В. А. Красов

ЭКСКРЕЦИЯ МОНОАМИНОВ, ИХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ И МЕТАБОЛИТОВ ПРИ ГИПЕРАКТИВНОМ СИНДРОМЕ У ДЕТЕЙ С ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

Московский НИИ психиатрии Минздрава РСФСР, Москва

Гиперактивный синдром (ГАС) часто встречается в структуре осложненных форм умственной отсталости и состояний пограничной интеллектуальной недостаточности [3]. Однако метаболические изменения в организме детей с этим синдромом изучены недостаточно, что затрудняет проведение адекватной терапии. Данные литературы, посвященной исследованию патогенеза этого синдрома, противоречивы: одни исследователи ведущую роль отводят нарушениям обмена норадреналина [12, 13, 17], другие — серотонина [10], третьи связывают ГАС с дефицитом дофамина в рецепторах ЦНС [9]. Очевидно, не всегда учитывают клинический полиморфизм синдрома. Можно полагать, что изменения метаболизма при ГАС во многом могут зависеть от включения в его структуру эмоционального компонента.

В задачу работы входило исследование различных звеньев цепи биосинтеза и катаболизма биогенных аминов (катехоламинов и серотонина) с целью выявления их зависимости от клинических вариантов ГАС и результатов проводимого лечения.

Методика

В группу обследуемых включен 21 ребенок 7—11 лет с ГАС (преобладали мальчи-

ки). У 6 детей диагностирована пограничная интеллектуальная недостаточность, у остальных — олигофрения в степени дебильности. По данным анамнеза, почти у всех детей отмечена перинатальная патология (токсикоз беременности матери, родовая асфиксия, недоношенность). Более чем у половины детей наблюдалась гидроцефалия, у части — резидуальная органическая микросимптоматика. 14 детей получали сиднокарб[N-фенилкарбамил-3(β-фенилизопропил)сиднонимин] в дозе 40 мг на протяжении 1 мес, 7 человек — соннапакс {хлористоводородный 2-метил-тио-10-[2-(1-метил-2-пиперидилэтил)-фенотиазин]} в дозе 30 мг, курс лечения тот же. Обследование проводили в динамике: до лечения (фон), в процессе лечения (через 2 нед от начала — пик лечения) и через 2—3 дня после отмены препаратов. Для учета возможных индивидуальных колебаний каждого ребенка в динамике лечения и до назначения препаратов обследовали трижды. В суточной моче исследовали содержание тирозина [14], катехоламинов: адреналина и норадреналина (НА), а также их предшественников: ДОФА (Д), дофамина (ДА) и продуктов их катаболизма — гомованилиновой (ГВК) и ванилилминдальной (ВМК) кислот [5, 7]; конечного продукта обмена серотонина — 5-оксиндолюксусной кислоты (5-ОИУК) [10] и конечного продукта обмена триптофана по кинурениновому пути N₁-метилникотинамида (МНА) [2]. В сыворотке крови исследовали активность аминоксидазы (АО) [1]. Психопатологические исследования обнаружили у детей снижение внимания, памяти, истощаемость.

Клинически было выявлено 4 варианта ГАС.

1. Простой вариант (9 человек). У этих детей отмечен синдром общей двигательной расторможенности, неусидчивость, обилие лиш-

Экскреция моноаминов, их предшественников и метаболитов при различных вариантах ГАС ($M \pm m$)

Вариант ГАС	НА	Д	ДА	ВМК	МНА	Отношение МНА/5-ОИУК
	нмоль/сут			мкмоль/сут		
Вся группа ($n=59-63$)	$20,68 \pm 1,53^*$	$73,87 \pm 4,06$	$266,0 \pm 24,93$	$6,54 \pm 0,50^*$	$39,69 \pm 7,20$	1,55
Простой ($n=27$) Антидисциплинар- ный ($n=12$) Гипертимный ($n=18$) Аффективный ($n=6$)	$23,58 \pm 3,49$	$78,43 \pm 7,55$	$266,94 \pm 42,44$	$5,58 \pm 0,70$	$47,18 \pm 12,20$	2,30
	$22,99 \pm 4,08$	$64,34 \pm 11,64$	$169,51 \pm 33,92^*$	$8,15 \pm 1,51^*$	$23,59 \pm 1,98^*$	0,75
	$21,16 \pm 2,60^*$	$88,93 \pm 8,32$	$322,49 \pm 91,18$	$7,45 \pm 1,31^*$	$50,20 \pm 10,80$	1,96
	$9,63 \pm 3,13^*$	$70,07 \pm 12,02$	$191,09 \pm 35,23^*$	$7,04 \pm 1,36^*$	$107,82 \pm 22,56^*$	3,27
Контроль ($n=36$)	$29,55 \pm 3,31$	$80,16 \pm 6,03$	$352,27 \pm 50,51$	$4,13 \pm 0,45$	$56,67 \pm 7,42$	2,12

Примечание. Здесь и в табл. 2: n —число обследований; звездочка—достоверность по отношению к контролю ($p < 0,05$).

них движений, недостаточную целенаправленность, нарушение концентрации активного внимания. Дети беспрерывно прыгают, бегают, то ненадолго садятся, задают много вопросов, часто не слушают ответы на них.

2. Антидисциплинарный вариант (4 человека). Наряду с симптомами простого варианта имеют место конфликтность, нарушение режима детских учреждений, драчливость, несдержанность, демонстративность, неспособность к планомерной деятельности, легкость возникновения реакций отказа, протеста.

3. Вариант с аффективной возбудимостью (2 человека). Наряду с симптомами простого варианта наблюдаются импульсивность поступков, агрессивность, негативизм, раздражительность, взрывчатость; постоянно отмечаются нарушения школьной адаптации, любые запреты вызывают бурные реакции протеста, аффект характеризуется кратковременностью.

4. Вариант с гипертимными проявлениями (6 человек). Наряду с симптомами простого варианта отмечаются повышенное самочувствие, приподнятое настроение, усиленное стремление к деятельности, болтливость, склонность к озорству, к легкой аффективной возбудимости, смеливость, общительность, непоседливость. Дети не доводят до конца начатое дело, не выносят ограничений, легко нарушают режим, дисциплину.

Из 14 детей, получавших сиднокарб, улучшение отмечено у 10, что проявлялось в упорядоченности поведения и повышении успеваемости. При лечении соннаксом улучшение отмечено у всех 7 детей.

Контрольную группу составили 12 детей с олигофренией в степени дебильности, у которых не выявлено каких-либо особенностей: дети были спокойны, дисциплинированы.

Результаты и обсуждение

Среди перечисленных выше биохимических показателей достоверные изменения по обследуемым группам были обнаружены лишь в экскреции ДА, НА, ВМК, МНА. Экскреция ДОФА и тирозина изменялась лишь под влия-

нием проводимого лечения. Изменений в экскреции 5-ОИУК и ГВК обнаружено не было.

Если при простом варианте ГАС особых отклонений указанных компонентов от контрольных значений не наблюдалось, то у детей с антидисциплинарными проявлениями обнаружены высокая экскреция ВМК и низкая ДА и МНА. При гипертимном варианте отмечалось снижение экскреции НА при повышении экскреции ВМК. У детей с аффективной возбудимостью низкая экскреция НА при высокой экскреции ВМК (в 2 раза выше контрольных значений) сочеталась с пониженным выделением ДА. Достоверных изменений в экскреции 5-ОИУК не отмечено ни при одном из вариантов.

Таким образом, в зависимости от исследуемого варианта ГАС можно наблюдать изменения в экскреции ДА и НА. Обращает на себя внимание разнонаправленность изменений экскреции МНА при антидисциплинарном варианте (снижение в 2 раза) и варианте с аффективной возбудимостью (повышение в 2 раза против контрольных величин), что может свидетельствовать о различиях в нарушениях обмена триптофана по кинурениновому пути при указанных вариантах ГАС. Об этом может свидетельствовать также изменение отношения МНА к 5-ОИУК, которое в случае антидисциплинарного варианта минимально, а при аффективной возбудимости — максимально (табл. 1).

Кинуренины рассматриваются как модуляторы эмоциональных состояний [4]. Отмечена тесная взаимосвязь

Изменение экскреции моноаминов, их предшественников и метаболитов под влиянием лечения ($M \pm m$)

Группа больных	НА	Д	ДА	ВМК	МНА	Тирозин
	нмоль/сут			мкмоль/сут		
Леченные сиднокарбом ($n=30-41$):						
фон	$21,69 \pm 1,77^*$	$73,01 \pm 5,02$	$228,29 \pm 19,35^*$	$6,59 \pm 0,70^*$	$54,83 \pm 7,79$	$19,31 \pm 2,5$
пик	$27,36 \pm 2,42$	$89,78 \pm 7,09$	$349,52 \pm 47,69$	$8,75 \pm 0,96^*$	$35,13 \pm 3,67$	$12,58 \pm 1,10^*$
отмена	$29,85 \pm 3,01^{**}$	$113,42 \pm 9,13^{**}$	$451,59 \pm 49,20^{**}$	$8,96 \pm 1,06^*$	$38,66 \pm 3,16$	$15,61 \pm 1,60^*$
Леченные соннаксом ($n=18-21$):						
фон	$27,78 \pm 4,73$	$67,94 \pm 8,11$	$287,33 \pm 37,39$	$6,89 \pm 0,86^*$	$24,69 \pm 1,91^*$	$19,86 \pm 2,54$
пик	$22,57 \pm 2,96$	$68,45 \pm 5,07$	$255,84 \pm 37,39$	$9,06 \pm 1,81^*$	$53,14 \pm 12,49^*$	$14,35 \pm 1,60^*$
отмена	$32,27 \pm 4,14$	$67,94 \pm 6,59$	$397,54 \pm 60,35$	$11,39 \pm 2,26^*$	$42,63 \pm 5,14$	$13,24 \pm 1,65^*$

** Достоверность по отношению к показателям фона ($p < 0,05$).

между катаболизмом биогенных аминов мозга и кинуренинами, образуемыми в печени. В частности, кинуренину отводится роль регулятора катаболизма серотонина в мозге и уровня триптофана в плазме крови [11]. Можно также полагать, что при аффективной возбудимости имеет место усиление метаболических процессов, связанных с повышенным использованием никотинамида. В случае антидисциплинарного варианта можно предположить «утечку» триптофана в сторону других видов обмена, в частности в сторону образования глутаминной кислоты, поскольку ранее у детей с интеллектуальной недостаточностью нами отмечалась ее высокая концентрация в сыворотке крови [8].

В общей группе детей с ГАС наблюдалось повышение экскреции ВМК и снижение НА, что находится в соответствии с данными [12], свидетельствующими о снижении экскреции центрального продукта метаболизма НА — метоксифенилэтилгликола у детей с ГАС. Снижение экскреции НА в наших наблюдениях, очевидно, связано с повышением его катаболизма, о чем может свидетельствовать повышенная экскреция ВМК (см. табл. 1). Обращает на себя также внимание повышение активности АО сыворотки (в контроле $8,7 \pm 0,84$ нмоль бензальдегида на 1 мл в 1 ч при 37°C , у детей с ГАС $12,49 \pm 0,76$ нмоль/мл/ч; $p < 0,05$); хотя в норме этот фермент не участвует в катаболизме НА, при патологии нельзя исключить возможность изменения его субстратной специфичности.

Учет клинических вариантов ГАС, как показано выше, позволяет выявить более широкий спектр изменений в экскреции биогенных аминов и их предшественников. Полученные результаты свидетельствуют в пользу изменения обмена не только катехоламинов (ДА и НА), но и, очевидно, предшественников МНА — кинуренинов в зависимости от рассматриваемого клинического варианта ГАС.

У детей, получавших сиднокарб, в основном была диагностирована олигофрения в степени дебильности. Клинические варианты ГАС были следующие: у 5 антидисциплинарный вариант, у 3 гипертимный, у 6 простой. Из табл. 2 видно, что в целом по группе под влиянием сиднокарба экскреция НА повышается до уровня контрольных значений, при этом возрастает экскреция его предшественников — Д и ДА, в то время как экскреция тирозина, являющегося источником биосинтеза последних, снижается (в контрольной группе она равнялась $20,47 \pm 1,65$ мкмоль/сут). Это дает основание считать, что сиднокарб наряду с возможным влиянием его на системы синаптического захвата НА [6] усиливает биосинтез ДА из тирозина. В пользу этого свидетельствуют и результаты экспериментов по исчезновению стимулирующего действия препарата при угнетении синтеза КА с помощью α -метил-пара-тирозина [16]. Лечение сопровождалось также некоторым снижением экскреции МНА: изменений экскреции ВМК не отмечено. Таким образом, нормализация обмена НА под

влиянием сиднокарба совпадает с клиническим улучшением, что может явиться косвенным свидетельством того, что нарушение поведения у детей с ГАС связано с изменением метаболизма НА.

Лечение сонাপаксом (3 ребенка с антидисциплинарным вариантом, 3 с гипертимным, 1 с простым) приводило к повышению экскреции МНА и некоторому снижению выведения тирозина. Клинический эффект в этой группе совпал с повышением экскреции МНА до контрольных значений. Учитывая, что около 50 % этой группы было представлено детьми с антидисциплинарными проявлениями, можно полагать, что нарушения обмена предшественников МНА определенным образом включаются в патогенез указанных состояний.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о необходимости учета клинических вариантов ГАС при исследовании обменных процессов, которые изменяются неоднородно в зависимости от включения аффективного компонента. Лечение сиднокарбом оказывает определенное положительное влияние на клиническую картину и обмен НА, что указывает на возможную роль нарушений последнего в патогенезе некоторых вариантов ГАС. В связи с тем, что предшественником биосинтеза МНА является кинуренин, проведенное предварительное исследование указывает на необходимость более углубленного изучения его обмена при антидисциплинарном варианте и при варианте ГАС с аффективной возбудимостью.

Очевидна также необходимость учета клинических вариантов ГАС при назначении лекарственной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балаклеевский А. И. // *Здравоохранение Белоруссии*. — 1976. — № 6. — С. 74—75.
2. Биохимические исследования в клинике / Под ред. Покровского А. А. — М., 1969.
3. Ковалев В. В. Семiotика и диагностика психических заболеваний у детей и подростков. — М., 1985.
4. Лапин И. П. // *Журн. всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева*. — 1976. — Т. 21. — № 2. — С. 151—157.
5. Матлина Э. Ш., Киселева З. М., Софиева Н. Э. // *Методы исследования некоторых гормонов и медиаторов*. — М., 1985. — С. 25—32.
6. Машковский М. Д. // *Общество венгерских фармакологов: Симпозиум о результатах применения препарата сиднокарб*. Научн. заседание экспериментальной секции. Доклады. — Вышеград. — 1973. — С. 5—11.
7. Меньшиков В. В., Большакова Т. Д. // *Методы исследования некоторых гормонов и медиаторов*. — М., 1965. — С. 49—55.
8. Турова Н. Ф., Ермолина Л. А., Барышиков В. А. // *Журн. невропатол. и психиатр.* — 1986. — № 3. — С. 372—375.
9. Arnold L. E., Kirilouk V., Corson S. A. et al. // *Amer. J. Psychiat.* — 1973. — Vol. 130. — P. 165—170.
10. Coleman M. // *J. Pediat.* — 1971. — Vol. 78, N 6. — P. 985—990.
11. Otsuka H., Yokomine R., Shibata J. // *Monoamine Oxidase, Basic and Clinical Frontiers*. — Amsterdam. — 1982. — P. 267—268.
12. Shekim W. O., Savid J., Davis J. M., Bylund D. B. // *Biol. Psychiat.* — 1983. — Vol. 18, N 6. — P. 707—714.
13. Shen Yu-Cun, Wang Yu-Feng // *Ibid.* — 1984. — Vol. 19, N 6. — P. 861—869.
14. Udenfriend S., Cooper J. R. // *J. Biol. Chem.* — 1952. — Vol. 196. — P. 226—234.
15. Udenfriend S., Elwood T., Welsbach H. // *Ibid.* — 1955. — Vol. 216. — P. 499—505.
16. Weisman et al. — Цит. по Машковскому М. Д.
17. Wender P. H., Epstein K. S., Kopin J. I., Gordon E. K. // *Amer. J. Psychiat.* — 1971. — Vol. 127. — P. 1411—1415.

Поступила 03.12.86

EXCRETION OF MONOAMINES, THEIR PRECURSORS AND METABOLITES IN HYPERACTIVE SYNDROME OF CHILDREN WITH MENTAL INSUFFICIENCY

N. F. Turova, E. Yu. Misonshnik, L. A. Ermolina, A. V. Azyavchik, V. A. Krasov

Institute of Psychiatry, Ministry of Public Health of the RSFSR, Moscow

Alterations on dynamics of excretion with urine of dopamine, noradrenaline, vanilylmandelic acid and N₁-methyl nicotinamide were detected in 7-11 years old children with mental insufficiency accompanied by effective component of the hyperdynamic syndrome in the course of treatment with sidnocarb and sonapax. Sidnocarb was shown to alter positively the excretion of noradrenaline and sonapax — that of N₁-methyl nicotinamide. Clinical features of the hyperdynamic syndrome should be taken into consideration in prescription of drug therapy.

*В. Е. Рыженков, Р. П. Огурцов, В. В. Трубачева, В. Г. Попов,
В. П. Пузырева, О. В. Ремезова, В. Х. Хавинсон, В. Г. Морозов*

ВЛИЯНИЕ ТИМАЛИНА НА РАЗВИТИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРЛИПИДЕМИИ И АТЕРОСКЛЕРОЗА

Институт экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

Экспериментальные, клинические и эпидемиологические данные указывают на важную роль нарушений обмена липидов и липопротеидов (ЛП) в развитии атеросклероза [см., например, 10, 19]. Показано, что при этом обнаруживаются изменения иммунного гомеостаза в направлении формирования иммунопатологических реакций, способствующих поражению артериальной стенки [9, 33]. Отмечено воздействие атерогенных ЛП на функциональное состояние Т-лимфоцитов; угнетение экспрессии антигенспецифических рецепторов [24], подавление пролиферативной активности лимфоцитов — непосредственное [22, 23] или опосредованное через нарушение супрессорной их функции [5, 26]. В эксперименте отмечено, что тимэктомия усиливает развитие экспериментальной гиперлипидемии [8], а введение веществ, выделенных из тимуса, ослабляет ее [29]. Эти данные свидетельствуют о взаимосвязи Т-системы иммунитета с липидным обменом в организме.

Целью данной работы было изучение влияния тималина — отечественного полипептидного препарата из тимуса [12] — на развитие экспериментальной гиперлипидемии и атеросклероза у кроликов, а также на липидные показатели у крыс с гиперлипидемией. Параллельно исследовали функциональную активность лимфоцитов и степень их сенсбилизации к атерогенным ЛП. Изучено также влияние тималина на свертывание крови и на развитие экспериментального отека (воспаления), вызванного брадикинином.

Методика

Опыты проведены на кроликах-самцах (2,6—3 кг) и крысах-самцах (180—210 г). Гиперлипидемия и атеросклероз вызывали у кроликов путем перорального введения холестерина (ХС) из расчета 0,3 г на 1 кг массы тела в 5 мл подсолнечного масла в течение 3 мес. 14 из 25 кроликов дополнительно получали тималин (0,5 мг/кг внутримышечно) через день в течение 3 мес. Время свертывания крови определяли в капиллярах [17]. Иммуноло-

гические показатели изучены у 8 кроликов, получавших ХС, и у 7 животных, получавших дополнительно тималин, а также у 12 интактных кроликов (обычный лабораторный корм).

В опытах на крысах тималин вводили внутримышечно из расчета 1,5 мг на 1 кг массы тела. Животные получали диету, содержащую 4 % ХС, 25 % подсолнечного масла и 0,12 % метилтиоурацила в течение 2 нед. 10 из 29 крыс этой серии дополнительно вводили тималин. Острое ожирение печени (накопление триглицеридов — ТГ) вызывали у 20 крыс однократным введением этанола (из расчета 10 г на 1 кг массы тела) перорально (50 % раствор); 10 животных предварительно в течение 4 дней вводили тималин. В эксперименте на 24 крысах индуцировали отек (воспаление) задней лапки введением под плантарный апоневроз 0,1 мл 0,01 % раствора брадикинина [4]; 12 животным также в течение 4 дней до инъекции брадикинина вводили тималин. Степень отека определяли онкометрически [14]. Кровь брали у крыс после декапитации, у кроликов — из ушной вены после 18 ч голодания. Для изучения иммунологических показателей кровь вносили в силиконированные пробирки с добавлением гепарина (25 ед на 1 мл крови).

Лимфоциты выделяли в градиенте фикол— верографии [16]. Взвесь лимфоцитов из селезенки крыс получали с помощью стеклянного гомогенизатора Поттера; взвесь ресуспендировали в среде № 199 с добавлением 10 % сыворотки крови теленка. Реакцию бласттрансформации (РБТ) лимфоцитов периферической крови кроликов и спленоцитов крыс при стимуляции фитогемагглютинином-II (ФГА-II) (5 мкг/мл, «Difco», США) исследовали по методу [20]. Клетки культивировали в 96-луночных пластинах (завод «Медполимер», СССР). Пролиферативную активность лимфоцитов оценивали по интенсивности включения H^3 -тимидина и H^3 -уридина в импульсах в 1 мин из расчета на 10^6 клеток. Супрессорную активность лимфоцитов, как спонтанную, так и индуцированную ФГА-II в дозе 15 мкг/мл, исследовали по методу [26]. Степень сенсбилизации лимфоцитов периферической крови кроликов и крыс к ЛПНП, ЛПОНП очень низкой плотности (ЛПНП, ЛПОНП) определяли в тесте угнетения миграции лейкоцитов в пятиканальных плоских капиллярах [2]. Пробы для подсчета радиоактивности в сцинтилляционном счетчике «Marsk» готовили по методу [13].

В сыворотке крови и в печени животных определяли содержание ХС [31] и ТГ [30], в аорте — содержание ХС. Степень атеросклеротического поражения аорты кроликов определяли планметрически [1]. Кроликов забивали способом воздушной эмболии, крыс декапитировали. Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики [3].

Результаты и обсуждение

В опытах на кроликах, получавших ХС, было отмечено, что у 7 из 11 животных содержание ХС в сыворотке крови составляло 1040—2800 мг%, у 4 остальных — 532—795 мг%; содержание ТГ было 257—528 и 104—228 мг% соответственно (табл. 1). Это нашло отражение в содержании ХС в аорте — у 8 из 11 кроликов оно было 11,5—30,8 мг на 1 г ткани (при этом атеросклеротическое поражение аорты составило 10—60%), у 3 животных — менее 10 мг на 1 г ткани (атеросклеротического поражения аорты не обнаружено). Отмеченные различия связаны с разной чувствительностью кроликов к экзогенному ХС, это описано в литературе [11].

Как видно из табл. 1, в группе животных, получавших ХС и дополнительно тималин, были выявлены различия в средних тенденциях к снижению содержания ХС и ТГ в крови, ХС в печени и аорте, а также в степени атеросклеротического поражения аорты. При этом под влиянием тималина увеличилось количество животных с отсутствием поражения аорты. Эти данные позволяют сделать заключение о положительном влиянии тималина на кроликов.

При изучении времени свертывания крови в опытах на кроликах было от-

мечено, что в группе животных, получавших только ХС, оно составляло 4 мин 55 ± 1 мин 7 с; в группе, получавшей ХС и дополнительно тималин, оно увеличивалось до 16 мин 15 ± 3 мин 12 с ($p < 0,001$).

В опытах на крысах, получавших способствующую развитию гиперхолестеринемии диету и дополнительно тималин в течение 2 нед, наблюдали достоверное снижение содержания ХС в печени ($59,5 \pm 1,5$ мг/г в сравнении с $78 \pm 1,7$ мг/г у животных, получавших только указанную диету; $p < 0,001$). Введение тималина уменьшало степень вызываемого брадикинином отека конечности у крыс. Так, через 30 мин после инъекции брадикинина интактным животным объем конечности увеличивается на 70% (с $1,0 \pm 0,02$ до $1,7 \pm 0,04$ мл вытесненной ею жидкости), а в группе, предварительно получавшей тималин в течение 4 дней, — лишь на 43% (с $1,0 \pm 0,02$ до $1,43 \pm 0,03$ мл, $p < 0,01$, по сравнению с животными, получавшими только брадикинин). Полученные результаты указывают на то, что в антиатеросклеротическом действии тималина, кроме снижения свертывания крови, может иметь значение уменьшение проницаемости артериальной стенки для атерогенных ЛП. Последнее отмечается в механизме антиатеросклеротического действия известного препарата пириди-

Таблица 1

Влияние тиаминна на содержание липидов в сыворотке крови, печени и аорте кроликов

№	ХС сыворотки крови, мг %		ХС печени, мг/г		ТГ сыворотки крови, мг %		ТГ печени, мг/г		ХС аорты, мг/г		Индекс атеросклеротического поражения аорты, %	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
1	532	266	13	10	104	86	9,3	3,8	7,8	5,8	0	0
2	640	400	13	10	224	104	10,3	6,0	8,3	6,9	0	0
3	760	665	22	13	224	143	11,1	7,7	9,4	7,5	0	0
4	795	840	27	15	228	143	11,1	7,7	11,5	7,7	10	0
5	1040	840	27	22	257	180	12,0	8,8	13,8	7,8	10	0
6	1080	1000	32	22	286	184	12,9	11,1	14,4	9,3	20	0
7	1460	1330	32	26	296	192	14,3	12,0	16,0	9,7	30	0
8	1480	1590	32	27	352	220	15,7	12,0	16,3	10,0	40	0
9	1600	1730	51	27	400	228	20,4	13,4	17,0	11,2	40	0
10	2640	1760	56	27	432	286	26,8	14,8	17,8	11,2	40	10
11	2800	1840	80	43	528	296	27,7	15,4	30,8	12,9	60	10
12		2130		43		352		22,2		13,4		30
13		2230		46		400		24,0		13,5		30
14		2400		54		455		27,4		14,4		60
	$P < 0,001$		$P < 0,01$		$P < 0,01$		Различия достоверны		$P < 0,01$		$P < 0,01$	

Примечание. Данные обработаны с помощью критерия различий в средних тенденциях для независимых выборок (метод Вилкинсона — Манна — Уитни [6]); I — животные, получавшие ХС, II — животные, получавшие ХС и тималин.

Влияние тималина на РБТ и супрессорную активность лимфоцитов у кроликов

Животные	Время, мес	Активность лимфоцитов в РБТ (имп/мин на 10^6 лимфоцитов) при стимуляции			Супрессорная активность лимфоцитов, %	
		—	ФГА	ЛПОИП	спонтанная	индуцированная ФГА
Контрольные, $n = 12$ (1)		2004,7±93,7	29 443±4 810	1 778±132,4	41,0±8,3	67,5±4,4
Получавшие атерогенную диету, $n = 8$ (2)	1,5	4409,1±274,6	37 885±7 364 $P_{2-1} < 0,05$	34 936±9 683 $P_{2-1} < 0,05$	33,3±5,1	27,9±7,0 $P_{2-1} < 0,05$
	3	5206,3±331,5 $P_{2-1} < 0,01$	27 877±5 368	36 370±8 073 $P_{2-1} < 0,05$	22,8±4,2	38,8±6,7 $P_{2-1} < 0,05$
Получавшие атерогенную диету и тималин, $n = 7$ (3)	1,5	6 345±423,2	51 776±11 019	24 443±1 387	28,2±8,2	65,8±8,9 $P_{3-2} < 0,05$
	3	5 000±515,8	46 578±9 183	8 629±680 $P_{3-2} < 0,001$	27,8±11,7	57,1±12,8 $P_{3-2} < 0,05$

полкарбамата (пармидина), не оказывающего гиполипидемического действия, но снижающего отек лапки у крыс, вызванный брадикинином [4].

В опытах на крысах с однократным введением этанола, вызывавшим через 4 ч накопление ТГ в печени (до $24,9 \pm 2,3$ мг/г в сравнении с $6,4 \pm 1,3$ мг/г у интактных животных; $P < 0,001$), было отмечено положительное влияние предварительного введения тималина (содержание ТГ в печени после введения этанола этим животным увеличилось лишь до $16,4 \pm 2,2$ мг на 1 г ткани в сравнении с крысами, получавшими только этанол; $P < 0,05$).

Результаты иммунологических исследований показали, что у кроликов через 1,5 мес после начала введения ХС выявилась тенденция к усилению спонтанного включения тимидина в лимфоциты. При стимуляции ФГА активность включения тимидина в ДНК лимфоцитов достоверно увеличилась (табл. 2), хотя индекс стимуляции (ИС) снижался (8,58 против 14,68 в контроле). При этом выявлялся пролиферативный ответ лимфоцитов на ЛПОИП. Из табл. 2 следует, что у кроликов данной группы снижается индуцированная ФГА супрессорная активность лимфоцитов. В тот же период в тесте угнетения миграции лимфоцитов отмечалась сенсбилизация к ЛПОИП (табл. 3). Через 3 мес после начала введения ХС возросло спонтанное включение тимидина в лимфо-

циты кроликов, но уменьшилась интенсивность РБТ при стимуляции ФГА и сохранялась реактивность к ЛПОИП (ИС 5,35 и 6,98 соответственно). При этом была подавлена как спонтанная, так и индуцированная ФГА супрессорная активность (см. табл. 2) и сохранялась сенсбилизация лимфоцитов к ЛПОИП, определяемая в тесте угнетения миграции лимфоцитов (см. табл. 3).

При сочетании введения кроликам ХС и тималина наблюдали первоначальное (через 1,5 мес) дальнейшее возрастание спонтанного и индуцированного ФГА включения тимидина в лимфоциты и снижение пролиферативного их ответа на ЛПОИП (см. табл. 2). После введения тималина в течение 3 мес выявилась тенденция к снижению спонтанного включения тимидина при относительно высокой степени ответа лимфоцитов на ФГА (ИС составил 9,3 против 5,3 в группе кроликов, получавших только ХС). При этом у животных, которым вводили тималин, подавлялся пролиферативный ответ на ЛПОИП. При введении тималина в сочетании с ХС уже через 1,5 мес отмечали нормализацию функции индуцированных ФГА супрессоров, но не стимулировалась функция спонтанных супрессорных лимфоцитов (см. табл. 2). Сенсбилизация к атерогенным ЛПОИП (ЛПОИП) у кроликов, получавших в течение 3 мес ХС, определяемая в тесте угнетения миграции лейкоцитов,

Влияние тималина на показатели сенсibilизации к ЛПОНП и реакцию угнетения миграции лейкоцитов у кроликов

Животные	Время, мес	Миграция лейкоцитов в присутствии			Количество животных с измененной миграцией лейкоцитов, %
		—	ЛПОНП		
			100 мкг/мл	10 мкг/мл	
Контрольные, $n = 12$ (1)	—	15,28±1,25	15,40±1,24	15,90±1,42	—
Получавшие атерогенную диету, $n = 8$ (2)	1,5	8,14±0,95 $P_{2-1} < 0,001$	5,48±1,4 $P_{2-1} < 0,001$	8,26±1,12 $P_{2-1} < 0,001$	80
	3	10,6±1,77	5,80±1,74 $P_{2-1} < 0,001$	6,90±1,12 $P_{2-1} < 0,001$	89
Получавшие атерогенную диету и тималин, $n = 7$ (3)	1,5	8,80±1,59	8,60±1,38	8,86±2,12	20
	3	9,48±0,96	9,49±0,53 $P_{3-2} < 0,05$	8,06±1,24	31

была отчетливо заторможена при дополнительном введении тималина (см. табл. 3).

При культивировании лимфоцитов периферической крови крыс, получавших способствующую развитию гиперхолестеринемии диету, наблюдали усиление спонтанного включения тимидина и особенно уридина (табл. 4). Последнее свидетельствует об активации системы Т-лимфоцитов [28]. В то же время ответ лимфоцитов на ФГА у крыс этой группы был в 2 раза меньше, чем у интактных животных. Отмечалось усиление пролиферации лимфоцитов при их инкубации с ЛПНП и ЛПОНП. Супрессорная активность у крыс этой группы и особенно индуцированная ФГА была подавлена (у 5 из 10 животных лимфоциты не проявля-

ли спонтанной супрессорной активности, а ФГА — индуцированная обнаруживалась лишь у 40 % животных). В тесте угнетения миграции лейкоцитов не наблюдали сенсibilизации к ЛПНП и ЛПОНП. При введении тималина крысам, получавшим «гиперлипидемическую» диету, была отмечена нормализация спонтанного поглощения лимфоцитами уридина и их реактивности к ФГА (см. табл. 4). Уменьшилась и степень подавления супрессорной активности лимфоцитов (как спонтанной, так и индуцированной ФГА). Супрессорная активность лимфоцитов обнаруживалась у 70 % крыс.

Таким образом, приведенные экспериментальные данные указывают на тенденцию к гиполлипидемическому и антиатеросклеротическому действию

Таблица 4

Влияние тималина на РБТ лимфоцитов крыс, получавших диету, способствующую развитию гиперхолестеринемии

Животные	Лимфоциты не стимулированы: степень включения, имп/мин на 10^6 мин			Лимфоциты стимулированы: включение ^3H -тимидина, имп/мин на 10^6 лимфоцитов		
	^3H -тимидина	^3H -уридина	тимидин/уридин	ФГА-П	ЛПОНП	ЛПНП
Контрольные, $n=9$ (1)	2033,6 ± 142,4	2941,3 ± 539,2	0,69	43263,5 ± 3685,7	2618,8 ± 184,6	3057,8 ± 292,4
Получавшие гиперлипидемическую диету $n=10$ (2)	3065,7 ± 236,7 $P_{2-1} < 0,01$	6061,3 ± 409,9 $P_{2-1} < 0,01$	0,50	21906,4 ± 2087,6 $P_{2-1} < 0,001$	5879,5 ± 740,0 $P_{2-1} < 0,001$	6844,1 ± 1357,1 $P_{2-1} < 0,01$
	Получавшие гиперлипидемическую диету и тималин, $n=10$ (3)	2467,1 ± 150,0 $P_{3-2} < 0,05$	2955,2 ± 378,5 $P_{3-2} < 0,001$	0,83	42490,9 ± 4183,3 $P_{3-2} < 0,001$	1263,8 ± 492,5

иммуномодулятора и биостимулятора тималина. Следует отметить определенный параллелизм между развитием экспериментальной гиперлипидемии и нарушениями функционального состояния лимфоцитов, в частности изменением реактивности к ФГА, подавлением их супрессорной функции и появлением сенсibilизации к атерогенным ЛП. Указанные изменения могут быть связаны с непосредственным воздействием атерогенных классов ЛП на пролиферативный ответ лимфоцитов к митогенам, что отмечено рядом исследователей [23, 24] при добавлении ЛПОП к лимфоцитам здоровых доноров и больных с ишемической болезнью сердца или аутологичной сыворотки к лимфоцитам больных с признаками атеросклероза [15]. При гиперлипидемии нарушение пролиферативной активности лимфоцитов может быть связано и с усилением микровязкости липидного слоя цитоплазматической мембраны вследствие избыточного накопления в ней холестерина, что ведет к нарушению функции рецепторов лимфоцитов и первой фазы их ответа на митогены — кэппинг-эффекта [21, 32].

По данным некоторых авторов [7, 17], у животных с генетически детерминированным отсутствием тимуса или после тимэктомии наблюдается повышенное содержание катехоламинов и кортикостероидов в крови и ряде внутренних органов, снижается уровень половых гормонов. Эти изменения могут способствовать развитию гиперлипидемии и дисфункции Т-системы иммунитета. Учитывая это, можно полагать, что введение препарата из тимуса тималина способствует нормализации клеточного иммунитета и гормональных нарушений, что и отражается в тенденции к гиполлипидемическому и антиатеросклеротическому действию. Действительно, в наших опытах восстанавливался ответ лимфоцитов на ФГА, нормализовывалась нарушенная их супрессорная активность и подавлялась сенсibilизация к атерогенным ЛП. Возможно, что нормализующее действие тималина на иммунную систему в условиях развивающейся гиперлипидемии у кроликов задерживает также образование аутоиммунных комплексов липопротеид — антигенов, обладающих большей атерогенностью, чем нативные ЛП [25].

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г. Р. Динамика атеросклеротического процесса у человека. — М., 1970.
2. Артемова А. Г. // Бюл. Экспер. биол. — 1973. — № 10. — С. 67—71.
3. Беленький М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. — Л., 1963.
4. Вахитова Г. М., Прокопов А. А., Шварц Г. Я. // Хим.-фарм. журн. — 1981. — № 7. — С. 50—55.
5. Ганджа И. М. // Врач. дело. — 1980. — № 4. — С. 74—76.
6. Гублер Е. В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. — Л., 1978. — С. 72—81.
7. Гунько М. В., Грух В. С., Чередищенко Г. А., Данышина О. И. // Физиология и биохимия онтогенеза. — Киев, 1983. — С. 11—124.
8. Кемилева З. Вилочковая железа: Пер. с болг. — М., 1984. — С. 179—187.
9. Климов А. Н. // Вестн. АМН СССР. — 1974. — № 2. — С. 29—36.
10. Климов А. Н. Дислипидотендемии и ишемическая болезнь сердца. — М., 1980. — С. 10—25.
11. Лейтес С. М. // Биохимия. — 1943. — № 5—6. — С. 283—291.
12. Морозов В. Г., Хавинсон В. Х. // Докл. АН СССР. — 1978. — Т. 240, № 4. — С. 1004—1007.
13. Назаров П. Г. // Лаб. дело. — 1975. — № 2. — С. 74—77.
14. Рыженков В. Е. // Фармакол. и токсикол. — 1967. — № 1. — С. 11—14.
15. Софронов Б. П., Огурицов Р. П., Попов В. Г., Пигаревский П. В. // Иммунология атеросклероза и ишемической болезни сердца. — Томск, 1985. — С. 12—13.
16. Хейфец Л. Б., Албалкин В. А. // Лаб. дело. — 1973. — № 10. — С. 46—48.
17. Сухарев Г. В. // Там же. — 1960. — № 1. — С. 26—27.
18. Чеснокова В. М., Иванова Л. П., Юнкер В. М. // Всесоюзный съезд эндокринологов, 2-й: Тезисы докладов. — Л., 1980. — С. 391—392.
19. Шестов Д. Б. // Липопротеиды высокой плотности и атеросклероз. — М., 1983. — С. 306—318.
20. Шютт Х. // Иммунологические методы. Под ред. Х. Фримеля: Пер. с нем. — М., 1979. — С. 31—37.
21. Anderson J. C. E., Green C. // FEBS Lett. — 1975. — Vol. 52. — P. 208—211.
22. Barou V., Ayrault-Jarrier M., Maziere J.-C., Polonovski J. // Biochimie. — 1980. — Vol. 62, N 11—12. — P. 829—832.
23. Curtis L. K., Edgington T. S. // J. Immunol. — 1976. — Vol. 116, N 5. — P. 1452—1458.
24. Goldman A. S., Dickey W. D., Schmalstieg F. C. // Surv. Immunol. Res. — 1982. — Vol. 1, N 1. — P. 24—29.
25. Klimov A. N. // Proc. 16 FEBS congress. Part A. — 1985. — P. 233—249.
26. Hagmann J., Weiler J., Waelty E. // FEBS Lett. — 1979. — Vol. 97, N 2. — P. 230—232.

27. Kuapp W., Posch B. // *J. Immunol.* — 1980. — Vol. 124, N 1. — P. 168—172.
28. Mellstedt H. // *Clin. exp. Immunol.* — 1975. — Vol. 19, N 1. — P. 75—82.
29. Mondola P., d'Errico M., Falconi C. // *Life Sci.* — 1977. — Vol. 21. — P. 519—524.
30. Nery B. P., Frings C. S. // *Clin. Chem.* — 1973. — Vol. 19. — P. 1201—1202.
31. Neuschlosz S. M. // *Biochem. Z.* — 1930. — Bd 225. — S. 115—140.
32. Santiago-Delpin E. A., Roman-Franco A. A., Colon J. I. // *Lipids.* — 1982. — Vol. 17. — P. 727—732.
33. Walton K. W. // *Immunity and Atherosclerosis.* — London, 1980. — P. 45—56.

Поступила 14.12.86

EFFECT OF THYMALIN ON DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL HYPERLIPIDEMIA AND ATHEROSCLEROSIS

V. E. Ryzhenkov, R. P. Ogurlov, V. V. Trubacheva, V. G. Popov, V. P. Puzirjova, O. V. Remesova, V. Ch. Chavinson, V. G. Morosov

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

Thymalin, which is a polypeptide preparation from thymus, exhibited hypolipidemic and antiatherosclerotic actions in rabbits maintained on a cholesterol-containing diet during three months. At the same time, thymalin caused favourable effect on the functional activity of lymphocytes impaired in hyperlipidemic animals, i. e. it normalized the T-suppressor activity and sensitivity to atherogenic lipoproteins.

УДК 612.112.3.014.46:615.276.4

Г. Б. Кирилличева, Н. Г. Сенилова, М. А. Туманян

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ИММУНОСТИМУЛЯТОРОВ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ НА АКТИВНОСТЬ 5-ИУКЛЕОТИДАЗЫ МАКРОФАГОВ ПЕРИТОНЕАЛЬНОГО ЭКССУДАТА МЫШЕЙ

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР, Москва

Проблема устойчивости организма к различным факторам внешней среды занимает важное место в медико-биологических исследованиях. Существенная роль в системе защитных врожденных механизмов принадлежит фагоцитозу. При изучении новых биологически активных препаратов большое значение придается изучению их влияния на иммунологическую реактивность организма. Широкое распространение получили методы, характеризующие действие препаратов на отдельные субпопуляции иммунокомпетентных клеток и, в частности, на клетки мононуклеарной фагоцитирующей системы, принимающие участие как в специфических, так и неспецифических иммунных реакциях организма. Одним из показателей функциональной активности макрофагов является уровень активности 5-нуклеотидазы (КФ 3.1.3.5) в этих клетках [4]. Имеются сведения о влиянии иммуностимуляторов на активность 5-нуклеотидазы макрофагов перитонеального экссудата [3].

Целью настоящего исследования было изучение влияния иммуностимуляторов различного биологического происхождения и химической структуры на активность 5-нуклеотидазы макрофагов перитонеального экссудата (МПЭ) мышей.

Методика

В работе использовали мышей-самцов линии СВА и белых мышей (3-месячного возраста). Исследуемые препараты вводили подкожно или внутривенно, однократно в рекомендованных для использования дозах, указанных в таблице. Активность 5-нуклеотидазы определяли в суспензии неразрушенных МПЭ через 1 и 8 сут после введения препаратов по модифицированному методу [3]. Макрофаги получали по методу [1]. Контролем служили животные, получавшие изотонический раствор хлорида натрия.

По данным эксперимента вычисляли точечные и интервальные оценки активности 5-нуклеотидазы по упрощенной методике [2].

Результаты и обсуждение

На рис. 1 и 2 изображены результаты изучения активности 5-нуклеотидазы в МПЭ мышей линии СВА и белых мышей соответственно через 1 сут после подкожного или внутривенного введения иммуностимуляторов.

На рис. 1 видно, что при подкожном введении мышам СВА ни один из примененных препаратов не вызывал заметного изменения активности 5-нуклеотидазы МПЭ мышей. Внутривенное введение всех исследуемых препаратов мышам СВА вызывало существенное снижение активности 5-нуклеотидазы. Введение изотонического

Характеристика использованных иммуностимуляторов

Номер	Препарат	Происхождение	Доза, мкг	
			на мышь	на единицу массы
1	Сальмозан*	Полисахарид из <i>S. typhi abdominalis</i>	100	5,6
2	Липополисахарид 1	Липополисахарид из <i>Proteus mirabilis</i>	100	5,6
3	Липополисахарид 2	Липополисахарид из <i>Proteus vulgaris</i>	100	5,6
4	Маннан	Полисахарид из <i>Candida albicans</i>	100	5,6
5	Фосфоманнан	Полисахарид из <i>Hansenula holstii</i>	100	5,6
6	Хитозан	Полисахарид из хитиновой оболочки насекомых	100	5,6
7	Ригин	Тетрапептид синтетического происхождения	100	5,6
8	Тафцин	То же	100	5,6
9	Задитен	Препарат синтетического происхождения	100	5,6
10	Левамизол	То же	70	4,0
11	Рибомидил	» »	100	5,6
12	Ипозинлекс	» »	100	5,6
13	Глюкуронат Na	» »	100	5,6
14	Глюкуроно-3-6-лактон	» »	100	5,6

* Препараты № 1, 2, 3 получены в НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи (М. А. Туманян, Н. Г. Сипилова, А. П. Дуплицева); препараты № 4, 5 — в Ленинградском химико-фармакологическом институте; препараты № 7, 8, 11, 12, 13, 14 — в Институте органического синтеза АН Латвийской ССР.

го раствора хлорида натрия также сопровождалось некоторым уменьшением активности фермента.

У неллинейных мышей в отличие от мышей СВА подкожное введение иммуностимуляторов сопровождалось снижением активности 5-нуклеотидазы (см. рис. 2). Наименьшее значение ферментативной активности в МПЭ отмечено при применении сальмозана (полисахарида, выделенного из *S. typhi abdominalis*). Характер изменения активности 5-нуклеотидазы у неллиней-

ных мышей при внутрибрюшинном введении примерно такой же, как и у мышей СВА (см. рис. 2).

При внутрибрюшинном применении препаратов и измерении активности 5-нуклеотидазы через 8 сут после введения (рис. 3) как у мышей СВА, так и у неллинейных отмечается снижение активности изучаемого фермента. Наибольшее уменьшение активности 5-нуклеотидазы наблюдали при применении сальмозана, хитозана, липополисахаридов, выделенных из *Proteus vulgaris*,

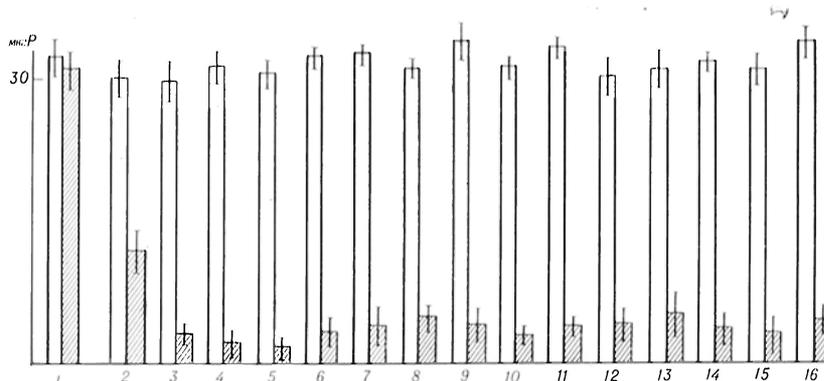


Рис. 1. Активность 5-нуклеотидазы (в мкг Р на 10^7 клеток за 1 ч при 37°C) в МПЭ мышей линии СВА через 1 сут после подкожного и внутрибрюшинного введения различных препаратов.

Здесь и на рис. 2: 1 — контроль (интактные животные); 2 — изотонический раствор хлорида натрия; 3 — сальмозан; 4 — липополисахарид (ЛПС) из *Proteus mirabilis*; 5 — ЛПС из *Proteus vulgaris*; 6 — маннан; 7 — фосфоманнан; 8 — хитозан; 9 — ригин; 10 — тафцин; 11 — задитен; 12 — левамизол; 13 — рибомидил; 14 — ипозинлекс; 15 — глюкуронат натрия; 16 — глюкуроно-3-6-лактон. Светлые столбики — подкожное введение; заштрихованные — внутрибрюшинное введение.

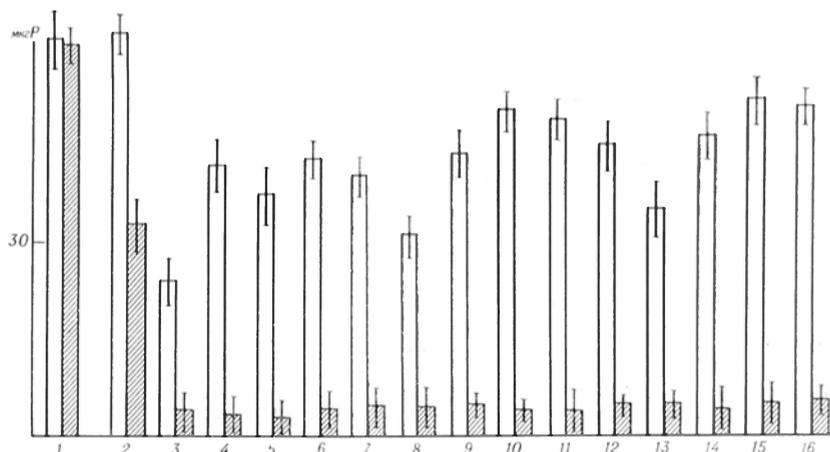


Рис. 2. Активность 5-нуклеотидазы (в мкг Р на 10^7 клеток за 1 ч при 37°C) в МПЭ неллинейных мышей через 1 сут после подкожного или внутрибрюшинного введения различных препаратов.

Proteus mirabilis, наименьшее — при введении инозинплекса, тафцина. При этом степень снижения активности 5-нуклеотидазы при введении того или иного препарата была примерно одинаковой у мышей СВА и неллинейных.

Таким образом, в результате исследований установлено, что характер изменений активности 5-нуклеотидазы в МПЭ при введении препаратов, обладающих иммуностимулирующими свойствами, зависит от способа введения последних и срока исследования.

Все примененные иммуностимулирующие препараты, независимо от биологического происхождения и химической структуры вызывают снижение активности 5-нуклеотидазы в МПЭ мышей. У мышей линии СВА уменьшение ферментативной активности в МПЭ на-

блюдали лишь при внутрибрюшинном введении препаратов, у неллинейных — как при подкожном, так и при внутрибрюшинном способе применения. Наибольшие изменения активности 5-нуклеотидазы в МПЭ отмечены при использовании препаратов микробного происхождения, наименьшие — в опытах с синтетическими препаратами. Наблюдаемое снижение активности 5-нуклеотидазы в МПЭ мышей свидетельствует об активации этих клеток, так как уменьшение активности 5-нуклеотидазы является одним из основных биохимических признаков активации макрофагов [4, 5].

Таким образом, исследования показали, что одним из основных механизмов иммуностимулирующего действия препаратов независимо от их химиче-

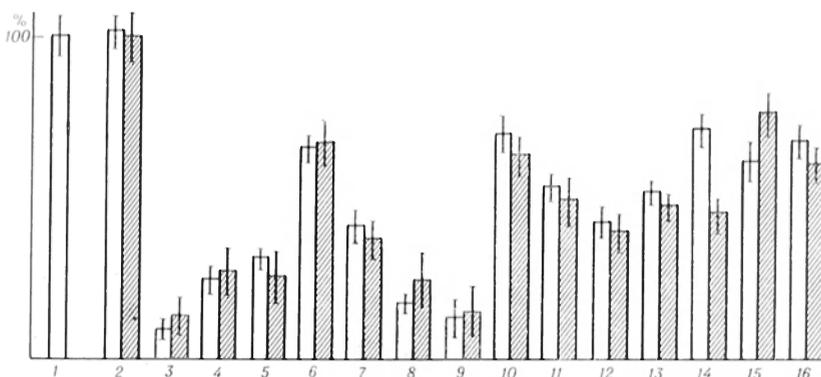


Рис. 3. Активность 5-нуклеотидазы (в % относительно контроля) в МПЭ мышей линии СВА и неллинейных мышей через 8 сут после внутрибрюшинного введения различных препаратов.

Обозначения, как и на рис. 1 и 2, светлые столбики — мыши линии СВА; заштрихованные — неллинейные мыши.

ской структуры и происхождения является активация клеток мононуклеарной фагоцитирующей системы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зайцева Л. Г., Фаворская Ю. Н. // Бюл. экспер. биол. — 1980. — № 11. — С. 576—578.
2. Монцевичоте-Эрингене Е. В. // Пат. физиол. — 1964. — № 4. — С. 71—77.
3. Тулманян М. А., Кирилличева Г. Б. // Иммунология. — 1984. — № 5. — С. 29—31.
4. Edelson P. J., Cohn Z. A. // J. exp. Med. — 1976. — Vol. 144. — P. 1581—1595.
5. Pietrangoli C. E., Skamene E., Edelson P. J. et al. // Infect. a. Immun. — 1981. — Vol. 32. — P. 1206—1210.

Поступила 21.07.86

УДК 612.115.12-06:612.115.35+612.115.12.014.46:615.273.53

Е. Е. Шимонаева, Г. В. Андреев

ТРОМБОЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОМПЛЕКСА ГЕПАРИН — ТКАНЕВЫЙ АКТИВАТОР ПЛАЗМИНОГЕНА И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА ФИБРИНОЛИТИЧЕСКУЮ И СВЕРТЫВАЮЩУЮ СИСТЕМЫ КРОВИ ЖИВОТНЫХ

Лаборатория ферментативного фибринолиза биологического факультета МГУ
им. М. В. Ломоносова

Ранее нами было показано, что гепарин и тканевый активатор плазминогена из сердца свиньи образуют *in vitro* в растворе комплексное соединение постоянного состава, соответствующего мольному отношению 1:1. Изучение свойств полученного комплекса показало, что он сохраняет активаторную и антикоагулянтную активность, которая мало отличается от активности эквивалентных количеств активатора и гепарина, и имеет слабо выраженную неферментативную фибринолитическую активность, что указывает на отличие этого комплекса от известных комплексных соединений гепарина с белками крови [5].

В настоящее время проявляется большой интерес к изучению влияния активатора и гепарина на систему гемостаза и фибринолиза, а также прослеживается определенная связь между ними. Предполагается, что гепарин и его фракции, будучи полианионными электролитами, обладают свойством взаимодействовать с кровеносными сосудами. Путем связывания на по-

EFFECT OF VARIOUS IMMUNOSTIMULATORS ON ACTIVITY OF 5-NUCLEOTIDASE FROM MACROPHAGES OF MICE PERITONEAL EXUDATE

G. V. Kirillicheva, N. G. Sinilova, M. A. Tulmanyan

Institute of Epidemiology and Microbiology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

All the immunostimulators studied, independently on their biological origin and chemical structure, decreased the 5-nucleotidase activity in macrophages of mice peritoneal exudate, thus indicating activation of these cells. The most distinct inhibition of the enzymatic activity in macrophages was induced by preparations of microbial origin. The decrease of the 5-nucleotidase activity in macrophages was observed in mice of CBA strain only after intraperitoneal administration of the preparations, while in non-linear animals — after subcutaneous or intraperitoneal injections.

верхности эндотелия гепарин и его фракции могут содействовать высвобождению тканевого активатора из эндотелиальных клеток, тем самым способствуя повышению фибринолиза [8]. В связи с этим изучение комплексных соединений гепарина с тканевым активатором плазминогена, по-видимому, является очень важным, особенно с точки зрения его физиологической роли в организме.

В настоящей работе исследовали влияние комплекса гепарин — тканевый активатор плазминогена из сердца свиньи на системы гемостаза и фибринолиза при внутривенном введении животным и его тромболитические свойства *in vitro*.

Методика

Исследования проведены на белых крысах-самцах массой 160—200 г. Крысам в *v. jugularis* вводили комплекс гепарин—тканевый активатор в физиологическом растворе, контрольным животным — отдельно компоненты этого комплекса в эквивалентных количествах. Комплекс получали методом, описанным ра-

Показатели функций фибринолитической системы крови после введения крысам комплекса гепарин-тканевый активатор плазминогена (I; $n = 12$), тканевого активатора плазминогена (II, $n = 12$) и гепарина (III, $n = 10$)

Показатель	I	II	III
Фибринолитическая активность эуглобулиновой фракции:			
время лизиса сгустка, мин:			
до введения	70±5	86±10	90±12
через 10 мин	56±5	52±6*	107±11
через 60 мин	122±18	81±8	99±19
лизис пластин фибрина, мм ² :			
активность активатора			
до введения	36±12	53±10	38±6
через 10 мин	89±11*	66±15	72±10*
через 60 мин	29±5	31±9	50±26
активность плазмينا			
до введения	29±7	16±3	37±9
через 10 мин	34±3	23±4	43±11
через 60 мин	23±7	23±6	35±3
Фибринолитическая активность цельной плазмы, %:			
до введения	16±4	22±4	25±11
через 10 мин	17±4	27±6	35±5
через 60 мин	18±6	29±7	29±5
Антиактиваторная активность, %:			
до введения	75±8	55±5	50±9
через 10 мин	34±6*	46±9	52±5
через 60 мин	37±6*	50±4	57±8
Антиплазминовая активность, с:			
до введения	229±5	198±9	235±40
через 10 мин	239±5	211±14	247±20
через 60 мин	214±5	199±15	244±15

Примечание. Здесь и в табл. 2 звездочкой отмечены статистически достоверно отличающиеся от контроля (до введения) результаты; n — число животных.

нее [3], тканевый активатор выделяли из сердца свиньи [7], использовали гепарин фирм «Srofa» (ЧССР) и «Richter» (Венгрия).

Кровь для анализа брали из вены до введения и через 10 и 60 мин после введения препаратов. В плазме определяли фибринолитическую активность эуглобулиновой фракции по времени лизиса сгустка [11] и на стандартных стабилизированных пластинках фибрина (прогретых и непрогретых) [6], концентрацию фибриногена и фибринолитическую активность цельной плазмы методом [10], активность антиплазминов [11], антиактиватора [2], растворимый фибрин [12] и время рекальцификации [9]. Тромболитические свойства комплекса и составляющих его компонентов определяли методом количественной оценки тромболитической активности препаратов фибринолитического действия *in vitro* [4].

Результаты исследований плазмы, взятой у животных, после введения им комплекса гепарин — тканевый активатор, активатора и гепарина представлены в табл. 1 и 2. Внутривенное введение животным комплекса гепарин — тканевый активатор не оказывало значительного влияния на фибринолитическую систему (см. табл. 1). По сравнению с тканевым активатором, при введении которого время лизиса сгустка эуглобулинов сокращается в среднем на 40 %, а в целом ряде случаев на 50 %, комплексе гепарин — тканевый активатор в те же сроки сокращает время лизиса в среднем на 20 %. Вместе с тем активаторная активность через 10 мин увеличивается в большей степени при введении комплекса, чем при введении одного активатора (на 60 и 20 % соответственно), что, по-видимому, связано с присутствием в комплексе гепарина, который способствует высвобождению дополнительных количеств активатора из стенок сосудов. Это подтверждается также введением эквивалентных количеств гепарина, в результате чего активность активатора увеличивается почти в 2 раза. Активность плазмينا практически не изменяется, что указывает на отсутствие свойства комплекса активировать плазминоген и соответственно повышать фибринолитическую активность крови. На это указывает и то, что фибринолитическая активность цельной плазмы при введении комплекса не изменяется. Эквивалентные количества активатора и гепарина статистически недостоверно повышают уровень плазмина и фибринолитическую активность цельной плазмы.

Исследование компонентов свертывающей системы (см. табл. 2) показало, что введение активатора практически не изменяет показатели этой системы, снижая только незначительную концентрацию фибриногена. Гепарин оказывает влияние на свертывающую активность крови, способствуя увеличению через 10 мин после введения времени рекальцификации, снижая уровень растворимого фибрина и концентрацию фибриногена. Введение животным комплекса гепарин — тканевый активатор сопровождается увеличением времени рекальцификации, но

в меньшей степени, чем при введении гепарина, незначительным изменением содержания растворимого фибрина и довольно значительным снижением концентрации фибриногена: через 10 мин — на 32 %, к 60 мин — почти в 2 раза, что, по-видимому, связано с присутствием гепарина в комплексе. Эти исследования позволяют сделать заключение, что тканевый активатор в комплексе с гепарином в меньшей степени проявляет свое влияние на фибринолитическую систему крови. Антикоагулянтная активность комплекса также выражена слабее, чем у эквивалентных количеств гепарина.

Результаты исследования тромболитических свойств комплекса гепарин — тканевый активатор представлены на рисунке. По нашим данным, указанный комплекс сохраняет литическую активность, но по сравнению с активатором у комплекса она выражена несколько слабее. Так, при введении тканевого активатора в замкнутую систему, содержащую донорскую кровь с закрепленным в ней тромбом, за 2 ч инкубации при 37 °С тромб лизируется на 82 %. В присутствии комплекса в тех же условиях тромб лизируется на 72 % (по сравнению с контролем, когда в систему вводят лишь физиологический раствор). Гепарин влияет на лизис тромба очень незначительно, уменьшая его первоначальную массу на 3—5 %.

Таким образом, результаты наших

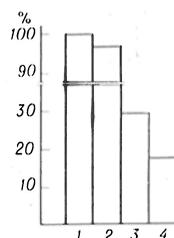
Таблица 2

Показатели функции свертывающей системы крови после введения крысам комплекса гепарин-тканевый активатор плазминогена (I; $n = 12$), тканевого активатора плазминогена (II; $n = 12$) и гепарина (III; $n = 10$)

Показатель	I	II	III
Концентрация фибриногена, мг %:			
до введения	340 ± 27	364 ± 23	347 ± 20
через 10 мин	230 ± 39	316 ± 14	266 ± 33
через 60 мин	193* ± 25	295 ± 17	250 ± 26
Концентрация растворимого фибрина, мг %:			
до введения	12 ± 2	17 ± 4	35 ± 11
через 10 мин	13 ± 2	16 ± 4	23 ± 3
через 60 мин	9 ± 1	18 ± 3	22 ± 3
Время рекальцификации, с:			
до введения	71 ± 3	81 ± 5	81 ± 5
через 10 мин	93* ± 3	76 ± 5	143* ± 23
через 60 мин	93* ± 5	71 ± 5	98 ± 10

Тромболитические свойства комплекса гепарин — тканевый активатор.

Масса тромба (в %) через 2 ч инкубации (37 °С) при введении в систему: 1 — физиологического раствора, 2 — гепарина, 3 — комплекса гепарин — тканевый активатор плазминогена, 4 — тканевого активатора плазминогена.



исследований указывают на то, что комплекс гепарин — тканевый активатор почти полностью сохраняет литические свойства за счет присутствия в нем активатора, в меньшей степени, чем активатор, влияет на систему фибринолиза и умеренно подавляет свертывающую активность за счет присутствия в нем гепарина, но менее выражено, чем только гепарин. Исходя из полученных данных, по-видимому, можно сделать заключение, что такое сочетание гепарина и тканевого активатора может играть важную роль при лечении тромбозов, так как введение этих веществ в виде комплекса или раздельно при их определенном соотношении будет несколько угнетать свертывающую активность крови, не оказывая влияния на фибринолитическую систему, сохраняя свойство лизировать тромб. Важным моментом является, по-видимому, и то, что введение комплекса вызывает высвобождение дополнительных количеств активатора из стенок сосудов, способствуя тем самым увеличению фибринолитического потенциала крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреевко Г. В. // Лаб. дело. — 1969. — № 8. — С. 477—479.
2. Андреевко Г. В., Шимонаева Е. Е. // Вопр. мед. химии. — 1983. — № 5. — С. 112—114.
3. Кудряшов Б. А., Калишевская Т. М., Ляпина Л. А. // Там же. — 1968. — № 3. — С. 272—282.
4. Хватов В. Б., Платонова Т. К., Шестаков В. А. Ускоренный метод определения тромболитической активности препаратов фибринолитического действия: Метод. рекомендации. — М., 1980.
5. Шимонаева Е. Е., Шимонаев Г. С., Алешина Т. С. // Биохимия. — 1983. — Т. 48. — № 10. — С. 1687—1690.
6. Astrup T., Müllertz S. // Arch. Biochem. — 1952. — Vol. 40. — P. 346—355.
7. Bachman F., Fletcher A. P., Alkjersig N., Sherry S. // Biochemistry (Wash.). — 1964. — Vol. 3. — P. 1578—1585.
8. Fareed J. // Seminars Thrombos. Haemostas. — 1985. — Vol. 11, N 1. — P. 1—13.
9. Howell W. H. // Perlik E. Gerinnungslaboratorium in Klinik und Praxis. — Leipzig, 1960. — S. 34—35.

10. Lazar G. // *Thrombos. Diathes. haemor.* (Stuttg.). — 1967. — Bd 17. — S. 401—404.
11. Niewiarowski S. *Krępowacie krwi.* — Warszawa, 1960. — P. 150—152.

12. Stachurska J., Szpielman H., Zatallo L. S., Kopeć M. // *Reumatologia.* — 1972. — Vol. 10, N 4. — P. 303—313.

Поступила 08.09.86

THROMBOLYTIC PROPERTIES OF THE COMPLEX HEPARIN-TISSUE ACTIVATOR OF PLASMINOGENE AND ITS EFFECT ON FIBRINOLYTIC AND COAGULATING SYSTEMS OF ANIMAL BLOOD

E. E. Shimonaeva, G. V. Andreenko

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

A complex heparin-tissue activator of plasminogene maintained its thrombolytic properties due to the presence of the activator. Studies of thrombolytic properties of the complex in vitro and of its effect in vivo on animal blood fibrinolytic and coagulation systems after intravenous administration confirmed this contention.

After intravenous administration into animals the complex caused only slight effect on the system of fibrinolysis and inhibited moderately the coagulating activity of blood. This combination of heparin and tissue activator of plasminogene appears to be important in treatment of thromboses.

УДК 616.342-002.44-092:616.342-018.73-008.939.631

М. Н. Исаев, П. Д. Рабинович

ВЫДЕЛЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ДУОДЕНАЛЬНОЙ ЯЗВОЙ

Саратовский медицинский институт

Ульцерогенез при язвенной болезни, по-видимому, связан с нарушением равновесия между резистентностью тканей гастродуоденальной системы (ГДС) и агрессивностью ее содержимого. Устойчивость двенадцатиперстной кишки к факторам агрессии в основном определяется присутствием в ее структурах фукогликопротеинов (ФГП) и гликозаминогликанов (ГАГ).

Ряд авторов нашли при язвенной болезни генетически детерминированное угнетение секреции ФГП в слизь желудка и двенадцатиперстной кишки [3—5, 8, 10, 13]. Поскольку слизь двенадцатиперстной кишки в отличие от желудочной содержит ГАГ [7, 11, 14], можно предположить, что одним из дополнительных дефектов при хронической дуоденальной язве является нарушение их синтеза и секреции.

Обмен ГАГ при язвенной болезни изучен недостаточно. При дуоденальной язве гистохимически установлено уменьшение их количества в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки [7]. В периоде обострения найдено снижение экскреции с мочой анти-тромбиновых веществ, которые, как известно, относятся к ГАГ [1]. Установлено также уменьшение ГАГ-урии и хондритинсульфатурии [6]. Таким образом, можно предполагать, что при

дуоденальной язве происходит угнетение выделения ГАГ.

Цель настоящей работы — выяснить, за счет каких компонентов ГАГ уменьшается их выделение у больных хронической дуоденальной язвой.

Методика

Обследовано 55 больных язвенной болезнью (31 в периоде обострения, 24 — ремиссии) с локализацией язвы в двенадцатиперстной кишке (42 мужчины и 13 женщин) и продолжительностью заболевания от 1 года до 30 лет и 29 практически здоровых людей (21 мужчина и 8 женщин). Возраст обследованных варьировал от 16 до 60 лет. Язвенную болезнь распознавали на основании наличия типичных клинических, рентгенологических и гастродуоденоскопических признаков.

Определяли выведение ГАГ за сутки, так как оно особенно точно характеризует состояние их обмена в организме. ГАГ выделяли методом [17]. Мочу консервировали тимолом из расчета 0,5 г/л. Для осаждения ГАГ-белковых комплексов 100 мл мочи из суточного объема разводили в 2 раза дистиллированной водой и добавляли цетилпиридиний-хлорид (ЦПХ) до конечной концентрации 0,2%. Смесь непрерывно встряхивали в течение 12 ч при 0°C и центрифугировали при 4°C и 8000 g в течение 15 мин. Для удаления ЦПХ осадок трижды отмывали 20 мл 10% ацетата калия в 95% этаноле с последующим центрифугированием при 4°C и 8000 g в течение 15 мин, затем растворяли в 5,0 мл 0,05 M трие-НСI буфера pH 7,5, содержащего 2,5 mM CaCl₂, помещали в кипящую водяную баню на 30 мин, охлаждали до

комнатной температуры и добавляли 3 мг папaina фирмы «Mergck». Протокол проводили при 40 °С в течение 48 ч с добавлением еще 3 мг папaina через 24 ч. Затем раствор охлаждали до 4 °С и добавляли трихлоруксусную кислоту до получения 10 % концентрации. Раствор оставляли при 4 °С на 1 ч с последующим центрифугированием в течение 15 мин при 8000 g и 0 °С. Из надосадочной жидкости брали 0,5 мл для определения общего количества ГАГ по содержанию уроновых кислот карбазоловым методом [9]; оставшийся материал диализовали в течение 48 ч при комнатной температуре против дистиллированной воды в целлофановой трубке («Sigma Stock N250-7U») ацелированной смесью уксусного ангидрида с пиридином (1:3) в течение 3,5 сут. Из полученного диализата брали 0,5 мл для определения количества ГАГ после диализа, оставшийся материал лиофилизировали.

Разделение смеси ГАГ проводили по методу [15] в модификации [2] хроматографией на колонках размером 0,8×8 см с немодифицированной целлюлозой фирмы «Lachema» (ЧССР) при 26–28 °С. В результате разделения получили 7 фракций, содержащих кератансульфат (КС), гиалуроновую кислоту (ГК), гепарансульфат (ГС), хондритинсульфат-4 (ХС-4), хондритинсульфат-6 (ХС-6), дерматансульфат (ДС) и гепарин. Для калибровки колонки и учета выхода фракций хроматографировали стандартные препараты ГАГ («Theodor Schuchardt», ФРГ и «Calbiochem», США), а также образец ГАГ, выделенный из мочи, с добавлением веществ-свидетелей. Выход составлял в среднем 99 %. Колонку перед использованием уравнивали 25 мл 1 % раствора ЦПХ. Лиофилизированную смесь растворяли в 1,0 мл бидистиллированной воды. На колонку наносили 0,7 мл с максимальным количеством ГАГ 600–700 мкг. Для элюции использовали на 1-м этапе 5 мл 1 % раствора ЦПХ, на 2-м 5 мл 0,3 М раствора NaCl в 0,5 % ЦПХ, на 3-м — 5 мл 0,28 М MgCl₂ в 0,05 % ЦПХ, на 4-м — 5 мл из 40 мл n-пропанола, 20 мл метанола, 1,5 мл ледяной уксусной кислоты, 0,4 г ЦПХ, доведенных дистиллированной водой до объема 10 мл, на 5-м — 5 мл из 18,8 мл 4 М MgCl₂, 0,6 мл ледяной уксусной кислоты, 50 мг ЦПХ, доведенных дистиллированной водой до объема 100 мл, на 6-м — 5 мл из 0,75 М MgCl₂ в 0,05 % ЦПХ, на 7-м — 5 мл 1,25 М MgCl₂. После каждого этапа колонку промывали 5 мл 0,05 % ЦПХ, а после 4-й фракции для более тщательного удаления из нее элюирующего раствора, содержащего n-пропанол, объем промывной жидкости увеличивали до 10 мл. 4-ю фракцию тщательно выпаривали для удаления n-пропанола, дающего в реакции с карбазолом интенсивно красное окрашивание.

О количестве ГАГ в каждой фракции судили по содержанию уроновых кислот карбазоловым методом [9]. К 1 мл пробы, охлажденной до 0 °С, добавляли 5 мл очищенной и охлажденной также до 0 °С концентрированной серной кислоты, в которой был растворен тетраборат натрия до получения 1 % концентрации. Образцы и контрольную пробу после тщательного перемешивания во льду помещали в кипящую баню на 10 мин, охлаждали до комнатной температуры, добавляли 0,2 мл 0,1 % спиртового раствора

карбазола, перемешивали, вновь помещали в кипящую водяную баню на 15 мин, охлаждали до комнатной температуры, тщательно перемешивали и измеряли оптическую плотность при длине волны 530 нм.

Количество ГАГ, выделенное за сутки, пересчитывали на соответствующий объем мочи. Достоверность установленных различий определяли при помощи критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Как видно из таблицы, общее количество ГАГ, выделяемое с суточной мочой здоровыми людьми, составляет 14,8 мг, из них значительную долю составили ХС-6 (26,1 %) и КС (21,1 %), несколько меньшую ГК (14,7 %), ХС-4 (13,1 %), ГС (11,5 %) и еще меньшую гепарин (6,3 %) и ДС (6,1 %). Из таблицы следует также, что суточная экскреция ГАГ с мочой у больных хронической дуоденальной язвой в периоде выраженного обострения снижена в 1,6 раза ($p < 0,001$). При этом особенно значительно уменьшено количество ХС-6 (в 2,7 раза; $p < 0,001$). Далее по степени снижения выведения компоненты ГАГ расположились следующим образом: КС в 1,6 раза ($p < 0,001$), ХС-4 в 1,6 раза ($p < 0,001$), ГК в 1,6 раза ($p < 0,01$), ГС в 1,6 раза ($p < 0,001$). Количество ДС и гепарина изменялось статистически недостоверно.

С наступлением ремиссии заболевания общая ГАГ-урия возрастает в 2,5 раза ($p < 0,01$), ГС в 1,5 раза ($p < 0,001$) превышает уровень выведения этих веществ здоровыми людьми. В этом периоде особенно значительно увеличивается экскреция ХС-6 (в 3,3 раза; $p < 0,001$), несколько меньше КС (в 3 раза; $p < 0,001$) и еще меньше ГК

Экскреция ГАГ и их отдельных компонентов с мочой (в мг/сут) у больных хронической дуоденальной язвой и здоровых людей ($M \pm m$)

Компоненты ГАГ	Больные в периоде обострения	Больные в периоде ремиссии	Здоровые люди
Сумма ГАГ	9,0 ± 0,73	22,2 ± 1,75	14,8 ± 0,86
КС	2,0 ± 0,23 (21,7 ± 1,61)	6,0 ± 0,58 (26,5 ± 1,43)	3,1 ± 0,2 (21,2 ± 1,34)
ГК	1,4 ± 0,14 (15,4 ± 1,14)	3,5 ± 0,62 (14,5 ± 0,99)	2,1 ± 0,15 (14,7 ± 0,77)
ГС	1,1 ± 0,1 (12,4 ± 0,78)	2,7 ± 0,2 (22,8 ± 0,72)	1,7 ± 0,15 (11,5 ± 0,66)
ХС-4	1,2 ± 0,12 (13,5 ± 0,79)	2,3 ± 0,11 (11,5 ± 0,78)	2,0 ± 0,18 (13,1 ± 0,61)
ХС-6	1,4 ± 0,12 (15,7 ± 0,47)	4,8 ± 0,4 (21,9 ± 1,21)	3,9 ± 0,27 (26,1 ± 0,71)
ДС	0,9 ± 0,08 (11,6 ± 1,19)	1,3 ± 0,18 (6,1 ± 0,53)	1,0 ± 0,19 (6,1 ± 0,8)
Гепарин	0,9 ± 0,11 (9,6 ± 0,84)	1,6 ± 0,19 (6,9 ± 0,6)	0,9 ± 0,08 (6,3 ± 0,49)

Примечание. В скобках — содержание компонентов ГАГ в процентах от суммы ГАГ.

(в 2,5 раза; $p < 0,01$), ГС (в 2,5 раза; $p < 0,001$), ХС-4 (в 1,9 раза; $p < 0,001$) и гепарина (в 1,8 раза; $p < 0,001$). Выведение ДС имеет только статистически недостоверную тенденцию к росту.

Следует отметить, что содержание в моче отдельных ГАГ у больных хронической дуоденальной язвой с наступлением ремиссии повышается столь существенно, что превышает нормальный уровень. Особенно заметно такое превышение для КС (в 1,9 раза; $p < 0,001$), гепарина (в 1,7 раза; $p < 0,01$) и ГС (в 1,6 раза; $p < 0,01$). Для остальных фракций оно статистически недостоверно.

Из сопоставления экскреции отдельных компонентов ГАГ мочи у больных хронической дуоденальной язвой в периоде обострения и ремиссии и у здоровых людей следует, что выведение ГК, ГС, ХС-4 практически не зависит от фазы течения заболевания. В то же время доля ХС-6 в сумме ГАГ во время выраженного обострения составляет только 15,7 % (у здоровых 26,1 %), а с наступлением ремиссии возрастает до 21,9 % (в 1,4 раза; $p < 0,01$), но не достигает нормального уровня. Доля ДС при обострении язвенной болезни с локализацией язвы в двенадцатиперстной кишке равна 11,6 %, что в 1,9 раза ($p < 0,01$) выше, чем у здоровых людей (6,1 %). С наступлением ремиссии она возвращается к нормальному уровню.

Содержание гепарина в спектре ГАГ мочи здоровых людей составляет 6,3 %, а у больных хронической дуоденальной язвой в периоде обострения 9,6 %, т. е. выше в 1,5 раза ($p < 0,01$). В периоде ремиссии оно, как и в случае ДС, возвращается к норме.

Из приведенных данных следует, что при язвенной болезни с дуоденальной локализацией язвы в периоде обострения выведение ГАГ значительно уменьшается, а в фазе ремиссии увеличивается до уровня, превышающего нормальный. Это наблюдение совпадает с ранее полученными данными [6, 7] об уменьшении образования и выведения ГАГ при активации дуоденальной язвы.

Установленное явление, по-видимому, должно способствовать ulcerogenesisу, так как ГАГ, как уже отмечалось, входят в состав дуоденальной слизи, обладают свойствами ингибито-

ров пепсина и необходимы для организации структурных элементов соединительнотканной стромы гастродуоденальной системы в области дна язвы. Правильная организация таких элементов обеспечивает устойчивость дна язвы и его эпителизацию. Приведенные положения подтверждаются экспериментальными наблюдениями [16], которые показали, что введение кортизона животным с острыми язвами желудка вызывает уменьшение образования ГАГ и одновременно замедляет их заживление.

Особый интерес при язвенной болезни представляют результаты исследования выведения отдельных ГАГ. В настоящей работе хроматографически уточнено, за счет каких соединений происходит обнаруженное ранее уменьшение количества хондроитинсульфатов. Оказалось, что оно связано со снижением экскреции ХС-6. Заживление острых язв у животных сопровождается резким увеличением количества ХС-4 и ХС-6 в соединительнотканной строме гастродуоденальной системы [16]. По нашим данным, для фазы рубцевания хронических дуоденальных язв у людей характерно значительное увеличение выведения ХС-6 с мочой. Вероятно, присутствие ХС-4 и ХС-6 в проксимальном отделе пищеварительной трубки имеет особое значение для регенерации. Следует отметить, что в связи с более полным хроматографическим разделением ГАГ мы в отличие от [16] смогли в фазе ремиссии констатировать существенное нарастание выведения КС. Возможно, это соединение также участвует в обеспечении защиты и восстановлении целостности двенадцатиперстной кишки.

Таким образом, при расположении язвы в двенадцатиперстной кишке в патогенезе язвенной болезни, по-видимому, принимает участие нарушение образования или выделения ГАГ, ослабляющее резистентность этого органа и тем содействующее ulcerogenesisу. Заживление язвенного дефекта сопровождается, судя по экскреции с мочой, значительным увеличением продукции ГАГ, особенно ХС-6 и КС. По-видимому, такая перестройка обмена повышает устойчивость двенадцатиперстной кишки и ее регенераторный потенциал, чем содействует наступлению ремиссии заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Егорова Л. В. // Некоторые актуальные вопросы учения о язвенной болезни. — Чита, 1971. — С. 199—200.
2. Коннова Л. А., Радченко Е. Р. // Рукопись деп. во ВНИИМИ. — Д-1651.
3. Кулаго Г. В., Лукашик Н. К., Гренадер И. З. // Здоровоохран. Белоруссии. — 1978. — № 9. — С. 65—67.
4. Рабинович П. Д., Лоншакова Н. М., Калининский Ю. И. и др. // Вопр. мед. химии. — 1972. — № 1. — С. 52—58.
5. Рабинович П. Д., Домрачева Н. И. // Тер. арх. — 1976. — № 6. — С. 67—72.
6. Рабинович П. Д., Герасимович А. И. // Там же. — 1985. — № 2. — С. 28—30.
7. Успенский В. М. // Врач. дело. — 1972. — № 8. — С. 72—75.
8. Фельдштин П. С., Вершинская Н. В., Тарасюк К. А. // Тер. арх. — 1977. — № 2. — С. 19—21.
9. Bitter T., Muir H. // *Analyt. Biochem.* — 1962. — Vol. 4, N 2. — P. 330.
10. Donaldson J. D., Macrae K. D., Parks T. G. // *Scand. J. Gastroent.* — 1981. — Vol. 16, N 2. — P. 235—239.
11. Lambert B., Andre C., Berard A. // *Digestion.* — 1971. — Vol. 4, N 4. — P. 234—249.
12. Ohkawa Sh., Hata R., Wagai J. et al. // *J. Biochem.* (Tokyo). — 1972. — Vol. 72, N 6. — P. 1495—1501.
13. Sarosiek K. J., Badurski J., Zwierz K. // *Pol. Tyg. Lek.* — 1974. — Vol. 29, N 49. — P. 2117—2120.
14. Schrager J. // *Nature.* — 1963. — Vol. 198, N 4883. — P. 899—900.
15. Svejcar J., Roberstson W. // *Analyt. Biochem.* — 1967. — Vol. 18, N 2. — P. 333—350.
16. Umehara S., Yukawa A., Shima Y. et al. // *Budapest.* — 1976. — P. 315—323.

Поступила 04.09.86

IDENTIFICATION OF GLYCOSAMINOGLYCANS IN PATIENTS WITH CHRONIC DUODENAL ULCER

M. N. Isaev, P. D. Rabinovich

Medical School, Saratov

Excretion of individual glycosaminoglycans (GAG's) with urine was studied in patients with chronic duodenal ulcer. 31 patient with acute manifestations of the duodenal ulcer, 24 patients within the period of remission as well as 29 practically healthy persons were studied. Column chromatography on cellulose was used for separation of a mixture containing keratan sulfate, hyaluronic acid, heparan sulfate, chondroitin-4 and -6-sulfates, dermatan sulfate and heparin. During the acute period of duodenal ulcer daily excretion of all the individual GAG's with urine was decreased (especially distinct for the fraction of chondroitin-6-sulfate) as compared with excretion of these carbohydrates in healthy persons. The level of GAG excretion was increased distinctly, exceeding the values found in healthy persons, during the remission. Excretion of chondroitin-6-sulfate and keratan sulfate was markedly increased in these cases.

УДК 616-036.882-08-036.82-07:616.36-008.939.626-092.9

В. Д. Конвай, А. В. Лукошкин, В. С. Поспелов

НАРУШЕНИЕ ОБМЕНА ГЛУТАТИОНА В ПЕЧЕНИ РЕАНИМИРОВАННЫХ КРЫС И ЕГО КОРРЕКЦИЯ

ЦНИЛ Омского медицинского института

Экспериментальными исследованиями показано, что в постреанимационном периоде ткань печени недостаточно обеспечена глутатионом вследствие усиленного вовлечения его в процессы инактивации гидроперекисей липидов [1]. Другие факторы, способные влиять на развитие данного явления, в частности изменение интенсивности биосинтеза глутатиона *de novo*, а также возможность коррекции его дефицита, изучены недостаточно.

В настоящей работе изучались обеспеченность ткани печени реанимированных животных глутатионом, интенсивность включения в него ¹⁴C-глицина и возможность коррекции дефицита данного трипептида посредством его введения в организм.

Методика

Исследования проводили на белых крысах-самцах массой 180—200 г, содержащихся в обычных условиях вивария. У наркотизированных эфиром животных вызывали 6,5-минутную асфиксию перекрытием интубационной трубки [4]. Реанимационные мероприятия включали искусственное дыхание в сочетании с непрямым массажем сердца. Контролем служили животные, подвергшиеся тем же воздействиям, что и подопытные, кроме асфиксии и оживления.

Через 90 мин, 6 ч, 1, 3, 7 и 21 сут после реанимации печень наркотизированных животных фиксировали погружением в жидкий азот, после чего крыс декантировали. За 60 мин до умерщвления животным внутривенно вводили ¹⁴C-глицин (3,7 МБк·кг⁻¹ массы тела). Печень гомогенизировали в 4 объемах 0,6 н. раствора хлорной кислоты, осадок отделяли центрифугированием при 1500 g в течение 10 мин. Надосадочную жидкость нейтрализовали 30 % раствором гидроокиси

Показатели обмена глутатиона ($\bar{X} \pm m$) в печени реанимированных крыс ($n = 5 - 6$)

Срок после оживления	Глутатион	Глутатион-дисульфид	Интенсивность включения ^{14}C -глицина в глутатион. $\text{нмп} \cdot \text{ммоль}^{-1}$
	$\text{нмоль} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка		
Контроль	$40,7 \pm 0,9$	$1,95 \pm 0,24$	$4,37 \pm 0,22$
90 мин	$32,1 \pm 3,3^{****}$	$1,99 \pm 0,19$	$11,10 \pm 1,31^{****}$
6 ч	$26,4 \pm 1,3^{****}$	$1,96 \pm 0,22$	$10,20 \pm 0,88^{****}$
24 ч	$60,7 \pm 1,4^{****}$	$1,43 \pm 0,34$	$5,37 \pm 0,15^{***}$
3 сут	$23,7 \pm 1,3^{****}$	$2,02 \pm 0,20$	$4,58 \pm 0,47$
7 сут	$37,0 \pm 1,1^*$	$2,06 \pm 0,32$	$6,46 \pm 0,62^{**}$
21 сут	$41,3 \pm 1,5$	$1,86 \pm 0,19$	$2,37 \pm 1,95$

Примечание. Одна звездочка — $p < 0,05$, две — $p < 0,02$, три — $p < 0,01$, четыре — $p < 0,001$ по сравнению с контролем.

калия, выпавший осадок перхлората калия отбрасывали. Добавлением 0,05 мл насыщенного раствора уксуснокислого свинца к 1 мл хлорнокислого экстракта осаждали глутатион. После центрифугирования (1500 g, 10 мин) осадок отделяли и растворяли его в 0,5 мл 0,5 н. раствора серной кислоты. Аликвоту в 0,04 мл полученного раствора использовали для определения содержания в нем глутатиона [5]. Из оставшегося раствора 0,4 мл нейтрализовали трис(оксиметил)аминометаном и смешивали с 10 мл сцинтилляционной жидкости Брея. Радиометрию проводили на счетчике СБС-2.

В другой серии экспериментов за 15 мин до асфиксии крысам вводили интратрибуциально глутатион ($0,5 \text{ г} \cdot \text{кг}^{-1}$) — группа «глутатион». Животных забивали через 30 мин и 24 ч постреанимационного периода. Результаты исследования этой группы сравнивали с контролем и группой крыс, реанимированных без предварительного введения глутатиона — группа «реанимация».

В ткани печени определяли содержание глутатиона [5], гидроперекисей липидов [7], аскорбата [2], гликогена [9], антиокислительную активность липидов [6], активность супероксиддисмутазы [3], в крови — концентрацию лактата [8] и урата [10]. На 50 животных изучали влияние введения глутатиона на выживаемость.

Полученные данные обработаны статистически, сравнение экспериментальных групп проводили с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Из табл. 1 данных видно, что содержание глутатиона в печени реанимированных животных волнообразно изменяется в течение исследуемого периода. Снижение этого показателя в ранние сроки после оживления сменилось его резким подъемом через 24 ч с повторным снижением на 3-и и 7-е сутки восстановительного периода. Через 21 сут содержание глутатиона в печени реанимированных крыс не от-

личалось от контроля. Уровень глутатиондисульфида во все сроки исследования статистически значимо не изменялся.

Выявленные изменения содержания глутатиона обусловлены, вероятно, изменением его вовлечения в реакции инактивации гидроперекисей липидов и не связаны с изменением процессов его синтеза. Последнее подтверждается динамикой интенсивности включения ^{14}C -глицина в глутатион.

Интенсивность включения глицина через 90 мин и 6 ч восстановительного периода более чем в 2 раза превышает соответствующие величины у контрольных животных. Вместе с тем через сутки после оживления, когда содержание глутатиона резко возрастает, на 25 % превышая исходный уровень, интенсивность включения ^{14}C -глицина снижается по сравнению с предыдущим сроком исследования, достоверно превышая, однако, уровень контроля. Дальнейшая динамика интенсивности включения ^{14}C -глицина в глутатион также носит волнообразный характер, как и изменение содержания в ткани этого трипептида, но обратным знаком.

Таким образом, увеличение синтеза глутатиона de novo не приводит к ликвидации его дефицита в печеночной ткани, а лишь поддерживает, вероятно, его уровень при усиленном вовлечении трипептида в реакции инактивации гидроперекисей липидов.

Исходя из изложенного, определенный интерес представляет возможность поддержания оптимального уровня глутатиона в ткани печени за счет введения экзогенного препарата.

Показатели перекисного окисления липидов и энергетического обмена ($\bar{X} \pm m$) у реанимированных крыс ($n = 6$)

Показатели	Группа животных		
	контроль	«реанимация»	«глутатион»
Через 30 мин после оживления			
Печень:			
глутатион, нмоль·мг ⁻¹ белка	39,6±1,1	33,5±1,9*	39,2±1,1**
антиокислительная активность липидов, мэкв·мг ⁻¹ липидов	7,24±0,24	5,53±0,34*	6,38±0,26*
гидроперекиси липидов, нмоль·мг ⁻¹ липидов	2,91±0,22	6,43±0,62*	3,59±0,15**
гликоген, мкг·мг ⁻¹ белка	622±82	275±68*	247±81*
Кровь:			
лактат, ммоль·л ⁻¹	3,30±0,12	7,69±0,80*	6,03±0,33*
урат, ммоль·л ⁻¹	123±7	259±9*	207±11**
Через 24 ч после оживления			
Печень:			
антиокислительная активность липидов, мэкв·мг ⁻¹ липидов	7,24±0,24	6,22±0,28*	7,14±0,39
аскорбат, нмоль·мг ⁻¹ белка	12,8±0,7	9,9±0,7*	11,4±0,8
супероксиддисмутаза, ед·мг ⁻¹ белка	15,1±0,9	17,9±0,6*	16,3±0,7
гидроперекиси липидов, нмоль·мг ⁻¹ липидов	2,91±0,22	3,64±0,12*	2,92±0,15**
гликоген, мкг·мг ⁻¹ белка	622±82	175±43*	345±84*
Кровь:			
лактат, ммоль·л ⁻¹	3,30±0,12	5,31±0,55*	3,68±7,9
урат, ммоль·л ⁻¹	123±7	152±7*	120±8**

Примечание. Одна звездочка — достоверное различие с контролем, две — с группой «реанимация».

В экспериментах с введением глутатиона перед асфиксией обнаружено отсутствие снижения его содержания в печени реанимированных крыс (табл. 2). Через 30 мин после оживления антиокислительная активность липидов в этой группе животных на 15,4 % превышает такую в группе «реанимация». Содержание гидроперекисей липидов у реанимированных на фоне введения глутатиона крыс существенно ниже (на 44,2 %).

Представленные результаты показывают, что восстановление количества глутатиона в ткани печени способствует более эффективной инактивации свободных радикалов, обеспечивая лучшую сохранность фонда тканевых антиоксидантов. Кроме того, лучшая обеспеченность глутатином гепатоцитов создает благоприятные условия для эффективной инактивации гидроперекисей липидов.

Вместе с тем в этот период нами не обнаружено выраженного влияния введения экзогенного глутатиона на уг-

леводный обмен. Содержание гликогена в ткани печени, концентрация лактата в крови животных группы «глутатион» не отличается от этих показателей у крыс группы «реанимация». Однако достоверное снижение содержания в крови реанимированных на фоне введения глутатиона животных урата указывает на некоторое уменьшение катаболизма пуриновых мононуклеотидов по сравнению с крысами группы «реанимация».

Благоприятное влияние введения экзогенного глутатиона отмечено и через 24 ч после оживления. В этот период у крыс группы «реанимация» увеличивается активность супероксиддисмутазы, снижается антиокислительная активность липидов, содержание в ткани печени аскорбата, а также гликогена. Количество гидроперекисей липидов в печеночной ткани, напротив, существенно больше, чем в контроле. В крови этой группы животных накапливаются лактат и урат.

У крыс, реанимированных на фоне

предварительного введения глутатиона, через 24 ч восстановительного периода указанные изменения либо выражены в меньшей степени, либо отсутствуют (см. табл. 2), что обуславливает снижение интенсивности свободнорадикальных процессов и в этот период исследования. Последнее предотвращает усиленное образование гидроперекисей липидов, содержание которых в гепатоцитах крыс группы «глутатион» не отличается от такового в контроле. Меньшая степень перекисидации мембранных структур способствует, по-видимому, более эффективной генерации АТФ митохондриями, чем снижает чрезмерную стимуляцию гликолиза и повышенный расход запасов углеводов. Это положение подтверждается более высоким содержанием гликогена в печени и снижением до контрольных концентраций лактата и урата в крови крыс группы «глутатион» по сравнению с группой «реанимация».

Таким образом, усиление синтеза глутатиона *de novo* в печени реанимированных крыс не предотвращает развития его дефицита. Введение экзогенного препарата перед асфиксией не только уменьшает интенсивность перекисидации мембранных структур, но и способствует более эффективной функции систем энергообеспечения. Установлено, кроме того, существенное (в 2,8 раза, $p < 0,001$) снижение летальности этих животных за весь период наблюдения (21 сут).

1. Конвай В. Д., Лукошкин А. А., Смирнова В. Б. // Вопр. мед. химии. — 1982. — № 4. — С. 42—46.
2. Соколовский В. В., Лебедева Л. В., Лизлун Т. В. // Лаб. дело. — 1974. — № 3. — С. 160—162.
3. Чумаков В. П., Осинская Л. Ф. // Вопр. мед. химии. — 1979. — № 3. — С. 261—266.
4. Шим Н. В. // Патогенез и экспериментальная терапия терминальных состояний. — Омск, 1979. — С. 57—62.
5. Шмакотина З. В., Уксусников В. П. // Лаб. дело. — 1968. — № 4. — С. 243.
6. Glavind J. // Acta chem. scand. — 1963. — Vol. 173. — P. 1635—1640.
7. Hicks M., Gebicki J. M. // Analyt. Biochem. — 1979. — Vol. 99. — P. 249—253.
8. Hohorst H.-J. // Methoden der enzymatischen Analyse / Hrsg. H. U. Bergmeyer. — Weinheim, 1970. — S. 1425—1429.
9. Kemp A., Kils van Heinincen A. J. M. // Biochem. J. — 1954. — Vol. 56, N 4. — P. 646—648.
10. Otelea G., Manguica M., Costescu R. // Timisoara Med. — 1976. — Vol. 21, N 2. — P. 90—94.

Поступила 08.09.86

IMPAIRMENT OF GLUTATHIONE METABOLISM IN LIVER TISSUE OF RATS AFTER RESUSCITATION AND ITS CORRECTION

V. D. Konvay, A. V. Lukoshkin, V. S. Pospelov

Medical School, Omsk

Elevated synthesis of glutathione in liver tissue of rats after resuscitation did not exclude its deficiency in the animals. Administration of exogenous glutathione before asphyxia decreased the rate of structural membrane lipids peroxidation as well as contributed to more effective function of energy generation systems.

УДК 616.633.1:577.152.32]-078.73

Н. А. Ушакова, Е. В. Казлас, Д. М. Беленький, И. С. Лукомская

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНТИТЕЛ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕЙТРАЛЬНОЙ И КИСЛОЙ α -ГЛЮКОЗИДАЗ МОЧИ ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

В моче человека содержатся две α -глюкозидазы — нейтральная и кислая (лизосомная), определение активности которых имеет существенное значение для диагностики поражения почек [2, 3] и гликогеноза II типа [6, 9]. Активность α -глюкозидазы повышается при поражении почек, коррелирует с тяжестью заболевания, в связи с чем измерение ее активности может быть использовано для диагностики поражения почек и контроля за эффектив-

ностью проводимой терапии [2, 3]. При гликогенозе II типа активность α -глюкозидазы в моче резко снижена [6]. Определение ее активности в моче позволяет не только установить диагноз заболевания, но и дифференцировать его форму [6, 9].

Активность нейтральной α -глюкозидазы проявляется в широком диапазоне рН [1]. Величина активности фермента при рН 4,0—4,5 составляет 60—70 % от активности при оптимуме рН

(5,5—6,8). Кислая α -глюкозидаза имеет оптимум pH 4,0—4,5, и активность ее при pH 6,5—7,0 составляет 10—15 % от активности при pH 4,0—4,5 [8]. Содержание кислой и нейтральной α -глюкозидаз в моче зависит от возраста и характера патологии [2, 3, 9]. Проявление значительной активности нейтральной α -глюкозидазы при pH 4,0—4,5 и высокая активность фермента в моче мешают достоверному определению кислой α -глюкозидазы, особенно в тех случаях, когда ее активность по тем или иным причинам снижена. В то же время высокая активность кислой α -глюкозидазы в моче сказывается на точности измерения активности нейтральной формы этого фермента [8]. Делались попытки [9] определять активность кислой α -глюкозидазы с целью диагностики гликогеноза II типа в присутствии KCl в высоких концентрациях (4 M), оказывающего активирующее действие на кислую α -глюкозидазу и значительно ингибирующую нейтральную форму фермента, особенно при pH 4,0. Однако такой способ определения приводит к получению неточных величин активности фермента.

Достоверное измерение активности кислой и нейтральной α -глюкозидаз в моче возможно при применении антител к обоим ферментам.

Целью настоящего исследования была разработка метода дифференциального определения активности обоих ферментов в моче здоровых и больных людей с использованием антител к этим ферментам.

Методика

Активность нейтральной и кислой α -глюкозидаз определяли по скорости образования 4-метилумбеллиферона при расщеплении 4-метилумбеллиферил- α -D-глюкопиранозид. Инкубационная смесь для определения нейтральной α -глюкозидазы состояла из 20 мкл исследуемой пробы и 200 мкл 0,1 M натрий-фосфатного буфера pH 6,5 содержащего 1,1 mM 4-метилумбеллиферил- α -D-глюкопиранозид (фирма «Koch-Light», Англия). Инкубационная смесь для измерения активности кислой α -глюкозидазы состояла из 20 мкл исследуемой пробы и 200 мкл 0,1 M натрий-ацетатного буфера pH 4,5, содержащего 1,1 mM 4-метилумбеллиферил- α -D-глюкопиранозид. Пробу инкубировали в течение 30 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 4 мл 0,1 M Na₂CO₃. Флюоресценцию образовавшегося 4-метилумбеллиферона измеряли на флюориметре «Биан-130» (СССР); λ возбуждения 365 нм, λ испускания 436 нм.

Мочу собирали утром с 7 до 9 ч натощак и центрифугировали при 16 000 g, а в неко-

торых случаях при 120 000 g в течение 60 мин для удаления возможных фрагментов клеток, лейкоцитов и т. д. Надосадочную жидкость концентрировали в 6—8 раз, используя фильтр РМ-10 (фирма «Amicon», Голландия). Концентрированную мочу диализовали против 25 mM NaCl, содержащего 1 mM ЭДТА, pH 6,7, в течение 1 сут при 4°C и использовали для определения в ней активности кислой и нейтральной α -глюкозидаз до и после осаждения ферментов соответствующими антителами.

Антисыворотку к нейтральной α -глюкозидазе получали иммунизацией кроликов гомогенным препаратом нейтральной α -глюкозидазы из щеточной каймы почек человека (мембраносвязанная форма фермента) [4]. Антисыворотку к кислой α -глюкозидазе получали иммунизацией кроликов гомогенным препаратом кислой α -глюкозидазы из печени человека [5]. Антитела к кислой α -глюкозидазе были получены из соответствующей антисыворотки путем хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе [7] и последующей гель-фильтрации через сфэрозу 6В. Полученная фракция антител содержала 5,8 мг белка в 1 мл.

Для последовательного осаждения кислой и нейтральной α -глюкозидаз к 200 мкл диализованной мочи добавляли 200 мкл 0,04 M натрий-фосфатного буфера pH 6,7, содержащего 0,3 M NaCl, 0,2 мг бычьего сывороточного альбумина и антитела (0,58 мг) к кислой α -глюкозидазе. Пробу инкубировали в течение 30 мин при 37°C, а затем 2 ч при 4°C, после чего центрифугировали в течение 30 мин при 2500 g при 4°C. К 100 мкл надосадочной жидкости приливали 100 мкл 0,02 M натрий-фосфатного буфера pH 6,7, содержащего 0,15 M NaCl, 0,05 мг бычьего сывороточного альбумина и антисыворотку к нейтральной α -глюкозидазе (разведение 1:8). Пробу инкубировали в течение 30 мин при 37°C и оставляли на ночь при 4°C, затем центрифугировали в течение 30 мин при 2500 g при 4°C. В надосадочных жидкостях, полученных после первого и второго осаждения ферментов антителами, определяли активность кислой и нейтральной α -глюкозидаз.

Для последовательного осаждения сначала нейтральной, а затем кислой α -глюкозидазы при первом осаждении использовали антисыворотку к нейтральному ферменту (разведение 1:8), а при второй иммунопреципитации — антитела к кислой α -глюкозидазе (0,15 мг в пробе).

Результаты и обсуждение

Для выяснения возможности использования антител к нейтральной и кислой α -глюкозидазам в целях дифференциального определения активности обоих ферментов в моче проводили последовательное осаждение кислой и нейтральной форм ферментов соответствующими антителами. В табл. 1 приведены результаты определения активности нейтральной α -глюкозидазы после осаждения кислой α -глюкозидазы антителами к кислой форме фермента. Высокая активность кислой

Таблица 1

Определение нейтральной α -глюкозидазы в моче человека после иммунопреципитации кислой α -глюкозидазы

Обследованные	рН реакционной среды	Активность α -глюкозидазы, нмоль 4-метилумбеллиферона в час на 1 мл мочи		
		исходная моча	надосадочная жидкость	
			после иммунопреципитации кислой α -глюкозидазы	после последующей иммунопреципитации нейтральной α -глюкозидазы
Норма 1	4,5	869,4	106,9	0
	6,5	277,7	162,5	0
2	4,5	911,1	293,0	10,7
	6,5	558,3	443,0	14,7
Большой М., хронический гломерулонефрит	4,5	1010,0	353,0	14,2
	6,5	653,0	521,0	14,9

α -глюкозидазы при незначительной активности нейтральной формы фермента (например, норма 1) затрудняет оценку величины активности нейтральной формы фермента. Последняя, может быть достоверно определена только после осаждения кислой α -глюкозидазы антителами к кислой форме фермента. В надосадочной жидкости при этом остается нейтральная α -глюкозидаза, что подтверждается более высокой активностью фермента при рН 6,5 по сравнению с его активностью при рН 4,5, а также практически полным осаждением активности фермента из надосадочной жидкости антисывороткой к нейтральной α -глюкозидазе (см. табл. 1).

Как следует из данных табл. 2, достоверное определение в моче активности кислой α -глюкозидазы возможно только при относительно низкой активности нейтральной формы фермента (например, норма 1). В тех случаях, когда измеряемая в моче при рН 6,5 активность α -глюкозидазы выше, чем при рН 4,5, что отмечается при поражении почек [3] и характерно для гликогеноза II типа [9], судить о наличии и величине активности кислой α -глюкозидазы представляется крайне затруднительным.

Из данных табл. 2 следует, что наличие кислой α -глюкозидазы в моче и величина ее активности могут быть определены после осаждения нейтрального фермента соответствующей антисывороткой. В надосадочной жидкости при этом остается кислая α -глюкозидаза, что видно из более высокой активности фермента при рН 4,5 по сравнению с его активностью при рН 6,5, а также из данных по осаждению оставшейся в этой надосадочной жидкости активности фермента антителами к кислой α -глюкозидазе (см. табл. 2).

В моче больного М. (см. табл. 2), которая хранилась длительное время при 4°C, отсутствовала кислая α -глюкозидаза, что следует из определения активности α -глюкозидазы после осаждения нейтральной формы фермента антисывороткой к нему и последующего осаждения кислой α -глюкозидазы антителами к ней. Действительно, пос-

Таблица 2

Определение кислой α -глюкозидазы в моче человека с использованием иммунопреципитации нейтральной α -глюкозидазы

Обследованные	рН реакционной среды	Активность α -глюкозидазы, нмоль 4-метилумбеллиферона в час на 1 мл мочи			
		исходная моча	надосадочная жидкость		
			после иммунопреципитации нейтральной α -глюкозидазы	после последующей иммунопреципитации кислой α -глюкозидазы	
Норма 1	4,5	869,4	800,0	13,9	
	6,5	277,4	102,8	6,8	
2	4,5	911,1	777,1	8,3	
	6,5	558,3	114,3	5,1	
Больные хроническим гломерулонефритом	Г.	4,5	176,1	118,1	7,2
		6,5	151,2	22,4	1,5
Ч.	4,5	267,9	111,2	—	
	6,5	319,3	19,8	—	
Ш.	4,5	282,6	134,5	12,3	
	6,5	282,6	26,7	2,9	
А.	4,5	157,3	31,8	8,0	
	6,5	217,6	7,7	2,3	
М.	4,5	59,9	1,2	1,2	
	6,5	95,2	1,7	1,8	

ле осаждения α -глюкозидазы из мочи антисывороткой к нейтральной α -глюкозидазе в надосадочной жидкости отсутствовал кислый фермент: незначительная активность в надосадочной жидкости была выше при рН 6,5, чем при рН 4,5, что характерно для нейтральной формы фермента, и не осаждалась при последующем добавлении антител к кислой α -глюкозидазе.

Отсутствие в моче больного М. кислой α -глюкозидазы было обусловлено инактивацией этого фермента в процессе длительного хранения мочи, поскольку, как видно из табл. 1, активность кислой α -глюкозидазы в свежесобранной моче больного М. довольно высока.

Таким образом, исследования показали, что использование антител к нейтральной α -глюкозидазе из щеточной каймы почек человека позволяет достоверно определять активность кислой α -глюкозидазы в моче здоровых и больных людей даже в тех случаях, когда активность нейтральной формы фермента в моче значительно превышает активность кислой формы фермента. Одновременное применение антител к обоим ферментам позволяет дифференциально определять активность кислой и нейтральной α -глюкозидаз в смеси. Последовательное применение антител подтверждает точность этих определений.

Авторы выражают глубокую признательность проф. Е. Л. Розенфельд за обсуждение результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лавренова Т. П., Лукомская И. С. // Вопр. мед. химии. — 1983. — № 4. — С. 91—95.

2. Лукомская И. С., Лавренова Т. П., Томила Н. А. и др. // Там же. — 1984. — № 4. — С. 74—78.
3. Лукомская И. С., Лавренова Т. П., Томила Н. А. и др. // Там же. — 1986. — № 5. — С. 112.
4. Лукомская И. С., Ушакова Н. А., Казлас Е. В. // Биохимия. — 1983. — Т. 48. — С. 1810—1819.
5. Belen'ky D. M., Mikhajlov V. J., Rosenfeld E. L. // Clin. chim. Acta. — 1979. — Vol. 93. — P. 365—370.
6. Mehler M., Di Mauro M. D. // Arch. Neurol. — 1976. — Vol. 33. — P. 692—695.
7. Nowotny A. Basic Exercises in Immunochemistry. — Berlin, 1979. — P. 8—12.
8. Schram A. W., Brouwer-Kelder B., Donker-Koopman W. E. et al. // Biochim. biophys. Acta. — 1979. — Vol. 567. — P. 370—383.
9. Soyama K., Ono E., Shimada N. et al. // Clin. chim. Acta. — 1977. — Vol. 77. — P. 61—67.

Поступила 16.06.86

USE OF ANTIBODIES FOR DIFFERENTIAL ESTIMATION OF NEUTRAL AND ACID α -GLUCOSIDASES IN HUMAN URINE UNDER NORMAL AND PATHOLOGICAL CONDITIONS

N. A. Ushakova, E. V. Kazlas, D. M. Belen'ky,
I. S. Lukomskaaya

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

Use of antibodies towards neutral α -glucosidase from human kidney brush border enabled to estimate distinctly the activity of acid α -glucosidase in urine of healthy persons and patients although the activity of neutral enzyme in urine exceeded markedly the acid enzyme activity. Simultaneous use of antibodies to both these enzymes permitted to estimate separately the activity of acid and neutral α -glucosidases in a mixture. Accuracy of these estimations was confirmed after consecutive use of these antibodies.

УДК 616.712-007.24-053.2-07:616.712-1-018.3-008.969.629-074

Т. А. Цветкова, Е. А. Козлов, С. С. Рудаков, А. А. Дельвиц

ЭКСТРАГИРУЕМОСТЬ КОЛЛАГЕНА РЕБЕРНОГО ХРЯЩА И КОЖИ ПРИ ВОРОНКООБРАЗНОЙ ДЕФОРМАЦИИ ГРУДНОЙ КЛЕТКИ У ДЕТЕЙ

НИИ медицинской энзимологии АМН СССР, Москва

Среди заболеваний, связанных с поражением соединительной ткани, наиболее часто встречается воронкообразная деформация грудной клетки (ВДГК), наблюдаемая в той или иной степени у 0,6 % детей [11]. Биохими-

ческие дефекты экстраклеточного матрикса при этом заболевании неизвестны.

Причиной развития ВДГК может быть изменение структуры коллагеновых волокон реберного хряща, обус-

ловленные нарушениями посттрансляционной модификации коллагена. В пользу этого предположения свидетельствуют данные о снижении при этой патологии экскреции с мочой оксинпролинсодержащих пептидов и свободного оксинпролина, являющихся продуктами деградации коллагена [4].

Ввиду сложности процесса коллагена, в котором участвуют 11 ферментов [1], прямой поиск возможной энзимопатии представляется затруднительным. Поэтому для прицельного поиска ферментных нарушений, являющихся этиологическим фактором заболевания, обычно исследуются такие свойства коллагена, как экстрагируемость, содержание внутри- и межмолекулярных поперечных сшивок, степень гидроксирования остатков пролина и лизина, а также уровень гликозилирования остатков оксинлизина.

В настоящей работе нами была изучена экстрагируемость коллагена кожи и хрящей детей, страдающих ВДГК, а также содержание в хрящах гликозаминогликанов.

Методика

Были исследованы 3 группы детей в возрасте 5—8 лет (по 4 ребенка в группе). 1-ю группу составили больные с изолированной формой ВДГК II или III степени, которая требует хирургической коррекции грудной клетки. Во 2-ю группу вошли больные с синдромальной формой ВДГК, т.е. с сочетанием ВДГК и синдрома Элерса—Данло. 3-я, контрольная, группа — дети без отклонений в развитии грудной клетки и заболеваний, связанных с поражением соединительной ткани, погибшие в результате травмы или от лейкоза. В первых 2 группах исследуемый материал был получен при операции по поводу торакопластики, а в контрольной группе — при аутопсии. Материал до использования хранили при -20°C .

Экстракция коллагена из хряща и кожи. Реберный хрящ освобождали от надхрящницы, нарезами пластинками толщиной 0,5 мм и экстрагировали при комнатной температуре, перемеивая с 4 М раствором гуанидин-гидрохлорида, содержащим ЭДТА в концентрации 0,05 М, фенолметилсульфонилфторид, йодацетат и 6-аминокапроат в концентрации 0,005 М (фракция 1, гуанидиновый экстракт). Пластинки хряща промывали водой и измельчали на холоде последовательно в гомогенизаторе «Vir-Tis-45» и стеклянном гомогенизаторе. Кислоторастворимый коллаген (фракция 2) получали экстракцией 0,5 М раствором уксусной кислоты в течение 24 ч на холоде при перемеивании. Остаток отделяли центрифугированием (1 ч при 50 000 г и 4°C) и экстрагировали в тех же условиях 0,1 % раствором пепсина в 0,5 М уксусной кислоте (фрак-

ция 3, пепсиновый экстракт). Нерастворимый остаток (фракция 4) отделяли центрифугированием в тех же условиях.

Порции диализованного против воды гуанидинового экстракта, кислоторастворимого коллагена, пепсинового экстракта и нерастворимого остатка гидролизывали в запаянных ампулах в 6 н. HCl 20 ч при 105°C . Гидролизаты высушивали в вакууме над целочью, растворяли сухой остаток в воде и определяли содержание оксинпролина колориметрической реакцией с п-диметиламинобензальдегидом [2]. Количество коллагена в пробах рассчитывали, принимая содержание оксинпролина в коллагене равным 13 % [6].

Экстракцию коллагена из кожи проводили аналогичным образом, исключая экстракцию раствором гуанидин-гидрохлорида.

Для определения содержания коллагена в образцах хряща последние высушивали при 105°C до постоянной массы, гидролизывали в 6 н. HCl и определяли содержание оксинпролина, как описано выше.

Для определения в хряще уроновых кислот высушенные образцы хряща гидролизывали в 6 н. H_2SO_4 и определяли количество уроновых кислот с помощью колориметрической реакции с карбазолом [5].

Для определения содержания α - и β -цепей во фракции уксуснокислого экстракта коллаген осаждали NaCl в конечной концентрации 2 М. Осадок отделяли центрифугированием (20 000 г 30 мин), растворяли в 0,5 М уксусной кислоте, диализывали против 0,1 М уксусной кислоты и лиофилизировали. Полученный препарат подвергали электрофорезу в 5 % акриламидном геле, используя буферную систему по Леммли [9]. Гели окрашивали в 0,15 % растворе Serva Blau R и после удаления избытка красителя сканировали на хромоскане «Joice-Lachle-201» при длине волны 595 нм.

Результаты и обсуждение

Результаты определения общего содержания коллагена и соотношения фракций растворимого и нерастворимого коллагена представлены в табл. 1. Было обнаружено, что в реберном хряще детей с изолированной и синдромальной формами ВДГК общее содержание коллагена в расчете на 1 г влажной массы ткани увеличено на 45—60 %. Доля растворимого коллагена во всех исследованных фракциях хрящей больных ВДГК достоверно снижена ($p < 0,01$) и, соответственно на 25—28 % увеличено относительно содержания нерастворимого коллагена. Следует отметить, что относительное содержание коллагена во фракциях гуанидинового, уксусно-кислого и пепсинового экстрактов хрящей детей с изолированной формой ВДГК и ВДГК на фоне синдрома Элерса—Данло достоверно не различается ($p > 0,05$). Эти данные позволяют предположить, что накопление нерастворимого коллагена является общим звеном в моле-

Соотношение фракций растворимого и нерастворимого коллагена в реберном хряще детей с ВДГК и детей контрольной группы ($M \pm m$)

Исследуемая группа	Коллаген, мг на 1 г хряща (влажная масса)	Распределение коллагена по фракциям, %				Соотношение цепей α/β
		фракция 1	фракция 2	фракция 3	фракция 4	
3-я	65,0 \pm 3,67	4,66 \pm 0,94	15,2 \pm 2,07	26,8 \pm 0,50	53,3 \pm 1,45	13,4 \pm 1,01
1-я	95,3 \pm 5,85	1,21 \pm 0,08	2,81 \pm 0,40	14,6 \pm 1,00	81,6 \pm 0,91	11,1 \pm 1,03
2-я	105 \pm 8,66	1,11 \pm 0,16	3,51 \pm 0,97	17,1 \pm 1,53	78,2 \pm 3,93	11,3 \pm 1,14

кулярной патологии изолированной и синдромальной форм ВДГК.

Согласно данным литературы [3, 12], с возрастом наблюдается увеличение доли неэкстрагируемого коллагена. Ввиду одинакового возраста детей контрольной и опытных групп наблюдаемое нами увеличение относительного количества неэкстрагируемого коллагена при ВДГК можно трактовать как один из признаков преждевременного старения хряща. Это наблюдение согласуется с данными морфологического исследования хряща при ВДГК.

Уменьшение экстрагируемого коллагена хряща было выявлено при диабете [12], тогда как при остеоартрозе экстрагируемость коллагена увеличивается [13].

При определении содержания коллагена в хрящевой ткани ребра как суммы всех 4 фракций в расчете на 1 г влажной ткани в обеих группах детей с ВДГК выявлено его повышение по сравнению с контрольной группой (см. табл. 1). При этом также не отмечено достоверных различий между изолированной формой ВДГК и ее сочетанием с синдромом Элерса — Данло. Наблюдаемое увеличение содержания коллагена в хряще при ВДГК можно связать как с изменением абсолютного содержания коллагена, так и с изменением количества воды, удерживаемой хрящевой тканью. Для решения этого вопроса было определено содержание коллагена в препаратах хряща, высушенных при 105 $^{\circ}$ C. Данные, представленные в табл. 2, указывают на равное содержание коллагена в расчете на сухую массу хряща для всех исследованных групп детей, что свидетельствует об уменьшении способности хряща при ВДГК удерживать воду. Поскольку основную роль в иммобилизации воды хрящевой тканью играют гликозаминогликаны, то было

определено также количество этих компонентов межклеточного матрикса по содержанию урановых кислот в расчете на сухую массу ткани. Достоверных различий по этому показателю между контрольной группой и детьми с ВДГК выявлено не было (см. табл. 2). Эти данные позволяют предположить качественные изменения протеогликанов в хрящах детей с ВДГК. Таким образом, наблюдаемое при ВДГК увеличение содержания коллагена в расчете на влажную массу хряща отражает уменьшение способности матрикса хрящей больных детей удерживать воду, что также можно трактовать как один из признаков, указывающих на преждевременное старение хряща.

Нельзя исключить, что ВДГК является системным заболеванием, при котором, помимо патологических изменений в реберном хряще, отмечаются морфологически менее выраженные изменения в других видах соединительной ткани. В связи с этим было проведено сравнение экстрагируемости коллагена кожи детей, страдающих ВДГК, и детей контрольной группы. Результаты, представленные в табл. 3, указывают на достоверное снижение при ВДГК фракции неэкстрагируемого коллагена, происходящее в основном за счет увеличения почти в 2 раза доли коллагена, экстрагируемого 0,5 М уксусной кислоты.

Таблица 2

Содержание коллагена и урановых кислот в реберном хряще детей с ВДГК и детей контрольной группы, мг на 1 г сухой ткани

Исследуемая группа	Коллаген	Урановые кислоты
3-я	562 \pm 16,1	32,7 \pm 4,93
1-я	557 \pm 5,00	35,3 \pm 6,59
2-я	556 \pm 10,9 $p > 0,05$	36,5 \pm 1,25 $p > 0,05$

Соотношение фракций растворимого и нерастворимого коллагена в коже детей с ВДГК и детей контрольной группы ($M \pm m$)

Исследуемая группа	Растворимый коллаген, %		Нерастворимый коллаген, %	Соотношение цепей α/β
	0,5 М уксусная кислота	0,1 % пепсин в 0,5 М уксусной кислоте		
3-я	$7,95 \pm 1,01$	$48,6 \pm 3,64$	$43,4 \pm 3,89$	$2,35 \pm 0,11$
1-я	$15,4 \pm 1,45$ $p < 0,005$	$50,9 \pm 4,70$ $p > 0,05$	$33,6 \pm 5,30$ $p > 0,05$	$1,96 \pm 0,17$ $p < 0,05$

Ранее повышенная экстрагируемость коллагена кожи была обнаружена при таких системных заболеваниях, как синдром Марфана [10] и синдром Элерса — Данло у человека [7] и собак [8].

Одной из наиболее вероятных причин изменения экстрагируемости коллагена является изменение количества межмолекулярных сшивок. В связи с этим было определено содержание α - и β -цепей коллагена в уксуснокислых экстрактах из хряща и кожи. Несмотря на значительные различия в экстрагируемости коллагена реберного хряща в норме и при ВДГК (см. табл. 1), мы не обнаружили достоверных различий в соотношении α - и β -цепей. Отсутствие корреляции между экстрагируемостью коллагена и соотношением в кислоторастворимом коллагене мономерных и димерных цепей может быть объяснено недостаточной чувствительностью метода определения или наличием других факторов, влияющих на экстрагируемость коллагена. По данным литературы, увеличение экстрагируемости коллагена кожи собак при синдроме Элерса — Данло сопровождается значительным увеличением относительного содержания мономеров коллагена [8]. С другой стороны, в легочной ткани больного с синдромом Элерса — Данло соотношение α - и β -цепей отличается незначительно, несмотря на резкое увеличение экстрагируемости коллагена [7].

ЛИТЕРАТУРА

1. Дельвиц А. А. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 2. — С. 2.

2. Замираева Т. В. // Современные методы в биохимии. — М. — 1977. — С. 262.
3. Канунго М. Биохимия старения: Пер. с англ. — М., 1982. — С. 157.
4. Прозоровская Н. Н., Глиняная С. В., Дельвиц А. А. и др. // Вопр. мед. химии. — 1987. — № 3. — С. 59—61.
5. Biller T., Muir H. // *Analyt. Biochem.* — 1962. — Vol. 4. — P. 330.
6. Burleigh A. J., Barrell A. J., Lazarus G. S. // *Biochem. J.* — 1974. — Vol. 137. — P. 373.
7. Clark J. G., Khun III Ch., Uitto O. J. // *Amer. Rev. resp. Dis.* — 1980. — Vol. 122. — P. 971.
8. Counts D. F. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1980. — Vol. 626. — P. 208.
9. Laemmli U. K. // *Nature.* — 1970. — Vol. 227. — P. 630.
10. Priest R. E., Moiddin J. P., Priest J. H. // *Ibid.* — 1973. — Vol. 245. — P. 264.
11. Raviash M. // *Congenital deformities of the chest wall and their surgical corrections.* — New York, 1976. — P. 176.
12. Schnider S. L., Kohn R. R. // *Exp. Geront.* — 1982. — Vol. 17. — P. 185.
13. Vigon G., Vigon E. // *Acta rhum. belg.* — 1977. — Vol. 1. — P. 9.

Поступила 08.09.86

EXTRACTIBILITY OF COSTAL CARTILAGE AND SKIN COLLAGEN FROM CHILDREN WITH FUNNEL CHEST

T. A. Tzvetkova, E. A. Kozlov, S. S. Rudakov, A. A. Del'vig

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

Content of collagen and relative content of unextractible collagen were increased by 35 % and 50 %, respectively, while the content of immobilized water was decreased in costal cartilage of children with the isolated form of funnel chest or with the deformation accompanied by Ehlers-Danlos syndrome. These anomalies may be considered as indicators of the cartilage premature ageing. In skin of the children with isolated form of funnel chest the ratio of collagen extracted with acetic acid was increased 2-fold.

Е. И. Каленикова, О. Ф. Дмитриева, Н. В. Коробов, С. В. Жуковский,
В. А. Тищенко, В. А. Виноградов

ФАРМАКОКИНЕТИКА ДАЛАРГИНА

ВКНЦ АМН СССР, Москва

Даларгин — первый опиоидный пептидный препарат, используемый в качестве средства лечения язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки. По химической структуре он представляет собой гексапептид Туг-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg.

Изучение *in vivo* судьбы пептидов как экзо-, так и эндогенного происхождения имеет свои особенности. Сложность задачи их выделения из биологического материала и опознавания обуславливает использование меченых пептидов; многокомпонентность получаемых экстрактов приводит к необходимости применения высокоспецифичных методов радиоиммунного и радиорецепторного анализов и (или) хроматографии высокого разрешения.

Данные литературы свидетельствуют о коротких временах полураспределения пептидных гормонов, в том числе опиоидных, исчисляемых минутами [16, 18]. Так, время полураспределения экзогенно вводимого β -эндорфина составляет 2 мин [12, 15]. Определенные замены в структуре молекул эндогенных пептидов позволяют создавать значительно более стабильные их синтетические аналоги; для ДАММЕ, например, имеющую аналогичную мет-энкефалину структуру (Туг-D-Ala-Gly-MePhe-Met(o)-ol), время полураспределения составляет 11 мин, полуэлиминации — 92 мин [11].

Изучение *in vivo* распределения, метаболизма и собственно фармакокинетики короткоживущих опиоидных пептидов и их синтетических аналогов представляет собой этап расшифровки механизма их действия. Задача работы — исследование распределения, метаболизма и фармакокинетики даларгина у крыс с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и радиоизотопного анализа.

Методика

Даларгин синтезирован в лаборатории синтеза пептидов (руководитель — проф. Ти-

тов М. И.) ВКНЦ АМН СССР; тритирование проводили в Институте молекулярной генетики АМН СССР по методике [6]. Кроме тритированного даларгина (12 Ки/ммоль) в работе использовали ^{125}I -даларгин и бычий сывороточный альбумин, меченный ^{125}I (^{125}I -БСА), полученные описанным методом [10] с последующим выделением моноидролизного с помощью ВЭЖХ, а также ^3H -тирозин (7 Ки/ммоль, Institute of isotopes of the Hungarian Academy of Sciences, Будапешт).

Опыты проводили на взрослых крысах-самцах линии Вистар массой около 300 г. ^3H -даларгин вводили внутривенно в дозе 150 мкг/кг в течение 10 с в 0,3 мл физиологического раствора.

Распределение препарата по тканям и его метаболизм изучали после введения в хвостовую вену. Через 1, 4 и 60 мин после введения препарата крыс декапитировали и отбирали аликвоту крови. Затем, вскрыв брюшную полость и грудную клетку, отсекали кусочки органов и тотчас замораживали, погружая в жидкий азот. Образцы хранили до анализа при -20°C .

Чтобы учесть вклад крови в суммарную радиоактивность ткани, у одного животного определяли кровенаполнение исследуемых органов с помощью ^{125}I -БСА, который вводили в хвостовую вену в 0,3 мл физиологического раствора; спустя 1 мин крысу декапитировали, после чего определяли радиоактивность тех же органов и тканей, что и в основном опыте. Кровенаполнение органов (тканей) рассчитывали, соотнося радиоактивность органа (аликвоты ткани) и аликвоты крови.

Фармакокинетику даларгина изучали по образцам крови и мочи наркотизированных и катетеризированных крыс. Для этого крысам под эфирным наркозом вводили полиэтиленовые катетеры в бедренные артерию и вену, а также в мочевой пузырь; производили трахеостомию. На протяжении опыта наркоз поддерживали этиминалом натрия в суммарной дозе 30 мг/кг, периодически вводимым в бедренную вену; следили за постоянством температуры тела животного ($37 \pm 0,1^\circ\text{C}$). ^3H -даларгин вводили через катетер в бедренной вене. Образцы крови по 0,2 мл брали через артериальный катетер; кровопотерю восполняли физиологическим раствором.

Подготовка образцов. Для определения суммарной радиоактивности образцы тканей солиобилизировали в гиамигидроксиде (Inter-technic, США) в соотношении 100 мкл на 10 мг ткани при 37°C до полного растворения и затем аликвоту вносили в сцинтиллятор, содержащий 4,0 г ППО и 0,1 мг ПОПОП в 1 л толуола.

Спектр метаболитов в тканях и жидкостях изучали с применением ВЭЖХ. Ткань измельчали в ступке в жидком азоте и полученный тонкий порошок сразу экстрагировали смесью для экстракции коротких пептидов [8], в соотношении 1 : 5 (масса/объем). После центри-

Распределение радиоактивности по тканям крысы после внутривенного введения ³H-даларгина

Время после введения, мин	ДРМ на 10 мг ткани · 10 ³																	
	почки		печень		легкие		кровь		сердце		селезенка		желудок		скелетная мышца		мозг	
	x _i	\bar{x}	x _i	\bar{x}	x _i	\bar{x}	x _i	\bar{x}	x _i	\bar{x}	x _i	\bar{x}	x _i	\bar{x}	x _i	\bar{x}	x _i	\bar{x}
1	588		468		130		200		80		69		70		50		8	
	440	596	200	323	160	151	136	170	72	76	60	65	38	60	32	41	6	7
	760		300		162		174		76		66		70		40		7	
4	500		270		83		70		60		60		66		28			
	550	525	232	274	88	84	80	79	66	63	56	58	86	79	34	44	Не определяли	
	560		320		80		86		62		58		85		71		29	
60	340		260		92		78		67		150		150		20		15	
	130	243	138	213	64	86	63	71	55	64	134	155	130	193	16	26	20	31
	260		240		102		70		70		180		300		41			

Примечание. Приведены величины радиоактивности аликвот наполненных кровью органов. Использовали по 3 крысы на каждую временную точку.

фугирования надосадочную жидкость упаривали досуха под вакуумом на «Vortex-Evaporator» («Buchler», США), растворяли в элюенте для хроматографического анализа и аликвоту вносили в хроматограф. Образцы крови и мочи собирали непосредственно в экстракционную смесь [8], центрифугировали и вносили на колонку.

ВЭЖХ. В работе использован жидкостный хроматограф высокого давления фирмы «Altech» модель 342 с детектором по оптической плотности 2158 Uvicord SD (LKB, Швеция), $\lambda=226$ нм. Анализ проводили на колонке Si 100: Polyol: RP 18 («Serva», ФРГ), 4,6×250 мм, размер частиц 5 мкм, с предколонкой, заполненной RP Pellicular (Alltech Associates, США), 4,6×50 мм. Разделение вели в градиенте ацетонитрила от 5 до 95 % в 0,1 % водном растворе трифторуксусной кислоты. Скорость потока элюента через колонку составляла 1,5 мл/мин. Элюат собирали по минутно в сцинтилляционные флаконы со сцинтиллятором Брея, используя коллектор фракций Supertrac (LKB, Швеция). Радиоактивность всех образцов определяли на жидкостном сцинтилляционном счетчике LS 6800 («Beckman», США).

Результаты и обсуждение

1. *Распределение радиоактивности по органам и тканям крысы после введения ³H-даларгина.* Через 1 мин после введения наиболее высокий уровень радиоактивности определялся в почках. Радиоактивность печени была в 2 раза ниже. Радиоактивность остальных тканей снижалась в ряду: кровь — легкое — сердце — селезенка — желудок — скелетная мышца (табл. 1). Радиоактивность ткани мозга на первой минуте практически полностью соответствовала расчетной радиоактивности находящейся в ней крови (табл. 2), что является свидетельством непроницаемости для да-

ларгина гематоэнцефалического барьера.

Спустя 4 мин после введения препарата радиоактивность всех исследуемых тканей несколько снижалась, кроме ткани желудка, в которой величина радиоактивности практически не изменилась.

Через 60 мин радиоактивность ткани почек составляла примерно 1/2, а

Таблица 2

Распределение радиоактивности (через 1 мин) после внутривенного введения даларгина по внутренним органам крысы

Орган	Кровенаполненные ткани, мкл/10 мг*	Радиоактивность ткани без крови, ДРМ/10 мг · 10 ³ **		Радиоактивность органа без крови, % от дозы	
		x _i	\bar{x}	x _i	\bar{x}
Почки	0,12	568	576	3,9	4,0
		420		2,9	
		740		5,1	
Печень	0,17	439	294	10,8	7,2
		171		4,2	
		271		6,7	
Легкие	0,37	67	88	0,4	0,4
		97		0,6	
		99		0,3	
Сердце	0,17	51	47	0,12	0,11
		43		0,10	
		47		0,11	
Желудок	0,03	65	54	0,3	0,3
		33		0,2	
		65		0,3	
Мозг	0,04	—	—	—	—
		—		—	
		—		—	
Кровь	—	200	170	—	12,0
		136		—	
		174		—	

Примечание. Одна звездочка — данные 1 опыта, две звездочки — данные 3 опытов.

печени — $\frac{2}{3}$ от величины, определяемой через 1 мин после введения даларгина. Уровень радиоактивности в крови, легких и скелетной мышце через 4 и 60 мин был практически одинаков, а в тканях желудка и селезенки он возрастал примерно втрое. Исследование метаболического спектра тканей желудка и селезенки (см. следующий раздел) через 60 мин после введения не выявило присутствия в них даларгина или его фрагментов в сколько-нибудь значительных количествах, способных обусловить подобное накопление метки. Оставалось допустить возможность образования и накопления в данных тканях продуктов повторного включения ^3H -тирозина, освобождающегося в процессе метаболизма даларгина. Правомочность данного предположения показал эксперимент, в котором при соблюдении тех же условий одному животному вводили ^{125}I -даларгин. В отличие от ^3H -тирозина ^{125}I -тирозин не способен участвовать в биосинтезе пептидов и белков и, следовательно, радиоактивность после введения ^{125}I -даларгина может определяться лишь им самим или его тирозинсодержащими фрагментами. Из табл. 3 с очевидностью следует, что введение ^{125}I -даларгина не вызвало аккумуляции радиоактивности ни в одном из исследуемых органов. Более того, в селезенке от 4-й до 60-й минуты происходит 3-кратное, а в печени — 9-кратное снижение радиоактивности. Исходя из полученных данных, можно заключить, что через 1 ч после внутривенного введения даларгина радиоактивность тканей обусловлена наличием в них продуктов повторного включения меченного тритием тирозина.

Показано, что даларгин ускоряет процессы регенерации в тканях [2, 7], что должно сопровождаться активацией анаболических процессов, в том числе и процессов биосинтеза белков и пептидов. В связи с этим было необходимо разрешить вопрос, является ли накопление ^3H -содержащих продуктов в селезенке и желудке отражением нормального процесса белкового обмена или оно вызвано введением препарата.

С этой целью проводили косвенную оценку интенсивности процессов утилизации экзогенного тирозина в отсутствие влияния даларгина на одном

Таблица 3
Распределение ^{125}I -даларгина после внутривенного введения

Орган	Радиоактивность, СРМ/10 мг	
	через 4 мин	через 60 мин
Печень	940	110
Селезенка	320	100
Желудок	250	230
Двенадцатиперстная кишка	410	220
Поджелудочная железа	430	90
Кровь	880	250

животном, вводя в оговоренных выше условиях ^3H -тирозин. Данные, приведенные в табл. 4, свидетельствуют, что сам ^3H -тирозин в дозе 75 мкг/кг от 4-й до 60-й минуты после внутривенного введения не накапливается ни в одном из исследуемых органов. Таким образом, обнаруженное в желудке и селезенке накопление ^3H -содержащих продуктов ресинтеза является следствием введения даларгина.

Сравнивая распределение радиоактивности через 1 и 60 мин после введения препарата, можно заключить, что наиболее активными «акцепторами» даларгина и его метаболитов являются ткани почек, печени и легкого; в то же время по количеству ресинтезированных ^3H -содержащих продуктов к тканям почек и печени приближаются ткани желудка и селезенки, что, по-видимому, обусловлено даларгинном.

Метаболизм даларгина. Спектр ^3H -содержащих метаболитов даларгина в крови и тканях изучали спустя

Таблица 4
Распределение радиоактивности по тканям крысы после внутривенного введения ^3H -тирозина

Орган	Радиоактивность, DPM/10 мг	
	через 1 мин	через 60 мин
Почки	305	86
Печень	71	25
Легкое	130	61
Кровь	50	7
Селезенка	48	47
Желудок	35	36
Мышца	25	12
Мозг	14	10

Таблица 5
Эффективность экстракции ^3H -фрагментов из тканей крысы (в %, $M \pm m$)

Ткань	Время декапитации после введения ^3H -даларгина		
	1 мин	4 мин	60 мин
Кровь	100	100	100
Печень	79 \pm 9	55 \pm 10	17 \pm 2
Желудок	93 \pm 9	60 \pm 6	25 \pm 8
Селезенка	90 \pm 10	79 \pm 14	27 \pm 4

1, 4 и 60 мин после его внутривенного введения в тех же образцах, которые исследовали в предыдущем разделе. Пробы тканей хранили, обрабатывали и анализировали как описано выше.

На стадии получения экстрактов контролировали полноту выхода из тканей ^3H -содержащих фрагментов. Средние значения этой величины по тканям печени, желудка, селезенки и крови приведены в табл. 5. Очевидно, что эффективность экстракции из тканей через 1 ч после введения даларгина в 3—4 раза ниже, чем через 1 мин. Этот факт является еще одним доказательством включения ^3H -тирозина в крупные пептидные и белко-

вые молекулы, так как применяемая экстракционная смесь извлекает из тканей лишь короткие пептиды [8].

На основании данных, приведенных выше, в качестве объектов для хроматографического исследования спектра метаболитов были выбраны ткани желудка и селезенки из-за наиболее выраженной аккумуляции радиоактивности, печени — как важнейшего органа, осуществляющего метаболизм, и кровь.

Результаты хроматографического разделения экстрактов представлены на рис. 1. Как видно на приведенных гистограммах, в экстрактах печени, желудка, селезенки и крови присутствуют одни и те же тирозинсодержащие фрагменты даларгина: N-концевые пентапептид, тетрапептид, трипептид и сам тирозин.

На 1-й минуте после введения из всех определяемых нами тирозинсодержащих метаболитов преобладающим является тетрапептид; в крови и печени определяются значительные количества тирозина; достоверно детектируются небольшие пики радиоактивности даларгина и пентапептида. Количество трипептида во всех тканях незначительно.

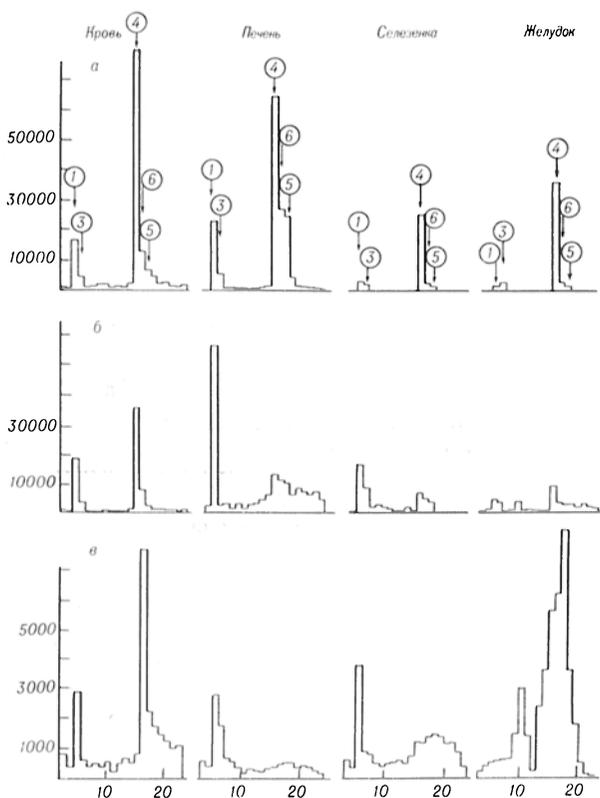


Рис. 1. Результаты хроматографического разделения экстрактов крови и тканей крыс через 1 мин (а), 4 мин (б) и 60 мин (в) после внутривенного введения ^3H -даларгина: гистограммы радиоактивности минутных фракций.

Стрелками отмечены времена выхода даларгина и его тирозинсодержащих метаболитов: 1 — тирозин, 3 — Tyr-D-Ala-Gly, 4 — Tyr-D-Ala-Gly-Phe, 5 — Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu, 6 — даларгин. По оси ординат — ДРМ/5 мг; по оси абсцисс здесь и на рис. 2—6 — время (в мин).

Через 4 мин после введения количество тетрапептида в крови и тканях снижается примерно в 3 раза при одновременном увеличении количества тирозина, что особенно выражено в печени. На гистограммах крови и печени заметно уменьшение количества даларгина и пентапептида.

К 60-й минуте после введения в экстрактах крови, печени и селезенки достоверно определяется лишь тирозин; возможное присутствие других ^3H -метаболитов маскируется радиоактивным фоном хроматограммы. В экстрактах желудка в этот период тирозин не определяется, и максимум радиоактивности совпадает со временем удерживания N-концевого пентапептида. Возможно, данный пик радиоактивности составляют пептиды с включенным ^3H -тирозином, имеющие близкие времена удерживания.

Преимущественное образование тетрапептида хорошо согласуется с данными, полученными нами ранее в опытах *in vitro* [4]. Так, инкубируя даларгин (0,02—0,2 мг/мл) с цельной сывороткой крови человека (37°C, рН 7,38), мы наблюдали образование двух относительно стабильных в условиях опыта метаболитов: N-концевых тетра- и пентапептидов. При снижении концентрации даларгина соотношении тетра- и пентаметаболитов изменялось в пользу тетра-формы. Однако образования свободного тирозина не происходило. Аналогичные результаты, полученные с помощью метода ЯМР для более высоких концентраций даларгина (1,0 мг/мл) в сыворотке, приводятся в исследовании Исаковой и соавт. [3].

Соотнесение данных, полученных *in vitro* и *in vivo*, дает основание заключить, что в образовании N-концевых тетра- и пентаметаболитов участвуют растворимые ферменты сыворотки (плазмы), а гидролиз связи $\text{Tyr}^1\text{-D-Ala}^2$ осуществляет либо мембраносвязанная аминопептидаза форменных элементов крови или сосудистой стенки, либо аминопептидазы в тканях органов.

Отщепление Arg^6 с образованием N-концевого пентапептида способен осуществить фермент, подобный карбоксипептидазе В (оптимум рН 7,5), выделенный из плазмы человека [19].

Представляется вероятным участие в метаболизме даларгина ангиотен-

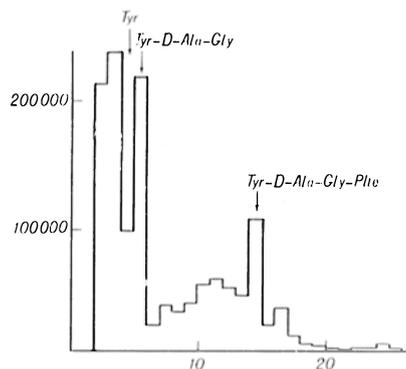


Рис. 2. Хроматографическое разделение 50 мкл экстракта мочи крысы, собранной в течение 2 ч после введения ^3H -даларгина: гистограмма радиоактивности минутных фракций элюата. Стрелками отмечены времена выхода ^3H -метаболитов. По оси ординат — ДРМ.

зинпревращающего фермента (АПФ). Этот фермент, выделенный из сыворотки крови поросят, способен расщеплять связь $\text{Gly}^3\text{-Phe}^4$ энкефалинов и участвовать в метаболизме других энкефалиноподобных пептидов. Применительно к нашим данным особенно интересна его дипептидилкарбоксипептидазная активность в отношении Leu -энкефалина- Arg^6 и Met -энкефалина- Arg^6 , приводящая к образованию N-концевых тетрапептидов [13]. Структура даларгина, также являющегося Arg^6 -аналогом Leu -энкефалина, с одной стороны, и высокое содержание АПФ в крови, оптимум рН (7,25), близкий к физиологическому значению рН крови, с другой, могут объяснить направленность метаболизма даларгина в сторону образования тетрапептида. Этот же фермент, возможно, осуществляет и дальнейший гидролиз в крови N-концевого пентапептида до трипептида Tyr-D-Ala-Gly . Образование N-концевого трипептида может происходить с участием эндопептидазы КФ.24.11 — «энкефалиназы» [17]. Не исключена также возможность участия мембраносвязанной эндопептидазы КФ 24.11, обращенной в сосудистое русло, в расщеплении связи $\text{Gly}^3\text{-Phe}^4$ даларгина с образованием N-концевого трипептида.

Гидролиз связи $\text{Tyr}^1\text{-D-Ala}^2$ с высвобождением свободного тирозина происходит под действием бестатиночувствительной аминопептидазы, проявляющей подобную активность в отношении энкефалинов [17].



Рис. 3. Хроматограмма 50 мкл экстракта крови с немечеными внесенными пептидами для контроля времен удерживания.

Времена удерживания составляют: 1 — для тирозина 5,5 мин, 2 — для Туг-D-Ala-Gly 6,5 мин, 3 — для Туг-D-Ala-Gly-Phe 15,4 мин, 4 — для Туг-D-Ala-Gly-Phe-Leu 17,7 мин, 5 — для даларгина 16,6 мин. Условия элюирования: растворитель А — 5 % водный раствор ацетонитрила с 0,1 % трифторуксусной кислоты, растворитель В — 95 % водный раствор ацетонитрила с 0,1 % ТФУ, градиент от 0 до 15 % В в А + В за 10 мин, от 15 до 55 % В — за 10 мин, от 55 до 100 % В — за 3 мин.

Фармакокинетика даларгина. Фармакокинетика ^3H -даларгина изучали, используя в качестве тест-ткани кровь. Как показано выше, в крови находится значительная часть введенной радиоактивности; спектр метаболитов в крови соответствует таковому в исследованных тканях; и, наконец, эффективность экстракции ^3H -фрагментов из крови максимальна как через 1 мин, так и спустя 1 ч после введения препарата.

Исследование проводили на 3 крысах. Пробы крови отбирали непосредственно в экстракционную смесь через 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40 и 60 мин после окончания введения. Общий объем отобранной за время опыта крови составил 2,4 мл. У одного животного пробы крови брали вплоть до 4 ч с интервалом между взятием последних проб 1 час. Одновременно через катетер в мочевом пузыре в течение первых 2 ч в пробирку с экстракционной смесью

собирали мочу. Отбор проб крови и мочи сразу в экстракционную смесь (рН 1,0) позволял мгновенно останавливать процессы ферментативного гидролиза в пробах и предотвратить бактериальное загрязнение образцов при хранении, способное исказить результаты анализа. По окончании отбора проб определяли общую радиоактивность в их аликвотах. Спектр метаболитов даларгина в моче и крови исследовали с помощью ВЭЖХ (рис. 3).

Общее количество выведенной с мочой радиоактивности в течение 2 ч составило для 3 животных 0,2, 1,2 и 2,1 % от введенного. На рис. 2 приведена гистограмма экстракта общей фракции мочи. Значительная доля (около 20 %) радиоактивности мочи приходится на трипептид ^3H -Туг-D-Ala-Gly, около 10 % — на тетрапептид ^3H -Туг-D-Ala-Gly-Phe. Примерно 40 % радиоактивности элюируется в свободном объеме колонки.

На рис. 4 приведены кривые зависимости радиоактивности крови от времени после введения даларгина. Все 3 кривые имеют одинаковый характер: на них выражен участок резкого снижения радиоактивности в первые 2—3 мин и относительно медленного ее снижения в последующие 30 мин. В интервале от 1 до 4 ч после введения радиоактивность крови была примерно одинаковой.

По результатам хроматографического анализа образцов крови построены кинетические кривые зависимости логарифма концентрации даларгина и каждого из ^3H -содержащих метаболитов от времени (рис. 5). Характер кривых показывает, что наименее стабильными фрагментами в крови являются даларгин и пентапеп-

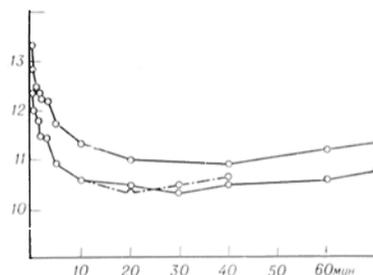


Рис. 4. Снижение радиоактивности крови у 3 крыс после внутривенного введения даларгина в дозе 150 мкг/кг.

Здесь и на рис. 5, 6 по оси ординат — $\ln C$.

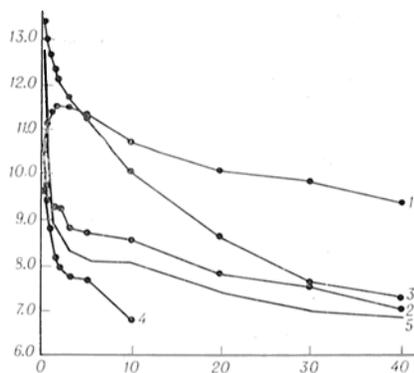


Рис. 5. Кривые зависимости логарифма концентрации (ДРМ/17 мкл) даларгина в крови и его тирозинсодержащих фрагментов от времени.

1 — тирозин, 2 — Tyr-D-Ala-Gly; 3 — Tyr-D-Ala-Gly-Phe, 4 — Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu; 5 — даларгин.

тид, характеризующиеся очень резким снижением концентраций в первую минуту после введения. Крутизна аналогичного участка кривой у тетрапептида заметно меньше. Кинетические кривые трипептида и тирозина имеют максимум при 0,5 и 1,5 мин соответственно.

Очевидно, что исчезновение исследуемых веществ из крови обусловлено 2 основными процессами: ферментативным гидролизом и проникновением в ткани с последующим рецепторным захватом. По данным, полученным в нашей лаборатории [5], наибольшей периферической опиоидной активностью обладают даларгин и пентапептид, активность тетрапептида значительно ниже. Трипептид Tyr-D-Ala-Gly практически не проявляет опиоидных свойств. Таким образом, рецепторный захват наиболее интенсивен для даларгина и пентапептида, в меньшей степени — для тетрапептида и, по-видимому, не затрагивает трипептид. С другой стороны, в ряду даларгин — пентапептид — тетрапептид возрастает стабильность фрагмен-

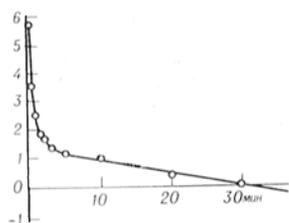


Рис. 6. Кинетическая кривая даларгина при внутривенном введении в дозе 150 мкг/кг.

Т а б л и ц а 6

Параметры трехэкспоненциальной кривой* зависимости концентрации даларгина в крови от времени (внутривенное введение)

Параметр	x_i	\bar{x}
C_0 , нг/мл	4648	4697
	4862	
	4580	
Vd , мл	10,8	10,7
	10,3	
	10,9	
α , мин ⁻¹	11,76	11,6
	11,04	
	12,01	
β , мин ⁻¹	1,34	1,75
	1,46	
	1,25	
γ , мин ⁻¹	0,050	0,045
	0,045	
	0,040	
$T_{1/2 \alpha}$, мин	0,060	0,060
	0,063	
	0,058	
$T_{1/2 \beta}$, мин	0,517	0,515
	0,475	
	0,554	
$T_{1/2 \gamma}$, мин	13,9	15,5
	15,4	
	17,3	

$$* C_p = A \cdot e^{-\alpha \cdot t} + B \cdot e^{-\beta \cdot t} + D \cdot e^{-\gamma \cdot t}$$

Примечание. Приведены средние значения параметров из 3 определений.

$V_d = \frac{D_{IV}}{A + B + D}$, где D_{IV} — внутривенная доза даларгина.

тов в присутствии растворимых ферментов сыворотки [4]. Таким образом, скорость снижения концентрации даларгина и его N-концевых пента- и тетрапептидов в крови в первые 1—2 мин после введения препарата пропорциональна их периферической опиоидной активности и скорости метаболизма.

Кинетическая кривая даларгина (рис. 6) хорошо описывается уравнением с 3 экспонентами. Основные фармакокинетические параметры даларгина приведены в табл. 6. Величи-

на объема распределения в нулевой момент времени — 10,7 мл — близка к объему плазмы крови (около 12 мл у крысы массой 300 г). На основании этого можно предположить, что даларгин не проникает в форменные элементы крови и не сорбируется на их мембранах.

Действительно, соотношение радиоактивности цельной крови, плазмы и отмытых форменных элементов (в основном эритроцитов) показало, что как на 4-й, так и на 60-й минутах после введения препарата радиоактивность крови обуславливается радиоактивностью плазмы (данные не приводятся).

За время исследования — 30 мин — концентрация препарата в крови снижается на 4 порядка (от 10^{-6} до 10^{-10} г). Пики радиоактивности даларгина на гистограммах образцов крови фазы элиминации лишь в 3—5 раз превышали фоновый уровень. В связи с этим было желательным подтвердить достоверность полученных значений γ и $T_{1/2\gamma}$. Радиоиммунхимическим методом, описанным в [1], было проведено исследование фармакокинетики даларгина в дозе 5 мг внутривенно. В целом кинетическая кривая зависимости $\ln C$ от T для этой дозы также представляла трехэкспоненциальную кривую, однако с более медленной β -фазой: $\beta = 0,284 \text{ мин}^{-1}$, $T_{1/2\beta} = 2,44 \text{ мин}$, $\tau = 3,52 \text{ мин}$. Рассчитанные средние значения константы скорости элиминации и времени полуэлиминации оказались очень близки приведенным в табл. 6: средние значения составляют для γ $0,058 \text{ мин}^{-1}$, для $T_{1/2\gamma}$ 12,0 мин. Следует отметить, что, несмотря на катастрофически быстрое исчезновение даларгина из крови, его концентрации через 30 мин после введения все еще на порядок превышают физиологические концентрации энкефалинов в плазме [9, 14].

Из полученных нами результатов и данных литературы [13, 15, 16, 18] следует, что у веществ пептидной природы в живом организме временя двукратного снижения концентраций очень малы: в рассмотренных случаях они не превышали 5 мин. При фармакокинетических исследованиях данного класса соединений это обстоятельство предъявляет жесткие требования к временам от-

бора первых проб, который должен начинаться уже на 1-й минуте после введения. Интересно что, как и для даларгина, кинетическая зависимость логарифма концентрации от времени для гормона роста имеет трехфазный характер и состоит из фаз быстрого и медленного распределения и фазы элиминации [18]. В исследовании Schüßmeier [16] кинетические данные рилизинг-фактора кортикотропина аппроксимированы двухэкспоненциальной кривой, однако довольно поздний отбор первой пробы (через 2 мин после введения) позволяет предположить наличие еще одной, первой и наиболее быстрой фазы, не зафиксированной авторами. Это замечание относится к исследованию и фармакокинетики β -эндорфина [12, 15] и метаболического клиренса ДАММЕ [11].

С учетом сказанного представляется возможным поиск закономерностей процессов распределения и метаболизма экзогенно вводимых коротких пептидов — лекарственных средств. Одним из подходов может явиться соотношение фармакокинетических характеристик пептидов со скоростями их ферментативного гидролиза в крови и тканях, константы рецепторного связывания и степенью гидрофобности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зайцев С. В., Виноградов В. А., Сергеева М. Г. и др. // Бюл. exper. биол. — 1986. — № 6. — С. 252—255.
2. Ильинский О. Б., Спевак С. Е., Соловьева А. И. и др. // Всесоюзная конф. «Нейропептиды: их роль в физиологии и патологии», 1-я: Тезисы докладов. — Томск, 1985. — С. 58—59.
3. Исакова О. Л., Сепетов Н. Ф., Беспалова Ж. Д. и др. // Биоорг. химия. — 1986. — Т. 12, № 1. — С. 106—111.
4. Каленикова Е. И., Нагорная Л. В., Дмитриева О. Ф., Тищенко В. А. // Всесоюзная конф. «Нейропептиды: их роль в физиологии и патологии», 1-я: Тезисы докладов. — Томск, 1985. — С. 77—78.
5. Коробов И. В. // Там же. — С. 73—74.
6. Петренко Б. В., Золотарев Ю. Н., Мясоедов Н. Ф. и др. // Биоорг. химия. — 1982. — Т. 8. — № 12. — С. 1615—1619.
7. Шейман И. М., Тирас Х. П., Виноградов В. А., Ефимов И. А. // Докл. АН СССР. — 1985. — Т. 284, № 2. — С. 481—483.
8. Bennett H. P. J., Hudson A., Kelly L. et al. // Biochem. J. — 1978. — Vol. 175, N 3. — P. 1139—1141.
9. Clement-Jones V., Lowry P. J., Rees L. H., Besser G. M. // Nature. — 1980. — Vol. 283. — P. 295—297.

10. *Fraker P. J., Speck J. C.* // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1978. — Vol. 80, N 4. — P. 849—857.
11. *Gilchrist N., Bolton J. E., Donald R. A.* et al. // Brit. J. clin. Pharmacol. — 1983. — Vol. 16, N 5. — P. 465—469.
12. *Houghten R. A., Swann R. W., Zi C. H.* // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1980. — Vol. 77, N 8. — P. 4588—4591.
13. *Kase R., Hazato T., Shimamura M.* et al. // Arch. Biochem. — 1985. — Vol. 240, N 1. — P. 330—336.
14. *Ryder S., Eng J.* // J. clin. Endocr. — 1981. — Vol. 52, N 2. — P. 367—369.
15. *Sato H., Sugiyama Y., Sawada Y.* et al. // Life Sci. — 1985. — Vol. 35, N 10. — P. 1051—1059.
16. *Schürmeyer T. H., Gold P. W., Galluci W. T.* et al. // Endocrinology. — 1985. — Vol. 117, N 1. — P. 300—306.
17. *Schwartz J. Ch.* // TINS, 1983. — Vol. 6, N 2. — P. 45—48.
18. *Sinha Y. N., Baxter S. R., Vanderlaan W. P.* // Endocrinology. — 1979. — Vol. 105, N 3. — P. 685—689.
19. *Skidgel R. A., Johnson A. R., Erdős E. G.* // Biochem. Pharmacol. — 1984. — Vol. 33, N 21. — P. 3471—3478.

Поступила 08.09.86

PHARMACOKINETICS OF DALARGINE

E. I. Kalenikova, O. F. Dmitrieva, N. V. Korobov, S. V. Zhukovsky, V. A. Tischenko, V. A. Vinogradov

All-Union Cardiological Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Pharmacokinetics of a new antiulcerous drug, synthetic opioid hexapeptide dalargine (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg), which is an analogue of Lue-enkephalin, was studied in rats. Distribution and metabolism of ^3H -Tyr-dalargine were examined after intravenous administration at a dose of 150 mg/kg. Main Tyr-containing metabolites of dalargine were detected and dynamics of their concentrations was evaluated in blood within 1 hr after administration. Kinetic curve of dalargine was described as three-exponential function.

УДК 616.453-008.61-092.9-07:[616-008.93:577.161.2]-074

*Н. А. Каратабанова, Ю. П. Арханчев, И. Н. Сергеев, Л. Ф. Линберг,
В. Б. Спиричев*

ОБМЕН ВИТАМИНА D ПРИ ЭКЗОГЕННОМ ГИПЕРКОРТИЦИЗМЕ У КРЫС

Институт питания АМН СССР, Москва

Известно, что длительное применение глюкокортикоидных гормонов в клинике и эксперименте вызывает нарушение гомеостаза кальция и состояния костной ткани [9—13, 18, 23]. В регуляции кальциевого обмена и ремоделирования костной ткани существенная роль принадлежит эндокринной системе витамина D [3]. Однако механизм действия глюкокортикоидов на метаболизм витамина D остается неясным. По данным одних авторов, у больных с синдромом Кушинга концентрация $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ в сыворотке крови существенно не изменялась [7]. В то же время кратковременное введение глюкокортикоидов здоровым людям приводит к увеличению циркулирующей концентрации $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [13]. Длительное введение глюкокортикоидов вызывает снижение уровня $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ в крови экспериментальных животных и больных, получающих глюкокортикоидную терапию [4, 13, 17, 21].

Согласно данным одним авторов, глюкокортикоиды не влияли на скорость превращения $25(\text{OH})\text{D}_3$ в

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, а также на распределение этого метаболита в органах-мишенях у рахитичных крыс [6, 15]. В то же время у цыплят, получавших глюкокортикоиды в течение 7 дней, отмечалась стимуляция активности 1α -гидроксилазы 25-оксивитамина D в почках [22]. В других исследованиях при кратковременном введении кортикостероидных гормонов наблюдалось снижение продукции $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ в почках и уменьшение связывания этого метаболита в слизистой тонкого кишечника [5]. Получены данные об ингибирующем действии глюкокортикоидов на концентрацию рецепторов $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ в цитозоле костных клеток [19, 20].

В связи с противоречивостью данных литературы о влиянии глюкокортикоидных гормонов на метаболизм витамина D целью настоящей работы явилось изучение синтеза $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ и $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in vivo при экзогенном гиперкортицизме у крыс.

Методика

В эксперименте использовали крыс-самцов Вистар с исходной массой тела $200 \pm 2,2$ г,

³H-метаболиты витамина D₃ в сыворотке крови, почках, печени, слизистой оболочке тонкого кишечника и костях крыс, получающих гидрокортизон в течение 7 дней (в расп/мин на 1 мл или 1 г)

Исследуемый материал	Группа животных	³ H-25 (OH) D ₃	³ H-24,25 (OH) ₂ D ₃	³ H-1,25 (OH) ₂ D ₃
Сыворотка	Контроль (5)	4091 ± 324	225 ± 29	404 ± 58
	Гидрокортизон (4)	4390 ± 318	262 ± 46	724 ± 112
Почки	Контроль (3)	1390 ± 92	126 ± 18	167 ± 29
	Гидрокортизон (6)	1624 ± 127	132 ± 19	348 ± 57
Печень	Контроль (3)	1242 ± 202	258 ± 31	143 ± 29
	Гидрокортизон (3)	856 ± 99	214 ± 38	294 ± 78
Слизистая оболочка тонкой кишки	Контроль (3)	762 ± 60	195 ± 28	364 ± 32
	Гидрокортизон (3)	1323 ± 120	227 ± 21	717 ± 84
Кости	Контроль (3)	547 ± 22	14 ± 0,9	5 ± 1,3
	Гидрокортизон (3)	794 ± 106	24 ± 5	400 ± 79
		<i>p</i> < 0,05		<i>p</i> < 0,01

Примечание. Здесь [и в табл. 2: *p* — достоверность различий с показателями группы контрольных животных; в скобках — количество животных.

находившихся на рационе вивария. Подопытным животным ежедневно внутримышечно вводили гидрокортизон («Рихтер», ВНР) в дозе 2,5 мг на 100 г массы тела. Метаболизм 25(OH) D₃ исследовали на 7-й и 28-й дни эксперимента. С этой целью животным за 18 ч до забоя вводили внутривенно 25-оксиг [26(27)-метил-³H]холекальциферол [³H-25(OH)D₃] с удельной радиоактивностью 22 Ки/ммоль («Radiochemical Centre», «Amersham», Англия) в 0,3 мл смеси этанол-пропиленгликоль (1:4) в дозе 1,25 мКи на 100 г массы тела животного. Для исследования использовали сыворотку крови, проксимальный отрезок кишки, почки, часть печени (1 г) и бедренные кости.

Метаболиты витамина D₃ экстрагировали, как описано ранее [1, 8]. Разделение 25(OH)D₃, 1,25(OH)₂D₃ и 24,25(OH)₂D₃ осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием системы фирмы «Altech» [1].

Содержание кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови определяли по описанным ранее методикам [2, 16].

Результаты и обсуждение

Введение гидрокортизона в течение 7 дней не вызывало изменений концентрации кальция в сыворотке крови (контроль — 10,6 ± 0,2 мг на 100 мл, гидрокортизон — 10,4 ± 0,2 мг на 100 мл), несмотря на повышение концентрации неорганического фосфора (контроль — 9,7 ± 0,5 мг на 100 мл, гидрокортизон — 11,2 ± 0,6 мг на 100 мл). Введение гидрокортизона в течение 28 дней приводило к снижению концентрации кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови (контроль — 9,8 ± 0,1 и 9,4 ± 0,3 мг

на 100 мл, гидрокортизон — 8,8 ± 0,2 и 7,6 ± 0,5 мг на 100 мл соответственно).

У крыс, получавших гидрокортизон в течение 7 дней, наблюдалось значительное увеличение включения метки из ³H-25(OH)D₃ в 1,25(OH)₂D₃ в сыворотке крови, почках, печени, слизистой оболочке тонкого кишечника и особенно в костях (табл. 1). У животных, получавших гидрокортизон, в печени отмечалось существенное снижение уровня меченого 25-оксивитамина D₃, что, очевидно, свидетельствует об общем усилении метаболизма витамина D₃ в организме. В слизистой оболочке и костях крыс, получавших гидрокортизон, отмечалась тенденция к накоплению меченого 25(OH)D₃ (см. табл. 1). Значительное усиление включения метки в 1,25(OH)₂D₃ в сыворотке крови, почках, слизистой оболочке тонкого кишечника и костях на начальном этапе развития экзогенного гиперкортицизма может свидетельствовать о стимуляции синтеза этого метаболита в указанный период.

Иной характер имеют изменения обмена витамина D₃ при длительном введении гидрокортизона (28 дней). В этот период включение метки в 1,25(OH)₂D₃ в сыворотке крови достоверно не отличается от такового в контроле, а в почках обнаруживает тенденцию к снижению (табл. 2). В то же время включение метки в

³H-метаболиты витамина D₃ в сыворотке крови, почках, печени, слизистой оболочке тонкого кишечника и костях крыс, получающих гидрокортизон в течение 28 дней (в расч/мин на 1 мл или 1 г)

Исследуемый материал	Группа животных	³ H-25 (OH)D ₃	³ H-24,25 (OH) ₂ D ₃	³ H-1,25 (OH) ₂ D ₃
Сыворотка	Контроль (5)	7002±672	289±24	116±17
	Гидрокортизон (3)	4851±679 <i>p</i> <0,05	380±20 <i>p</i> <0,02	152±65
Почки	Контроль (7)	1950±238	101±7	205±45
	Гидрокортизон (4)	1900±443 <i>p</i> <0,002	214±23	115±28
Печень	Контроль (4)	1855±509	140±48	96±17
	Гидрокортизон (4)	1745±439	271±64	47±1 <i>p</i> <0,05
Слизистая оболочка тонкой кишки	Контроль (4)	811±37	136±16	116±18
	Гидрокортизон (3)	1090±95 <i>p</i> <0,05	93±18	68±8 <i>p</i> <0,05
Кости	Контроль (4)	431±59	45±9	33±8
	Гидрокортизон (2)	524±22	17±3 <i>p</i> <0,05	18±5

24,25(OH)₂D₃ в почках и сыворотке крови возрастает почти в 2 раза, что может указывать на значительное усиление синтеза этого метаболита. Одновременно в слизистой оболочке тонкого кишечника и бедренных костях наблюдаются снижение концентрации меченых 1,25(OH)₂D₃ и 24,25(OH)₂D₃, а также тенденция к накоплению меченого 25-оксивитамина D₃. Это может указывать на уменьшение связывания обоих этих метаболитов в органах-мишенях.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о фазовом действии глюкокортикоидов на обмен витамина D.

На начальных этапах развития экзогенного гиперкортицизма (7 дней) наблюдается стимуляция синтеза 1,25(OH)₂D₃. С нашей точки зрения, одной из причин стимуляции синтеза 1,25(OH)₂D₃ и его накопления в органах-мишенях может являться гиперфосфатемия, наблюдаемая у животных через 7 дней после введения гидрокортизона. Можно полагать, что повышение концентрации неорганического фосфора в сыворотке крови в этот период, связывая ионы кальция, приводит к снижению концентрации ионизированного кальция, что вызывает повышение секреции паратгормона и стимулирует образование 1,25(OH)₂D₃ в почках. Результатом этого является усиление всасывания кальция в тонком кишечнике и увеличение резорбции предобразованной костной ткани, что приводит к раз-

витию остеопороза. Таким образом, стимуляция синтеза 1,25(OH)₂D₃ на начальных стадиях развития экзогенного гиперкортицизма, очевидно, носит патологический характер. С этой точкой зрения согласуется тот факт, что при кратковременном введении глюкокортикоидов у экспериментальных животных наблюдается развитие остеопороза [14].

Длительное введение гидрокортизона (28 дней) приводит к торможению синтеза 1,25(OH)₂D₃ в почках и снижению связывания 1,25(OH)₂D₃ и 24,25(OH)₂D₃ в слизистой оболочке тонкого кишечника и костях. Ингибирование синтеза 1,25(OH)₂D₃ в почках на поздней стадии развития экзогенного гиперкортицизма приводит к снижению всасывания кальция в тонком кишечнике. Гипокальциемия и гипофосфатемия, развивающиеся при длительном введении гидрокортизона, могут вызывать нарушение минерализации запово образуемой кости. Снижение связывания 1,25(OH)₂D₃ и 24,25(OH)₂D₃ в костной ткани в этот период, по-видимому, свидетельствует об угнетении образования кости и развитии остеодистрофии. Ингибирование метаболизма витамина D на поздней стадии развития экзогенного гиперкортицизма происходит, по-видимому, без участия паратгормона, так как при экзогенном гиперкортицизме, несмотря на торможение образования 1,25(OH)₂D₃, наблюдается гиперпаратиреоз [11, 18]. В то же время циркулирующая концентрация

1,25(OH)₂D₃ снижена при экзогенном гиперкортицизме, тогда как концентрация 24,25(OH)₂D₃ в сыворотке крови при этом повышена [17]. Это указывает на уменьшение продукции 1,25(OH)₂D₃. Очевидно, чувствительность тканей-мишеней к паратгормону усиливается только на ранней стадии развития экзогенного гиперкортицизма, тогда как на более поздних этапах развития этой патологии, вероятно, наблюдается снижение такой чувствительности.

Полученные данные о разнонаправленном действии гидрокортизона на обмен витамина D в зависимости от сроков его введения указывают на целесообразность дифференцированного подхода к коррекции нарушений фосфорно-кальциевого обмена и состояния костной ткани на ранних и поздних стадиях развития экзогенного гиперкортицизма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арханчев Ю. П., Сергеев И. Н., Блажевич Н. В. и др. // *Вопр. мед. химии*. — 1984. — № 1. — С. 96—103.
2. Вичев Е. П., Каракашов А. В. // Там же. — 1960. — № 6. — С. 435—438.
3. Спиричев В. Б. // *Вопр. питания*. — 1980. — № 5. — С. 67—74.
4. Chesney R. W., Mazess R. B., Hamstra A. J. et al. // *Lancet*. — 1978. — Vol. 2. — P. 1123—1125.
5. Edelstein S., Noff D., Matilahu A. et al. // *FEBS Lett.* — 1977. — Vol. 82. — P. 15—17.
6. Favus M. J., Kimberg D. V., Millar G. N., Gershon E. // *J. clin. Invest.* — 1973. — Vol. 52. — P. 1328—1335.
7. Findling J. W., Adams N. D., Lemann J. J. R. et al. // *J. clin. Endocr.* — 1982. — Vol. 54. — P. 1039—1044.
8. Gilbertson T. J., Stryd R. F. // *Clin. Chem.* — 1977. — Vol. 23. — P. 1700—1704.
9. Glade M. J., Krook H. F., Schyver Y. F., Hints H. F. // *J. Nutr.* — 1982. — Vol. 112. — P. 77—86.
10. Hahn B., Hahn T. // *Arthr. a Rheum.* — 1976. — Vol. 19. — P. 800.
11. Hahn T. J., Halstead L. R., Teitelbaum S. L.,

- Hahn B. H. // *J. clin. Invest.* — 1979. — Vol. 64. — P. 655—665.
12. Hahn T. J., Halstead L. R., Baran D. T. // *J. clin. Endocr.* — 1981. — Vol. 52. — P. 111—115.
 13. Izawa Y., Makita T., Ichiki H. // *Acta vitaminol. enzymol.* — 1985. — Vol. 7. — P. 77—84.
 14. Jee W. S., Park H. L., Roberts W. E., Kenner G. H. // *Amer. J. Anat.* — 1970. — Vol. 129. — P. 477—480.
 15. Kimberg D. V., Baerg R. D., Gershon E., Graudusius R. T. // *J. clin. Invest.* — 1971. — Vol. 50. — P. 1309—1320.
 16. King E. J. // *Biochem. J.* — 1932. — Vol. 26. — P. 292—301.
 17. Lindgren J. U., Merchant C. R., DeLuca H. F. // *Calcif. Tissue int.* — 1982. — Vol. 34. — P. 253—257.
 18. Lukert B. P., Adams J. S. // *Arch. intern. Med.* — 1976. — Vol. 136. — P. 1249—1253.
 19. Manolagas S. C., Abare J., Howard J., Deftos L. F. // *Calcif. Tissue int.* — 1982. — Vol. 34. — P. 55.
 20. Manolagas S. C., Andersen D. C., Lamb G. A. // *Nature*. — 1979. — Vol. 277. — P. 314—315.
 21. O'Regan S., Chesney R. W., Hamstra A. et al. // *Acta paedial. scand.* — 1979. — Vol. 68. — P. 109—111.
 22. Spanos E., Colston K. W., MacIntyre I. // *FEBS Lett.* — 1977. — Vol. 45. — P. 73—76.
 23. Thompson J. S., Palmieri G. M. A., Eliel L. F., Crowford R. L. // *J. Bone Jt Surg.* — 1972. — Vol. 54-A. — P. 1490—1499.

Получено 08.09.86

METABOLISM OF VITAMIN D IN EXOGENOUS HYPERCORTICOIDISM OF RATS

N. A. Karabanova, Yu. P. Arkharchev, I. N. Sergeev, V. B. Spirichev, L. F. Linberg

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

Short-term administration of hydrocortisone into rats (within 7 days) stimulated 1,25(OH)₂D₃ synthesis in kidney and led to accumulation of the metabolite in blood serum, small intestinal mucosa and bones. After long-term administration of hydrocortisone within 28 days synthesis of 1,25(OH)₂D₃ was decreased in kidney while the content of 24,25(OH)₂D₃ was simultaneously increased. Concentration of labelled 1,25(OH)₂D₃ and 24,25(OH)₂D₃ was distinctly decreased in small intestinal mucosa and femur bones.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ БОЛЕЗНИ КРАББЕ У ДВУХ БРАТЬЕВ ИЗ ГДР С ПОМОЩЬЮ НОВОГО ФЛУОРОГЕННОГО СУБСТРАТА ДЛЯ ГАЛАКТОЦЕРЕБРОЗИДАЗЫ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва
Институт медицинской генетики Университета им. Эрнст-Моритц-Аридта, Грайфсвальд,
ГДР

Болезнь Краббе, или глобонидноклеточная лейкодистрофия, относится к группе наследственных гликолипидозов и развивается в результате недостаточности лизосомной галактоцереброзид- β -D-галактозидазы¹ (КФ 3.2.1.46) [1, 13].

Для клинической картины заболевания характерен ряд симптомов со стороны нервной системы, которые обычно проявляются через 3—6 мес после рождения ребенка, повышенная возбудимость, ригидность конечностей, умственная и двигательная недостаточность. Болезнь быстро прогрессирует и заканчивается смертью больных к 1—2 годам жизни в результате нарушений функции головного мозга. В последнее время описаны случаи и более поздних форм болезни [9]. Накопивающийся при болезни Краббе галактоцереброзид обнаруживается в глобонидных клетках белого вещества головного мозга, для которого характерна резкая демиелинизация, существенно превалирующая над накоплением галактоцереброзида [1, 7, 13]. Болезнь Краббе является сравнительно редким аутосомно-рецессивным заболеванием среди других видов гликолипидозов. Со времени описания этой патологии датским педиатром К. Краббе в 1916 г. описано около 100 больных [8].

Диагноз болезни Краббе основывается на клинических данных и (главным образом) на выявлении недостаточности галактоцереброзидазы в лейкоцитах и фибробластах больных. В отличие от многих других гликозидаз для определения активности галактоцереброзидазы не пригодны синтетические хромогенные субстраты и флуорогенные гликозиды типа *p*-нитрофенил- и 4-метилумбеллиферил- β -D-галактопиранозидов [7]. Эти соединения

являются субстратами для G_{M1} - β -D-галактозидазы, недостаточность которой имеется при G_{M1} -ганглиозидозе [1].

До недавнего времени для определения активности галактоцереброзидазы использовали природные субстраты, меченные ³H [14], хромогенный синтетический субстрат [6] и флуоресцентно меченные аналоги природных субстратов [3, 5, 15]. Однако выделение и модификация природных субстратов — дорогостоящий и трудоемкий процесс, что осложняет их применение в биохимической диагностике болезни Краббе.

Использование синтетического хромогенного субстрата гликолипидной природы 2-гексадеканонламино-4-нитрофенил- β -D-галактопиранозида (HNGal) ограничено его низкой чувствительностью [4].

Ранее нами был предложен новый синтетический флуорогенный субстрат липидной природы для галактоцереброзидазы, 6-гексадеканоиладель-4-метилумбеллиферил- β -D-галактопиранозид (HMGal), позволяющий выявлять недостаточность этого фермента при болезни Краббе [2].

В настоящей работе приведены результаты клинико-биохимической диагностики болезни Краббе у двух братьев из ГДР с помощью указанного субстрата.

Методика

В качестве ферментных препаратов для определения активности ряда лизосомных гидролаз использовали гомогенаты, полученные из культивируемых кожных фибробластов обследуемых больных и здоровых доноров. Культуры фибробластов получали по методу [11, 12]. После промывания и суспендирования клеток в физиологическом растворе их разрушали 3-кратным замораживанием-оттаиванием в системе сухой лед — ацетон и гомогенизировали. В гомогенате определяли активность следующих лизосомных ферментов: β -галактозидазы, β -гексозаминидазы, β -глюкозидазы и арилсульфатазы А по описанной ранее мето-

¹ Далее в тексте галактоцереброзидаза.

Активность (в нмоль расщепленных субстратов на 1 мг белка в 1 ч при 37 °С) ряда лизосомных гидролаз в фибробластах клинически здоровых доноров и больных людей

Источник фибробластов	Галактоцереброзидаза	β -Галактозидаза	β -Гексозаминидаза	β -Глюкозидаза	Арилсульфатаза А
Здоровые доноры (норма)	0,71 (0,5—1,44) (n = 17) (1,4—3,2)*	354 (235—618) (n = 23) (400—1000)*	4110 (1231—8049) (n = 25)	313 (122—483) (n = 22)	287 (129—542) (n = 18)
Ребенок Г. Х.	0,15 0,17*	345 616*	1930 —	— —	409 —
Ребенок Г. С.	0,13 0,15*	304 571*	2180 —	210 —	409 —
Штамм ИМГ-953	0,14	—	—	—	—

Примечание. Активность галактоцереброзидазы определяли по методу [2], используя в качестве субстрата НМGal, активность арилсульфатазы А — с помощью п-нитрокатохола сульфата, звездочка — активность галактоцереброзидазы и β -галактозидазы, при определении которых в Роттердаме использовали в качестве субстратов соответственно меченный галактоцереброзид и 4-МУФ- β -D-галактопиранозид. В скобках — пределы колебаний активности ферментов.

дике [16]. Активность галактоцереброзидазы определяли по методу [2] с небольшими модификациями. Удельную активность исследуемых ферментов выражали в наномолях расщепленных соответствующих флуорогенных гликозидов на 1 мг белка в 1 ч при 37 °С. Белок определяли по методу Лоури и соавт. [10], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

В работе использовали также референсный штамм фибробластов кожи от человека с болезнью Краббе (Human Genetic Mutant Cell Repository, New Jersey, США), полученный из Института медицинской генетики АМН СССР и условно обозначенный ИМГ-953.

Результаты и обсуждение

Ребенок Г. Х., родился 29.10.81. Родители не являются родственниками. До 5 мес не было обнаружено признаков заболевания. В дальнейшем отмечались повышенная возбудимость, ригидность конечностей, развились умственная и двигательная недостаточность, повышенные сухожильные рефлексы, судороги. Внутренние органы без особых изменений. Смерть больного последовала в возрасте 1 года 9 мес. Аутопсийный материал органов оказался недоступен для исследования.

Ребенок Г. С., родился 21.11.82. Развитие протекало без видимых отклонений до 3 мес. В возрасте 5 мес появились тремор конечностей, судороги, затруднение глотания, мышечная гипертония, крик без видимых причин. Позднее развилась умственная и двигательная недостаточность. Внутренние органы без существенных изменений.

Данные об активности лизосомных гидролаз в фибробластах здоровых

людей и больных представлены в таблице. Как видно из таблицы, из 5 исследованных ферментов существенное снижение активности в фибробластах больных характерно только для галактоцереброзидазы. Примерно такая же активность галактоцереброзидазы наблюдается и в случае референсного штамма фибробластов (ИМГ-953) от пациента с болезнью Краббе. Активность G_{M1} - β -галактозидазы (β -галактозидаза) у обоих больных оказалась в пределах нормы, что позволяет исключить G_{M1} -ганглиозидоз.

Нормальная общая активность гексозаминидазы, β -глюкозидазы и арилсульфатазы в фибробластах больных позволила исключить наличие у обоих больных таких гликолипидозов, как болезнь Зандгоффа (G_{M2} -ганглиозидоз, вариант 0), болезнь Гоше и метакроматическая лейкодистрофия [1].

Активность галактоцереброзидазы в фибробластах больных исследовали также с помощью меченого по галактозе церамидгалактозида в отделе клеточной биологии и генетики Роттердамского университета (Нидерланды) доктором О. П. Ван Диггелен. Активность фермента по природному субстрату также оказалась существенно ниже нормы (см. таблицу), в то время как активность β -галактозидазы по соответствующему 4-МУФ- β -галактозиду была в пределах нормы.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что у обоих больных братьев имелась болезнь Краббе, клинико-биохимическая диагностика которой впервые была проведена в ГДР.

Работа проведена в рамках договора о научном сотрудничестве между СССР и ГДР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Видершайн Г. Я. Биохимические основы гликосидозов. — М., 1980.
2. Видершайн Г. Я., Козлова И. К., Ильина Г. С. // Биохимия. — 1985. — № 10. — С. 1665—1668.
3. Семенов Е. П., Видершайн Г. Я. // Там же. — 1984. — № 9. — С. 1556—1560.
4. Besley G. T. N., Bain A. D. // Clin. chim. Acta. — 1978. — Vol. 88. — P. 229—236.
5. Besley G. T. N., Gatt S. // Там же. — 1981. — Vol. 110. — P. 19—26.
6. Gal A. E., Brady R. O., Pentchev P. G. et al. // Там же. — 1977. — Vol. 77. — P. 53—59.
7. Glew R. H., Basu A., Prence E. M. et al. // Lab. Invest. — 1984. — Vol. 53. — P. 250—269.
8. Kanfer J. // Handbook of Lipid Research / Ed. J. Kanfer, S. Hakomori. — New York, 1983. — Vol. 3. — P. 249—325.
9. Loonen M. C. B., Van Diggelen O. P., Jance H. C. et al. // Neuropediatrics. — 1985. — Vol. 16. — P. 137—142.
10. Lowry C. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
11. Machill G., Christofi C. H., Wehnert M. et al. // Mschr Derm. — 1978. — Bd 164. — S. 703—710.
12. Machill G., Wehnert M., Petruschka L. // Ergebn. exp. Med. — 1983. — Bd 44. — S. 7—17.
13. Suzuki K., Suzuki Y. // The Metabolic Basis of Inherited Disease / Ed. J. B. Stanbury. — New York, 1983. — P. 857—880.

14. Svennerholm L., Hakansson G., Mansson J. et al. // Clin. chim. Acta. — 1979. — Vol. 92. — P. 53—64.
15. Ziegler M., Zlotogora P. R. et al. // Ibid. — 1984. — Vol. 142. — P. 313—316.
16. Zschesche M., Seidlitz G., Grimm U. et al. // Dtsch. Gesundh.-Wes. — 1983. — Bd 38. — S. 1552—1558.

Поступила 02.07.86

IDENTIFICATION OF KRABBE'S DISEASE IN TWO BROTHERS FROM GDR USING A NEW FLUOROGENIC SUBSTRATE FOR GALACTOCEREBROSIDASE

G. Ya. Wiederschain, M. Zschesche, G. Seidlitz

Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow, Institute of Medical Genetics, Ernst-Moritz-Arndt University, Greifswald, GDR

Activity of several lysosomal hydrolases was studied in skin fibroblasts obtained from two brothers living in GDR. Both patients exhibited distinct clinical symptoms of severe neurovisceral disease. Analysis of the lysosomal enzymes activity enabled to exclude possible occurrence in the patients of such glycolipidoses as Gaucher's disease, Sandhoff's disease, GM₁-gangliosidosis and metachromatic leukodystrophy. A new fluorogenic galactoside of lipid nature 6-hexadecanoylamino-4-hethylumbelliperyl-β-D-galactoside used as a substrate of galactocerebrosidase enabled to detect in the patients distinct decrease in this enzymatic activity and to diagnose Krabbe's disease. Biochemical diagnosis of Krabbe's disease using the fluorogenic substrate was also confirmed by analysis with labelled galactocerebroside as a substrate.

УДК 616.611-002-07:616.633.1:577.152.344.042.2]-074

Т. С. Пасхина, Л. В. Платонова, Л. Р. Полянцева

ИНГИБИТОР ТРИПСИНА МОЧИ У БОЛЬНЫХ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТОМ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, лаборатория нефрологии
Г ММИ им. И. М. Сеченова

В последние годы интенсивно изучаются свойства, структура и функции кислотоустойчивых ингибиторов (КСИ) протеиназ, присутствующих в плазме крови и моче человека и млекопитающих [4, 5, 7, 13, 19]. Эти ингибиторы протеиназ образуются из высокомолекулярного лабильного предшественника — интер-α-ингибитора трипсина (ИТ, M_r 180 000) при его ограниченном протеолизе трипсиноподобными протеиназами [19] плазмы и клеток крови и некоторых тканей [11, 19]. Активные фрагменты ИТ, сохра-

няющие его N-концевую аминокислотную последовательность, имеют M_r от 23 000 до 44 000 [19]; они приобретают сравнительно со своим предшественником, т. е. с ИТ, новое свойство — сохранять антипротеазную активность после прогревания в кислой среде.

Детально изучены физико-химические свойства и антипротеазное действие КСИ по отношению к трипсину, хмотрипсину, эластазе гранулоцитов и другим протеиназам [3, 6, 10, 14]. Менее изучены биологические функции этих ингибиторов, а также фермент-

ные системы, ответственные за образование КСИ из ИТ в норме и при патологии.

Антитриглицеридная активность мочи здорового человека почти исключительно определяется присутствием КСИ (ИТМ) [18]. Значительное повышение содержания КСИ в моче и плазме крови наблюдается при беременности, а также при некоторых патологических состояниях: диссеминированной форме рака, септических состояниях, болезнях почек [12, 17, 18, 20]. Предполагается, что почки являются главным органом, в котором происходит фрагментация ИТ с образованием ИТМ [16].

Ранее нами было показано, что у больных нефритом различного происхождения, осложненного нефротическим синдромом, значительно увеличена концентрация ИТМ в моче [7]. С целью дальнейшего развития этих исследований мы изучали взаимосвязь между тяжестью патологического процесса в почках (от латентной формы до нефротической) при хроническом гломерулонефрите (ХГН), в том числе при переходе в стадию хронической почечной недостаточности (ХПН), и концентрацией ИТМ в моче.

Методика

Использовали препарат трипсино фирмы «Serva» (ФРГ), этиловый эфир N-бензил-L-аргинина (БАЭЭ) фирмы «Koch-Light» (Англия), агарозу и кумасси ярко-синий R-250 фирмы «Sigma» (США).

Высокоочищенные препараты ИТМ с M_r 32 000 и 22 000, использованные в качестве стандартов, были получены ранее, как описано в работе [5].

Моноспецифическая антисыворотка к ИТМ была получена от кроликов, иммунизированных суммарным (не разделенным на изоформы) препаратом ИТМ по схеме, описанной в работе [5]; 1 мл анти-ИТМ-сыворотки содержит 743 мкг антител, зона эквивалентности соответствует связыванию 99 мкг ИТМ 1 мл антисыворотки.

Концентрацию ИТМ и кислотоустойчивую антитриглицеридную активность (КСИ-АТА) определяли в белковых осадках из первой утренней порции мочи 13 здоровых лиц и 50 больных ХГН (у 43 — первичный ХГН и у 7 — ХГН при системных заболеваниях). Больные (41 мужчина и 9 женщины) были в возрасте от 17 до 69 лет. По клинической картине заболевания они были разделены на 2 основные группы: 1-я (23 больных) — с латентной формой ХГН и 2-я (20 больных) — с нефротической формой ХГН. Латентный нефрит характеризовался отсутствием у больных отеков, нормальным содержанием белка и холестерина в сыворотке крови; основные проявления заболевания выражались изменением состава мочи:

умеренная протеинурия (0,05—3,0 г/с), в пробе Нечипоренко лейкоцитурия 250—17 500 в 1 мм³ и микрогематурия 250—28 000 в 1 мм³, гиаловые цилиндры.

При нефротической форме ХГН у всех больных были отеки, массивная протеинурия (3,6—25,0 г/с), гипоальбуминемия (2,8—1,1 г%), гипопротейнемия (5,8—3,6 г%), гиперхолестеринемия (315—600 мг%).

Клинические и лабораторные показатели у больных ХГН при системных заболеваниях с нефротическим синдромом соответствовали уровню их у больных с первичным ХГН нефротической формы.

В каждой группе было выделено 2 подгруппы больных: 1-я — с нормальной (64—131 мл/мин) и 2-я — с пониженной величиной клубочковой фильтрации (47—10 мл/мин).

Концентрацию ИТМ и КСИ-АТА определяли не в нативной моче, а в белковых осадках, полученных при добавлении к порции утренней мочи (10—100 мл) 2 объемов ацетона, охлажденного до 4 °С; раствор выдерживали 1 ч при 4 °С для формирования белкового осадка, после чего центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 мин отделяли осадок. Полученные белковые осадки растворяли в минимальном объеме дистиллированной воды, диализовали против дистиллированной воды в течение ночи при 4 °С и лиофилизировали. Содержание белка в осадках колебалось от 40 до 90 % (на сухую массу).

Белок в белковых осадках определяли методом Лоури и соавт. [15].

Антигенное содержание ИТМ в белковых осадках мочи определяли 2 методами. В тех случаях, когда использовали метод двойного иммуноэлектрофореза [8], электрофорез в первом направлении проводили на пластинках (5×5 см), покрытых слоем 1 % агарозы толщиной 1,5 мм; в лунки, находящиеся на расстоянии 0,5 см от края пластины и 0,8 см друг от друга, вносили 2,5 мкл (10—70 мкг белка) раствора белкового осадка в 0,01 М трис-барбитуровом буфере pH 8,6. Электрофорез проводили при 4 °С при напряжении 10 В/см, силе тока 8—10 мА в течение 15 мин в 0,18 М трис-барбитуровом буфере pH 8,6. Электрофорез во втором направлении проводили на пластинках (4×5 см), покрытых 1 % агарозой, содержащей 4,7 % анти-ИТМ-сыворотки, при напряжении 10 В/см и силе тока 20 мА при 4 °С в течение 4 ч. После прокрашивания белковых преципитатов в гелях кумасси ярко-синим R-250 и отмывания фона красителя высчитывали площади пиков, соответствующие молекулярным формам ИТМ с M_r 32 000 и 22 000, как произведение высоты преципитата на его ширину, измеренную на половине высоты пика.

Калибровочные графики зависимости площади пиков преципитатов, полученных при двойном иммуноэлектрофорезе, высокоочищенных изоформ ИТМ с M_r 32 000 и 22 000 от количества соответствующей формы ИТМ (от 0,05 до 0,2 мкг с M_r 32 000 и от 0,2 до 1,0 мкг с M_r 22 000) использовали для определения содержания молекулярных форм ИТМ в образцах белковых осадков мочи.

Метод ракетного иммуноэлектрофореза [8] использовали для определения содержания ИТМ в белковых осадках мочи 5 человек. Электрофорез проводили на пластинках (5×5 см), покрытых слоем (1,5 мм) 1 % агарозы, содержащей 4,7 % анти-ИТМ-сыворотки при 4 °С в течение 4 ч при напряжении 10 В/см

Концентрация ИТМ и КСИ-АТА ($M \pm m$) в моче здоровых лиц и больных с различными клиническими формами ХГН

Группа обследованных	Число обследованных	ИТМ, мкг/мл	КСИ-АТА, ИЕ/мл	Лейкоцитурия, число лейкоцитов в 1 мм ³
1-я — ХГН латентной формы	23	3,05±1,13	0,26±0,13	2526±2138
2-я — ХГН нефротической формы	20	26,17±7,55	1,37±0,35	4307±2208
3-я — ХГН при системных заболеваниях	7	0,29*; 7,04**; 3,57*; 2,63* 1,15*; 13,41**; 6,69**	0,02*; 0,72**; 0,18*; 0,44**; 0,74**; 0,27*; 1,20**	2500; 1750; 2000; 3500; 4500
4-я — здоровые	13	1,05±0,15	0,12±0,04	500—1000

Примечание. Одна звездочка — латентная форма системного ХГН, две звездочки — нефротическая форма системного ХГН.

и силе тока 20 мА в 0,18 М трис-барбитуровом буфере рН 8,6. Вычисление площадей иммунопреципитатов и построение калибровочных графиков зависимости величины площадей преципитатов, соответствующих формам с M_r 32 000 и 22 000, от количества ИТМ проводили, как описано выше для метода двойного иммуноэлектрофореза.

АТА ИТМ белковых осадков мочи (КСИ-АТА) измеряли спектрофотометрически, как описано в работе [2], по торможению БАЭЭ-эстеразной активности трипсина растворами белковых осадков мочи. Осадки растворяли в 0,1 М ацетатном буфере рН 4,0 и прогревали в течение 50 мин при 80 °С. КСИ-АТА выражали в условных ингибиторных единицах в 1 мл мочи (ИЕ/мл), принимая за 1 ИЕ такое количество ИТМ, которое тормозит расщепление 1 ммоль БАЭЭ трипсином за 1 мин при стандартных условиях.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 приведены данные о содержании ИТМ и КСИ-АТА в утренней моче 50 больных ХГН различной выраженности (латентная и нефротическая формы) в сравнении с этими показателями у 13 здоровых лиц. Определение этих двух показателей позволило оценить не только общие величины экскреции ИТМ в соответствии с его антигенным содержанием в утренней моче, но и количество свободного, некомплексированного с протеиназами ИТМ в динамике развития патологического процесса в почках.

Проведенные нами исследования показывают, что в 1 мл утренней мочи здорового человека содержится около 1 мкг ИТМ, что близко к данным Узун и соавт. [21], которые, используя радиоиммунологический метод, определили в суточной моче доноров концентрацию ИТМ в пределах 0,5—1,0 мкг/мл.

Как видно из табл. 1, развитие патологического процесса в почках сопровождается повышением концентрации ИТМ в моче и ее КСИ-АТА. При латентной форме ХГН оба показателя возрастают в сравнении с нормой в 3 и 2,3 раза соответственно ($p < 0,01$); при нефротической форме ХГН резко увеличена экскреция ИТМ: концентрация ИТМ увеличивается в 26 раз ($p < 0,001$), а КСИ-АТА — в 10—12 раз по сравнению с нормой и в 8,5 и 5 раз по сравнению с латентной формой ХГН. Вероятно, переход от латентной формы ХГН к нефротической представляет собой качественно и количественно новый этап в механизме образования ИТМ из ИТ, обусловленный развитием иммунного воспаления в почках.

Повышение концентрации ИТМ (от 2 до 13 раз) по сравнению с нормой выявлено также у больных нефротической формой ХГН при системных заболеваниях (на почве бактериального эндокардита, туберкулеза, амилоидоза, системной красной волчанки и др.).

Резкое возрастание концентрации ИТМ в моче больных с латентной и особенно с нефротической формами ХГН может быть обусловлено рядом причин: активным освобождением ИТМ из ИТ в плазме крови под влиянием ее протеолитических ферментов (например, калликреина плазмы крови) с последующей его фильтрацией через клубочковые капилляры в мочу, а также ускорением локального внутрипочечного протеолиза. В последнем случае вероятно преимущественная роль протеиназ клеточного происхож-

Содержание ИТМ и КСИ-АТА в моче больных ХГН в зависимости от функционального состояния почек ($M \pm m$)

Диагноз	Число обследованных	Клубочковая фильтрация, мл/мин	ИТМ, мкг/мл	КСИ-АТА, ИЕ/мл	Белок, мг/мл	Лейкоцитурия, число лейкоцитов в 1 мм ³
Латентная форма ХГН: нормальная функция почек	17	94 ± 6 (69—154)	1,33 ± 0,27	0,12 ± 0,03	0,75 ± 0,22	2553 ± 974
<i>p</i>		< 0,01	< 0,001	< 0,05	> 0,05	> 0,05
сниженная функция почек	6	30 ± 6 (11,5—50)	4,77 ± 1,24	0,39 ± 0,15	0,70 ± 0,37	2500 ± 1877
Нефротическая форма ХГН: нормальная функция почек	9	86 ± 5 (64—131)	20,59 ± 2,68	1,38 ± 0,20	12,89 ± 1,91	4764 ± 2391
<i>p</i>		< 0,01	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
стадия ХПН	11	30 ± 4 (10,4—47)	31,74 ± 7,38	1,36 ± 0,26	10,58 ± 1,80	3850 ± 553

дения (и в первую очередь таких, как моноциты, макрофагов, тучных клеток).

Учитывая высказываемые в литературе мнения о роли протеназ нейтрофилов (преимущественно эластазы) в механизме образования ИТМ из ИТ [11], мы сопоставили уровни ИТМ и КСИ-АТА в моче с показателями лейкоцитурии у обследованных 1-й и 2-й групп. Как видно из табл. 1, отсутствует прямая зависимость между уровнем ИТМ и КСИ-АТА в моче и лейкоцитурией. Так, при переходе от латентной формы ХГН к нефротической лейкоцитурия повышается в 1,7 раза, в то время как уровень ИТМ и КСИ-АТА достоверно ($p < 0,001$) увеличиваются в 8,5 и 5,3 раза соответственно (см. табл. 1). Эти факты делают гипотезу о важной роли протеназ нейтрофилов в механизме образования ИТМ из ИТ при ХГН маловероятной.

С целью установления взаимосвязи между функциональным состоянием почек (т. е. стадией заболевания) и количеством экскретируемого с мочой ИТМ мы систематизировали полученные нами данные о концентрации ИТМ и КСИ-АТА в соответствии с величинами клубочковой фильтрации (табл. 2). Подобное выражение полученных данных оказалось чрезвычайно информативным.

Как видно из табл. 2, величины концентрации ИТМ и КСИ-АТА оказались достоверно ($p < 0,001$) зависящими

ми в группе больных латентной формой ХГН от функции почек, о которой судили по величине клубочковой фильтрации. Так, при нормальной функции почек величины экскреции ИТМ и КСИ-АТА соответствовали норме (см. табл. 1); наряду с этим у больных ХГН латентной формы со сниженной функцией почек в отличие от здоровых лиц, а также от больных этой формой ХГН с нормальной функцией почек отмечено достоверное ($p < 0,001$) возрастание этих величин в 3,5 и 3,2 раза соответственно. Таким образом, увеличение экскреции ИТМ с мочой оказалось независимым от уровня протенурии и лейкоцитурии (см. табл. 2).

У больных с нефротической формой ХГН (см. табл. 2) переход болезни в стадию почечной недостаточности характеризуется тенденцией к дальнейшему прогрессирующему увеличению концентрации ИТМ в моче от 20,6 до 31,7 мкг/мл. У некоторых тяжелобольных с нефротической формой ХГН на стадии ХПН величина клубочковой фильтрации была снижена до 10 мл/мин, а концентрация ИТМ в моче составляла 60,2 мкг/мл, что превышало норму в 57,3 раза.

Различия в концентрации ИТМ в моче в подгруппах больных с латентной и нефротической формами ХГН в зависимости от величины клубочковой фильтрации отмечали при отсутствии достоверных ($p > 0,05$) различий в уровне протенурии и лейкоцитурии

внутри каждой группы (1-й и 2-й) больных ХГН (см. табл. 2). Не выявлены изменения в КСИ-АТА при переходе нефротической формы ХГН в стадию ХПН, по-видимому, вследствие усиленного комплексообразования ИТМ с протеиназами.

Таким образом, данные табл. 2 свидетельствуют, что повышение концентрации ИТМ в моче при развитии почечной недостаточности не обусловлено протениурией и лейкоцитурией. Маловероятен также механизм внутриплазменного образования ИТМ из ИТ и его усиленной фильтрации через клубочки почек в мочу при ХГН, так как клубочковая фильтрация при ХПН существенно снижается, а концентрация ИТМ продолжает возрастать.

Можно предположить, что значительное увеличение концентрации ИТМ в моче при прогрессировании ХГН и усилении выраженности иммунного воспаления в почках обусловлено интенсивным протеолизом ИТ ферментами клеток (моноциты, макрофаги, тучные клетки), которым в настоящее время придают ведущее значение в патогенезе гломерулонефрита [9].

Дальнейший рост концентрации ИТМ в моче больных ХПН (максимально до 30—60 мкг/мл) может быть обусловлен присутствием в почках активного плазмина [1], роль которого в протеолизе ИТ и образовании КСИ протеиназ отмечали ранее [11]. Наряду с этим мы придаем важное значение протеиназам клеток, участвующих в образовании соединительной ткани (фибробласты, тучные клетки, гистiocиты) на стадии сморщенной почки.

В литературе активно обсуждается вопрос о величине молекулярной массы ИТМ, освобождающегося в мочу при ограниченном протеолизе ИТ. Ранее в суточной моче здоровых лиц и больных нефропатиями были обнаружены 2 формы ИТМ с M_r 32 000 и 22 000 [7]. Мы выявили в утренней моче здоровых лиц и больных с латентной и нефротической формами ХГН только одну форму ИТМ (рис. 1, см. вклейку), молекулярная масса которой в соответствии с ранее проведенными исследованиями с использованием электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия равна 32 000 D [7]. Форма с M_r 22 000 представляет собой

Таблица 3
Содержание ИТМ в моче донора и больных ХГН (в мкг/мл), определенное методами двойного и ракетного иммуноэлектрофорезов

Диагноз	Ракетный иммуноэлектрофорез	Двойной иммуноэлектрофорез
Донор А.	0,63	0,81
Больной Л. (ХГН, латентная форма, нормальная функция почек)	0,91	1,10
Больной Д. (ХГН, латентная форма, сниженная функция почек)	7,23	6,14
Больной К. (ХГН, нефротическая форма, нормальная функция почек)	19,91	20,23
Больной М. (ХГН, нефротическая форма, стадия ХПН)	55,17	52,48

продукт протеолиза высокомолекулярной формы ИТМ протеиназами мочи во время ее сбора в течение суток. Это было подтверждено нашими исследованиями по идентификации молекулярных форм ИТМ в утренней моче больных нефропатиями, хранившейся при комнатной температуре в течение 1 сут (рис. 2, см. вклейку). Превращение формы ИТМ с M_r 32 000 в форму с M_r 22 000 не было выявлено нами в моче здоровых лиц при тех же условиях.

Учитывая возможность использования метода количественного определения антигенного содержания ИТМ в моче в диагностических целях при ранних формах ХПН, мы попытались упростить методику и заменить трудоемкий метод двойного иммуноэлектрофореза сравнительно простым методом ракетного иммуноэлектрофореза (рис. 3, см. вклейку). Эта замена стала возможной в связи с установлением факта наличия одной формы ИТМ с M_r 32 000 в моче здоровых лиц и больных ХГН. Обоснованность замены двойного иммуноэлектрофореза ракетным подтверждают данные табл. 3. Применение метода ракетного иммуноэлектрофореза предоставляет реальную возможность определения концентрации ИТМ в моче как одного из показателей дифференциальной диагностики формы и стадии ХГН.

Установленный в данной работе факт значительного повышения концентрации ИТМ в моче, зависящего от клинической формы заболевания (тя-

жести ХГН) и функционального состояния почек, может быть использован для выявления ранних стадий прогрессирования ХГН и развития почечной недостаточности.

Авторы выражают благодарность О. Г. Оглоблиной (ВКНЦ АМН СССР) за предоставление высокоочищенного препарата ИТМ из мочи больных нефритами и В. В. Карпицкого (Крымский медицинский институт) за получение моноспецифической антисыворотки к ИТМ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреевко Г. В., Полянцева Л. Р., Подорожская Л. В. // Тер. арх. — 1982. — № 7. — С. 53—57.
2. Нуртимова В. Ф., Пасхина Т. С. // Биохимия. — 1969. — Т. 34. — № 2. — С. 282—292.
3. Оглоблина О. Г., Якубовская Р. И., Платонова Л. В. и др. // Биоорг. химия. — 1976. — Т. 2. — № 11. — С. 1568—1579.
4. Оглоблина О. Г. // Биохимия. — 1982. — Т. 47. — № 10. — С. 1587—1598.
5. Оглоблина О. Г., Галстян Н. А., Карпицкий В. В. и др. // Вопр. мед. химии. — 1982. — № 4. — С. 86—93.
6. Оглоблина О. Г., Платонова Л. В., Мартынов В. Ф. и др. // Укр. биохим. журн. — 1983. — Т. 55. — № 3. — С. 285—294.
7. Оглоблина О. Г., Полянцева Л. Р., Пасхина Т. С. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 2. — С. 104—108.
8. Руководство по количественному иммуноэлектрофорезу: Пер. с англ. — М., 1977.
9. Шилов Е. М., Лесков В. П., Гордовская Н. Б. // Тер. арх. — 1986. — № 3. — С. 135—141.
10. Bromke B., Kueppers F. // Biochem. Med. — 1982. — Vol. 27. — P. 56—57.
11. Diell T., Dobrinski W., Hochstrasser K. // Hoppe-Seyler's Z. physiol., Chem. — 1979. — Bd 360. — S. 1313—1318.
12. Franck C., Pedersen J. // Scand. J. Lab. Invest. — 1983. — Vol. 43. — P. 151—155.
13. Hochstrasser K., Wachter E., Albrecht G., Reisinger P. // Biol. Chem. Hoppe-Seyler. — 1985. — Vol. 366. — P. 473—478.
14. Jönsson B. M., Löffler Ch., Ohlson K. // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. — 1982. — Vol. 363. — P. 1167—1175.
15. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.

16. Machara S., Sumi H., Toki N. // Enzyme. — 1981. — Vol. 26. — P. 122—128.
17. Maruyama M., Sumi H., Akazawa K., Miura H. // Clin. chim. Acta. — 1984. — Vol. 138. — P. 205—213.
18. Mizon C., Banduyck M., Bonnetterre J., Mizon J. // Bull. Cancer (Paris). — 1983. — Vol. 70. — P. 266—270.
19. Reisinger P., Hochstrasser K., Albrecht G. et al. // Biol. Chem. Hoppe-Seyler. — 1985. — Vol. 366. — P. 479—483.
20. Toki N., Sumi H. // Acta haemat. (Basel). — 1982. — Vol. 67. — P. 110—114.
21. Usui T., Maehara S., Kawashita E. et al. // Enzyme. — 1984. — Vol. 31. — P. 11—16.

Поступила 20.08.86

URINARY TRYPSIN INHIBITOR IN PATIENTS WITH GLOMERULONEPHRITIS

T. S. Pashkina, L. V. Platonova, L. R. Polyantseva

Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Laboratory of Nephrology, 1 Medical School, Moscow

Concentrations of urinary trypsin inhibitor (UTI) and acid stable antitryptic activity (AS-ATA) were estimated in morning urine of 50 patients with chronic glomerulonephritis and of 13 healthy persons in order to detect interrelationship between severity of kidney impairment and the content of the inhibitor in urine. In healthy persons concentrations of UTI and AS-ATA were equal to $1.05 \pm 0.15 \mu\text{g/ml}$ and $0.12 \pm 0.04 \text{ IU/ml}$, respectively. Similar values of the substances were detected in patients with latent form of glomerulonephritis and normal kidney function. Statistically distinct ($P < 0.01$) increase of both these inhibitors was found in urine of patients with latent form of glomerulonephritis and impaired kidney function ($4.77 \pm 1.24 \mu\text{g/ml}$ and $0.39 \pm 0.15 \text{ IU/ml}$, respectively) as well as with nephrotic form ($26.17 \pm 7.55 \mu\text{g/ml}$ and $1.37 \pm 0.35 \text{ IU/ml}$, respectively) of glomerulonephritis of both primary type and caused by accompanying systemic diseases. Further increase in concentration of UTI up to $31.74 \pm 7.38 \mu\text{g/ml}$ and activation of AS-ATA in urine was observed in the patients with nephrotic form of glomerulonephritis at the step of chronic kidney insufficiency. The increase in UTI concentration observed did not correlate with the level of leukocyturia. Proteinases of monocytes, mast cells, fibroblasts, involved in inflammation and formation of connective tissue in kidney, but not of enzymes from polymorphonuclear leukocytes, appear to be responsible for formation of UTI out of its precursor inter- α -trypsin inhibitor in glomerulonephritis.

Н. Н. Прозоровская, Т. Н. Сучкова, С. В. Сучков, А. А. Дельвиг

О ВОЗМОЖНОМ УЧАСТИИ МЕХАНИЗМОВ ЕСТЕСТВЕННОЙ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ В НАРУШЕНИЯХ КАТАБОЛИЗМА КОЛЛАГЕНА ПРИ ОЧАГОВОЙ СКЛЕРОДЕРМИИ

НИИ медицинской энзимологии АМН СССР, Москва

В основе дезорганизации и структурной перестройки соединительной ткани при склеродермии лежат различного рода аномалии в метаболизме соединительнотканых компонентов и в первую очередь коллагеновых белков [5, 20, 27]. Имеются данные об участии клеток иммунной системы, Т-лимфоцитов и макрофагов в регуляции физиологических функций фибробластов [16, 23, 26, 39, 43]. Однако не изученным остается вопрос о взаимоотношениях фибробластов с особой популяцией лимфоцитов — естественными клетками-киллерами (НК-клетками) в процессе реализации основных функций соединительной ткани.

Известно, что НК-клетки, способные к спонтанному лизису различного рода мишеней, осуществляют в организме контроль за пролиферацией и дифференцировкой различных клеточных элементов, в том числе фибробластов [6, 7, 14, 19]. Узнавание киллерами своих мишеней происходит вследствие того, что те или иные клетки по каким-либо причинам (опухольная трансформация, аутоиммунные повреждения и др.) видоизменяют антигенную специфичность собственной поверхности и становятся в антигенном отношении для организма чужеродными [21, 31, 39]. Так, по данным работы [32], интеграция провируса в геном фибробластов влечет за собой экспрессию хозяином вирусных белков, антигенная специфичность которых обуславливает формирование у фибробластов по отношению к лимфоцитам-киллерам свойств высокоаффинной мишени. Аналогичной точки зрения, придающей особую значимость феномену антигенной конверсии, придерживаются авторы работ [6, 7] при анализе механизмов узнавания НК-клетками своих мишеней. Таким образом, ослабление функции контроля со стороны НК-клеток может являться одной из непосредственных причин увеличения уровня пролиферирующей активности фибробластов, что приводит в даль-

нейшем к усилению коллагенообразования в целом. Веским доказательством такой точки зрения служат данные [28] о том, что в патогенезе склеродермии играют роль не только количественные сдвиги в биосинтезе коллагена, но и глубокие качественные изменения в самой его структуре, обуславливающие в конечном счете серию вариаций в антигенной специфичности коллагеновых детерминант.

Задача настоящей работы состояла в изучении возможных взаимоотношений между состоянием естественной цитотоксичности (ЕЦТ) и характером катаболизма коллагена у больных очаговой склеродермией. Поскольку основным метаболическим маркером коллагена является оксипролин (ОП), определение показателей экскреции с мочой этого метаболизма в свободной (СФОП) и пептидосвязанной (ПФОП) форме использовали для оценки соотношения уровней биосинтеза и деградации коллагеновых белков.

Методика

Клинический материал. Обследовано 29 человек практически здоровых доноров (группа 1, согласно классификации) и 11 больных (мужчин 2, женщин 9) в возрасте от 22 до 68 лет, страдающих очаговыми формами склеродермии от 3—4 мес до 8 лет (группа 2). Все пациенты были классифицированы в зависимости от длительности, степени тяжести, активности и распространенности патологического процесса (табл. 1—3); (группы 2.1, 2.2 и 2.3). В группу 2.1 вошло 2 больных со свежеевыявленной (менее 4 мес) генерализованной формой бляшечной склеродермии, характеризующейся быстропрогрессирующим течением и наличием у больных выраженных субъективных ощущений в виде кожного зуда, чувства покалывания, парестезий и болей в конечностях.

К группе 2.2 отнесли 4 человека с ограниченной формой бляшечной склеродермии длительностью от 6 мес до 1 года, медленным развитием очагов поражения кожи и наличием слабовыраженных субъективных ощущений.

И, наконец, группу 2.3 составили 5 пациентов с хроническим течением (более 4 лет) заболевания и наличием обширных участков атрофии кожи.

Реактивы. Сефадекс G-10 и G-50 фирмы «Pharmacia» (Швеция). Тойперл HW-50 фирмы «Toyo Soda» (Япония). Хлорамин Т, п-диметил-

Показатели экскреции с мочой ОП у больных очаговой склеродермией ($M \pm m$)

Группа обследованных	n	Содержание в моче		Относительное содержание в моче, %, от ООП	
		ООП, мг на 100 мл	ОП/КН, ммоль/моль	СФОП	ПФОП ₁
Здоровые доноры	16	1,1 ± 0,2 (0,7—1,5)	10,3 ± 1,1 (8,0—12,6)	4,6 ± 0,6 (3,3—5,9)	17,0 ± 1,9
Больные очаговой склеродермией	11	2,9 ± 0,4 (2,0—3,8)	29,4 ± 2,4 (24,0—34,8)	18,2 ± 2,7 (12,1—24,3)	—
в том числе:					
2.1	2	3,5 ± 0,9	31,8 ± 3,1	5,9 ± 0,4	4,3 ± 1,6
2.2	4	3,5 ± 0,9	31,8 ± 3,1	22,2 ± 3,4	39,1 ± 5,8
2.3	5	2,1 ± 0,4	27,0 ± 3,8	15,1 ± 3,7	19,4 ± 3,3

Примечание. Здесь и в табл. 2 в скобках — значения 95 % доверительного интервала.

аминобенальдегид фирмы «Sigma» (США), ОП фирмы «Reanal» (Венгрия). Остальные реактивы аналитической степени чистоты квалификации о. ч.

Исследование показателей экскреции с мочой ОП. Для этой цели использовали утреннюю порцию мочи, предварительно отфильтрованную, как описано ранее [9].

Фракционирование мочи на Сефадексе G-10 описано ранее [9]. В работе использовали ПФОП₁ и ПФОП₂, содержание ОП-пептиды с молекулярными массами (m_r) более 0,7 кД и менее 0,7 кД соответственно. Во фракции ПФОП₂ определяли СФОП. Содержание общего ОП (ООП), рассчитываемого по сумме ОП во фракциях ПФОП₁ и ПФОП₂, выражали в миллиграммах на 100 мл фракционированной мочи или в пересчете на креатинин (КН), соотношение ОП/КН (в миллимолях на 1 моль).

Фракционирование на Сефадексе G-50 или Тойперл HW-50. На колонку с любым из двух молекулярных сит размерами 2,2 × 100 см нанесли фракцию ПФОП₁ объемом 3 мл. Колонку предварительно калибровали с помощью белков-метчиков фирмы «Merck» (ФРГ) — бычьего сывороточного альбумина, химотрипсиногена, миоглобина и инсулина, имеющих значения m_r , равные 45, 25, 17,8 и 3,495 кД соответственно. Элюирование проводили при 220 нм с помощью 0,01 М NH₄OH со скоростью 21 мл/ч. Объем фракций 2,8 мл. Фракции, содержащие ОП, объединяли по объему в соответствии с выбранным диапазоном m_r , рассчитанным на основании калибровочной кривой, лиофилизировали и определяли в них содержание ОП. ОП в составе пептидов с m_r менее 1,5 кД вычисляли суммированием ОП во фракции ПФОП₁ и

объединенной фракции пептидов с m_r от 0,7 до 1,5 кД. При использовании Тойперл HW-50 и Сефадекса G-50 были получены аналогичные результаты, вследствие чего в табл. 2 они приведены в совокупности.

Определение содержания ОП. ОП во фракциях ПФОП₁ и ПФОП₂, а также в объединенной фракции лиофилизированных элюатов, собранных с колонок, определяли по методу [2], опуская в случае определения СФОП стадию кислотного гидролиза. Определение ОП в каждой индивидуальной фракции после гель-филтрации проводили методом целочного гидролиза по [17], позволяющего идентифицировать коллагеновые пептиды в составе пула других белков.

Содержание КН в моче определяли методом [8].

Уровень ЕЦТ. Лимфоциты выделяли из гепаринизированной крови по методу [33]. Определение литической активности НК клеток осуществляли в стандартном микроцитотоксическом тесте с использованием в качестве мишеней клеток линии K562, меченных (³H)-уридином [10]. Оценку величины спонтанного цитолиза *in vitro* производили при оптимальном соотношении эффектор:мишень, равном 50:1 [10]. Для количественного расчета показателей применяли цитотоксический индекс (ЦИ):

$$\text{ЦИ} = \left(i - \frac{\text{число импульсов в тест-ячейке}}{\text{число импульсов в контроле}} \right) \times 100 \%$$

Контролем служили клетки-мишени, инкубируемые в отсутствие лимфоцитов.

Т а б л и ц а 2

Состав оксипролинсодержащих пептидов в моче больных очаговой склеродермией в зависимости от их молекулярной массы ($M \pm m$)

Группа обследованных	n	Содержание, % от ООП и состав				
		ПФОП ₁	пептидов с m_r в диапазоне, кД			
			< 1,5	1,5—5,0	5,0—10,0	> 10,0
Здоровые доноры	16	93,9 ± 2,3 (88—100)	80,7 ± 3,2 (73—89)	10,0 ± 1,4 (7—13)	2,9 ± 0,4 (2—4)	0,3 ± 0,1 (0,1—0,5)
Больные очаговой склеродермией,	9	—	—	—	—	—
в том числе:						
2.2	4	77,8 ± 3,4 (68—87)	49,5 ± 1,9 (44—55)	9,9 ± 0,8 (8—12)	12,3 ± 1,8 (7—17)	7,3 ± 0,8 (5—10)
2.3	5	84,9 ± 3,7 (76—94)	67,5 ± 2,4 (61—74)	6,0 ± 0,7 (4—8)	10,9 ± 1,0 (7—14)	0,5 ± 0,1 (0,2—0,8)



Рис. 1. Двойной иммуноэлектрофорез высокоочищенных препаратов ИГМ с M_r 32 000 и 22 000 (а), полученных из мочи больных нефротатиями, образца белкового осадка мочи здорового человека (б) и больного с нефротической формой ХГН (в).
а — 0,13 мкг ИГМ с M_r 32 000 (пик 1) и 0,63 мкг ИГМ с M_r 22 000 (пик 2); б — 0,013 мг белкового осадка мочи здорового человека; в — 0,036 мг белкового осадка мочи больного ХГН.

Рис. 2. Двойной иммуноэлектрофорез белкового осадка, полученного из свежей утренней мочи больного К с нефротической формой ХГН (а) и из той же мочи, стоявшей в течение 1 сут при комнатной температуре (б).

а — 0,040 мг белкового осадка свежей утренней мочи; б — то же после хранения утренней мочи в течение 1 сут.

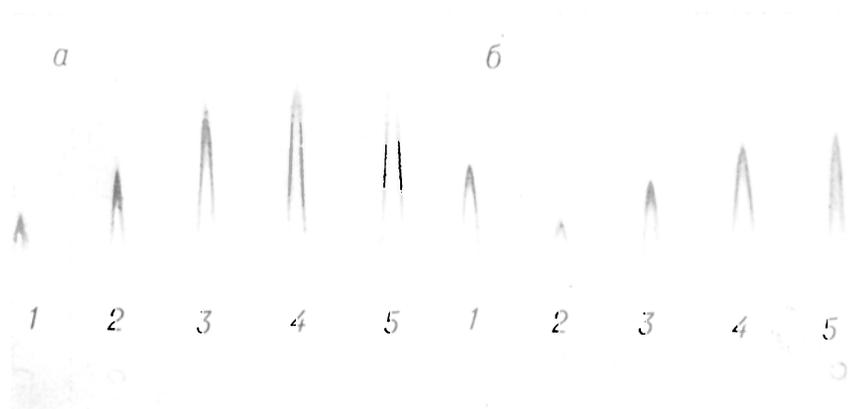
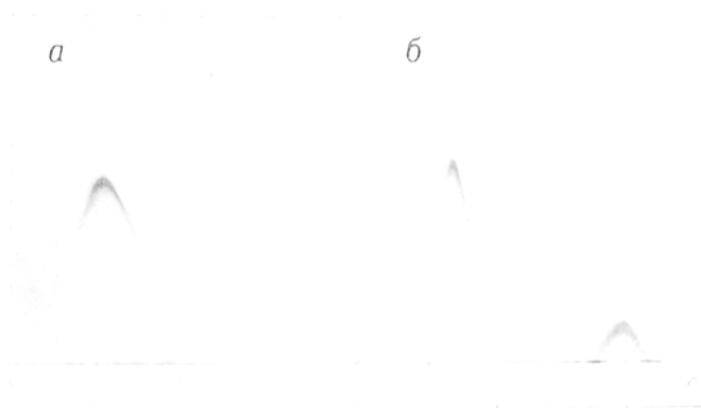


Рис. 3. Ракетный иммуноэлектрофорез высокоочищенного препарата ИГМ с M_r 32 000 из мочи больных нефротатиями (а) и образцов утренней мочи здорового человека и больных ХГН (б).
а: 1 — 0,025 мкг ИГМ с M_r 32 000, 2 — 0,075 мкг, 3 — 0,125 мкг, 4 — 0,186 мкг, 5 — 0,250 мкг; б — белковые осадки мочи здорового человека (1 — 0,0063 мг белка) и больных ХГН (2 — 0,0030 мг белка, 3 — 0,014 мг, 4 — 0,040 мг, 5 — 0,105 мг).

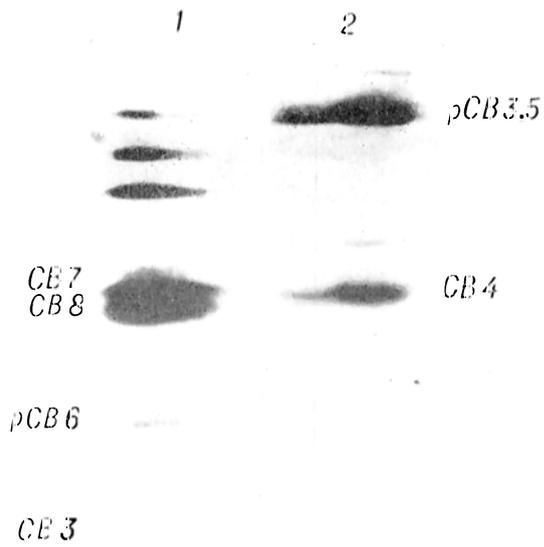


Рис. 1. Флюорограмма ПААГ (15 %) после электрофореза пептидов, полученных в результате обработки бромцианом кусочков гелей, содержащих меченые ^{14}C -глицином цепи проколлагена I типа.

1 — пептиды цепи про α 1(1); 2 — пептиды цепи про α 2(1).

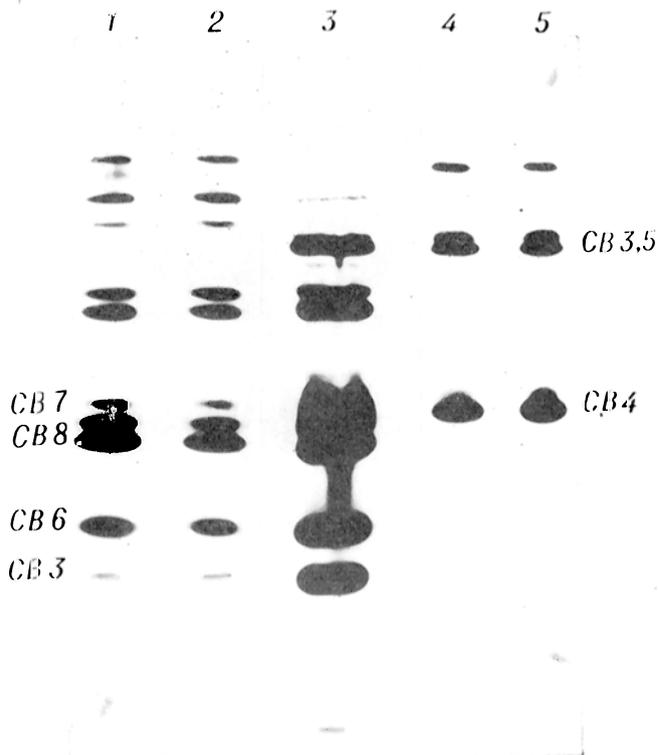


Рис. 2. Электрофорез в 15 % ПААГ бромциановых пептидов коллагена I типа.

Гель окрашен аммонийным комплексом серебра. 1, 2 — пептиды цепи α 1(1), расщепление в кусочках гелей; 4, 5 — пептиды цепи α 2(1), расщепление в кусочках гелей; 1, 4 — кусочки вырезаны из гелей, окрашенных кумассей в растворе; 2, 5 — кусочки вырезаны из гелей, окрашенных кумассей в 2 % уксусной кислоте; 3 — пептиды не фракционированного на цепи коллагена I типа, обработанного бромцианом в растворе.

Уровень естественной цитотоксичности у больных очаговой склеродермией ($M \pm m$)

Группа обследованных	n	ЦИ	p
Здоровые доноры	29	54,6±3,6	—
Больные очаговой склеродермией, в том числе:	11	—	—
2.1.	2	64,9±1,8	<0,001
2.2.	4	26,8±5,2	<0,001
2.3.	5	51,9±2,9	>0,05

Результаты определения содержания в моче ОП представлены в табл. 1, из данных которой видно, что для очаговой склеродермии характерно заметное возрастание уровня экскреции с мочой основного метаболического маркера коллагена — ОП. Это следует из увеличения показателей ООП и ОП/КН в 3—3,5 раза по сравнению с таковыми группами здоровых доноров ($p < 0,05$ и $p < 0,001$ соответственно). В то же время эти показатели не обнаруживают статистически значимых различий в зависимости от длительности и активности процесса, вследствие чего их патогенетическая ценность ограничивается главным образом установлением самого факта наличия дефекта в метаболизме коллагеновых белков.

Результаты определения относительного содержания СФОП и ПФОП₁ в составе ООП также отражены в табл. 1. Во всех случаях (исключение составили 2 пациента группы 2.1) доля СФОП возрастает по сравнению с нормой в 4—5 раз ($p < 0,001$). У 2 пациентов группы 2.1 с быстро прогрессирующим течением свежесывявленной генерализованной формы бляшечной склеродермии отмечали нормальные показатели СФОП. Полученные результаты свидетельствуют о наличии различий в механизмах метаболических дефектов коллагена в зависимости от таких клинических параметров, как длительность, степень тяжести и распространенность патологического процесса.

В этой связи исключительный интерес приобретает сопоставление имеющихся данных с результатами анализа содержания ОП во фракции ПФОП₁ (см. раздел «Методика»). Как видно из табл. 1, показатели ПФОП₁ резко различаются у пациентов всех трех групп. Так, у больных группы 2.1, имеющих нормальный уровень СФОП, доля ПФОП₁ значительно ниже контрольных цифр ($p < 0,001$). Уменьшение экскреции ОП в составе пептидов с m_r более 0,7 кД (фракция ПФОП₁) и соответственно увеличение доли ОП во фракции пептидов с m_r менее 0,7 кД (фракция ПФОП₂) свидетельствует о важной роли механизмов коллагенолиза в патогенезе наиболее ранних, активных стадий очаговой

склеродермии, отличающихся интенсивной генерализацией процесса и быстрым развитием очагов атрофии, а впоследствии и фиброза кожи.

Иная картина наблюдается у 4 пациентов группы 2.2. У этих больных отмечается значительно менее активное (подострое), чем у 2 предыдущих, течение заболевания с медленным развитием специфических очагов поражения, при этом отсутствует яркая клиническая симптоматика и имеется тенденция к переходу процесса в хроническую стадию. В этом случае показатели ПФОП₁ значительно превышали нормальные цифры ($p < 0,001$), причем это увеличение коррелировало с высокими показателями как ООП, так и СФОП (см. выше). Указанное обстоятельство позволяет заключить, что у больных данной группы по мере развития заболевания и перехода его в хроническую стадию на фоне интенсивного коллагенолиза большой удельный вес приобретают процессы коллагенообразования *de novo*, в основе которых лежит, по-видимому, повышенная пролиферирующая и биосинтетическая активность фибробластов [42, 43].

В хронической стадии очаговой склеродермии (клиническая группа 2.3) интенсивность коллагенообразования, очевидно, снижается, о чем свидетельствует и уменьшение экскреции с мочой ООП, и нормализация показателей ПФОП₁. Не исключено, что менее активными становятся и процессы деградации коллагена, хотя соответствующие этому показатели СФОП не имеют статистически достоверных отличий от аналогичных цифр у больных клинических групп 2.1 и 2.2 ($p > 0,05$).

Для более углубленной оценки состояния катаболизма коллагена исследовали относительное содержание и

состав ОП-пептидов в зависимости от значений их m_r . Анализ пептидного профиля показал, что в ранних стадиях заболевания длительностью менее года с медленным развитием характерной клинической симптоматики (см. табл. 2, группа 2.2), на фоне уменьшения суммарного ПФОП (ПФОП_c) отмечается заметное обеднение фракции ОП-пептидов с m_r менее 1,5 кД, тогда как доля крупномолекулярных фрагментов с m_r 5 кД и более значительно возрастает.

У лиц с хроническим течением заболевания более 4 лет (см. табл. 2, группа 2.3), имеющих обширные участки атрофии кожного покрова, наблюдается иная картина — в выделяемой такими больными моче уровень экскреции крупномолекулярных ОП-пептидов (в диапазоне m_r 1,5—10,0 кД) снижается. Положительная динамика в сторону нормализации показателей экскреции характерна и для низкомолекулярных фрагментов (менее 1,5 кД) с той лишь разницей, что относительное их содержание в составе экскретуемого суммарного пула ОП-пептидов возрастает.

Таким образом, при очаговой склеродермии в зависимости от длительности, степени тяжести, активности и распространенности процесса изменяется либо набор коллагенолитических ферментов, либо характер посттрансляционных модификаций коллагеновых волокон [5, 20, 27, 28]. В общем случае, однако, содержание ОП в составе пептидов с m_r менее 1,5 кД принято считать показателем интенсивности коллагенолиза, а с m_r более 1,5 кД — показателем интенсивности коллагенообразования *de novo* [24, 40].

Исходя из этих предпосылок и полученных нами результатов, можно сделать вывод, что развитие очаговой склеродермии сопровождается постепенным затуханием процессов крайне интенсивного коллагенообразования в целом. В то же время все большее значение приобретают механизмы коллагенолиза и посттрансляционной модификации (процессинга) коллагеновых белков, активизация которых указывает на происходящие при очаговой склеродермии адаптационные перестройки в катаболизме основного белка соединительной ткани.

Непосредственный контроль за ско-

ростью пролиферации фибробластов осуществляют в организме НК-клетки [19, 31, 32]. Появление у клеточных мишеней чувствительности к лимфоцитам-киллерам определяется не только изменением антигенного рисунка собственной поверхности, но также и случайными «всплесками» в нормальных средних частотах митозов и соответственно увеличением среднечисленной популяции активно пролиферирующих и синтезирующих коллаген фибробластов [19, 41]. Возникновение определенных колебаний уровня ЕЦТ может играть существенную роль в нарушениях физиологических функций соединительной ткани вообще и, в частности, в катаболизме коллагеновых белков при очаговых формах склеродермии.

Исходя из вышесказанного, у больных очаговой склеродермией исследовали состояние ЕЦТ, используя для этой цели тест па лизис донорскими лимфоцитами *in vitro* клеток-мишеней линии К562, меченных (³H)-уридином [10]. Результаты этой серии экспериментов представлены в табл. 3, из которой видно, что уровень ЕЦТ сильно различается в зависимости от клинических параметров патологического процесса.

У 2 пациентов группы 2.1 литическая активность НК-клеток заметно превышает нормальные показатели ($p < 0,001$), коррелируя с ярко выраженной у таких больных клинической симптоматикой, с одной стороны и, главное, ассоциируясь с высоким уровнем деградации коллагена, с другой.

В противоположность этому для лиц, страдающих ограниченной формой бляшечной склеродермии также менее года, но отличающихся от пациентов группы 2.1 локализovanностью процесса, медленным развитием очагов поражения и отсутствием неприятных субъективных ощущений, характерно значительное уменьшение значений ЦИ (на 45—50 %), коррелирующее со снижением интенсивности коллагенолиза. Наблюдаемая корреляция, а также тенденция к нормализации процессов деградации коллагеновых белков у пациентов группы 2.1 и 2.2 позволяет предположить наличие при очаговой склеродермии причинной связи между уровнем ЕЦТ и характером катаболизма коллагена.

Интересно отметить, что с переходом заболевания в хроническую стадию (см. табл. 3, группа 2.3) литическая активность НК-клеток начинает возрастать и постепенно приближается к нормальным цифрам. У этих же пациентов наблюдается и тенденция к снижению интенсивности коллагенообразования (см. выше), причем эта тенденция коррелирует с возрастанием суммарной коллагенолитической активности и, что более вероятно, с изменением самого набора коллагенолитических ферментов.

Следовательно, для очаговой склеродермии характерны колебания уровня ЕЦТ, зависящие от длительности, степени тяжести и распространенности патологического процесса, с одной стороны, и коррелирующие с соответствующими перестройками в катаболизме (не исключено, что и в посттрансляционной модификации) коллагеновых белков, с другой. Для поддержания сбалансированного уровня между коллагенолизом и коллагенообразованием НК-клетки наряду с основным механизмом контроля — цитолитическим — используют также секретлируемые водорастворимые факторы с иммунорегуляторными свойствами, такие, например, как интерлейкины, интерфероны и т. п. [7, 39, 41].

Колебания в уровне ЕЦТ наблюдаются и при других коллагенозах, к которым относятся, в частности, системная красная волчанка [1, 3, 12, 18, 25] и рассеянный склероз [15], причем во всех этих случаях важнейшим патогенетическим звеном является наличие серьезных дефектов в обмене коллагеновых белков.

Роль НК-клеток в патогенезе указанных заболеваний не ограничивается контролем пролиферативной активности фибробластов [31]. Снижение уровня ЕЦТ может, в частности, способствовать поликлональной активации В-лимфоцитов и гиперстимуляции аутоиммунных механизмов. При коллагенозах факт существования резких сдвигов в антигенной специфичности коллагеновых детерминант не вызывает сомнений [28, 29, 37]. Таким образом, учитывая данные о высокой чувствительности фибробластов, экспрессирующих на своей поверхности вирусспецифические белки, к литическому действию НК-клеток [4, 11, 13, 30, 33, 34, 36], можно заключить, что популя-

ция естественных клеток-киллеров осуществляет свои регуляторные функции в отношении обмена коллагеновых белков по крайней мере на двух различных уровнях — прямом, используя для этой цели мощные цитолитические механизмы, и опосредованном, т. е. через систему В-лимфоцитов, контролируя в этом случае интенсивность образования аутоантител против коллагена и других компонентов соединительной ткани. Последнее обстоятельство особенно интересно тем, что у больных группы 2.1 высокая литическая активность НК-клеток (см. табл. 3), обуславливающая, по-видимому, низкий уровень коллагенообразования вследствие цитолиза фибробластов и, наоборот, высокую интенсивность коллагенолиза (см. табл. 1 и 2), коррелирует с отсутствием в крови аутоантител к коллагеновым белкам (данные не приводятся). Это свидетельствует о сохранении при очаговой склеродермии в ее наиболее ранних стадиях адекватного уровня ЕЦТ, что дает возможность в дальнейшем проводить терапевтическую коррекцию тех или иных нарушений во взаимоотношениях между состоянием ЕЦТ и метаболизмом коллагена по крайней мере при очаговых формах склеродермии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александрова Е. Н., Насонов Е. Л., Быховская С. Ю. и др. // Тер. арх. — 1984. — № 5. — С. 29—32.
2. Бергман К., Локсли М. // Современные методы в биохимии. — М., 1977. — С. 262—264.
3. Бунатян К. А., Зедгенидзе М. С., Алексеева Л. В. и др. // Иммунология. — 1985. — № 5. — С. 62—65.
4. Владимирцев В. А., Ладеева Ж. И., Гусева Н. Г. // Вопр. ревмат. — 1982. — № 1. — С. 33—38.
5. Дельвиг А. А. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 2. — С. 2—14.
6. Ломакин М. С., Майский И. П. // Успехи совр. биол. — 1985. — Т. 99, № 2. — С. 249—263.
7. Ломакин М. С., Майский И. П., Бочко Г. М. // Там же. — Т. 100, № 3(6). — С. 395—409.
8. Поппер А. // Методические указания по применению унифицированных клинических лабораторных методов исследования / Под ред. В. В. Меньшикова. — М., 1973. — С. 70—71.
9. Прозоровская Н. Н., Глиняная С. В., Дельвиг А. А. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 6. — С. 84—86.
10. Сучкова Т. Н., Чекнев С. Б. // Вестн. дермат. — 1986. — № 10. — С. 13—17.
11. Яценко О. Б. // Врач. дело. — 1983. — № 2. — С. 61—64.

12. Egan M. L., Mendelson S. L., Abo T. et al. // *Arthr. a. Rheum.* — 1983. — Vol. 26, N 5. — P. 623—629.
13. Fauci A. C. // *J. Allergy.* — 1980. — Vol. 66, N 1. — P. 5—17.
14. Ferrarini M., Cadoni A., Franzi A. T. // *Europ. J. Immunol.* — 1980. — Vol. 10, N 7. — P. 562—570.
15. Gonzalez-Amaro R., Alcocer-Varela J., Martinez-Gordero E., Alarcon-Segovia D. // *J. clin. Immunol.* — 1984. — Vol. 4, N 4. — P. 273—279.
16. Hibbs M. S., Postlethwaite A. E., Smith G. H. et al. // *J. exp. Med.* — 1983. — Vol. 157, N 1. — P. 47—59.
17. Hurrar G., Maiocco J., Naftolin F. // *Analyt. Biochem.* — 1980. — Vol. 105, N 2. — P. 424—429.
18. Katz P., Zaytoun A. M., Lee J. H. et al. // *J. Immunol.* — 1982. — Vol. 129, N 5. — P. 1966—1971.
19. Kimber I. // *Med. Lab. Sci.* — 1985. — Vol. 42, N 1. — P. 60—77.
20. Kivirikko K. I. // *International Review of Connective Tissue Research.* — New York, 1970. — Vol. 5. — P. 93—163.
21. Klein E., Vanky F. // *Fundamental Mechanisms in Human Cancer Immunology.* — New York, 1981. — P. 321—330.
22. Klemperer P., Pollack A. D., Baehr C. // *J. A. M. A.* — 1984. — Vol. 251, N 12. — P. 1593—1594.
23. Lee E. B., Anhalt G. L., Voorhees J. J., Diar L. A. // *Int. J. Derm.* — 1984. — Vol. 23, N 2. — P. 85—89.
24. Minisola S., Antonelli R., Scarpeolli A. et al. // *Calcif. Tissue Int.* — 1983. — Vol. 35, N 1. — P. 141—143.
25. Oshimi K., Sumiya M., Ginda N. et al. // *Ann. rheum. Dis.* — 1982. — Vol. 41, N 2. — P. 417—420.
26. Postlethwaite A. E., Kang A. H. // *J. Lab. clin. Med.* — 1984. — Vol. 103, N 4. — P. 506—510.
27. Rahamson M. // *Med. Aktuell.* — 1982. — Bd 8, N 9. — S. 400—411.
28. Rasboe-Hansen G. // *Acta derm.-venereol. (Stockh.).* — 1979. — Vol. 59, N 5. — P. 465—467.
29. Ruffrel N. // *Prat. Méd.* — 1984. — Vol. 22. — P. 11—12.
30. Sird A. G., Britton S. // *Immunol. Rev.* — 1979. — Vol. 45, N 1. — P. 41—47.
31. Schaltner A., Duggan D. B. // *Arthr. a. Rheum.* — 1984. — Vol. 27, N 9. — P. 1072—1073.
32. Sjorisyewicz L. K., Rodgers B., Morris S. et al. // *J. Immunol.* — 1985. — Vol. 134, N 4. — P. 2695—2701.
33. Boyum A. // *Scand. J. clin. Lab. Invest.* — 1968. — Suppl. 97. — P. 77—89.
34. Srieva I. A., Targan S., Stevens R. H. // *J. Immunol.* — 1984. — Vol. 132, N 2. — P. 610—615.
35. Stahman H. M. // *Immunol. Today.* — 1985. — Vol. 6, N 6. — P. 192—195.
36. Stelson R. J., Fink J. M. // *Sci. Amer.* — 1985. — Vol. 252, N 6. — P. 34—41.
37. Sterup J. // *Acta derm. venereol. (Stockh.).* — 1984. — Vol. 64, N 6. — P. 485—492.
38. Subbitt W. L., Mathews P. M., Bankhurst A. D. // *J. clin. Invest.* — 1983. — Vol. 71, N 5. — P. 1230—1239.
39. Suttlenberg E. M. // *Surv. Immunol. Res.* — 1985. — Vol. 4, N 1. — P. 69—80.
40. Szymonowicz A., Legentil G. P., Makuart F. X. et al. // *Pharm. Biol.* — 1981. — Vol. 15, N 1. — P. 37—48.
41. Trinchieri G., Perussia B. // *Lab. Invest.* — 1984. — Vol. 50, N 5. — P. 489—513.
42. Wahl S. M. // *Lymphokine Res.* — 1983. — Vol. 2, N 4. — P. 139—144.
43. Wahl S. M., Gately C. L. // *J. Immunol.* — 1983. — Vol. 130, N 3. — P. 1226—1230.
44. Whiteside T. L., Kumagai Y., Roumm A. D. et al. // *Arthr. a. Rheum.* — 1983. — Vol. 26, N 7. — P. 841—847.

Поступила 06.08.86

ROLE OF NATURAL CYTOTOXICITY IN IMPAIRMENTS OF COLLAGEN CATABOLISM IN FOCAL SCLERODERMIA

N. N. Prozorovskaya, T. N. Suchkova, S. V. Suchkov, A. A. Del'vig

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

Relationship between the state of natural cytotoxicity and collagen catabolism were studied in patients with focal sclerodermia. In the impairment activity of natural killer cells (NK cells) was markedly altered depending on such clinical parameters as duration, severity, activity and distribution of the disease as well as it was related to definite transformations in catabolism of collagen proteins. Low rate of collagen production and intensive collagenolytic processes correlated with the high lever of hydrolytic activity of NK cells at the early steps of systemic morphea guttata accompanied by highly progressive course of the disease. Under conditions of subacute forms of focal morphea guttata activity of NK cells was distinctly decreased down to 50% of that of normal state and was accompanied by alterations in the spectrum of collagenolytic enzymes as well as by considerable variations in collagen production and in posttranslational modification of collagen fibrils. During the chronic step of sclerodermia activity of NK cells was normalized and correlated with the lowered rate of collagen production as well as with the subsequent alterations in collagen proteins catabolism. Alterations in the level of natural cytotoxicity appear to correlate with the state of collagen metabolism in focal sclerodermia.

П. А. Возиян, Ю. Д. Холодова, И. П. Смирнова, Г. М. Чоботько

ПОВЕРХНОСТНЫЕ СВОЙСТВА И РАЗМЕРЫ ЛИПОПРОТЕИНОВ ОЧЕНЬ НИЗКОЙ И НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ ПЛАЗМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ И ПРИ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИИ

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

В настоящее время сложились достаточно устойчивые представления относительно того, что одним из основных факторов, определяющих развитие атеросклероза, является переход от специфического рецепторопосредованного захвата липопротеинов (ЛП) очень низкой (ЛОНП) и низкой (ЛНП) плотности клетками сосудистой стенки в здоровом организме к неспецифическому их захвату при развитии патологии [17]. Специфический эндцитозный захват не приводит к накоплению в клетках ЛП и холестерина благодаря существованию внутриклеточных механизмов, регулирующих синтез рецепторов и собственно холестерина. При высоком уровне ЛОНП и ЛНП в крови, когда механизмы регуляции синтеза рецепторов нарушаются, начинает работать другой механизм — неспецифический эндцитоз. Он не подвержен регуляции клеткой и потому ведет к нарушению внутриклеточного баланса липидов, в частности холестерина [17]. К определяющим факторам такого неспецифического взаимодействия ЛП с сосудистой стенкой относятся, вероятно, их размеры и поверхностные заряды [10]. Изучение этих характеристик ЛОНП и ЛНП приобретает, таким образом, особое значение для выяснения причин перехода от рецепторзависимого к нерегулируемому захвату атерогенных ЛП сосудистой стенкой при развитии атеросклероза.

В этой работе мы изучали поверхностные свойства и размеры ЛОНП и ЛНП плазмы крови человека в норме и при гиперхолестеринемии — доклинической стадии атеросклероза — с помощью методов потенциометрического титрования и безызлучательного переноса энергии между флуоресцентными зондами. Найденные величины сравнивали с величинами, полученными другими методами.

Методика

Исследовали препараты ЛОНП и ЛНП мужчин в возрасте 40—49 и 50—59 лет

(510 человек) без признаков ишемической болезни сердца в соответствии с критериями эпидемиологического обследования (анкета-опросник Роуза, физикальное и электрокардиографическое обследование в покое и с нагрузкой). Кровь брали утром натощак через 12—14 ч после приема пищи.

ЛП плазмы крови выделяли методом последовательного центрифугирования в растворах NaCl и NaBr соответствующих плотностей [20]. Чистоту фракций контролировали методом электрофореза в ПААГ. Полученные суспензии ЛОНП и ЛНП диализовали против 0,15 М NaCl (рН 7,5) в течение ночи. Содержание белка в ЛП определяли по Лоури [21]. Все измерения проводили не позднее чем через 1 сут после выделения.

Для определения геометрических параметров ЛП с помощью метода безызлучательного переноса энергии [5] использовали флуоресцентные зонды: антрацен (Харьковский завод химреактивов); *n*-терфенил (ПТФ); 7-(2-антрил)-гептановую кислоту (АБК) [4]; ОСП-14 [7]. Флуоресцентные исследования проводили на спектрофлуориметре «Hitachi-MPF-4» в 1 мм кварцевой кювете при концентрации ЛП 1 мг/мл и меньше; концентрация этанола в исследуемых образцах не превышала 2%.

Потенциометрическое титрование проводили, как описано ранее [12], результаты анализировали методом дифференциальных кривых на ЭВМ СОУ-1. Для расчета поверхностных зарядов использовали результаты связывания протонов в физиологическом интервале рН 7,0—7,5.

Содержание холестерина и триглицеридов определяли на автоанализаторе «Technicon AA-11», липиды экстрагировали по Фолчу и разделяли методом ТСХ на силикагеле ЛС 5/40 (ЧССР). Рехроматографию осуществляли на пластинках с нейтральным Al_2O_3 (фирма «Welm», ФРГ), импрегнированных 25% $AgNO_3$ и активированных в течение 30 мин при 120 °С, а также на силикагеле ЛС 5/40. Содержание холестерина и его эфиров после элюции измеряли с помощью ГЖХ на хроматографе «Сrom-41» (ЧССР). Фосфолипиды определяли с помощью двумерной микротонкослойной хроматографии.

Результаты и обсуждение

Безызлучательный перенос энергии между флуоресцентными зондами приводит к снижению интенсивности флуоресценции доноров от F_0 до F при увеличении концентрации акцепторов C . В работе [5] рассмотрены закономерности такого переноса в частицах ЛП. Если доноры расположены на расстоянии X от границы раздела липид — вода, то зависимость F/F_0 от C имеет вид:

Характеристика поверхностных зарядов ЛОНП и ЛНП плазмы крови человека в норме и при гиперхолестеринемии

Характеристика	ЛОНП		ЛНП	
	норма	гиперхолестеринемия	норма	гиперхолестеринемия
Емкость связывания протонов (рН 7,0—7,5), мкг-экв на 1 г ЛП	46±5	41±3	18±3	4,0±0,5
Площадь поверхности, м ² на 1 г ЛП	186±9,2	163±8,3	242±11,3	206±5,4
Поверхностная плотность зарядов, К/м ² ×10 ²	—0,5	—0,3	—0,2	—0,05
Радиус, нм	13,9±0,6	20,7±1,2	10,0±0,5	12,7±0,4

$$F/F_0 \approx \exp[-\alpha B(X) CN_A \pi R_0^2/S]$$

в случае, когда акцепторы находятся на поверхности частицы, и

$$F/F_0 \approx \exp[-\alpha B(X) CN_A 4\pi R_0^3/3V'],$$

если акцепторы распределены в объеме липидной фазы. Здесь α — коэффициент, зависящий от вращательной подвижности зондов; $B(X)$ — коэффициент доступности, показывающий, какая часть объема, окружающая донор, доступна для акцепторов; R_0 — радиус Фёрстера; N_A — число Авогадро; S и V — площадь поверхности и объем частиц в 1 л суспензии. Измерив V и S можно рассчитать радиус сферической частицы липопротеина: $R=3V/S$.

Существует еще один путь определения радиуса ЛП. В случае переноса энергии от доноров, распределенных в объеме частицы на поверхностные акцепторы имеет место уравнение:

$$B(R) = V \ln(F_0/F) / \alpha CN_A \frac{4}{3} \pi R_0^3$$

при $\ln(F_0/F) < 0,3$.

Связь между V' и V и между $B(R)$ и R приведена в работе [6]. Для определения объема ЛП использовали перенос энергии между ПТФ и антраценом, при определении площади поверхности — между А6К и ОСП-14, для непосредственного определения радиуса — между антраценом и ОСП-14. Радиусы липопротеиновых частиц (средние по двум методам) и величины площадей их поверхностей приведены в табл. 1.

Размеры нормальных ЛП, полученные в наших экспериментах (13,9 нм для ОНП и 10 нм для ЛНП), близки к величинам, известным в литературе. Так, по данным электронной микроскопии (метод негативного контрасти-

рования) [15, 24], радиус ЛНП составляет 10,5—12,5 и 9—15 нм. Эксперименты по рассеянию рентгеновских лучей [23], оптическому смешению [9] и безызлучательному переносу энергии на флюоресцентные зонды [6] дают значения 12, 10, 68 и 10 нм соответственно. Что касается ЛОНП, то их размеры более вариабельны и лежат в пределах 15—45 нм [15, 19].

В наших экспериментах наблюдалось достоверное увеличение размеров ЛОНП и ЛНП при гиперхолестеринемии (см. табл. 1). Это в определенной мере связано с изменением состава этих ЛП, который был подробно изучен нами ранее [13]. Вероятно, основной вклад в изменение геометрических параметров ЛП вносят эфиры холестерина, относительное содержание которых в ЛОНП увеличивается при гиперхолестеринемии почти в 2 раза (табл. 2). Подобные явления наблюдались и при алиментарном атеросклерозе у кроликов: измерения светорассеяния [11] и электронные микрофотографии суспензий ЛОНП [26] показали увеличение размеров этого класса ЛП, причем в последнем случае оно сопровождалось значительным увеличением содержания в них эфиров холестерина.

Что касается ЛНП, то здесь данные литературы противоречивы. Авторы, исследовавшие размеры ЛНП методом гель-электрофореза [16], не обнаружили каких-либо изменений у лиц с гиперлипидемией. По данным других исследователей [27], содержание эфиров холестерина в ЛНП немодифицированной плазмы крови было выше, чем в обработанной йодацетатом натрия *in vitro*. Однако размеры ЛНП в немодифицированной плазме были меньше. По нашим данным, размеры ЛНП при гиперхолестеринемии увеличиваются (см. табл. 1), причем это

Состав ЛП плазмы крови мужчин в норме и при гиперхолестеринемии ($M \pm m$)

Показатель	ЛОНП		ЛНП	
	норма	гиперхолестеринемия	норма	гиперхолестеринемия
Холестерин, мг/дл	21,7±0,6 (16,9)	38,6±2,8 (16,8)	107±2,1 (34,5)	172±4,8 (38,6)
Эфиры холестерина, мг/дл	5,3±0,1 (4,1)	16,7±0,2 (7,3)	52,7±0,4 (16,6)	89,7±3,7 (20,2)
Триглицериды, мг/дл	53,0±0,3 (41,3)	110±2,8 (47,8)	22,5±0,2 (7,1)	36,2±0,3 (8,2)
Фосфолипиды, мг/дл	25,4±0,7 (19,8)	26,7±1,1 (11,6)	65,0±2,3 (20,8)	70,5±3,3 (15,9)
Белок, мг/дл	23±1 (17,9)	38±3 (16,5)	63±2 (21,0)	76±4 (17,1)

Примечание. В норме $n=420$, при гиперхолестеринемии $n=90$. В скобках—относительное содержание в процентах.

увеличение сопровождается повышением содержания в них эфиров холестерина с 16,6 до 20,2 % [13]. Причины такого противоположного влияния увеличения содержания эфиров холестерина на размеры ЛНП неясны. Возможно, эти различия связаны с многофакторным влиянием процедуры модификации на размер ЛП. Аналогичное нашим данным увеличение размеров ЛНП наблюдалось также при экспериментальной гиперхолестеринемии у крыс [22].

Для определения плотности поверхностных зарядов (σ) мы выбирали участок кривой титрования, лежащий в области физиологических рН (7,0—7,5; см. рисунок). Емкость этого участка определяется в основном вторичными фосфатами фосфолипидов, имидазольными группами гистидина и частично α -NH₂-группами. Возможен также вклад вторичных карбоксильных групп [12]. Учитывая содержание белка в ЛП, количество связанных протонов пересчитывали на 1 г ЛП. Для расчета σ использовали выражение:

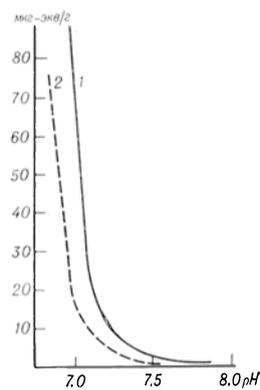
$$\sigma = \frac{L_{\text{св}} \cdot N_A \cdot e}{S},$$

где $L_{\text{св}}$ — количество связанных лигандов (протонов), г-экв/г ЛП; N_A — число Авогадро, $6,025 \cdot 10^{23}$ моль⁻¹; e — заряд электрона, $1,6 \cdot 10^{-19}$ К; S — площадь поверхности липопротеиновых частиц, м²/г ЛП. В этом выражении имеет размерность К/м².

При определении плотности поверхностных зарядов мы исходили из предположения, что связывание протонов происходит равномерно по всему объ-

ему частицы, а вклад в σ вносит поверхностный слой толщиной 1 нм (глубина сканирования электрофоретических методов) [25]. Полученные нами при этом величины плотностей поверхностных зарядов для ЛОНП и ЛНП здоровых людей составляли $-0,5 \times 10^{-2}$ и $0,2 \cdot 10^{-2}$ К/м² соответственно (см. табл. 1). Они были близки к значениям σ , определяемым другими методами. Для ЛНП эта величина, определяемая методом спинных меток [2], равнялась $-0,3 \cdot 10^{-2}$ К/м². По данным другой работы [14], она составляет $-0,1 \cdot 10^{-2}$ К/м². Используя данные об электрофоретической подвижности ЛП, приведенные в работе [16], мы рассчитали плотности поверхностных зарядов для ЛОНП и ЛНП, которые составили $-0,8 \cdot 10^{-2}$ и $0,7 \times 10^{-2}$ К/м² соответственно (рН 7,3).

Таким образом, при использовании нами метода расчета наблюдается достаточно хорошее соответствие полученных плотностей поверхностных зарядов ЛОНП и ЛНП известным по



Кривые потенциометрического титрования ЛНП в норме (1) и при гиперхолестеринемии (2) в физиологической области рН. По оси ординат N^+ связывания.

данным литературы. Следовательно, метод потенциометрического титрования, применяемый обычно для определения природы и количества функциональных групп, ответственных за связывание протонов, удобен для количественной характеристики поверхностных зарядов ЛП при условии использования величин связывания в интервале физиологических рН.

В наших экспериментах наблюдалось уменьшение плотности поверхностных зарядов при гиперхолестеринемии для обоих классов атерогенных ЛП (см. табл. 1). Ранее подобное уменьшение наблюдалось нами в ЛНП плазмы крови крыс [3] и человека [13] с гиперхолестеринемией при исследованиях в более широком диапазоне рН. В последнем случае изменения электроотрицательности ЛП сопровождалось сдвигами рК ионогенных групп (боковые COOH, вторичные фосфаты и имидазол гистидина). Это свидетельствует о том, что уменьшение поверхностного заряда атерогенных липопротеинов при гиперхолестеринемии обусловлено конформационными изменениями апопротеинов, которые могут быть вызваны изменениями их липидного окружения. О том же свидетельствует наблюдавшийся при экспериментальном атеросклерозе у кроликов коротковолновый сдвиг собственной белковой флюоресценции в препаратах ЛОНП и ЛНП, который сопровождался уменьшением их поверхностных зарядов [11].

Таким образом, на ранних стадиях развития атеросклероза, сопровождающихся увеличением содержания холестерина в ЛОНП и ЛНП [13], частицы ЛП этих классов претерпевают значительные преобразования. Пронходящие вследствие изменения липидного окружения конформационные перестройки апопротеинов, а также увеличение размеров ЛП из-за этерификации холестерина и погружения его эфиров вглубь частицы могут нарушать стерические параметры, обеспечивающие рецепторный захват этих ЛП мембраной клеток сосудистой стенки. В то же время уменьшение плотности поверхностного отрицательного заряда и увеличение площади контакта с клетками сосудистой стенки создают благоприятные условия для неспецифического эндоцитоза таких частиц. При увеличении размера

ЛОНП увеличивается соотношение объем : площадь поверхности этих ЛП, что может затруднять действие липопротеинлипазы [11] и таким образом вносить дополнительные нарушения в метаболизм ЛП в крови. Накопление ЛОНП, с одной стороны, может облегчать их захват клетками сосудистой стенки, а с другой — приводить к образованию крупных агрегатов радиусом до 250 нм, которые наблюдали на электронных микрофотографиях в крови людей при гиперлипидемии [18]. Образование таких агрегатов, а возможно, и увеличение размеров отдельных частиц ЛП может быть одной из причин изменения реологических свойств крови, которые наблюдаются при развитии атеросклероза. Кроме того, ЛОНП и ЛНП, вероятно, способствуют агрегации эритроцитов при гиперлипидемии [8]. Поскольку нарушение гемореологии (в том числе повышение вязкости крови) коррелирует с тяжестью ишемической болезни сердца [1], можно предположить, что неспецифический, повышенный захват атерогенных ЛП сосудистой стенкой является одним из путей нормализации реологических показателей крови, когда рецепторный механизм не справляется с этой задачей. Тем самым появляется дополнительный фактор, стимулирующий развитие атеросклероза при гиперлипидемии.

Авторы выражают благодарность А. П. Каплуну (Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова) за любезно предоставленные зонды и Г. Е. Добрецову (И ММИ им. Н. И. Пирогова) за предоставленные зонды, а также ценные замечания при обсуждении результатов работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеева Н. В. Центральная гемодинамика, гемореология и перекисное окисление липидов при аритмиях у больных ишемической болезнью сердца: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 1985.
2. Белая М. Л., Эль-Карадаги С., Горшкова И. Н., Твердислов В. А. // Биофизика. — 1983. — Т. 27. — № 2. — С. 254—258.
3. Бондарь О. П., Холодова Ю. Д., Климишевский В. М., Феденко Г. А. // Докл. АН УССР, сер. Б. — 1982. — № 10. — С. 55—58.
4. Добрецов Г. Е., Спирин М. М., Чекрыгин О. В. и др. // Биоорг. химия. — 1981. — Т. 7. — № 4. — С. 606—612.

5. Добрецов Г. Е. // Укр. биохим. журн. — 1984. — Т. 56. — № 2. — С. 211—221.
6. Добрецов Г. Е., Лапшин Е. П., Кузнецов А. С. // Там же. — 1984. — Т. 56. — № 2. — С. 167—171.
7. Дубур Г. Я., Лапшин Е. П., Деме А. К., Дубуре Р. Д. // Всесоюзный биофизический съезд, 1-й: Тезисы докладов. — М., 1982. — Т. 4. — С. 18.
8. Дудаев В. А., Парфенов А. С., Торховская Т. В. и др. // Кардиология. — 1983. — № 3. — С. 37—41.
9. Климов А. П., Шмелев Г. Е., Носкин А. В. и др. // Биофизика. — 1982. — Т. 27. — № 3. — С. 458—462.
10. Климов А. П., Назорнев В. А. // Успехи совр. биол. — 1984. — Т. 98. — № 1. — С. 73—89.
11. Формазюк В. Е., Добрецов Г. Е., Полеский В. А. и др. // Вопр. мед. химии. — 1980. — № 4. — С. 540—545.
12. Холодова Ю. Д., Бондарь О. П. // Цитология. — 1980. — Т. 22. — № 5. — С. 499—513.
13. Холодова Ю. Д., Чоботко Г. М., Смирнова Н. П. и др. // Докл. АН УССР, сер. Б. — 1985. — № 12. — С. 73—77.
14. Essex C. G., Grant E. H., Sheppard R. J. et al. // Protides of the Biological Fluids. — Oxford, 1977. — P. 67.
15. Forte T., Nichols A. K. // Advanc. Lipid Res. — 1972. — Vol. 10. — P. 1.
16. Ghoch S., Basu M. K., Schweppe J. S. // Analyt. Biochem. — 1972. — Vol. 50. — P. 592.
17. Goldstein J. L., Brown M. S. // Ann. Rev. Biochem. — 1977. — Vol. 46. — P. 897—930.
18. Jones A. L., Price J. M. // J. Histochem. Cytochem. — 1968. — Vol. 16, N 5. — P. 366.
19. Laggner P., Degovics G., Muller K. W. et al. // Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. — 1977. — Bd 358, N 7. — S. 771—778.
20. Lindgren F. T. // Analysis of Lipids and Lipoproteins / Ed. E. G. Perkins. — Champaign, 1975. — Vol. 1. — P. 56—58.
21. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Pandall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.
22. Mitamura T., Keimatsu M., Imai J. // New Horizons in Lipid Biochemistry / Ed. Y. Imai. — Sapporo, 1984. — P. 234—246.
23. Scanu A. // Dietary Fats and Health. — Champaign, 1983. — P. 531.
24. Shen M. M. S., Krauss R. M., Lindgren F. T., Forte T. // J. Lipid Res. — 1981. — Vol. 22, N 2. — P. 236—244.
25. Sherbel G. V., Lakshmi M. S., Rao K. V. // Exp. Cell Res. — 1972. — Vol. 70, N 1. — P. 113—123.
26. Shore V. G., Shore B., Hart R. G. // Biochemistry (Wash.). — 1974. — Vol. 13. — P. 1579.
27. Zechner R., Kostner G. M., Dieplinger H. et al. // Chem. Phys. Lipids. — 1984. — Vol. 36, N 2. — P. 111—119.

Поступила 09.07.86

SURFACE PROPERTIES AND DIMENSIONS OF VERY LOW AND LOW DENSITY LIPOPROTEINS IN HUMAN BLOOD PLASMA UNDER CONDITIONS OF NORMAL STATE AND HYPERCHOLESTEROLEMIA

P. A. Voznyan, Yu. D. Kholodova, I. P. Smirnova, G. M. Chobot'ko

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

Dimensions and density of surface charge of very low (VLDL) and low density lipoproteins (LDL) from human blood plasma under conditions of normal state and hypercholesterolemia were evaluated by means of redialation-free energy transition between fluorescent probes and potentiometric titration. Radia of VLDL constituted 13.9 ± 0.6 nm and 20.7 ± 1.2 nm and those of LDL — 10.0 ± 0.5 nm and 12 ± 0.4 nm, respectively, in normal state and under the pathological conditions, while the density of surface charge of VLDL was equal to $0.5 \times 10^{-2} \text{K/m}^2$ and $0.3 \cdot 10^{-2} \text{K/m}^2$; those of LDL — $0.2 \cdot 10^{-2} \text{K/m}^2$ and $0.05 \cdot 10^{-2} \text{K/m}^2$, respectively. These alterations appear to facilitate the unspecific interaction between atherogenic lipoproteins and vascular cells in hypercholesterolemia.

УДК 616.36-004.4-07:616.37-008.6

А. С. Логинов, Р. А. Высоцкая

ИНКРЕТОРНАЯ ФУНКЦИЯ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ АЛКОГОЛЬНЫХ ПОРАЖЕНИЯХ ПЕЧЕНИ

ЦНИИ гастроэнтерологии, Москва

Одним из проявлений гепатотоксического действия алкоголя является нарушение структуры мембран гепатоцитов. Последние содержат рецепторы панкреатических гормонов [9, 22]. В печени же происходит и метаболизм указанных гормонов. В связи с этим в последние годы важное значение придается исследованию инкреторной функции поджелудочной железы при

поражениях печени [3, 5], чему способствовала разработка высокочувствительных и специфичных методов радиоиммунологического определения панкреатических гормонов. Согласно современным представлениям, для объективной оценки функции инсулярного аппарата особое значение имеет С-пептид (связывающий пептид), который образуется в эквимолярных с

Уровни глюкагона, инсулина и С-пептида в крови больных с хроническими заболеваниями печени ($M \pm m$)

Обследованные	Глюкагон, нг/л	Инсулин, нмоль/л	С-пептид, нмоль/л	Инсулин/С-пептид
С алкогольной жировой дистрофией (30)	128 ± 16,26	0,25 ± 0,02*	0,25 ± 0,04*	1,00 ± 0,04*
С алкогольным циррозом печени (25)	146 ± 14,15*	0,32 ± 0,05*	0,19 ± 0,08*	1,68 ± 0,20*
С хроническим активным гепатитом (36)	116 ± 12,17	0,20 ± 0,02*	0,51 ± 0,06	0,39 ± 0,03*
С первичным билиарным циррозом (30)	125 ± 6,13*	0,24 ± 0,02*	0,43 ± 0,05	0,56 ± 0,06*
Здоровые	89,6 ± 10,55	0,12 ± 0,03	0,62 ± 0,09	0,19 ± 0,03

Примечание. Звездочкой отмечены показатели, отличающиеся от таковых у здоровых людей ($p < 0,05$); в скобках—число обследованных.

инсулином количествах из проинсулина в β -клетках поджелудочной железы. Попадая с портальной кровью в печень, более 50% инсулина в ней разрушается, а С-пептид проходит неизменным и расщепляется лишь в почках [10]. Поскольку уровень С-пептида в периферической крови не зависит от функционального состояния печени, он более точно, чем уровень инсулина, отражает гормональную активность β -клеток поджелудочной железы [15, 24]. Значительный интерес представляет также исследование секреции биологического антагониста инсулина — глюкагона, которому принадлежит существенная роль в развитии гипергликемических состояний [7, 26], нередко сопровождающих патологию печени. Несмотря на очевидную значимость изучения гормональной активности поджелудочной железы при алкогольных поражениях печени, характер возможных ее нарушений продолжает оставаться недостаточно исследованным. Вместе с тем известно, что при хроническом воздействии алкоголя изменяется функциональное состояние не только печени, но и поджелудочной железы. Исходя из этого, задачей настоящей работы явилось исследование инкреторной функции поджелудочной железы у больных с алкогольными поражениями печени.

Методика

Содержание в сыворотке крови иммунореактивных инсулина и С-пептида, а в плазме — глюкагона исследовали радиоиммунологически с использованием стандартных наборов («Инсулин-кит», Венгрия; «Риа-мат» С-пептид, «Зук-Маллинсродт», ФРГ; «Глюкагон-кит», «Cambridge», США). Уровень глюкозы в крови оценивали ортотолуидиновым методом [6]. Исследования проводили как патощак, так и на фоне

теста на толерантность к глюкозе: через 30, 60, 90, 120 и 180 мин после приема 50 г глюкозы в 200 мл воды.

Под наблюдением находились больные с жировой дистрофией печени (30 человек) и циррозом (25 человек) алкогольной этиологии. Результаты сопоставляли с данными, полученными при обследовании больных хроническим активным гепатитом вирусной этиологии (36 человек) и первичным билиарным циррозом (30 человек). В контрольную группу вошли 20 практически здоровых лиц (доноры). Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Исследование содержания в крови больных иммунореактивных инсулина, глюкагона и С-пептида как показателей гормональной активности поджелудочной железы позволило выявить существенные нарушения ее эндокринного аппарата при алкогольной интоксикации (см. таблицу). Следует прежде всего отметить значительную достоверную гиперинсулинемию, характерную для всех групп больных с патологией печени. В то же время обращает на себя внимание более существенное увеличение содержания инсулина у больных с алкогольными поражениями печени, чем у лиц с патологией неалкогольной природы (хроническим активным гепатитом вирусной этиологии в стадии обострения, первичным билиарным циррозом): базальный уровень инсулина при выраженной жировой дистрофии и циррозе алкогольной этиологии в 2,5—3 раза превышал нормальные величины ($p < 0,01$) (рис. 1).

В противоположность этому уровень С-пептида в крови всех групп больных был, наоборот, пониженным. Однако если при хроническом активном гепатите и первичном билиарном циррозе

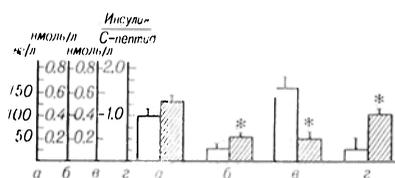


Рис. 1. Изменение уровня панкреатических гормонов и С-пептида в крови больных с алкогольной жировой дистрофией печени.

А — глюкагон; Б — инсулин; В — С-пептид; Г — отношение инсулин/С-пептид; светлые столбики — здоровые люди; заштрихованные — больные с алкогольной жировой дистрофией печени. Звездочкой отмечены величины, достоверно отличающиеся от таковых у здоровых людей ($p < 0,05$).

это снижение оказалось недостоверным из-за выраженных индивидуальных колебаний, то для заболеваний печени алкогольного происхождения характерным было более существенное (в 2,5—3 раза) достоверное уменьшение содержания С-пептида в сыворотке крови. Таким образом, несмотря на повышенный уровень инсулина в периферической крови, исследование С-пептида позволило выявить гипофункцию β -клеток поджелудочной железы при алкогольных поражениях печени. Это связано с тем, что уровень инсулина в периферической крови зависит от функционального состояния печени, которая в норме расщепляет более половины присутствующего в портальной крови инсулина [13]. При патологии печени его катаболизм в гепатоцитах понижается, что и является одной из существенных причин развития гиперинсулинемии. Вместе с тем уровень С-пептида в крови, как указывалось выше, в отличие от инсулина не зависит от функционального состояния печени и отражает истинную секрецию инсулина и С-пептида β -клетками поджелудочной железы.

Нарушение секреции инсулина при алкогольных поражениях печени особенно отчетливо прослеживалось при сопоставлении ее с секрецией С-пептида: коэффициент инсулин/С-пептид был повышен в 5—8 раз ($p < 0,001$). Следует отметить, что если в норме уровень С-пептида в периферической крови натошак в молярном отношении в среднем в 5 раз превышает содержание в ней инсулина, что соответствует данным литературы [10], то при алкогольных заболеваниях печени их содержание в крови было практически одинаковым (см. таблицу) в связи с уменьшением секреции С-пептида и

увеличением в крови содержания инсулина. Приведенные данные свидетельствуют о более выраженной информативности радиоиммунологического определения в крови С-пептида (по сравнению с инсулином) ввиду отсутствия его распада в печени. Эти результаты находятся в соответствии с имеющимися в литературе сведениями о том, что изменения в соотношении инсулина и С-пептида могут быть использованы как критерий выявления нарушений в экстракции и метаболизме инсулина печенью [19, 20].

Снижение толерантности к нагрузке углеводами у больных с хроническими заболеваниями печени известно [17]. Однако сведений о взаимосвязи этих нарушений с выраженностью заболевания и гормональными сдвигами имеется мало. У обследованных нами больных уровень глюкозы в крови натощак в среднем ($5,46 \pm 0,23$ ммоль/л) не отличался от ее содержания у здоровых ($5,14 \pm 0,31$ ммоль/л). При проведении теста на толерантность к глюкозе у больных с выраженной алкогольной жировой дистрофией печени повышенный уровень глюкозы удерживался в течение 2—3 ч (рис. 2), в то время как у здоровых он возвращался к исходным величинам уже через 60 мин. Таким образом, глюкозотолерантный тест позволил выявить изменения углеводного обмена при алкогольной интоксикации. При этом были еще раз подтверждены и нарушения секреции панкреатических гормонов:

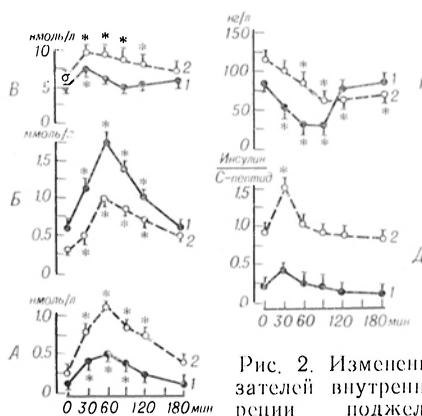


Рис. 2. Изменение показателей внутренней секреции поджелудочной железы в крови больных с алкогольной жировой дистрофией печени на фоне перорального глюкозотолерантного теста. А — инсулин; Б — С-пептид; В — глюкоза; Г — глюкагон; Д — отношение инсулин/С-пептид; 1 — здоровые люди; 2 — больные с алкогольной жировой дистрофией печени, звездочкой отмечены значения, достоверно отличающиеся от исходного уровня ($p < 0,05$).

на рис. 2 четко видна более выраженная и продолжительная по времени гиперинсулинемия у обследованных больных в ответ на гипергликемию. Сумма концентраций инсулина в сыворотке крови во время теста значительно превышала таковую у здоровых ($4,02 \pm 0,40$ и $1,73 \pm 0,25$ нмоль/л соответственно; $p < 0,001$).

Исследование концентрации антагониста инсулина — глюкагона выявило увеличение его базального уровня в плазме крови всех групп больных, однако оно было достоверным лишь при циррозе — как алкогольном, так и первичном билиарном (соответственно на 62 и 40 % по сравнению со здоровыми; см. таблицу). Наблюдавшееся при этом возрастание (на 43 %) содержания глюкагона у больных с алкогольной жировой дистрофией, которое оказалось недостоверным из-за значительных индивидуальных колебаний, еще более отчетливо проявилось на фоне нагрузки глюкозой. Известно, что в норме стимуляция секреции глюкагона α -клетками поджелудочной железы происходит лишь при снижении концентрации глюкозы в крови; при этом гормон оказывает избирательное действие на печень, ускоряя гликогенолиз и способствуя повышению уровня глюкозы в крови. Однако при алкогольной жировой дистрофии, несмотря на избыточное количество глюкозы в крови после нагрузки, увеличенная секреция глюкагона продолжалась, в то время как у здоровых наблюдалось значительное снижение его уровня на 30—60-й минуте (см. рис. 1).

Менее значительное и более замедленное во времени по сравнению с нормой уменьшение секреции глюкагона в ответ на введение глюкозы свидетельствует о нарушении гормональной активности α -клеток поджелудочной железы при хронических алкогольных воздействиях. Эти данные представляют интерес в связи с известной ролью глюкагона в регуляции метаболизма глюкозы [20]: повышенный уровень гормона в крови может в свою очередь способствовать развитию нарушений углеводного обмена при заболеваниях печени, в частности приводить к гипергликемии.

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о нарушении инкретной функции поджелудочной железы при алкогольных поражениях

печени. При этом, несмотря на гиперинсулинемию, выявлено снижение активности инсулярного аппарата, проявлением которого явилось уменьшение содержания С-пептида в сыворотке крови. Это соответствует данным литературы о сниженном уровне инсулина при хронических болезнях печени в портальной венозной крови, полученной с использованием катетеров [17]. При обсуждении патогенеза нарушений гормональной функции поджелудочной железы у больных с алкогольными заболеваниями печени следует учитывать наличие при этом патологии и поджелудочной железы, поскольку известно, что длительная алкогольная интоксикация приводит к развитию хронических панкреатитов. Гормональные сдвиги поддерживаются также факторами, включающими их взаимозависимую регуляцию: так, глюкагон стимулирует секрецию инсулина [25], в то время как последний, действуя прямо на печень, подавляет эффекты глюкагона и его секрецию [12]. Следует, кроме того, учитывать возможное нарушение механизмов взаимодействия гормонов с клеткой, включающих систему рецепторов и медиаторов [19], в связи с повреждением мембран гепатоцитов при патологии печени.

Результаты собственных исследований и анализ данных литературы позволяют полагать, что патогенез резистентности к инсулину и гиперинсулинемии при хронических заболеваниях печени включает в себя снижение метаболизма данного гормона и его связывания в печени [2, 23]; снижение связывания инсулина рецепторами моноцитов и эритроцитов, являющиеся вторичным по отношению к уменьшению количества инсулиновых рецепторов на клетку [14, 22]; пострецепторные нарушения эффектов инсулина [18]; повышенный уровень глюкагона у больных [4, 11, 16]. Тесная взаимосвязь панкреатических гормонов с метаболическими процессами в организме дает основание полагать, что нарушение секреции этих гормонов может привести к существенным расстройствам многих сторон обмена веществ и способствовать хронизации болезни. С учетом этих фактов предпринимается попытка использования в клинической практике инсулин-глюкагоновых инфузий для лечения алкогольных ге-

патитов [8]. Полученные данные позволяют также еще раз подчеркнуть существенное значение функционального состояния печени для поддержания нормального уровня панкреатических гормонов в крови, что является одним из необходимых условий биохимического гомеостаза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Под ред. А. А. Покровского. Биохимические исследования в клинике. — М., 1969.
2. Высоцкая Р. А., Логинов А. С. // Всесоюзный биохимический съезд, 5-й: Тезисы. — М., 1986. — С. 79—80.
3. Зубовский Г. А., Васильченко С. А. // Клини мед. — 1982. — № 9. — С. 56—60.
4. Логинов А. С., Высоцкая Р. А., Ткаченко Е. В. // Болезни гепатобиллярной системы и поджелудочной железы. — М., 1984. — С. 60—71.
5. Логинов А. С., Высоцкая Р. А., Исакова Э. С., Карпова М. Е. // Тер. арх. — 1985. — № 12. — С. 74—77.
6. Тареев Е. М., Мухин А. С., Семендяева М. Е. и др. // Успехи гепатологии. — Рига, 1978. — Вып. 7. — С. 161—178.
7. Юдаев Н. А. // Тер. арх. — 1977. — № 5. — С. 6—11.
8. Baker A., Jaspán J., Haines N. // Gastroenterology. — 1981. — Vol. 80. — P. 1410—1414.
9. Blei J., Robins D., Drobny E. et al. // Ibid. — 1982. — Vol. 83. — P. 1191—1199.
10. Beyer J., Krause U., Cordes U. // J. ital. chim. Acta. — 1979. — N 4. — P. 9—23.
11. Bonola E. // Acta diabet. Lat. — 1984. — Vol. 21. — P. 241—250.
12. Cherrington A., Liljenquist J. // Glucagon / Ed. R. Unger, L. Orci. — New York, 1981. — P. 221—253.
13. Cornell R., McClellan C. // J. Reticuloendotl. Soc. — 1982. — Vol. 32. — P. 397—407.
14. Fujita S., Takimoto T. et al. // Horm. Metab. Res. — 1982. — Vol. 15. — P. 51—52.
15. Greco A., Crucitti F. et al. // Diabetologia. — 1979. — Vol. 17. — P. 23—28.

16. Hyakkoku B., Kihara A. // Jap. J. Gastroent., 1983. — Vol. 80. — P. 1151—1161.
17. Johnston D., Alberti K. et al. // Horm. Metab. Res. — 1982. — Vol. 14. — P. 34—39.
18. Kotterman O., Gray R. et al. // J. clin. Invest. — 1981. — Vol. 68. — P. 957—969.
19. Kuehl F. // Hormon-Receptor Interaction: Molecular Aspects. — New York. — 1976. — P. 385—400.
20. Kühl C., Hornnes P., Faber O. // Horm. Metab. Res. — 1981. — Vol. 13. — P. 71—72.
21. Munro H. // The Liver: Biology and Pathology. — New York. — 1982. — P. 677—691.
22. Proietto J., Nankervis A. et al. // Clin. Endocr. — 1984. — Vol. 21. — P. 677—688.
23. Puavilai C., Grodny E., Domont L., Baumann G. // J. clin. Endocr. — 1982. — Vol. 54. — P. 247—253.
24. Sutherland D., Najarian J. et al. // Ann. intern Med. — 1981. — Vol. 95. — P. 537.
25. Samols E., Tyler L., Marks V. // Glucagon: Molecular Physiology, Clinical and Therapeutic Implications. — Oxford. — 1977. — P. 151—173.
26. Unger R., Orci L. // New Engl. J. Med. — 1981. — Vol. 304. — P. 1575—1580.

Получила 20.08.86

STATE OF PANCREAS INCRETORY FUNCTIONS IN ALCOHOL IMPAIRMENTS OF LIVER TISSUE

A. S. Loginov, R. A. Vysotskaya

Central Institute of Gastroenterology, Moscow

Impairments in pancreas incretory functions were detected in patients with chronic liver diseases of alcohol etiology (lipid dystrophy, cirrhosis) after radioimmunologic examination of immunoreactive insulin, C-peptide and glucagon in blood under these conditions and during glucose-tolerance test. Mechanisms of resistance to insulin and to hyperinsulinemia under conditions of these pathological states are considered. Role of liver tissue has been emphasized in maintaining of blood pancreatic hormones level.

УДК 616.342-002.44-092.9-089:616.833.191-089.85-089.168-07:616.33/342-008.94:577.175.859

С. А. Моренкова, Т. У. Табуцадзе, Л. М. Федорова

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ ВАГОТОМИИ НА СИНТЕЗ ПРОСТАГЛАНДИНОВ (E, F_{2α}), ТРОМБОКСАНА И ПРОСТАЦИКЛИНА В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ГАСТРОДУОДЕНАЛЬНОЙ ЗОНЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЯЗВАХ У КРЫС

Институт хирургии им. А. В. Вишневского АМН СССР, Москва

Известно, что в разных отделах желудочно-кишечного тракта животных и человека синтезируется широкий спектр биологически активных метаболитов арахидоновой кислоты: простагландины (ПГ), простаглицлин,

тромбоксан A₂ и др. [3, 2]. По-видимому, данная группа регуляторов внутриклеточного метаболизма играет существенную роль в физиологии и патофизиологии желудочно-кишечного тракта [8], поскольку имеются сведе-

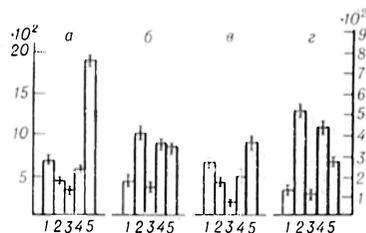


Рис. 1. Влияние различных вариантов ваготомии на синтез ПГ и ПГ-подобных соединений в фундальном отделе желудка крыс.

Здесь и на рис. 2 и 3: по оси ординат слева — содержание ПГЕ₂ (а) и ПГФ_{2α} (б); справа — 6-кето-ПГФ_{1α} (в) и ТХВ₂ (з) (в нг на 1 мг белка за 10 мин). 1 — контроль, 2 — цистеамин, 3 — цистеамин + ПВ, 4 — цистеамин + ПВ, 5 — цистеамин + СПВ.

ния о непосредственном участии ПГ-подобных веществ в регуляции секреции соляной кислоты [10], образовании защитной слизи [4], влиянии их на транспорт ионов [9], роли этих соединений в механизме цитопротекции [8, 11], регенерации эпителия слизистой оболочки [6] и др. Это дает основание предполагать, что эндогенные биорегуляторы (ПГ и другие, подобные им вещества) могут иметь непосредственное отношение к патогенезу язвообразования.

В этой связи целью настоящей работы явилось исследование активности синтеза ПГ и ПГ-подобных соединений и их соотношения в разных отделах слизистой оболочки гастродуоденальной зоны у крыс под влиянием ваготомии в условиях экспериментальной язвы двенадцатиперстной кишки.

Методика

Работа выполнена на крысах-самках Вистар массой 160—180 г. Язвенную болезнь двенадцатиперстной кишки вызывали однократной подкожной инъекцией цистеамин («Fluka», Швейцария) в дозе 30 мг на 100 г по методу [13]. Через сутки после введения цистеамин животных подвергали одному из 3 вариантов поддиафрагмальной ваготомии: 1) полной стволовой (ПВ), 2) неполной, с перерезкой одного ствола вагуса (ПВ), 3) проксимальной селективной, с перерезкой отдельных веточек вагуса (СПВ). Через 2 нед после операции извлекали слизистую оболочку антрального и фундального отделов желудка и двенадцатиперстной кишки, фиксировали в жидком азоте и хранили при -70° до использования. Во всех случаях осуществляли визуальный и морфологический контроль. Крысы, получавшие цистеамин и не подвергавшиеся оперативному вмешательству, а также интактные животные служили контролем.

Перед анализом навески слизистой оболочки (10—20 мг) гомогенизировали в 0,05 М трис-НСI буфере рН 8,5 и инкубировали 10 мин

при 37°C и постоянном встряхивании. Реакцию останавливали добавлением 5,6 % муравьиной кислоты до рН 3,0—3,5 и пробы экстрагировали дважды 5-кратными объемами этилацетата. Органическую фазу после центрифугирования объединяли, выпаривали в токе азота или под вакуумом при 45°C . Затем для разделения ПГ на группы Е и F_{2α} проводили колоночную хроматографию на кремневой кислоте, 100—200 меш («Bio Rad», США) по методу [5]. Количественное определение ПГЕ₂, ПГФ_{2α}, тромбоксана В₂ (ТХВ₂) и простаглицлина осуществляли радиоиммунологическим методом с помощью стандартных наборов фирмы «Clinical assays», США. Белок определяли по Лоури [7]. Результаты выражали в пикограммах на 1 мг белка за 10 мин.

Результаты и обсуждение

Как видно на рис. 1, разные варианты ваготомии на фоне введения цистеамин неодинаково влияют на синтез ПГЕ₂, ПГФ_{2α}, 6-кето-ПГФ_{1α} (стабильный метаболит простаглицлина) и ТХВ₂ в слизистой оболочке фундального отдела желудка. Так, при полной стволовой ваготомии, при которой происходит полная денервация всех отделов гастродуоденальной зоны, а также печени, желчного пузыря, поджелудочной железы [1], значительно снижается синтез всех типов простаглицлинов по сравнению с интактными животными. Неполная стволовая ваготомия активирует подавленный цистеамином синтез ПГЕ₂ и 6-кето-ПГФ_{1α} и несколько подавляет образование ПГФ_{2α} и ТХВ₂. Селективная проксимальная ваготомия, не нарушающая иннервации пилородуоденального отдела желудка, способствует повышению синтеза ПГЕ₂ и 6-кето-ПГФ_{1α}, подавленному соответственно в 3 и 2,2 раза, у животных, подвергавшихся действию цистеамин. Увеличенный после введения цистеамин биосинтез ПГФ_{2α} и ТХВ₂ снижается под влиянием селективной проксимальной ваготомии в 1,3 и 1,8 раза соответственно. Эти данные согласуются с результатами, свидетельствующими о том, что образование язвенного дефекта в желудке и двенадцатиперстной кишке может вызываться активацией синтеза ПГФ_{2α} и особенно ТХВ₂, который, кроме сильнейшего вазоконстрикторного действия, вызывает микро- и макротромбозы за счет индукции агрегации тромбоцитов [2, 14, 15].

Более существенные изменения были обнаружены в антральном отделе желудка (рис. 2). Введение цистеами-

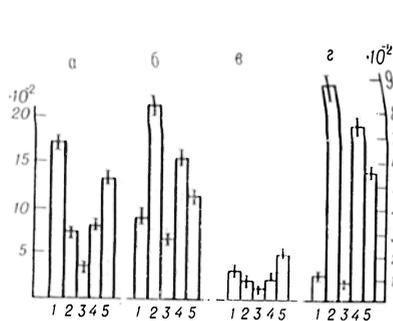


Рис. 2. Влияние различных вариантов ваготомии на синтез ПГ и ПГ-подобных соединений в антральном отделе желудка.

на снижает синтез ПГЕ₂ и 6-кето-ПГГ_{1α} по сравнению с таковым интактных животных (в 2,3 и 1,7 раза соответственно). Как и в слизистой оболочке фундальной части желудка, полная стволовая ваготомия приводит к значительному угнетению образования всех типов ПГ. Проксимальная селективная ваготомия не нормализует полностью синтез ПГЕ₂, но значительно активизирует образование 6-кето-ПГГ_{1α} по сравнению с интактными животными (в 1,5 раза). Следует особо подчеркнуть, что в этой части желудка наиболее резко (в 7,3 раза) активирован биосинтез ТХВ₂ и проксимальная селективная ваготомия снижает его образование лишь в 1,6 раза относительно максимума его образования. Микроскопически в этой части желудка после введения цистеамина наблюдались многочисленные эрозии, число которых значительно сокращалось после операции. Наблюдалась взаимосвязь между активацией синтеза ТХВ₂ и ПГГ_{2α} и количеством эрозивных повреждений.

Наиболее характерные изменения выявлены в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки (рис. 3). Образование ПГЕ₂ и 6-кето-ПГГ_{1α} после введения цистеамина падает соответственно в 3,9 и 2,0 раза относительно показателей интактных животных. Проксимальная селективная ваготомия наиболее существенно (в 3,6 раза) стимулирует синтез 6-кето-ПГГ_{1α}. В слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки, где и локализуется язвенный дефект, образование ТХВ₂ выражено в большей степени, чем во всех остальных отделах гастродуоденальной зоны. Кроме того, следует отметить, что возрастающий после введения цистеамина в 11,1 раза

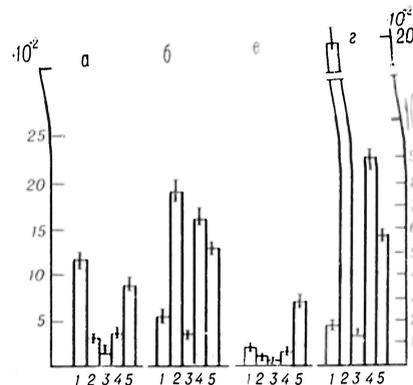


Рис. 3. Влияние различных вариантов ваготомии на синтез ПГ и ПГ-подобных соединений в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки.

синтез ТХВ₂ в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки (по сравнению с интактными животными) резко снижается только под влиянием селективной проксимальной ваготомии.

Таким образом поддиафрагмальная селективная проксимальная ваготомия активизирует синтез тех групп ПГ (ПГЕ₂ и 6-кето-ПГГ_{1α}), которые проявляют цитопротекторный и секреторегулирующий эффекты в слизистой оболочке гастродуоденальной зоны и тормозит образование соединений (ПГГ_{2α} и ТХВ₂), оказывающих повреждающее действие на органы и ткани. Вероятно, селективная проксимальная ваготомия, вызывая указанные метаболические сдвиги, может способствовать нормализации секреции соляной кислоты и заживлению язв в двенадцатиперстной кишке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Григорьев П. Я. Диагностика и лечение язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки. — М., 1986.
2. Basso N., Matera A., Florini A. et al. // *Advanc. Prostagland. Thrombox. Leukotr. Res.* — 1983. — Vol. 12. — P. 383—387.
3. Bunnet A. // *Prostaglandins: Physiological, Pharmacological and Pathological Aspects* / Ed. S. M. Karim — Baltimore, 1976. — P. 247—276.
4. Bottcher W. E., Golanska E. M., Kauffman G. L. // *Surg. Forum.* — 1982. — Vol. 33. — P. 164—166.
5. Granström E. // *Advanc. Prostagland. Thrombox. Leukotr. Res.* — 1980. — Vol. 6. — P. 69—76.
6. Konturek S. J., Radeski T., Brzozowski J. et al. // *Gastroenterology.* — 1981. — Vol. 81. — P. 438—443.
7. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // *J. biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.

8. Miller T. A. // Amer. J. Physiol. — 1983. — Vol. 245. — P. G601—G623.
9. Miller T. A., Kramer B. B., Henagan J. M. et al. // Dig. Dis. Sci. — 1983. — Vol. 28. — P. 641—648.
10. Robert A. // Progress in Gastroenterology / Ed. G. B. J. Glass. — New York, 1977. — Vol. 3. — P. 771—801.
11. Robert A. // Gastroenterology. — 1979. — Vol. 77. — P. 761—767.
12. Robert A. // Physiology of the Gastrointestinal Tract / Ed. L. R. Johnson. — New York, 1981. — P. 1407—1434.
13. Selye H., Szabo S. // Nature. — 1973. — Vol. 244. — P. 458—459.
14. Whittle B. J. R. // Prostaglandins. — 1981. — Vol. 21, Suppl. — P. 113—118.
15. Whittle B. J. R., Monkada S. // Advanc. Prostaglandin Thrombox. Leukotr. Res. — 1983. — Vol. 12. — P. 373—378.

Поступила 23.09.86

EFFECT OF VARIOUS TYPES OF VAGOTOMY ON SYNTHESIS OF PROSTAGLANDINS E AND F_{2α}, THROMBOXANE AND PROSTACYCLINE IN MUCOSE OF GASTRODUODENAL AREA IN EXPERIMENTAL ULCER OF RATS

S. A. Morenkova, T. U. Tabutsadze, L. M. Fedorova

A. V. Vishnevsky Institute of Surgery, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Synthesis of prostaglandins E₂ and F_{2α} (PGE₂, PGF_{2α}) thromboxane B₂ (TXB₂) and prostacycline (PGI) was studied in mucose of gastroduodenal area under conditions of experimental ulcer in rats after complete truncal vagotomy as well as after incomplete vagotomy involving dissection of one vagus trunk, proximal selective dissection, dissection of vagus nerve. Estimation of PGE₂, PGF_{2α}, TXB₂ and PGI biosynthesis in mucose of stomach fundal and antral parts and in duodenal mucose showed that dissection of vagus nerve, as compared with complete truncal vagotomy or with

dissection of one vagus trunk, was the most effective type of operation in ulcers of duodenum. After this operation the synthesis of the eicosanoids (PGE₂ and PGI) was activated, which caused cytoprotective and secrete-regulating effects, while production of PGE₂ and TXB_{2α} (the tissue-deteriorating substances) was inhibited. Dissection of vagus nerve appears to contribute to secretion of hydrogen chloride in stomach as well as to accelerate reparative processes in gastroduodenal mucose via the metabolic mechanisms studied.

УДК 616.633.587.43-055.5/7-074

А. М. Герасимов, А. С. Захаров

СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЙ МЕХАНИЗМ ОКИСЛЕНИЯ ГОМОГЕНТИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ АЛКАПТОНУРИИ

Центральный НИИ травматологии и ортопедии им. Н. Н. Приорова, Москва

Гомогентизиновая кислота (ГГК) — интермедиат в метаболизме тирозина — окисляется в малеилацетоуксусную кислоту в реакции, катализируемой гомогентизат-1,2-диоксигеназой (КФ 1.13.11.5), содержащей Fe²⁺. Наследственное заболевание, при котором ген, ответственный за синтез данной оксигеназы, дефектен, носит название алкаптонурии (гомогентизинурии, охроноза). ГГК выделяется с мочой и при добавлении щелочи окисляется с образованием 1,4-бензохинон-2-уксусной кислоты и продуктов ее полимеризации [3], что сопровождается характерным потемнением мочи. Химизм автоокисления ГГК в тканях, как предполагают, аналогичен. Известно, что автоокисление органических веществ в щелочной среде может происходить с генерацией супероксидного радикала (O₂⁻). Для ГГК подобный механизм не обоснован.

Методика

Суточную мочу больных алкаптонурией или доноров собирали в емкости из темного стекла, содержащие 10 мл ледяной уксусной кислоты под слой (0,5 см) вазелинового масла для предотвращения контакта мочи с воздухом. Количество ГГК в моче определяли по предложенному ранее методу [1]. Все спектрофотометрические измерения проводили на аппарате «Beckman-5260» (США). Восстановление цитохрома в инкубационной среде (3,0 мл), содержащей 0,05 М трис-НСl буфер рН 7,4, 20 мкМ цитохрома с («Serva», ФРГ) и различные количества исследуемой мочи, регистрировали при 37 °С по изменению оптической плотности при 550 нм. Для определения доли O₂⁻-зависимого восстановления цитохрома в инкубационную среду добавляли очищенный препарат супероксиддисмутазы (СОД; КФ 1.15.1.1) в конечной концентрации 200 ед·мл⁻¹. Активность СОД определяли в ксантиноксидазной системе [9]. Количество восстановленного цитохрома с рассчитывали с использованием коэффициента молярной экстинкции 2,1·10⁴ М⁻¹×см⁻¹. В работе применяли альбумин сыворотки крови человека, кверцетин, цистеамин («Serva», ФРГ), восстановленный глю-

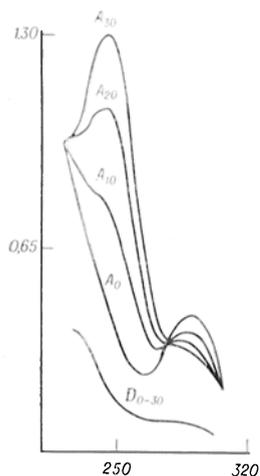


Рис. 1. Спектр поглощения мочи донора (D) и больного алкаптонурией (A) в зависимости от времени инкубации.

По оси абсцисс — длина волны (в нм), по оси ординат — оптическая плотность. Изменение оптической плотности регистрировали в течение 30 мин после начала инкубации 6 мкл мочи в 0,05 М трис-НСl буфере рН 7,4 при 25 °С с интервалом 10 мин.

татион, дегидроаскорбиновую кислоту («Sigma», США), ЭДТА, НАДН, НАДФН, АДР, АТР («Reanal», ВНР). Остальные реактивы были отечественного производства квалификации ч. д. а.

Результаты и обсуждение

В суточной моче больных алкаптонурией концентрация ГГК составляла не менее 4,8 г·л⁻¹, тогда как у доноров ее не обнаруживалось. При такой концентрации ГГК легко идентифицировалась даже при разведении в 500 раз по спектру поглощения с максимумом при 290 нм. Инкубация мочи, содержащей ГГК, в слабощелочной среде приводила к уменьшению максимума при 290 нм, которое сопровождалось появлением и увеличением максимума при 250 нм (рис. 1), являющегося характерным для 1,4-бензохинон-2-уксусной кислоты — продукта неферментативного окисления ГГК [4]. Защелачивание среды инкубации увеличивало скорость окисления ГГК, оцениваемую по изменению оптической плотности при 290 нм (табл. 1). Этанол, СОД и дегидроаскорбиновая кислота не оказывали влияния на скорость окисления ГГК, тогда как аскорбиновая кислота и кверцетин тормозили ее на 50 %, а восстановленный глутатион, цистеамин и ионол — на 40, 30 и 20 % соответственно. Полное ингибирование окисления ГГК в исследуемой системе было достигнуто при 1·10⁻³ М концентрации ЭДТА, что свидетельствует о вовлечении в реакцию свободных ионов металлов. В целом эти данные указывают на свободнорадикальный механизм процесса, протекающего без участия гидрок-

Таблица 1
Влияние некоторых соединений на окисление ГГК в моче больного алкаптонурией

Соединение	Концентрация, М	V _I /V _{II}
Трис-НСl буфер рН 9,0	5·10 ⁻²	10,0
Этанол	5·10 ⁻²	1,0
СОД	333 ед·мл ⁻¹	1,0
Дегидроаскорбиновая кислота	1,5·10 ⁻⁵	1,0
Ионол	7·10 ⁻⁵	0,8
Цистеамин	1,2·10 ⁻⁵	0,7
Восстановленный глутатион	1,2·10 ⁻⁵	0,6
Аскорбиновая кислота	1,5·10 ⁻⁵	0,5
Кверцетин	1,5·10 ⁻⁵	0,5
ЭДТА	1·10 ⁻³	0

Примечание. VI и VII — начальная скорость (в мин⁻¹) изменения оптической плотности при 290 нм в присутствии и в отсутствие исследуемого реагента соответственно. Условия проведения реакции приведены на рис. 1. В случае использования аскорбиновой кислоты учитывалась скорость ее окисления. Здесь и в табл. 2 представлены средние результаты 3 измерений.

сильного (неэффективность этанола) и супероксидного (неэффективность СОД) радикалов.

В практическом отношении важно, что уменьшение оптической плотности при 290 нм, сочетающееся с ее повышением при 250 нм, при защелачивании среды и предупреждение этих изменений при добавлении ЭДТА может быть использовано как быстрый, чувствительный и не требующий специальных реагентов метод идентификации и количественного определения ГГК в моче.

Известно, что окисление гидрохинонов до хинонов опосредовано образованием семихинонов, которые могут принимать участие в различных свободнорадикальных реакциях, в том числе в переносе электрона на молекулярный кислород с образованием O₂⁻ [2, 10]. Чтобы обнаружить появление O₂⁻ при окислении ГГК, содержащейся в моче, использовали ингибируемое СОД восстановление цитохрома с в качестве системы индикации O₂⁻ [6].

Добавление мочи больного алкаптонурией (но не донора) в инкубационную среду, содержащую цитохром с, вызывает восстановление последнего (рис. 2), при этом начальная скорость реакции линейно зависит от количества мочи, содержащей ГГК

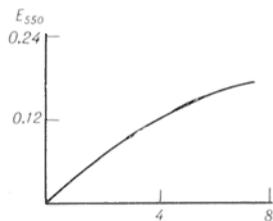


Рис. 2. Кинетика восстановления цитохрома с мочой больного алкаптонурией.

По оси абсцисс — время (в мин); объем образца мочи 0,5 мкл.

(рис. 3). СОД уменьшала скорость восстановления цитохрома примерно на 30 % (рис. 3). Увеличение рН среды вызывало повышение скорости как O_2^- -зависимого, так и O_2^- -независимого пути восстановления цитохрома (табл. 2). Замена трис-НСI буфера на эквимолярный фосфатный буфер с одинаковым рН (7,4) приводила к снижению скорости восстановления цитохрома в данной системе почти в 2 раза (см. табл. 2). Кальций, NADH, NADPH, ADP, АТР не оказывали существенного влияния, тогда как альбумин сыворотки крови уменьшал скорость восстановления цитохрома с в 4,5 раза. Медь, железо и марганец вызывали увеличение скорости процесса, а ЭДТА полностью ингибировала O_2^- -зависимое и O_2^- -независимое восстановление цитохрома (см. табл. 2).

Таким образом, при наличии кислорода, ионов металлов переменной валентности и щелочной среды происходит окисление ГГК по свободнорадикальному механизму с образованием семихинонов и O_2^- . Процесс удается смоделировать при использовании мочи больных алкаптонурией, что указывает на свободнорадикальный характер возникновения ведущего клиниче-

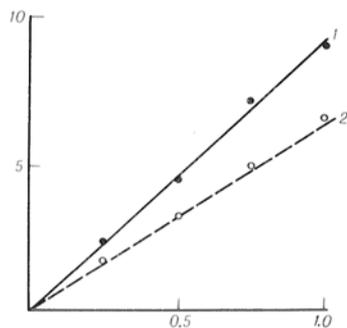


Рис. 3. Зависимость скорости восстановления цитохрома с от количества мочи больного алкаптонурией в отсутствие (1) и в присутствии (2) супероксиддисмутазы.

По оси абсцисс — количество мочи (в мкл), по оси ординат — скорость восстановления (в нмоль · мин⁻¹).

Таблица 2

Влияние некоторых соединений на восстановление цитохрома с мочой больного алкаптонурией

Соединение	Концентрация, М	Соотношение путей восстановления цитохрома с, %		Скорость восстановления цитохрома с, %
		O_2^- -независимое	O_2^- -зависимое	
Контроль:				
рН 7,4		69	31	100
рН 7,8		68	32	180
Фосфатный буфер рН 7,4		73	27	52
NADH	$5 \cdot 10^{-5}$	67	33	100
NADPH	$5 \cdot 10^{-5}$	72	28	100
ADP	$5 \cdot 10^{-5}$	68	32	94
АТР	$5 \cdot 10^{-5}$	78	22	80
Альбумин сыворотки крови человека	$3 \cdot 10^{-5}$	71	29	22
CaCl ₂	$3 \cdot 10^{-3}$	70	30	94
CuSO ₄	$5 \cdot 10^{-6}$	75	25	184
FeSO ₄	$1 \cdot 10^{-5}$	78	22	140
MnSO ₄	$1 \cdot 10^{-5}$	72	28	156
ЭДТА	$1 \cdot 10^{-3}$	0	0	0

Примечание. Условия измерений как на рис. 2.

ского симптома этого заболевания — потемнения мочи при ее защелачивании.

Доказательства свободнорадикального механизма окисления ГГК существенно дополняют представления о патогенезе дегенеративных изменений соединительнотканых образований при охронозе. Считают, что основным механизмом патологии суставов, хрящей, сосудов при алкаптонурии является связывание продуктов окисления ГГК с коллагеном [8, 11]. Вместе с тем известно, что системы генерации O_2^- обладают цитотоксичностью, способны вызывать повреждение сосудистой стенки, деградацию коллагена и гиалуроновой кислоты [5, 6]. Естественно предположить, что опосредованная O_2^- или семихиноном ГГК свободнорадикальная деструкция клеток и биополимеров является одним из механизмов патогенеза «охронозных» изменений соединительнотканых структур.

Лечение больных алкаптонурией сводится к назначению больших доз аскорбиновой кислоты, что нередко не дает эффекта [7]. Приведенные выше данные о торможении окисления ГГК

антиоксидантами различного механизма действия (см. табл. 1) позволяют ожидать, что сочетание антиоксидантов благодаря неодинаковым фармакодинамическим и фармакокинетическим свойствам может быть более благоприятным. Напротив, назначение большим щелочных препаратов, солей металлов переменной валентности, диет или процедур, способствующих возникновению алкалоза, следует проводить с осторожностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Герасимов А. М., Зямяткина О. Г. // Генетика в ортопедии. — М., 1982. — С. 44—46.
2. Герасимов А. М., Захаров А. С., Гудошников Л. В. // Всесоюзный биохимический съезд, 5-й: Тезисы докладов. — М., 1986. — Т. 3. — С. 395—396.
3. Герасимов А. М., Фурцева Л. П. Биохимическая диагностика в травматологии и ортопедии. — М., 1986. — С. 126—128.
4. Consden R., Forbes H., Glynn L. // Biochem. J. — 1951. — Vol. 50. — P. 274—278.
5. Greenwald R. A. // Arthr. Rheum. — 1980. — Vol. 23. — P. 455—463.
6. McCord J. M. // Science. — 1974. — Vol. 185. — P. 529—531.

7. McKusick V. A. // Heritable Disorders of Connective Tissues. — St. Louis, 1972. — P. 314.
8. Milch R. A. // Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.). — 1961. — Vol. 106. — P. 68—70.
9. Misra H. P., Fridovich I. // J. biol. Chem. — 1972. — Vol. 247. — P. 188—192.
10. Poroshow J., Hochstein P. // Pathology of Oxygen / Ed. A. P. Autor. — New York, 1982. — P. 245—261.
11. Zannoni V. G., Lomtevas N., Goldfinger S. // Biochim. biophys. Acta. — 1969. — Vol. 177. — P. 94—105.

Поступила 17.06.87

FREE RADICAL OXIDATION OF HOMOGEN-TISINIC ACID IN ALKAPTONURIA

A. M. Gerasimov, A. S. Zakharov

Central Institute of Traumatology and Orthopedics, Moscow

Non-enzymatic oxidation in alkaline media of homogentisinic acid, excreted with urine in alkaptonuria, involved free radical mechanism. The oxidative process was accompanied by production of superoxide anion $O_2^{\cdot-}$ and required metal cations. Free radical destruction of cells and biopolymers via $O_2^{\cdot-}$ or homogentisinic acid semiquinone appears to be one of pathogenetic mechanisms responsible for impairment of connective tissue structures in patients with alkaptonuria.

УДК 616.89-008.441.1-07:[616.452-008.6+616.839-008.1]-072.7:615.31:547.583.5

В. Н. Васильев, В. С. Чугунов, Л. М. Дербенева, М. С. Еремеев

ПРОБА С L-ДОФА У БОЛЬНЫХ ПРИ НЕВРОЗЕ НАВЯЗЧИВЫХ СТРАХОВ

Нейрогормональная лаборатория Клинической специализированной больницы № 8
им. Соловьева, Москва

Введение в организм L-ДОФА, являющуюся физиологическим предшественником дофамина, вызывает ряд изменений в обмене катехоламинов, в частности увеличение синтеза дофамина, норадреналина и их метаболитов в различных отделах головного [16, 19, 21] и спинного мозга [18], а также активацию внадпочечникового синтеза адреналина [10].

Большая часть L-ДОФА ассимилируется и метаболизируется различными тканями и органами [20, 22] и лишь 10—20 % его проникает через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и захватывается тканями мозга [14, 15]. Прохождение препарата через ГЭБ осуществляется с постоянной скоростью и зависит от состояния эпителия сосудистых сплетений [14], но может изменяться под воздействием различных факторов [13].

Физиологические эффекты L-ДОФА весьма различны, охватывают нервную, мышечную, сердечно-сосудистую, пищеварительную и другие системы организма и могут определяться как периферическим [8, 24], так и центральным декарбокисированием препарата [9, 17].

Эффекты центрального действия препарата проявляются тем отчетливее, чем меньше изменения, связанные с его периферической ассимиляцией. Вероятность последних снижается при низких дозах изучаемого препарата. Это особенно важно, когда он используется в качестве пробы с целью выявления синтетических и функциональных возможностей симпатико-адреналовой системы (САС). Непосредственное участие этой системы в адаптивных реакциях организма общеизвестно. Одним из признаков на-

рушения адаптативных процессов при воздействии стрессогенного фактора является развитие невроза, сопровождающееся выраженными нарушениями деятельности САС [1—3, 5, 6].

Предложенная В. Н. Васильевым проба с 0,1 г Л-ДОФА для установления функциональных возможностей САС позволяет судить о реактивности и синтетических возможностях САС и выявить нарушения в синтезе катехоламинов [2, 3].

Целью настоящей работы было изучение особенностей синтетических и функциональных возможностей САС у больных неврозом навязчивых страхов в группах, изначально различающихся по активности САС, определяемой методом адренограмм [6].

Методика

Исследовали влияние перорального приема 0,1 г Л-ДОФА на экскрецию с мочой катехоламинов и ДОФА у больных мужчин и женщин при неврозе навязчивых страхов. В клинических условиях обследовано 35 женщин и 30 мужчин с данной патологией в возрасте 25—45 лет. Экскрецию адреналина, норадреналина, дофамина и их общего предшественника ДОФА определяли флюориметрическим модифицированным методом Euler и Lischajko.

Мочу собирали в течение 2 сут в следующие временные интервалы: 9—12, 12—16, 16—20, 20—9 ч. Первые сутки были контрольными: у больных были отменены все воздействия (препараты исключали за 3 дня до исследования), на вторые сутки в 9 ч утра больным давали per os 0,1 г Л-ДОФА.

Полученные результаты сравнивали с данными 80 клинически здоровых людей того же возраста, обследованных в адекватных условиях [5].

Результаты и обсуждение

При проведении пробы с Л-ДОФА было выявлено наличие двух противоположных реакций. У 70 % женщин и 63 % мужчин с данной патологией отмечалось значительное увеличение экскреции норадреналина, что может свидетельствовать об активации биосинтеза этого амина. В остальных случаях наблюдалось резкое снижение экскреции норадреналина вплоть до полного его отсутствия в течение 2 и более рассматриваемых периодов суток, что может указывать на «блок» синтеза норадреналина.

При этом в случаях с усилением экскреции норадреналина ее исходный фон был в 1,5—2 раза ниже, чем у здоровых людей, и в 2—3 раза ниже,

чем у больных, прием которыми Л-ДОФА вызывал снижение экскреции норадреналина. Так, если при первом типе реакции у женщин суточная экскреция норадреналина возрастала с $5,3 \pm 0,8$ до $15,4 \pm 0,9$ мкг, а у мужчин — с $3,2 \pm 0,4$ до $15,6 \pm 1,3$ мкг, то при втором типе суточная экскреция снижалась у женщин с $12,2 \pm 2,4$ до $6,3 \pm 1,0$ мкг и у мужчин с $15,3 \pm 1,0$ до $8,0 \pm 0,8$ мкг.

Эти данные позволяют дифференцировать казавшуюся однородной группу больных по потенциальным возможностям в синтезе катехоламинов, однако вскрыть более детальные различия, косвенно указывающие на характер нарушений в цепи синтеза катехоламинов, удалось лишь при делении больных на 3 группы в зависимости от типа функционирования САС: адреналового (А-тип), норадреналового (НА-тип) и смешанного (А+НА-тип), а также при изучении изменений экскреции катехоламинов в течение суток [6].

1-я группа с А-типом функционирования САС характеризовалась значительным нарушением суточного ритма экскреции катехоламинов [5]. В ответ на пробу с Л-ДОФА у женщин этой группы в утреннее время экскреция всех катехоламинов возрастала в 2,5—3,5 раза, неметаболизированного ДОФА — в 7 раз и норадреналина — в 14 раз при 2-кратном угнетении экскреции адреналина в дневное время. Экскреция норадреналина значительно снижалась в вечернее время, оставаясь, однако, повышенной в 1,7 раза по сравнению с фоном. В ночное время выявлено 2-кратное угнетение экскреции дофамина и резкое снижение экскреции норадреналина на фоне тенденции к повышению экскреции адреналина (рис. 1).

У мужчин этой группы основные закономерности изменений экскреции катехоламинов оставались такими же, но реакции были более выражены: на фоне 4-кратного увеличения выделения неметаболизированного ДОФА наблюдалось 7-кратное увеличение экскреции дофамина и 30-кратное — норадреналина. В дневное время экскреция норадреналина снижалась, оставаясь, однако, в 6 раз выше контроля на фоне полного прекращения экскреции дофамина. В вечернее время экскреция дофамина несколько

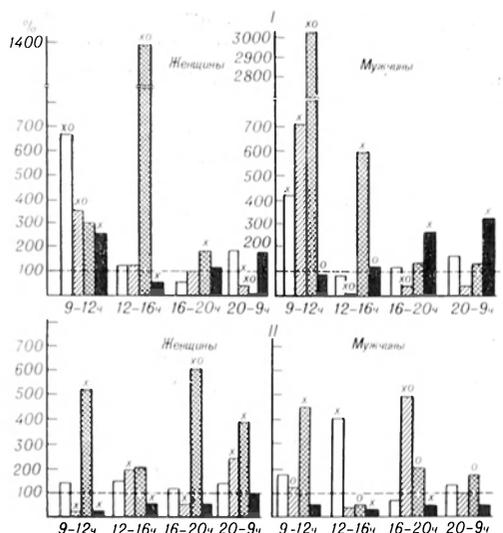


Рис. 1. Проба с Л-ДОФА у больных неврозом навязчивых страхов 1-й (I) и 2-й (II) группы. Здесь и на рис. 2 и 3 данные представлены в процентах от исходной экскреции в контрольное время. По оси абсцисс — время суток. Светлый столбик — экскреция ДОФА, столбик со штриховкой — экскреция дофамина, столбик с двойной штриховкой — экскреция норадреналина, темный столбик — экскреция адреналина. Крестик — $p < 0,05$ по сравнению с контролем, кружок — $p < 0,05$ по сравнению с показателем у здоровых людей.

активизировалась по сравнению с дневной, но все еще оставалась в 3 раза ниже контроля, при этом в 2,5 раза увеличивалась экскреция адреналина (рис. 1).

Сравнивая данные этой группы с реакцией здоровых людей (рис. 2), можно отметить, что реактивность САС у больных значительно выше, чем у здоровых, причем это отличие более выражено у мужчин, чем у женщин. Развитие реакции не только в утреннее время, но и в последующие периоды суток указывает на достаточно высокие синтетические возможности системы. Одновременное резкое увеличение экскреции катехоламинов в первые часы после введения Л-ДОФА может свидетельствовать о повышенной активности ферментов системы норадреналина.

2-я группа больных также имела А-тип функционирования САС с монотонным спадом экскреции адреналина от утреннего времени к ночному, что указывает на нарушение суточного ритма. Проба с Л-ДОФА в этой группе у женщин в утреннее время выявила резкое угнетение экскреции дофамина и адреналина при 5-кратном увеличении экскреции норадрена-

лина. В дневное время отмечалось 2-кратное повышение экскреции дофамина по сравнению с контролем, в вечернее время введение этого медиатора снижалось до половины. Экскреция адреналина оставалась на уровне контроля, а норадреналина увеличивалась в 6 раз. В ночное время выведение дофамина увеличивалось в 2,5 раза, а норадреналина несколько снижалось по сравнению с таковым в вечернее время, но оставалось все же в 4 раза выше контроля (см. рис. 1).

У мужчин реакция на прием Л-ДОФА в утреннее время несколько отличалась от таковой у женщин за счет отсутствия изменений в экскреции дофамина. В дневное время это отличие выражалось в тенденции к угнетению экскреции всех катехоламинов на фоне повышения до 4 раз экскреции ДОФА с усилением экскреции катехоламинов в вечернее время, особенно дофамина (в 5 раз), и общего снижения — в ночное время (см. рис. 1).

Эти данные свидетельствуют о хорошей реактивности больных этой группы на фоне высоких синтетических возможностей и сохранности компенсаторных механизмов по сравнению со здоровыми людьми (см. рис. 2). При этом экзогенный ДОФА у женщин, вероятно, преимущественно используется для синтеза дофамина, который в свою очередь при повышенной скорости гидроксирования

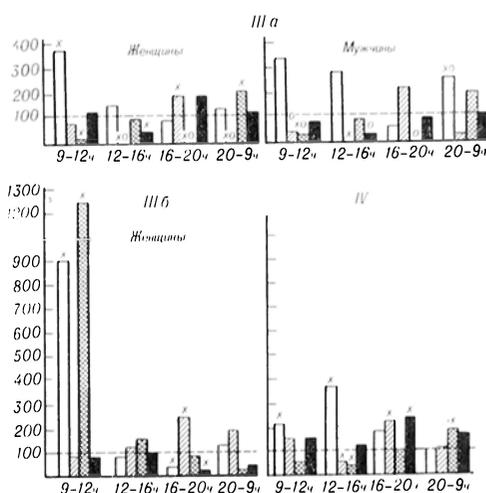


Рис. 2. Проба с Л-ДОФА у больных неврозом навязчивых страхов 3-й группы (III) и здоровых людей (IV).

IIIa — больные первой подгруппы 3-й группы, IIIb — больные женщины второй подгруппы 3-й группы.

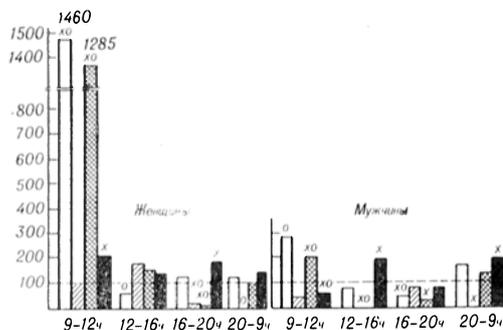


Рис. 3. Проба с L-ДОФА у больных неврозом навязчивых страхов третьей подгруппы 3-й группы.

превращается в норадrenalин. Учитывая высокую исходную экскрецию адреналина и угнетение ее после пробы можно полагать, что у таких больных адреналин синтезируется исключительно из эндогенного ДОФА и недостаточно метаболизируется катехоламинотрансферазой. Указания на подобное разграничение путей синтеза имеются и в литературе [7]. Отличия экскреции катехоламинов у мужчин можно, вероятно, отнести за счет предполагаемого отсутствия нарушений в β -гидроксилировании.

3-я группа имела НА-тип функционирования САС и характеризовалась наличием порадrenalиновых кризов в различные периоды суток. В зависимости от времени формирования кризов в этой группе выделены 3 подгруппы.

Для первой подгруппы характерно наличие кризов в утреннее время и нарушение суточного ритма экскреции катехоламинов. У женщин проба с L-ДОФА вызывала в утреннее время увеличение в 3,7 раза экскреции неметаболизированного ДОФА и 5-кратное снижение экскреции порадrenalина с последующей ее активацией в дневное время до исходного уровня на фоне полного «блока» экскреции дофамина. В вечернее время увеличивалась в 2 раза экскреция дофамина и адреналина, но отмечалось угнетение экскреции порадrenalина с активацией ее в ночное время и повторным снижением экскреции дофамина (см. рис. 2). У мужчин изменения носили сходный характер, но преимущественно выражались в несколько большей экскреции неметаболизированного ДОФА в дневное и ночное время (см. рис. 2).

Эти данные свидетельствуют о снижении реактивности и синтетических возможностях САС у больных этой подгруппы.

Вторая подгруппа характеризовалась проявлением кризов в дневное время и включала только женщин. Проба с L-ДОФА в утреннее время вызывала у них 9-кратное увеличение экскреции неметаболизированного ДОФА при 13-кратном увеличении экскреции порадrenalина. В дневное время экскреция катехоламинов и ДОФА приближалась к исходной, лишь уровень порадrenalина превышался в 1,5 раза. В вечернее время отмечалось 2-кратное снижение экскреции ДОФА по сравнению с исходной и 4-кратное — адреналина. Экскреция дофамина увеличивалась в вечернее и ночное время вместо ее полного угнетения в эти периоды в исходном состоянии (см. рис. 2). Это свидетельствует о повышенной реактивности САС у таких больных и достаточно высоких синтетических возможностях ее по сравнению со здоровыми, на что указывает выраженное усиление выведения дофамина в большей части суток. Столь резкая реакция на введение L-ДОФА в утреннее время может объясняться изменениями функционального состояния рецепторов гипоталамуса [4, 11], вероятно в сторону повышения их чувствительности.

В третьей подгруппе этой группы порадrenalиновые кризы проявлялись в вечернее время и сопровождалась выраженными нарушениями суточного ритма экскреции катехоламинов. Проба с L-ДОФА у женщин в утреннее время вызывала увеличение экскреции неметаболизированного ДОФА в 14,6 раза и порадrenalина — в 13 раз при 2-кратном увеличении выведения адреналина с последующей нормализацией этих показателей в дневное время. В вечернее время выявилось 4-кратное увеличение экскреции дофамина и 10-кратное — порадrenalина при повышении почти в 2 раза экскреции адреналина. Полное угнетение экскреции дофамина на фоне отсутствия изменений экскреции остальных катехоламинов отмечалось в ночное время (рис. 3). У мужчин этой подгруппы введение L-ДОФА вызывало в утреннее время увеличение в 3 раза выброса неметаболизированного ДОФА, экскреция которого

была у них почти в 5 раз меньше, чем у женщин; одновременно, как и у женщин, отмечалась активация выведения порадrenalина, но на фоне угнетения экскреции дофамина и адреналина. В дневное время наблюдалось дальнейшее снижение экскреции дофамина вплоть до полного ее прекращения и подавление экскреции порадrenalина на фоне 2-кратного увеличения выведения адреналина. В вечернее время экскреция дофамина и порадrenalина несколько увеличивалась, но оставалась все же ниже исходной; экскреция адреналина при этом снижалась. В ночное время увеличивалось выделение ДОФА и порадrenalина на фоне полного угнетения экскреции дофамина и 2-кратное увеличение экскреции адреналина (см. рис. 3). Эти данные свидетельствуют о повышенной реактивности САС по сравнению с таковой у здоровых, возмозно связанной с большими изменениями чувствительности рецепторов гипоталамуса к L-ДОФА у женщин и отсутствием таких изменений у мужчин. Компенсаторные механизмы САС сохраняются, хотя и значительно ограничиваются резким снижением синтетических возможностей САС, особенно у мужчин.

Таким образом, проявление порадrenalиновых кризов в утреннее, дневное и вечернее время у больных 3-й группы сопровождалось различными нарушениями деятельности САС. Если в терапевтическом подходе к больным первой подгруппы следует исходить из сниженной реактивности и, как показала наша практика [6], в этом случае на первый план выступают такие методики, как 10-дневная разгрузочная диетотерапия (РДТ₁₀), иглоапликации и аэробика в утренние часы с последующей аутогенной тренировкой, то во второй и третьей подгруппах нужно учитывать повышенную реактивность и снижение синтетических возможностей САС. Поэтому, придавая первостепенное значение таким методикам, как аэробика в утреннее время, аутогенная терапия, гипноуггестивная терапия в соответствующие периоды формирования кризов, краткосрочная РДТ (разгрузочные дни, 1—2-дневная РДТ), рекомендуется проводить их на фоне комплексной витаминотерапии. Для купирования кризов целесообразно приме-

нение β -адреноблокаторов во время проявления кризов.

Что касается 1-й и 2-й групп, то здесь нужно учитывать достаточно высокие синтетические возможности в обеих группах и целенаправленно воздействовать на стимуляцию метаболизма во 2-й. Исходя из этого, для них возрастает роль двигательных методик, таких как релаксационная гимнастика (РЛГ), аэробика и т. д. Для 1-й группы показаны РДТ₅, а также фармакотерапия в виде небольших доз L-ДОФА. Для 2-й группы особенно показаны РЛГ, краткосрочная РДТ на фоне фармакотерапии такими β -адреноблокаторами, как седуксен, вызывающий снижение экскреции свободных и увеличение — связанных в виде сульфатов, форм адреналина.

Таким образом, проба с 0,1 г L-ДОФА дает возможность для объективизации больных неврозом навязчивых страхов, что представляет интерес в плане разработки более специфической диагностики и терапии данного заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильев В. Н. Симпатико-адреналовая активность при различных функциональных состояниях человека. — М., 1986.
2. Васильев В. Н., Чугунов В. С., Квоков Л. И. // Вопр. мед. химии. — 1981. — № 5. — С. 672—676.
3. Васильев В. Н., Чугунов В. С. // Там же, — 1983. — № 3. — С. 119—124.
4. Вейн А. М., Голубев В. П., Берзиньш Ю. Э. Паркинсонизм. — Рига, 1981.
5. Чугунов В. С., Васильев В. Н., Еремеев М. С. и др. // Журн. невропатол. и психiatr. — 1983. — № 11. — С. 1676—1681.
6. Чугунов В. С., Васильев В. П. Неврозы, неврозоподобные состояния и симпатико-адреналовая система: Объективизация диагностики, терапии, прогнозирования. — М., 1984.
7. Bagchi S. P., Barchi P., Smith Th. M. // Brain Res. — 1980. — Vol. 187, № 2. — P. 403—414.
8. Bansal S., Lee L. A., Woolf P. D. // J. clin. Endocr. — 1981. — Vol. 53, № 2. — P. 301—306.
9. Boismare F., Le Poncin-Lafitte M., Rapin J. R. // Aviat. Space environm. Med. — 1980. — Vol. 51, № 2. — P. 126—128.
10. Bun Nguyen T., Nair J., Kuchel O., Genest J. // J. Lab. clin. Med. — 1981. — Vol. 98, № 4. — P. 527—535.
11. D'Alessandro K., Bellastella A., De Luca R., Esposito V. // Chronobiologia. — 1977. — Vol. 4, № 2. — P. 108—110.
12. Edwards D. J., Bizk M. // J. Neurochem. — 1981. — Vol. 36, № 5. — P. 1641—1647.

13. Erikson T., Liliequist S., Carisson A. // J. Pharm. Pharmacol. — 1979. — Vol. 31, № 9. — P. 636—637.
14. Freed C. A., Murphy R. C. // J. Pharmacol. exp. Ther. — 1978. — Vol. 205, № 3. — P. 702—709.
15. Garnett E. S., Firnau G., Nahmias C. et al. // Amer. J. Physiol. — 1980. — Vol. 238, № 5. — P. 318—327.
16. Hefti F., Melamed E. // Brain Res. — 1981. — Vol. 225, № 2. — P. 333—346.
17. Johansson P., Hermansson L. E., Henning M. // Europ. J. Pharmacol. — 1983. — Vol. 90, № 2—3. — P. 215—220.
18. Kimura J., Miyamoto A., Urano S. et al. // Andrologia. — 1982. — Vol. 14, № 4. — P. 341—346.
19. Koyuncuoglu H., Atamer-Simsek S., Keyer-Uysal M. // Pharmacol. Res. Commun. — 1981. — Vol. 13, № 8. — P. 787—795.
20. Linden L. B., Niemi B. // Acta pharmacol. (Kbh.). — 1982. — Vol. 51, № 5. — P. 434—440.
21. Melamed E., Dafni N. // J. Pharm. Pharmacol. — 1982. — Vol. 34, № 12. — P. 820—822.
22. Rundquist J., Allenmark S., Enerback L. // Histochem. J. — 1982. — Vol. 14, № 3. — P. 429—443.
23. Sasahara K., Nitani T., Habara T. et al. // J. pharm. Sci. — 1981. — Vol. 70, № 7. — P. 730—733.
24. Sovilla J. J., Schoderet M. // Life Sci. — 1982. — Vol. 31, № 9. — P. 2081—2092.

Поступила 29.10.86

L-DOPA TEST IN PATIENTS WITH MORBID FEAR NEUROSIS

V. N. Vasil'ev, V. S. Chugunov, L. M. Derbeneva, M. S. Ereemeev

Neuro-Hormonal Laboratory, Clinical Specialized Hospital N2, Moscow

Three groups of patients with morbid fear neurosis, dissimilar in prevailing of either adrenaline or noradrenaline excretion, were identified using the complex method of sympathoadrenal system (SAS) examination. The test with 0.1 g L-DOPA loading demonstrated the high rate of synthesis and high reactivity of SAS in the first two groups with the adrenal type of SAS functioning as well as an increased hydroxylation in the course of synthesis of catecholamines. These anomalies were accompanied by impairments of adrenaline metabolism in the second group. A decreased reactivity of SAS in morning crises and elevated reactivity—during day and evening crises were observed in the third group of patients, characterized by the noradrenaline type of the system functioning as well as by presence of noradrenaline crises.

УДК 616.61-07:[616.633.1:577.152.321]-074

Н. А. Ушакова, Т. П. Лавренова, Е. В. Казлас, Н. А. Томилина,
М. Л. Зубкин П. Д. Федорова, И. С. Лукомская

РАСТВОРИМАЯ И МЕМБРАННО-СВЯЗАННАЯ ФОРМЫ НЕЙТРАЛЬНОЙ α -ГЛЮКОЗИДАЗЫ МОЧИ ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ И ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ПОЧЕК

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР и НИИ трансплантологии и искусственных органов Минздрава СССР, Москва

Ранее показано [1, 9, 10], что нейтральная α -глюкозидаза мочи человека имеет почечное происхождение и активность фермента в моче резко возрастает при патологии почек [3, 4]. Иммунохимическим методом было установлено [12], что в почках человека нейтральная α -глюкозидаза содержится в эпителиальных клетках извитых канальцев и отсутствует в клубочках. Фермент локализован преимущественно в щеточной кайме (мембранно-связанная форма) этих клеток и лишь 8—10 % общей активности содержится в цитозоле (растворимая форма) [6]. В моче в основном секретируется растворимая форма фермента, идентичная по свойствам растворимому ферменту почек [1]. Однако при патологических процессах в почках, сопровождающихся физиологическими и деструктивными изменениями эпите-

лиальных клеток извитых канальцев, содержание в моче мембранно-связанной формы фермента может существенно изменяться.

Целью настоящего исследования было определение содержания мембранно-связанной и растворимой форм нейтральной α -глюкозидазы в моче здоровых и больных людей с различной почечной патологией, изучение некоторых свойств мембранно-связанного фермента и установление иммунологической идентичности растворимой и мембранно-связанной форм фермента мочи здоровых и больных людей соответствующим формам фермента почек.

Методика

Реактивы. В работе были использованы следующие реактивы: мальтоза отечественного производства, 4-метилумбеллиферил- α -D-глю-

копиранозид фирмы «Koch-Light» (Англия), папаин («Merck», ФРГ), тритон X-100 («Loba-Chemie», Австрия).

Аналитические методы. Активность нейтральной α -глюкозидазы определяли по скорости расщепления мальтозы. Инкубационная смесь состояла из 50 мкл диализованной мочи и 200 мкл 0,2 М калийфосфатного буфера, pH 6,5, содержащего 8,3 мМ мальтозу. Пробу инкубировали 30 мин при 37 °С. Реакцию останавливали кипячением в течение 3 мин. Образовавшуюся глюкозу определяли глюкозооксидазным методом [2]. Активность нейтральной α -глюкозидазы выражали в микромолях распавшейся мальтозы за 1 ч на 1 ммоль креатинина. Активность нейтральной α -глюкозидазы определяли также по скорости расщепления 4-метилумбеллиферил- α -D-глюкопиранозид. Инкубационная смесь состояла из 20 мкл мочи и 200 мкл 0,2 М калийфосфатного буфера, pH 6,5, содержащего 1,1 мМ 4-метилумбеллиферил- α -D-глюкопиранозид. Инкубацию проводили 30 мин при 37 °С. Реакцию останавливали добавлением 4 мл 0,1 М Na_2CO_3 . Флуоресценцию образовавшегося 4-метилумбеллиферона измеряли на флуориметре «Биан-130» (СССР) при возбуждении 365 нм и испускании 436 нм. Активность выражали в наномолях 4-метилумбеллиферона за 1 ч.

Концентрацию креатинина в моче определяли реакцией Яффе в модификации Пошнера и др. [14].

Антисыворотку к нейтральной α -глюкозидазе щеточной каймы почек человека получали иммунизацией кроликов гомогенным препаратом фермента [5]. Антитела (фракция IgG) к нейтральной α -глюкозидазе почек человека и кислой α -глюкозидазе печени человека получали из соответствующей антисыворотки путем хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе [13] и дополнительно очищали гель-фильтрацией через сефарозу 6Б.

Получение ферментных препаратов. Щеточную кайму выделяли из почек человека по методу Буса и Кенин [7]. Для получения растворимой фракции фермента корковый слой почки человека гомогенизировали с 0,02 М калийфосфатным буфером, pH 6,7, содержащим 0,15 М NaCl. Гомогенат центрифугировали 60 мин при 105 000 g. К надосадочной жидкости добавляли сухой $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 80 % насыщения. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием, суспендировали в минимальном объеме 0,02 М натрийфосфатного буфера, pH 6,7, содержащего 0,15 М NaCl, диализовали против этого же буфера и использовали в качестве препарата растворимой α -глюкозидазы.

Исследование мочи. Мочу собирали утром (с 7 до 9 ч) натощак после водной нагрузки (250—300 мл воды). Часть мочи (5 мл) диализовали против 25 мМ NaCl, содержащего 1 мМ ЭДТА, pH 6,7, в течение 1 сут при 4 °С.

Для получения растворимой и мембранно-связанной фракций 11 мл исходной мочи центрифугировали при 120 000 g в течение 60 мин при 15 °С (последнее необходимо, чтобы избежать выпадения содержащихся в моче солей в осадок). Надосадочную жидкость, содержащую растворимую фракцию, отбирали. После тщательного удаления следов жидкости в пробирке осадок суспендировали в 1 мл 0,05 М калийфосфатного буфера, pH 6,5. При изучении влияния папаина и тритона X-100 на солиби-

лизацию мембранно-связанной нейтральной глюкозидазы осадок получали из 65—130 мл мочи. Полученные осадки (120 000 g, 60 мин) суспендировали в 12 мл 0,05 М калийфосфатного буфера, pH 6,5, содержащего 10 мМ маннит, и центрифугировали 60 мин при 12 000 g. Осадки суспендировали в 2 мл 0,05 М калийфосфатного буфера, pH 6,5.

Обработка мембранно-связанной α -глюкозидазы мочи папаином и тритоном X-100. К 2 мл суспендированного в 0,05 М калийфосфатном буфере, pH 6,5, промытого осадка добавляли 0,2 мл (0,2 мг) папаина, активированного цистеином (1 мг/мл), или 0,1 мл 20 % раствора тритона X-100. Пробу с папаином инкубировали 15 мин при 37 °С; пробы с тритоном X-100 инкубировали 60 мин при комнатной температуре при перемешивании. После инкубации в пробы добавляли по 10 мл 0,05 М калийфосфатного буфера, pH 6,5, и центрифугировали 60 мин при 120 000 g. Надосадочную жидкость отбирали, осадки суспендировали в 1 мл 0,05 М калийфосфатного буфера, pH 6,5. Активность нейтральной α -глюкозидазы определяли в осадке и в надосадочной жидкости.

Осаждение нейтральной и кислой α -глюкозидаз антителами. Для осаждения мембранно-связанной нейтральной α -глюкозидазы к 200 мкл ферментного препарата добавляли (в конечных концентрациях): 0,2 % тритона X-100; 0,02 М натрийфосфатный буфер, pH 6,7; 0,15 М NaCl; бычий сывороточный альбумин (0,5 мг/мл) и соответствующее количество фракции IgG или антисыворотки. Общий объем пробы 400 мкл. Пробу инкубировали 30 мин при 37 °С и оставляли на ночь при 4 °С. Затем пробы центрифугировали 30 мин при 2500 g и 4 °С; в надосадочной жидкости определяли активность нейтральной α -глюкозидазы, используя в качестве субстрата 4-метилумбеллиферил- α -D-глюкопиранозид.

Для последовательного осаждения антителами кислой, а затем нейтральной глюкозидазы к 200 мкл ферментного препарата добавляли (до конечной концентрации): 0,2 М натрийфосфатный буфер, pH 6,7; 0,15 М NaCl; бычий сывороточный альбумин (0,5 мг/мл) и соответствующее количество IgG к кислой α -глюкозидазе. Общий объем пробы 400 мкл. Пробу инкубировали 30 мин при 37 °С, 2 ч при 4 °С и центрифугировали 30 мин при 2500 g и 4 °С. К 200 мкл надосадочной жидкости добавляли определенное количество антисыворотки или антител (фракция IgG) к нейтральной α -глюкозидазе, натрийфосфатный буфер, pH 6,7, до конечной концентрации 0,02 М, NaCl (0,15 М) и бычий сывороточный альбумин (0,5 мг/мл). Общий объем пробы 400 мкл. Пробу инкубировали 30 мин при 37 °С, оставляли на ночь при 4 °С, а затем центрифугировали, как описано выше. В надосадочной жидкости определяли активность нейтральной α -глюкозидазы с использованием в качестве субстрата 4-метилумбеллиферил- α -D-глюкопиранозид.

Результаты и обсуждение

Для решения вопроса о наличии в моче мембранно-связанной формы нейтральной α -глюкозидазы мочу здоровых людей центрифугировали 60 мин при 120 000 g, определяя в осадке и надосадочной жидкости активность фермента.

Таблица 1

Активность растворимой и мембранно-связанной нейтральной α -глюкозидазы в моче здоровых людей

Обследованный, №	Активность, нмоль на 1 ммоль креатинина за 1 ч			Активность в осадке, % от суммы активнос- тей осадка и на- досадочной жид- кости
	исходная моча	осадок, 120 000 g, 60 мин	надоса- дочная жидкость, 120 000 g, 60 мин	
1	1435	44	1394	3,0
2	1037	40	980	3,9
3	1529	33	1429	2,3
4	790	61	696	8,1
5	482	19	432	4,3
6	573	54	550	9,0

Как видно из табл. 1, в моче здоровых людей содержится в основном растворимая форма фермента (91—97% от общей активности) и только незначительная часть активности (2—9%) обнаруживается в осадке. Низкая активность нейтральной α -глюкозидазы в осадке не была связана с возможностью перехода фермента из осадка в растворимое состояние в процессе сбора и центрифугирования мочи. Так, активность нейтральной α -глюкозидазы в осадке, полученном при центрифугировании мочи через 3, 6 и 12 ч после выдерживания при комнатной температуре, была одинакова. На определение активности нейтральной α -глюкозидазы в осадке не влияло добавление тритона X-100 в реакционную среду (табл. 2), что свидетельствует об отсутствии латентной активности фермента в осадке и указывает на возможную локализацию фермента на поверхности частиц, осаждающихся при центрифугировании мочи.

Таблица 2

Влияние тритона X-100 на активность нейтральной α -глюкозидазы в осадке мочи человека

Обследованный, №	Активность, нмоль на 1 мл суспензии осадка за 1 ч	
	в отсутствие тритона X-100	в присутствии тритона X-100 (0,2%)
1 (здоровый)	24	23
2 (больной)	62	62
3 (больной)	390	360
4 (больной)	184	184
5 (больной)	140	138
6 (больной)	910	900

Известно, что мембранно-связанные ферменты щеточной каймы, находящиеся на наружной поверхности мембраны, легко переходят в растворимое состояние под действием протеолитических ферментов (папаина и др.) в результате отщепления основной, гидрофильной, части молекулы фермента от поверхности мембраны, точнее, от гидрофобного «якоря» фермента, пронизывающего мембрану. Ферменты щеточной каймы могут также солюбилизоваться различными детергентами (тритоном X-100, DS-Na и др.).

Для выяснения действия папаина тритона X-100 на нейтральную α -глюкозидазу осадка мочи осадок, полученный центрифугированием мочи при 120 000 g в течение 60 мин, отмывали от возможных соосаждающихся растворимых примесей путем суспендирования его в 0,05 M калийфосфатном буфере, pH 6,5, содержащем 10 mM маннит, и центрифугировали 60 мин при 120 000 g. Промытый осадок суспендировали и инкубировали с активированным папаином или тритоном X-100. После инкубации пробы центрифугировали 60 мин при 120 000 g. В осадке и в надосадочной жидкости определяли активность нейтральной α -глюкозидазы. Из данных табл. 3 и 4 видно, что инкубация осадка как с папаином (см. табл. 3), так и с тритоном X-100 (см. табл. 4) приводит к

Таблица 3

Солюбилизация мембранно-связанной нейтральной α -глюкозидазы из осадка мочи человека под действием папаина

Объект исследова- ния	Большой К-ов (опыт 1)		Большой К-ев (опыт 2)	
	активность, нмоль на 1 мл мочи за 1 ч	относитель- ная актив- ность, %	активность, нмоль на 1 мл мочи за 1 ч	относитель- ная актив- ность, %
Исходная моча	4013	—	11 520	—
Осадок (120 000 g, 60 мин)	840	—	4 680	—
Осадок (120 000 g, 60 мин), промытый раствором маннита	677	100	3 884	100
Надосадочная жидкость (120 000 g, 60 мин) после ин- кубации осадка с папаином	627	92,6	3 385	87,2

Таблица 4

Солобализация мембранно-связанной нейтральной α -глюкозидазы из осадка мочи человека под действием тритона X-100

Объект исследования	Больной К-оп (опыт 1)		Больной К-ев (опыт 2)	
	активность, μ моль на 1 мл мочи за 1 ч	относительная активность, %	активность, μ моль на 1 мл мочи за 1 ч	относительная активность, %
Исходная моча	4704	—	11 904	—
Осадок (120 000 g, 60 мин)	840	—	5 460	—
Осадок (120 000 g, 60 мин), промытый раствором маннита	688	100	4 309	100
Надосадочная жидкость (120 000 g, 60 мин) после солобализации осадка тритоном X-100	581	84,4	3 300	76,6
Надосадочная жидкость (120 000 g, 60 мин) после повторной солобализации тритоном X-100	54	7,8	363	8,4
Общий выход фермента из осадка в раствор после солобализации тритоном X-100	635	92,3	3 663	85,0

почти полному переходу нейтральной α -глюкозидазы из осадка в растворимое состояние: 92,3—93,6 % в одном и 85—87 % в другом опыте. Эти результаты показывают, что нейтральная α -глюкозидаза осадка представляет собой мембранно-связанную форму фермента и, очевидно, находится на наружной поверхности мембраны, что свойственно ферменту цеточной каймы и везикул, образованных из микроворсинок цеточной каймы.

При поражении почек в моче больных увеличивается активность как растворимой, так и мембранно-связанной нейтральной α -глюкозидазы (табл. 5). Во многих случаях это увеличение происходит параллельно, т. е. на фоне общего увеличения активности фермента в моче процентное содержание мембранно-связанной формы остается в пределах нормы (8—10 %). В других случаях наблюдается относительно более резкое возрастание в моче мембранно-связанной формы фермента, содержание которой достигает 30—36 % от общей активности фермента (см. табл. 5).

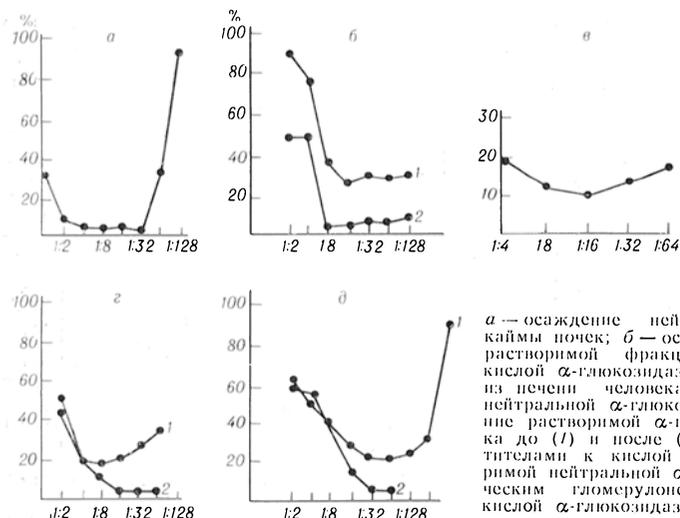
Таблица 5

Активность общей и мембранно-связанной нейтральной α -глюкозидазы в моче человека при заболеваниях почек

Обследованные	Диагноз	Активность мембранно-связанного фермента		
		Общая активность, μ моль на 1 ммоль креатинина за 1 ч	Активность на 1 ммоль креатинина за 1 ч	Активность от общей активности, %
	Норма (максимальные величины)	51,0 (n=55)	5,1 (n=7)	10,0 (n=7)
З-в	ХГН, полная ремиссия	40,7	4,6	11,3
С-пов	ХГН, частичная ремиссия	61,0	5,4	8,8
Л-у	ХГН	24,0	0,9	3,7
Ж-ко	ХГН	62,0	2,8	4,5
К-ко	ХГН	31,0	3,4	11,5
М-в	АТП, удовлетворительное состояние	61,3	5,6	9,2
Ч-цвын	ХГН	86,0	7,4	8,6
Е-в	ХГН	117,1	9,8	8,4
К-па	ХГН	111,9	10,2	9,1
К-п	ХГН	114,2	10,6	9,3
Т-ов	ХГН	381,0	38,9	10,2
К-ва	ХГН	129,0	14,6	11,3
Г-ов	ХГН, нефротический синдром	209,1	35,3	16,9
Р-кий	Амилоидоз, нефротическая форма	501,0	87,2	17,4
М-ов	ХГН, нефротический синдром	100,0	17,9	17,8
С-ов	То же	125,2	24,7	19,7
О-ян	» »	149,6	30,7	20,5
Б-ов	» »	122,1	31,5	25,8
М-ни	ХГН	203,5	53,1	26,1
К-ев	ХГН, нефротический синдром	250,4	76,1	30,4
Г-ов	ХГН	72,3	23,2	32,1
В-ов	ХГН	116,0	40,5	34,9
А-ов	ХГН, нефротический синдром	94,4	34,8	36,9

Примечание. ХГН—хронический гломеруло-нефрит; АТП—аллотрансплантация; ХПН—хроническая почечная недостаточность.

Увеличение в моче больных активности растворимого фермента, очевидно, связано с усилением его секреции, а возможно, секреции и синтеза. Возрастание секреции и синтеза мембранно-связанного фермента может быть вызвано как усилением процесса везикулизации и отпочковывания везикул от микроворсинок эпителиальных клеток [11], так и разрушением эпителиальных клеток. В почках человека в основном (приблизительно 90 %) содержится мембранно-связанный фермент, поэтому преобладание в моче больных растворимого фермента (см. табл. 5) свидетельствует о том, что при поражениях почек резко увеличивается секреция растворимого фермента, разрушение же эпителиальных клеток при этом если и происхо-



Осаждение активности нейтральной α -глюкозидазы из почек и мочи человека антителами к нейтральной α -глюкозидазе из щеточной каймы почек человека.

По оси абсцисс — разведение антител (*а* и *в*) или антисыворотки (*б*, *г*, *д*); по оси ординат — активность α -глюкозидазы (в % к контролю); *а* — осаждение нейтральной α -глюкозидазы из щеточной каймы почек; *б* — осаждение нейтральной α -глюкозидазы из растворимой фракции почек до (1) и после (2) удаления кислой α -глюкозидазы антителами к кислой α -глюкозидазе из печени человека; *в* — осаждение мембранно-связанной нейтральной α -глюкозидазы из мочи человека; *г* — осаждение растворимой α -глюкозидазы из мочи здорового человека до (1) и после (2) удаления кислой α -глюкозидазы антителами к кислой α -глюкозидазе; *д* — осаждение растворимой нейтральной α -глюкозидазы из мочи больного хроническим гломерулонефритом до (1) и после (2) удаления кислой α -глюкозидазы антителами к кислой α -глюкозидазе.

дит, то в количественном отношении оно незначительно по сравнению с увеличением секреции растворимого фермента и поэтому не оказывает существенного влияния на общий уровень активности нейтральной α -глюкозидазы в моче. Однако определение активности мембранно-связанного фермента в моче при поражении почек может иметь самостоятельное значение для количественной оценки деструктивных изменений эпителиальных клеток извитых канальцев при заболеваниях почек.

Ранее было показано [1, 9, 10, 12], что растворимая α -глюкозидаза мочи здоровых людей имеет почечное происхождение. Для доказательства того, что растворимая и мембранно-связанная формы нейтральной α -глюкозидазы мочи больных с почечной патологией имеют только почечное происхождение, нами было проведено титрование растворимой и мембранно-связанной глюкозидазы мочи антителами (или антисывороткой), полученными к нейтральной α -глюкозидазе из щеточной каймы почек человека. Как видно из рисунка, антитела к нейтральной α -глюкозидазе из щеточной каймы почек человека полностью осаждают фермент из щеточной каймы почек и на 90% — мембранно-связанный фермент из осадка мочи. Растворимый фермент почек и мочи также осаждался антисывороткой к нейтральной α -глюкозидазе из щеточной каймы почек. Однако из-за присутствия в растворимой фракции почек и мочи значительных количеств кислой α -глюкозидазы, особенно в мо-

че здоровых людей, где активность ее часто во много раз превышала активность нейтрального фермента, об истинных результатах титрования нейтральной α -глюкозидазы можно было судить только после предварительного удаления кислой α -глюкозидазы. Кислую α -глюкозидазу в исследуемых образцах осаждали антителами, полученными к кислой α -глюкозидазе из печени человека. На рисунке приведены результаты титрования растворимой α -глюкозидазы почек и мочи человека до (1) и после (2) осаждения кислой α -глюкозидазы. После удаления из образцов кислой α -глюкозидазы наблюдалось полное осаждение антисывороткой к нейтральной α -глюкозидазе как растворимого фермента почек, так и растворимого фермента мочи здоровых и больных людей.

Таким образом, данные о титровании нейтральной α -глюкозидазы мочи антителами к нейтральной α -глюкозидазе почек показывают, что растворимый и мембранно-связанный ферменты мочи здоровых и больных с почечной патологией имеют исключительно почечное происхождение, поскольку нейтральная α -глюкозидаза, иммунологически идентичная ферменту почек, у человека найдена только в слизистой кишечника [8].

Увеличение активности нейтральной α -глюкозидазы в моче людей при поражении почек [3, 4] и иммунологическая идентичность фермента мочи больных ферменту почек еще раз подтверждают целесообразность определения активности нейтральной α -глюкозидазы в моче для диагностики по-

ражения почек и контроля за эффективностью проводимой терапии [4].

Проведенные исследования показали, что увеличение активности нейтральной α -глюкозидазы при поражении почек в основном связано с усилением секреции растворимой формы фермента, которая составляет большую часть активности фермента в моче здоровых и больных людей. Активность мембранно-связанной формы фермента в моче при поражении почек также возрастает, но в количественном отношении менее существенно. Однако определение активности мембранно-связанного фермента в моче больных, по-видимому, может иметь самостоятельное значение для оценки происходящих деструктивных изменений эпителиальных клеток извитых канальцев при заболеваниях почек.

Авторы выражают глубокую признательность проф. Е. Л. Розенфельд и проф. М. Я. Ратнер за ценные советы при обсуждении результатов и канд. биол. наук Д. М. Беленькому за предоставление антисыворотки к кислой α -глюкозидазе человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лавренова Т. П., Лукомская И. С. // *Вопр. мед. химии.* — 1983. — № 4. — С. 91—95.
2. Лукомская И. С., Городецкий В. К. // *Биохимия.* — 1961. — Т. 26. — № 3. — С. 477—482.
3. Лукомская И. С., Лавренова Т. П., Томиллина Н. А. и др. // *Вопр. мед. химии.* — 1984. — № 4. — С. 74—78.
4. Лукомская И. С., Лавренова Т. П., Томиллина Н. А. и др. // *Там же.* — 1986. — № 5. — С. 112.
5. Лукомская И. С., Ушакова Н. А., Казлас Е. В. // *Биохимия.* — 1983. — Т. 48. — № 11. — С. 1810—1819.
6. Ушакова Н. А., Лукомская И. С. // *Там же.* — 1976. — Т. 41. — № 7. — С. 1320—1329.

7. Booth A. G., Kenny A. J. // *Biochem. J.* — 1974. — Vol. 142. — P. 575—581.
8. Buret G. de, Vannier C., Guidicelli J., Sudaoka P. // *Biochimie.* — 1979. — Vol. 61, N 10. — P. 1177—1183.
9. Lukomskaya I. S., Ushakova N. A. // *Federation of European Biochemical Societies Special Meeting on Enzymes. Abstracts.* — Dubrovnik, 1979. — P. S5—54.
10. Minamiura N., Matoba K., Nishinaka H. et al. // *J. Biochem. (Tokyo).* — 1982. — Vol. 91. — P. 809—816.
11. Mooseker M. S., Keller T. C. S. III, Hirokawa N. // *Brush Border Membranes.* — London, 1983. — P. 195—210.
12. Nishinaka H., Minamiura N., Matoba K. et al. // *J. Histochem. Cytochem.* — 1982. — Vol. 30, N 11. — P. 1186—1189.
13. Nowolny A. *Basic Exercises in Immunochimistry.* — Berlin, 1979. — P. 8.
14. Popper H., Mandel E., Mayer H. // *Biochem. Z.* — 1937. — Bd 291. — S. 354—367.

Поступила 18.07.86

SOLUBLE AND MEMBRANE-BOUND FORMS OF NEUTRAL α -GLUCOSIDASE IN HUMAN URINE OF HEALTHY PERSONS AND IN PATIENTS WITH KIDNEY IMPAIRMENTS

N. A. Ushakova, T. P. Lavrenova, E. V. Kazlas, N. A. Tomilina, M. L. Zubkin, N. D. Fedorova, I. S. Lukomskaya

Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Institute of Transplantology and Artificial Organs, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

Soluble and membrane-bound forms of neutral α -glucosidase, which are immunologically similar to the corresponding forms of kidney enzymes, were found in urine of healthy persons and of patients with kidney impairments. Membrane-bound enzyme was only slightly active in urine of healthy persons and constituted 3-10% of total urine activity although the ratio of membrane-bound enzyme was simultaneously elevated under pathological conditions. The increased rate of soluble enzyme secretion was responsible for distinct activation of neutral α -glucosidase in urine of the patients with kidney impairments.

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 612.822.1+612.45.015.3:[547.95:547.943].015.1:577.152.34]-088.1

А. П. Ростовцев, О. О. Григорьянц, О. А. Гомазков

СУБСТРАТЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭНКЕФАЛИНОБРАЗУЮЩЕЙ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ В МОЗГЕ И НАДПОЧЕЧНИКАХ КРЫСЫ

НИИ медицинской энзимологии АМН СССР, Москва

Энкефалины, как и большинство биологически активных пептидов, являются продуктами протеолитического расщепления (процессинга) белковых предшественников, в которых последовательности активных пептидов заключены между парами основных аминокислот [3, 9, 15]. На первом этапе процессинга при участии трипсиноподобного фермента происходит расщепление пептидных связей, образованных карбоксильными группами основных аминокислот, в результате чего образуются enkephalin-containing hexapeptides с остатками лизина или аргинина на С-конце [13]. Затем карбоксипептидазо-В-подобный фермент, или enkephalin-forming carboxypeptidase (ЭОК), отщепляет С-концевую аминокислоту с высвобождением молекулы enkephalin [6, 8].

ЭОК отличается от широко распространенной в организме лизосомальной карбоксипептидазы В субклеточной локализацией, рядом физико-химических и каталитических свойств [6, 8, 14].

Энкефалины принимают участие в регуляции таких патофизиологических явлений, как стресс, боль, экстремальные состояния и т. п. Поэтому изучение свойств ЭОК при различных функциональных состояниях организма представляет несомненный интерес.

При исследовании ЭОК в гомогенатах тканей возникают проблемы, одной из которых является выбор высокоспецифичных субстратов, удобных

для работы с неочищенными препаратами фермента. В ряде работ в качестве субстрата для определения активности ЭОК, очищенной до гомогенного состояния, был использован природный enkephalin-containing hexapeptide [125 I]enkephalin-arg⁶ (см. рисунок) [11]. Однако при исследовании активности фермента в гомогенате этот субстрат мало пригоден из-за неспецифического гидролиза, катализируемого аминокептидазами и другими ферментами.

Для исследования ЭОК был синтезирован трипептид dansyl-phe-leu-arg [6], имитирующий С-концевую часть [125 I]enkephalin-arg⁶ (см. рисунок). Недостатком этого трипептида является то, что он может одновременно подвергаться гидролизу, катализируемому карбоксипептидазой В.

Следовало полагать, что субстрат, структура которого приближалась бы к [125 I]enkephalin-arg⁶, а N-концевая часть была бы защищена от действия enkephalin-degrading ферментов, был бы более пригоден для исследования активности ЭОК в тканевых препаратах. Поэтому в качестве возможного субстрата для определения enkephalin-forming carboxypeptidase активности в данной работе исследовали структурный аналог [125 I]enkephalin-arg⁶ — даларгин. Этот пептид был синтезирован в ВКНЦ АМН СССР [3] и получил широкое применение в клинической практике. Даларгин представляет собой hexapeptide, в котором в отличие от [125 I]enkephalin-arg⁶ остаток глицина во втором положении заменен на остаток D-аланина (см. рисунок), что делает его устойчивым к действию аминокептидазы — основного enkephalin-degrading фермента.

TYR-GLY-GLY-PHE-LEU-ARG
[125 I]enkephalin arg⁶

Dansyl-PHE-ALA-ARG
Дансильный трипептид
TYR-D-ALA-GLY-PHE-LEU-ARG
Даларгин

Субстраты, используемые для определения активности ЭОК.

В нашу задачу входило сравнение dansyl-phe-ala-arg и даларгина в качестве субстратов для определения энцефалинообразующей карбоксипептидазы в гомогенатах тканей животных.

Методика

Dansyl-phe-ala-arg был синтезирован [2] и любезно предоставлен В. П. Незавибадько (Институт молекулярной генетики АН СССР), $[\text{Leu}^3]$ энкефалин-arg⁶, $[\text{Leu}^5]$ энкефалин, даларгин, $[\text{H}^3]$ -tyr¹, D-ala², $[\text{Leu}^6]$ энкефалин-arg⁶ (8,8 Сг/ммоль), tyr-D-ala-gly — М. И. Титовым (Институт экспериментальной кардиологии ВКНЦ АМН СССР); использованы сахараза, трис, NaH_2PO_4 , CH_3COONa — категории р. А. («Серва»), остальные реактивы отечественного производства категории х. ч. Все растворы готовили на деионизованной воде (Milli Q, Millipore).

Белых нелинейных крыс-самцов с массой тела 130—150 г декапитировали, ткани после взвешивания промывали в охлажденном 0,9 % растворе КСl и гомогенизировали в охлажденном 10 мМ трис-НСl-буфере рН 7,7, содержащем 0,25 М сахарозу (в 10 объемах для мозга, надпочечников, в 100 объемах для гипофиза), гомогенизатором типа «Polytron» при 50 000 об/мин трижды по 30 с с минутными интервалами при 2—4 °С. Эти гомогенаты использовали в качестве ферментного препарата.

Определение карбоксипептидазной активности с dansyl-phe-ala-arg. При взаимодействии с этим субстратом карбоксипептидаза В и ЭОК отщепляют С-концевой остаток аргинина. Образующийся в результате реакции дансильированный дипептид количественно экстрагируют хлороформом, тогда как непрореагировавший субстрат остается в водной фазе. Количество образовавшегося продукта определяют по флюоресценции органической фазы.

В отсутствие ионов Co^{2+} — активатора ЭОК — определяют суммарную активность карбоксипептидазы В и ЭОК, содержащихся в ферментном препарате. Добавление ионов Co^{2+} в состав инкубационной среды вызывает значительную активацию ЭОК (в 10—11 раз), при этом активность карбоксипептидазы В не изменяется [6]. Активность Co^{2+} -активируемой ЭОК определяют как разность карбоксипептидазных активностей с добавлением и без добавления ионов Co^{2+} .

Ферментный препарат (10—100 мкл), субстрат (100 мкМ dansyl-phe-ala-arg) и 50 мМ Na-ацетатный буфер рН 5,6 до конечного объема 500 мкл инкубировали при 37 °С в течение 10 мин. При определении активности Co^{2+} -активируемой ЭОК в состав инкубационной пробы добавляли CoCl_2 в конечной концентрации 1 мМ. Реакцию инициировали добавлением ферментного препарата и останавливали добавлением 50 мкл 2,5 н НСl. После прекращения реакции к пробам приливали по 3 мл хлороформа, интенсивно встряхивали на «Vibro-fix» и измеряли флюоресценцию органической фазы в десяти миллиметровых кварцевых кюветках на спектрофлюориметре «Hitachi MPF-2A» ($\lambda_{\text{возб}}=360$ нм, $\lambda_{\text{исп}}=510$ нм). Количество образовавшегося продукта — dansyl-phe-ala — определяли по калибровочной

кривой, линейной в пределах 0,05—10 пмоль продукта.

Величины констант Михаэлиса (K_M) и V_{max} определяли по методу [10] в координатах S/V от S при концентрациях dansyl-phe-ala-arg 12,5, 25, 50, 100, 200 мкМ. Величины констант ингибирования (K_i) карбоксипептидазы В и Co^{2+} -активируемой ЭОК определяли графически по методу [1] при концентрациях субстрата 25, 50, 75, 100 мкМ и концентрациях ингибиторов — $[\text{Leu}^5]$ энкефалин-arg⁶ и даларгина — 25, 50, 75, 100, 250 мкМ. Через 10 и 20 мин инкубации при 37 °С отбирали аликвоты по 20 мкл, реакцию останавливали добавлением 2,5 мкл 2,5 н НСl. Характер ингибирования даларгином и $[\text{Leu}^5]$ энкефалином-arg⁶ карбоксипептидазы В и ЭОК конкурентный.

Определение карбоксипептидазной активности с даларгином. Инкубационные пробы содержали даларгин (0,5 мМ), $[\text{H}^3]$ даларгин (10 000 срм), ферментный препарат (1—10 мкл), 50 мМ Na-ацетатный буфер рН 5,6 (до 50 мкл). При определении активности Co^{2+} -активируемой ЭОК в состав пробы входил CoCl_2 в конечной концентрации 1 мМ. Реакцию начинали добавлением ферментного препарата, через 10—20 мин инкубации при 37 °С реакцию останавливали добавлением 7,5 мкл 2,5 н НСl и центрифугировали пробу при 10 800 г в течение 5 мин на микроцентрифуге «Eppendorf 5414».

Разделение продуктов реакции проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на силикагелевых пластинах Silufol 254. Аликвоты объемом 10 и 20 мкл наносили в точки и хроматографировали в смеси пиридин/ $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}/n$ -бутанол в соотношении 2:1:1:5. Пептиды-свидетели хроматографировали на тех же пластинах и проявляли пингидрином. Участки, соответствующие положению пятен $[\text{H}^3]$ -содержащих пептидов, вырезали, радиоактивность определяли на жидкостном сцинтилляционном счетчике.

Концентрацию белка в гомогенатах определяли по методам [12] и [4]. Экспериментальные результаты обрабатывали статистически по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В предварительных экспериментах были определены кинетические константы реакции взаимодействия карбоксипептидазы В и Co^{2+} -активируемой энцефалинообразующей карбоксипептидазы с dansyl-phe-ala-arg. Эти эксперименты проводили с целью оптимизации условий определения активности ЭОК. Полученные результаты приведены в табл. 1. Концентрация субстрата в составе инкубационной среды для определения активности, используемая в работе [7], только в 1,5—2 раза превышала величину K_M , определенной этими авторами и равной 0,022 мМ. Определенные нами величины K_M совпадают с величинами, полученными в работе [7]. Близкие по значениям K_M карбоксипепти-

Таблица 1

Кинетические характеристики карбоксипептидазы В и Co^{2+} -активируемой энкефалинообразующей карбоксипептидазы мозга крысы (субстрат dansyl-phe-ala-arg)

Кинетические характеристики	Карбоксипептидаза В	Co^{2+} -активируемая ЭОК
K_M , мМ	0,035	0,025
U_{max} , нмоль/мин·мг	0,7	0,2
K_i , мМ:		
[Leu ⁵] энкефалин-arg ⁶	0,106	0,046
даларгин	0,175	0,016

дазы В и Co^{2+} -активируемой ЭОК указывают на то, что dansyl-phe-ala-arg, будучи хорошим субстратом для определения карбоксипептидазной активности, не является специфичным в отношении энкефалинообразующей карбоксипептидазы.

Исходя из величины K_M ЭОК, измеренной в пробах с дансильным субстратом, в наших опытах была увеличена концентрация dansyl-phe-ala-arg в среде для определения активности до 100 мкМ, что позволило определить активность ферментов при более оптимальных условиях по сравнению с работами [6, 7].

В табл. 2 приведены результаты определения активности карбоксипептидазы В и ЭОК в тканях крысы (с коррекцией концентрации дансильного субстрата).

Различия между карбоксипептидазой В и Co^{2+} -активируемой ЭОК были выявлены при определении K_i ферментов энкефалинсодержащими гексапептидами. Как видно из табл. 1, карбоксипептидаза В и Co^{2+} -активируемая ЭОК значительно различаются по сродству к [Leu⁵]энкефалин-arg⁶ и даларгину. Специфичность [Leu⁵]энкефалина-arg⁶ и даларгина по отношению к ЭОК проявляется в значительно меньших величинах K_i ЭОК этими гексапептидами по сравнению с аналогичными экспериментами с карбоксипептидазой В. Меньшая величина K_i для даларгина по сравнению с K_i для [Leu⁵]энкефалина-arg⁶, возможно, свидетельствует о том, что в связывании энкефалинсодержащей части субстрата большую роль играют гидрофобные взаимодействия, так как замена остатка глицина на остаток D-аланина заметно уменьшает величину константы ингибирования; при

этом некоторое увеличение боковой цепи не вызывает стерических затруднений. Выраженное сродство ЭОК к даларгину позволило допустить, что даларгину может быть использован в качестве высокоспецифичного субстрата для изучения каталитических особенностей фермента.

Исходя из предположения, что замена глицина² на D-аланин² в структуре даларгина делает его более устойчивым к действию аминопептидаз, присутствующих в тканевых препаратах, были проведены качественные опыты по гидролизу даларгина и [Leu⁵]энкефалина-arg⁶ в пробах с гомогенатами мозга крысы. Оказалось, что даларгин, как и [Leu⁵]энкефалин-arg⁶, гидролизуется по связи Leu⁵-arg⁶ с образованием [D-ala², Leu⁵]энкефалина и [Leu⁵]энкефалина соответственно. [Leu⁵]энкефалин-arg⁶ и [Leu⁵]энкефалин, кроме того, расщепляются по связям tyr¹-gly² и gly³-phe⁴ с образованием тирозина и трипептида tyr¹-gly²-gly³, тогда как даларгин и [D-ala², Leu⁵]энкефалин не гидролизуются аминопептидазой и лишь в незначительной степени расщепляются по связи gly³-phe⁴ с образованием трипептида tyr¹-D-ala²-gly³. R_1 : [D-ala², Leu⁵]энкефалин — 0,73, даларгин — 0,53, тирозин — 0,37, tyr-D-ala-gly — 0,31.

При кинетическом анализе реакции взаимодействия карбоксипептидазы В и Co^{2+} -активируемой ЭОК с даларгином установлено, что K_M ЭОК (0,046 мМ) на порядок меньше K_M

Таблица 2

Активность карбоксипептидазы В и ЭОК, определяемая с использованием в качестве субстрата dansyl-phe-ala-arg

Ткань	Удельная активность, нмоль dansyl-phe-ala-мин ⁻¹ ·мг ⁻¹	
	карбоксипептидаза В	Co^{2+} -активируемая ЭОК
Гипофиз	7,30 ± 2,10	13,60 ± 3,60
Мозжечок	0,39 ± 0,03	0,31 ± 0,02
Мозг (без мозжечка)	0,64 ± 0,04	0,29 ± 0,02
Надпочечники	1,04 ± 0,09	0,58 ± 0,12

Примечание. Приведены средние значения и доверительные интервалы для уровня значимости $p=0,95$ удельной активности карбоксипептидазы В и Co^{2+} -активируемой ЭОК в мозге, мозжечке, гипофизе (7 животных) и надпочечниках (3 животных).

карбоксипептидазы В, (0,5 мМ), что свидетельствует о значительно большем сродстве ЭОК к даларгину по сравнению с карбоксипептидазой В. Величины K_M ЭОК по даларгину и dansyl-phe-ala-arg сопоставимы, что говорит об одинаково хорошем связывании обоих субстратов в активном центре фермента. Величины V_{max} для карбоксипептидазы В и ЭОК в опытах с даларгином довольно высоки (9,6 и 1,9 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹), что указывает на большую эффективность ферментативного катализа при гидролизе даларгина.

Таким образом, проведенные исследования показали, что даларгин можно рассматривать в качестве высокоспецифичного субстрата для ЭОК. Оба изученных нами субстрата пригодны для определения активности энкефалинообразующей карбоксипептидазы в тканевых ферментных препаратах. К преимуществам способа определения с помощью дансильного субстрата можно отнести методическую простоту и высокую чувствительность анализа. Даларгин проявляет более выраженное сродство к ЭОК. Поэтому оба субстрата взаимно дополняют друг друга: дансильный субстрат больше пригоден для массовых скрининговых исследований, тогда как даларгин позволяет изучить каталитические свойства фермента и их изменения при различных функциональных состояниях организма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Корниш-Бовден Э. Основы ферментативной кинетики: Пер. с англ. — М., 1979. — С. 87.
2. Незавибацько В. П. // Биоорг. химия. — 1986. — Т. 12, № 6. — С. 733—735.
3. Чазов Е. И., Смирнов В. П., Титов М. И. и др. // А. с. 1031134. СССР.
4. Bradford M. M. // Analyt. Biochem. — 1976. — Vol. 72. — P. 248—254.

5. Comb M., Seeburg P. H., Adelman J. et al. // Nature. — 1982. — Vol. 295. — P. 663—666.
6. Fricker L. D., Snyder S. H. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1982. — Vol. 79. — P. 3886—3890.
7. Fricker L. D., Snyder S. H. // J. biol. Chem. — 1983. — Vol. 258. — P. 10950—10955.
8. Fricker L. D., Supattapone S., Snyder S. H. // Life Sci. — 1982. — Vol. 31. — P. 1841—1844.
9. Gubler U., Seeburg P., Hoffman B. J. et al. // Nature. — 1982. — Vol. 295. — P. 206—208.
10. Hanes C. S. // Biochem. J. — 1932. — Vol. 26. — P. 1406.
11. Hook V. Y.-H., Loh Y. P. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1984. — Vol. 81. — P. 2776—2780.
12. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
13. Stern A. S., Lewis R. V., Kimura S. et al. // Arch. Biochem. — 1980. — Vol. 205. — P. 606—613.
14. Supattapone S., Fricker L. D., Snyder S. H. // J. Neurochem. — 1984. — Vol. 42. — P. 1017—1023.
15. Tager H. S., Palsell C., Chan S. et al. // Biol. Cell. — 1979. — Vol. 36. — P. 127—136.

Поступила 18.08.86

THE SUBSTRATES FOR STUDY OF ENKEPHALIN-FORMING CARBOXYPEPTIDASES IN RAT BRAIN AND ADRENAL GLANDS

A. P. Rostovtsev, O. O. Grigoryants, O. A. Gornazkov

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

Dansyl-Phe-Ala-Arg and (D-Ala², Leu⁵) enkephalin-Arg⁶ (dalargin) were studied as possible substrates for enkephalin-forming carboxypeptidase (EFC) and carboxypeptidase B (CPB) in crude tissue homogenates. Activities of these enzymes in rat cerebellum, pituitary and adrenal glands were determined using the dansyl substrate. Kinetic characteristics of CPB and EFC were evaluated for dansyl substrate and dalargin. Affinity of EFC to dalargin was 10-fold higher as compared with CPB. Dalargin may be used as a specific substrate for study of EFC in tissue preparations.

*И. И. Гончаров, Г. В. Кацяя, В. Ю. Бутнев, В. И. Воронцов,
Л. Б. Хагундокова, Р. Веземан*

ПРИМЕНЕНИЕ РАДИОИММУННОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ 11-ДЕЗОКСИКОРТИЗОЛА ДЛЯ ОЦЕНКИ ФУНКЦИИ СИСТЕМЫ ГИПОФИЗ — КОРА НАДПОЧЕЧНИКОВ В УСЛОВИЯХ МЕТОПИРОНОВОГО ТЕСТА

Институт экспериментальной патологии и терапии АМН СССР, Сухуми, СССР; Централь-
ный институт микробиологии и экспериментальной терапии АН ГДР, Гена, ГДР

В плане выяснения функциональных резервов коры надпочечников и аде-
ногипофиза важная роль принадле-
жит тесту с метопираном [2-метил-1,2-
бис(3-пиридил)-пропанон-1], специ-
фическим ингибитором 11 β -гидрокси-
лирования стероидов. В результате
введения метопирана возникает блок
в системе синтеза кортикостероидов
между 11-дезоксикортизолом и корти-
золом. По возрастанию концентрации
11-дезоксикортизола в крови можно
оценить функциональные резервы ко-
ры надпочечников и гипофиза, секре-
торная активность которых в этих
условиях резко активизируется по меха-
низму обратной связи ввиду ингибиро-
вания синтеза кортизола.

До последнего времени для опреде-
ления 11-дезоксикортизола использо-
вали метод конкурентного связывания
с белком, который обладает сравни-
тельно низкой специфичностью. В свя-
зи с этим требовалось предваритель-
ное хроматографическое выделение
этого соединения, что в значительной
степени повышало трудоемкость мето-
да [5].

В данной статье описан простой вы-
сокоспецифичный радиоиммунный ме-
тод определения 11-дезоксикортизола,
который открывает возможность более
широкого применения метопираново-
го теста как в клинических, так и экс-
периментальных исследованиях.

Методика

В работе использовали: 11-дезоксикортизол
(«Sigma», США), меченый ³H-11-дезоксикор-
тизол (1776 ТБк/моль, Институт прикладной
химии Министерства химической промышлен-
ности СССР), антителы к 11-дезоксикор-
тизолу (Институт экспериментальной патоло-
гии и терапии АМН СССР, ГУ 42.14—332),
синтиляционную смесь (0,5 г 1,4-ди-5-фе-
нил-оксазолилбензола и 5 г 2,5-дифенилоксазо-
ла в 1 л толуола), 0,1 М фосфатный буфер
рН 7,4, содержащий 0,1 % желатина и
0,4 % NaCl.

³H-11-дезоксикортизол очищали от продук-
тов радиолиза хроматографией на колонке с
сефадексом LH-20 в системе толуол — мета-
нол (85 : 15). Скорость счета рабочего раство-
ра ³H-11-дезоксикортизола в фосфатной бу-
ферной системе составляла 10 000 имп на
0,1 мл в 1 мин.

Синтез 3-(0-карбоксиметилокси)-11-де-
зоксикортизола и его конъюгацию с бычьим
сывороточным альбумином (БСА) осуществ-
ляли описанными ранее методами [3] в отделе
химии стероидных соединений Центрального
института микробиологии и экспериментальной
терапии АН ГДР (Йена). Конъюгат 11-дезок-
сикортизола с БСА, по данным электрофото-
метрического анализа, содержал 26 молекул
стероида на 1 молекулу БСА.

В Институте экспериментальной патологии
и терапии АМН СССР (Сухуми) для получе-
ния антисыворотки кроликов породы шинш-
лла массой 2,5—3 кг иммунизировали конъюга-
том 11-дезоксикортизола с БСА. На каждое
животное брали по 2 мг антигена на 1 им-
мунизацию. Взвесь антигена в полном адью-
ванте Фрейда вводили в область лимфоузлов
передних и задних конечностей. Иммунизи-
ровали трехкратно с интервалом в 1 мес. Через
2 нед после последней иммунизации брали
кровь из ушной вены для получения антисы-
воротки.

Специфичность антисыворотки определяли
по методу Абрахама [2] с 32 родственными
стероидами, сходство антител к 11-дезоксикор-
тизолу — по графику Скэтчарда [1].

Для оценки воспроизводимости результа-
тов радиоиммуноанализа был приготовлен пул
плазмы крови обезьян (самок павианов га-
мадрилов), который использовали в каждом
эксперименте в качестве эталона сравнения.
Коэффициент вариации при определении кон-
центрации стероида в пуле в различных се-
риях определен не превышал 15 %, а в
пределах 1 эксперимента в параллельных про-
бах пула был ниже 10 %.

Эксперимент с введением метопирана был
выполнен на обезьянах — неполовозрелых
(в возрасте 3 лет) и взрослых (10—14 лет)
самцах павианов гамдрилов. Масса у непо-
лодозрелых животных была в среднем в 2 ра-
за меньше, чем у взрослых, поэтому первым
вводили по 250 мг, вторым — по 500 мг
метопирана. Кровь для определения 11-дезок-
сикортизола брали из локтевой вены до вве-
дения препарата, а затем через 3, 6, 24, 48
и 72 ч после введения.

Для экстракции 11-дезоксикортизола 20 мкл
исследуемой плазмы интенсивно встряхивали
с 2 мл этилового эфира на супермиксере. Эф-
фективность экстракции 11-дезоксикортизола

из плазмы крови в указанных условиях составляла 95—97 %.

Для контроля величины неспецифического фона («бланка») проводили экстракцию фосфатной буферной системы эфиром в том же соотношении, как и при экстракции исследуемой плазмы. Отсутствие достоверных различий в активности проб максимального связывания (B_0) и «бланка» исключало влияние факторов неспецифического фона на результаты радиоиммунологических определений.

Эфирный экстракт отделяли от плазмы замораживанием водной фазы при температуре от -30 до -40 °С с последующим декантрованием. Эфир выпаривали на водяной бане при $38-40$ °С и к упаренному экстракту добавляли по 200 мкл фосфатной буферной системы, после чего пробы инкубировали в водяной бане 5 мин при 60 °С и встряхивали на миксере в течение 20 с.

Диназон концентрации 11-дезоксикортизола в калибровочной кривой составлял от 25 до 800 нг на 0,2 мл. Растворы калибровочных проб, ^3H -11-дезоксикортизола и антисыворотки готовили в фосфатной буферной системе. Затем растворы антисыворотки и ^3H -11-дезоксикортизола смешивали в равных объемах и добавляли во все пробы в виде смеси по 100 мкл. Содержимое пробирок перемешивали на миксере всем штативом, инкубировали в водяной бане 10 мин при 60 °С и 30 мин при 30 °С, после чего штатив переносили в ледяную баню с температурой воды $2-4$ °С. Для разделения свободной и связанной фракций стероида добавляли 0,5 мл 1 % суспензии активированного угля в фосфатной буферной системе. После инкубации в течение 10 мин в ледяной бане и центрифугирования при 2000 г в течение 5 мин при 4 °С надосадочную жидкость сливали для счета радиоактивности во флаконы, содержащие 10 мл сцинтилляционной смеси. Содержимое флаконов инкубировали 5 мин в водяной бане при 60 °С, встряхивали 5 с на миксере, охлаждали и измеряли уровень радиоактивности на жидкостно-сцинтилляционном счетчике LS-30 «Интертехник» (Франция) с эффективностью счета 48 %.

Содержание 11-дезоксикортизола в пробах исследуемой плазмы рассчитывали по графику зависимости относительного процента связывания проб калибровочной кривой от концентрации стандарта в системе $\text{logit} - \text{log}$ координат.

Результаты и обсуждение

В результате иммунизации животных была получена антисыворотка с титром 1:96 000. Константа сродства антител к 11-дезоксикортизолу составила $3,5 \cdot 10^9$ л/моль. Величины перекрестных реакций антисыворотки приведены в таблице.

Как видно из таблицы, максимальная перекрестная реакция антисыворотки к 11-дезоксикортизолу была зарегистрирована для 17-оксипрогестерона и составляла 11,4 %. Однако, учитывая, что концентрация этого соединения в крови человека и обезьян в 5—10 раз ниже, чем 11-дезоксикор-

Специфичность антисыворотки к 11-дезоксикортизолу

Соединение	Величина перекрестной реакции, %
11-Дезоксикортизол	100
17-Оксипрогестерон	11,4
Кортизон	1,4
Прогестерон	0,8
Кортизол	0,6
Дезоксикортикостерон	0,1

Остальные соединения—менее 0,1%

тизола, указанная величина перекрестной реакции не искажала результатов определений.

Стандартная кривая для определения 11-дезоксикортизола, построенная в $\text{logit} - \text{log}$ координатах, приведена на рис. 1. В диназоне от 25 до 800 пг отмечался линейный характер кривой. Коэффициент вариации параллельных проб каждой дозы калибровочной кривой колебался от 1,5 до 5,5 %.

При определении открываемости для оценки точности метода получена кривая зависимости исследуемого количества 11-дезоксикортизола от добавленного в пробу (рис. 2). Эффективность открытия для всех добавленных доз составила $96,4 \pm 0,6$ %.

Результаты оценки точности метода с применением теста на параллелизм представлены на рис. 3. Как видно из рисунка, зависимость содержания 11-дезоксикортизола от объема экстрагируемой плазмы крови различных видов животных (обезьян, морских свинок) и человека носит линейный характер.

На рис. 4 приведена динамика содержания 11-дезоксикортизола в плазме крови неполовозрелых и взрослых самцов павианов гамадрилов в условиях метопирилового теста. Исходный

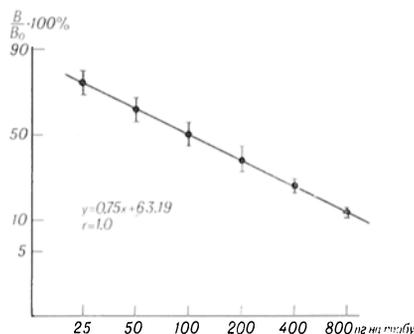


Рис. 1. Калибровочная кривая радиоиммунного определения 11-дезоксикортизола, построенная в системе $\text{logit} - \text{log}$ координат.

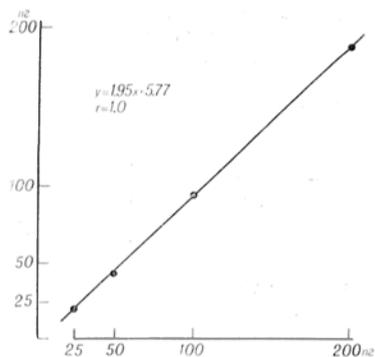


Рис. 2. Зависимость определяемого количества 11-дезоксикортизола от количества гормона, добавленного в бесстероидную плазму.

По оси абсцисс — количество добавленного, по оси ординат — количество открытого 11-дезоксикортизола (в нг).

уровень 11-дезоксикортизола в крови неполовозрелых животных был почти в 2 раза выше, чем у взрослых, и составлял $17,8 \pm 2,8$ и $9,0 \pm 1,4$ нг/мл соответственно. Через 3—6 ч после введения метопирона содержание 11-дезоксикортизола увеличивалось в крови взрослых животных в 12 раз, у неполовозрелых — в 15 раз. Восстановление исходных значений происходило через 48 ч.

Полученные результаты показывают, что разработанный метод радиоиммунного определения 11-дезоксикортизола обладает высокой чувстви-

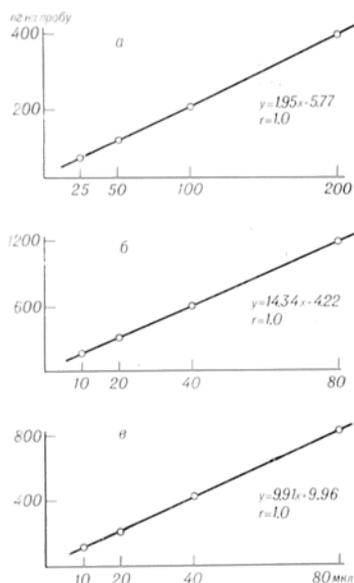


Рис. 3. Зависимость содержания 11-дезоксикортизола от объема исследуемой плазмы различных видов животных и человека.

а — человек (мужчина); *б* — самки павианов гамадрилов; *в* — самки морских свинок.

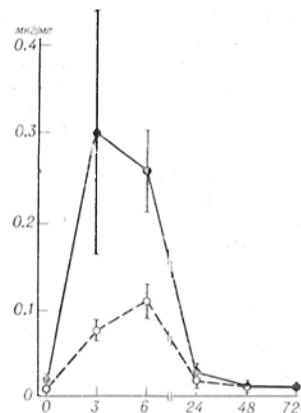


Рис. 4. Изменение содержания 11-дезоксикортизола в крови неполовозрелых (сплошная линия) и взрослых (пунктирная линия) самцов павианов гамадрилов ($n=5$) после введения метопирона.

тельностью и специфичностью, позволяющими определять содержание этого соединения без предварительного хроматографического выделения.

Антисыворотка, используемая в данном методе в качестве связывающего агента, выгодно отличается от аналогов, описанных в литературе. Так, в работе Махажан и соавт. [5] при получении антисыворотки в качестве антигена был использован конъюгат 11-дезоксикортизола - 21-гемисукцината с БСА. Полученная на его основе антисыворотка давала 100% перекрестную реакцию с 17-оксипрогестероном, вероятно, вследствие нейтрализации гидроксильной группы 11-дезоксикортизола у 21 атома углерода. Естественно, это значительно снижало специфичность метода.

Использование аналогичной антисыворотки, описанной Kobayashi и соавт. [6] (конъюгация в 21 положении) в иммуноферментном методе определения 11-дезоксикортизола, требовало предварительного хроматографического выделения стероида на колонках с сефадексом LH-20.

Высокая специфичность полученной нами антисыворотки, вероятно, определяется, с одной стороны, правильно выбранным методом конъюгации стероида (в 3 положении) с молекулой белка при синтезе антигена, с другой — использованием в качестве гаптена 3-карбоксиметилоксима, который как известно, в отличие от гемисукци-

натов позволяет индуцировать выработку более специфичных антител [6].

Использование предложенного радиоиммунологического метода определения 11-дезоксикортизола в крови позволяет отказаться от классической схемы проведения метопиринового теста с 4—6-разовым введенным больших доз препарата, а ограничиться однократным введенным метопирина, которое сопровождается выраженным повышением уровня 11-дезоксикортизола в крови и, следовательно, дает возможность оценить функциональные резервы коры надпочечников и аденогипофиза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ткачова Г. А., Балаболкин М. Н., Ларичева Н. П. Радиоиммунохимические методы исследования. — М., 1983. — С. 131—132.
2. Abraham G. E. // J. Steroid Biochem. — 1975. — Vol. 6. — P. 261—270.
3. Erlanger B. F., Borek F., Beiser S. M., Lieberman S. // J. biol. Chem. — 1957. — Vol. 228. — P. 713—727.
4. Jaffe B. M., Behrman H. R. Methods of Hormone Radioimmunoassay. — New York, 1979. — P. 776.
5. Mahajan D. K., Wahlen J. D., Tyler F. H., West C. D. // Steroids. — 1972. — Vol. 20. — P. 609—620.

6. Yoshihara Kobayashi, Hiroko Mukai, Noriko Tsubota, Fukuko Watanabe. // J. Steroid Biochem. — 1984. — Vol. 20. — P. 913—915.

Поступила 04.12.86

RADIOIMMUNOASSAY OF 11-DEOXYCORTISOL IN EVALUATION OF FUNCTIONS OF HYPOPHYSIS-ADRENAL CORTEX SYSTEM UNDER CONDITIONS OF METOPIRONE TEST

N. P. Goncharov, G. V. Kalsjia, V. Yu. Bulnev, V. I. Vorontsov, L. V. Chagundocova, R. Vesserman

Institute of Experimental Pathology and Therapy, Academy of Medical Sciences of the USSR, Sukhumi

A radioimmunoassay of 11-deoxycortisol in human and animal blood plasma was developed. The antiserum used in the method was prepared against a conjugate of 11-deoxycortisol-3(0-carboxymethyloxime) and bovine serum albumin. Specificity of the antiserum was determined in cross reactions using 32 steroids. High specificity of the antiserum allowed to determine 11-deoxycortisol without preliminary chromatographic isolation. Sensitivity of the method enabled to detect 25 pg of 11-deoxycortisol. The intra- and interassay variations were less than 10 % and 15 %, respectively. The method was used for evaluation of hypophysis-adrenal cortex system functions under the conditions of metopirone test.

УДК 616-008.939.629-074

Б. М. Шер, Б. П. Соколов

БРОМЦИАНОВОЕ ПЕПТИДНОЕ КАРТИРОВАНИЕ КОЛЛАГЕНОВЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ ПОСЛЕ РАЗДЕЛЕНИЯ ЭЛЕКТРОФЕРЕЗОМ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ И ДЕТЕКЦИИ ОКРАШИВАНИЕМ ИЛИ РАДИОАВТОГРАФИЕЙ

Институт медицинской генетики АМН СССР, Москва

При изучении заболеваний соединительной ткани и в ряде других случаев возникает необходимость структурного анализа индивидуальных цепей коллагенов либо их предшественников или продуктов деградации. Одним из наиболее часто используемых методов является сравнение электрофоретических характеристик пептидов, получаемых расщеплением коллагеновых полипептидов бромцианом. Индивидуальные цепи коллагеновых белков для анализа получают путем использования либо различных комбинаций солевого фракционирования и хроматографии на ДЭАЭ- или КМ-целлюлозе [5, 9], либо электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ)

[3, 4]. Хроматографические методы трудоемки (особенно при изучении большого числа образцов) и требуют значительных количеств материала. Разделение электрофорезом значительно проще, экономичнее и позволяет использовать неочищенные препараты коллагеновых белков. Недостатком этого метода является то, что после определения положения полипептидов стандартными методами, которые обычно предусматривают фиксацию, извлечь их из геля с хорошим выходом трудно. Для того чтобы избежать снижения эффективности элюции вследствие фиксации при окрашивании, предполагалось определять положение цепей коллагеновых

полипептидов в геле путем частичного переноса материала на нитроцеллюлозную мембрану с последующим окрашиванием мембраны кумасси R-250 и совмещением с исходным гелем [10]. Метод достаточно эффективен, однако трудоемок и имеет очевидные ограничения в точности вырезания полос.

Другой подход, который позволяет обойти трудности, связанные с извлечением полипептидов из гелей после разделения электрофорезом, состоит в том, чтобы расщеплять их бромцианом непосредственно в геле. Этот подход был описан в работе [1] для коллагеновых белков, меченных ^3H -пролином. В первоначальном варианте метода [1] из пластины геля сразу после электрофореза вырезают полосу длиной 10 см, соответствующую индивидуальной дорожке, обрабатывают ее бромцианом и помещают горизонтально на верхний край геля второго направления, в котором и проводят электрофоретический анализ бромциановых пептидов. Недостатком метода является то, что вырезаемая полоска геля имеет большие размеры и содержит сразу несколько полипептидов. Прямую локализацию полипептидов, которая позволила бы вырезать кусочки гелей, содержащие индивидуальные цепи коллагеновых белков, и анализировать их по отдельности, не проводят во избежание снижения выхода пептидов в гель второго направления. Для того чтобы уменьшить размеры полоски геля, зону, содержащую интересующие исследователя белки, можно приблизительно локализовать, ориентируясь по соседним дорожкам, которые обрабатывают РРО и подвергают флюорографии [4]. Однако провести таким образом точное вырезание индивидуальных полос весьма сложно. Другим недостатком метода [1] является то, что меченные ^3H -аминокислотами коллагены в достаточных для картирования количествах можно получить только в культуре клеток. В связи с этим возникает необходимость разработки аналогичного метода пептидного картирования для немеченых коллагенов, выделенных из тканей.

И для меченых, и для немеченых коллагенов оптимальными были бы методы, позволяющие проводить пептидное картирование с предваритель-

ным прямым определением положения полипептидов в геле.

Учитывая вышесказанное, мы считали необходимым изучить влияние разных методов локализации цепей коллагеновых полипептидов в геле первого направления на эффективность их последующего электрофоретического переноса в гель второго направления. На основании полученных данных предложены методы анализа бромциановых пептидов индивидуальных цепей как меченных радиоактивными изотопами, так и немеченных коллагеновых белков после разделения цепей электрофорезом и прямой локализации полипептидов в геле.

Методика

Получение меченных ^{14}C -пролином проколлагенов. Монослой фибробластов кожи человека инкубировали в течение 16 ч в среде Игла, содержащей ^{14}C -пролин (0,2 МБк/мл, удельная активность 7,4 МБк/мМ, ЧССР), аскорбиновую кислоту (50 мкг/мл), β -аминопропионитрил (100 мкг/мл), HEPES (15 мМ). Культуральную среду собирали, центрифугировали (2000 об/мин, 10 мин), к надосадочной жидкости добавляли этанол (конечная концентрация 70 об.%), выдерживали на холоду 20 ч и центрифугировали (5000 об/мин, 30 мин). Осадок промывали 70 % этанолом и лиофилизировали, после чего обрабатывали пеницином (100 мкг/мл, фирма «Serva») в 2 % уксусной кислоте в течение 16 ч при 4°C и лиофилизировали.

Немеченные коллагены I и II типов получали экстракцией из кожи и хрящей соответственно, как описано в работе [2]. Электрофорез в 5 % ПААГ проводили по методу [7]. После электрофореза гели нарезали на полоски, содержащие отдельные дорожки. Положение цепей коллагенов определяли одним из следующих способов: 1) совмещением с рептерговскими пленками, на которые экзонировали полоски гелей, высушенные на ватмане 3 мм; 2) окрашиванием кумасси R-250 (0,1 %) в 2 % уксусной кислоте в течение 5 мин с последующим промыванием водой в течение 10 мин; 3) окрашиванием кумасси R-250 (0,1 %) в растворе I (вода — этанол — уксусная кислота — 5 : 5 : 1) в течение 20 мин с последующим промыванием водой в течение 20 мин; 4) осаждением додецилсульфата натрия (ДСН), не связанного с полипептидами, 4 М раствором ацетата натрия по методу [6]. Белковые полосы при этом видны на черном фоне; 5) путем сопоставления с соседними дорожками, локализацию полипептидов в которых проводили способами 1—4.

Кусочки, содержащие индивидуальные цепи коллагенов, вырезали скальпелем, промывали в буфере для образцов (2 мл на кусочек геля 2 раза по 15 мин) и наносили в карманы геля второго направления.

После электрофореза гели обрабатывали РРО, высушивали и подвергали флюорографии. Зоны, содержащие индивидуальные цепи коллагеновых белков, вырезали, количество

радиоактивного материала в них определяли в диоксановом сквинтилляторе. Остаточную радиоактивность в исходных кусочках гелей определяли также после обработки их РРО.

Расщепление цепей коллагеновых белков CNBr в кусочках гелей проводили, как описано в работе [1], с небольшими изменениями: кусочки гелей промывали в течение 10 мин 70 % муравьиной кислотой, добавляли 400 мкл 70 % муравьиной кислоты, 50 мкл раствора бромистого циана в диметилформамиде (1 г/мл) и выдерживали при покачивании в течение 3 ч при 37 °С. Перед тем как поместить на верхний край геля второго направления, кусочки промывали 0,06 М раствором трис-НСl pH 6,8, содержащим бромфеноловый синий.

После того как при промывке буфер переставал изменять синий цвет на желтый, кусочки промывали 10 мин в буфере для образцов (0,06 М трис-НСl pH 6,8, 2 % ДСН, 2 % меркаптоэтанол, бромфеноловый синий) и помещали на верхний край геля второго направления, в котором проводили электрофоретическое разделение полученных пептидов. После электрофореза гели подвергали флюорографии либо окрашивали кумасси R-250 или аммонийным комплексом серебра [8].

Результаты и обсуждение

Влияние разных методов локализации цепей коллагеновых белков на эффективность их последующей элюции из гелей. Наименьшие потери вследствие фиксации можно ожидать при определении положения цепей коллагеновых белков радиоавтографией гелей, высушенных непосредственно после электрофореза, либо при окрашивании в растворителях, в которых коллагены хорошо растворимы (например, в 2% уксусной кислоте). Значительное снижение элюции можно ожидать при окрашивании в фиксирующих растворах (например, в 10 % ТХУ либо в растворе I).

Для того чтобы сравнить разные способы детекции по их влиянию на эффективность перехода цепей коллагенов в гель второго направления, серию параллельных образцов, содержащих по 100 мкг меченого ¹⁴C коллагена I типа (удельная активность 100 000 имп/мг), подвергали электрофорезу в 5 % ПААГ. Положение полипептидов локализовали одним из способов, описанных в разделе «Методика» (см. таблицу). Кусочки гелей, содержащие индивидуальные цепи $\alpha 1(I)$ и $\alpha 2(I)$, вырезали и после промывания в буфере для образцов помещали в лунки второго геля. После электрофореза гели обрабатывали РРО, высушивали и подвергали флюо-

Эффективность элюции при разных способах детекции полос $\alpha 1(I)$ и $\alpha 2(I)$ после электрофореза в 5 % ПААГ

Способ обработки геля при выявлении полос коллагенов в геле I направления	Эффективность элюции, %			
	при электрофорезе		при диффузии за 30 мин**	
	$\alpha 1(I)$	$\alpha 2(I)$	$\alpha 1(I)$	$\alpha 2(I)$
Интактный гель	98	98	24	49
Высушен с последующей радиоавтографией	86	86	36	60
Окрашен кумасси в 2% уксусной кислоте	77	92	14	46
Окрашен кумасси в растворе I*	68	90	7	25
Фиксирован 10% раствором ТХУ, окрашен кумасси в растворе I	9	49	15	22

Примечание. Одна звездочка—раствор I имеет следующий состав: этанол—вода—уксусная кислота—5:5:1, две—кусочки геля встряхивали в буфере, состоящем из 0,08 М трис-НСl pH 6,8, 0,1% ДСН.

рографии. Об эффективности электроэлюции судили по количеству радиоактивного материала в зонах, содержащих цепи $\alpha 1(I)$ и $\alpha 2(I)$, и в исходных кусочках гелей.

Из кусочков, которые вырезали из интактных полосок гелей (положение цепей определяли по соседним дорожкам), в гель второго направления в случае цепи $\alpha 1(I)$ переходит около 98 % материала. Из гелей, высушенных сразу после электрофореза и экспонированных на рентгеновскую пленку в течение 1-х суток, эффективность электропереноса ниже и составляет 86 %. Из кусочков гелей, окрашенных кумасси в 2 % уксусной кислоте, в гель второго направления переходит около 77 % материала, т. е. эффективность электроэлюции снижается по сравнению с интактными гелями на 21 %. Даже при окрашивании в растворе I, который для многих белков обладает фиксирующими свойствами, эффективность электроэлюции составляет около 67 %. В противоположность этому обработка гелей 10 % раствором ТХУ перед окрашиванием снижает эффективность электроэлюции. Около 90 % радиоактивного материала при этом остается в исходном кусочке геля. Надо отметить, что наличие связанного красителя не влияет на эффективность элюции. При

промывании кусочков гелей, окрашенных кумасси, раствором I до полного удаления красителя эффективность электроэлюции не повышалась.

В случае цепи $\alpha 2(1)$ и окрашивание, и высушивание гелей влияют на эффективность электроэлюции в еще меньшей степени, чем в случае $\alpha 1(1)$. При окрашивании эффективность элюции по сравнению с таковой в интактных гелях снижается всего на 6—8%, при высушивании — на 12% (см. таблицу). Результаты, аналогичные полученным для коллагеновых цепей $\alpha 1(1)$ и $\alpha 2(1)$, получены нами и для проколлагеновых цепей $\alpha 1(1)$ и $\alpha 2(1)$ (данные не приведены).

Для коллагена II типа строгая количественная оценка эффективности электроэлюции цепи $\alpha 1(II)$ после визуализации в связи с отсутствием меченого материала не проводилась. Однако ориентировочная оценка по интенсивности полос в геле второго направления не выявила существенного ее снижения после окрашивания гелей.

Хорошие результаты по электроэлюции цепей коллагенов получены при выявлении полипептидов методом осаждения ДСН, не связанного с белками [8]. Однако чувствительность этого метода значительно ниже, чем при окрашивании кумасси. Кроме того, белковые полосы видны относительно короткое время (15—30 мин) и точно вырезать все полосы из геля с большим числом образцов сложно. Дополнительная трудность состоит в том, что после вырезания одной из нескольких близколежащих полос полосы, находящиеся вблизи вырезанной, становятся трудно различимыми.

В отличие от электроэлюции на диффузионную элюцию в буфер, содержащий ДСН, процедуры окрашивания гелей влияют значительно сильнее. Так, из кусочков, вырезанных из гелей, окрашенных кумасси в растворе I, за 30 мин встряхивания при комнатной температуре в 2 мл буфера, содержащего 0,1% ДСН, элюируется почти в 4 раза меньше $\alpha 1(1)$, чем из интактного геля; из кусочков, окрашенных в 2% уксусной кислоте, — приблизительно в 2 раза (см. таблицу). На диффузию $\alpha 2(1)$ окрашивание влияет меньше — при окрашивании в растворе I скорость элюции снижается примерно в 2 раза, при

окрашивании в 2% уксусной кислоте она практически не снижается.

Важно отметить, что потери материала в процессе окрашивания гелей практически отсутствуют. В специальных экспериментах установлено, что из кусочков, вырезанных из гелей, окрашенных кумасси в растворе I, цепи $\alpha 1(1)$ и $\alpha 2(1)$ при последующем выдерживании кусочков в растворе I не вымываются в заметных количествах по крайней мере в течение нескольких суток, хотя краситель за это время вымывается полностью. При промывании в 2% уксусной кислоте кусочков, окрашенных кумасси в 2% уксусной кислоте, мы также не обнаружили заметной потери материала. Гели при этом обесцвечивались лишь незначительно. Поскольку в растворах уксусной кислоты сами по себе цепи коллагенов хорошо растворимы и эффективно элюируются из геля [10], отсутствие диффузии в 2% уксусной кислоте окрашенных цепей указывает на то, что в этих условиях наличие комплекса с кумасси фиксирует цепи. При перенесении кусочков в нейтральный буфер, содержащий ДСН, фиксирующее действие красителя, по-видимому, снижается, что повышает скорость диффузии. Однако и после этого элюция цепи $\alpha 1(1)$ в отличие от $\alpha 2(1)$ протекает с меньшей скоростью, чем из интактных гелей. Раствор I, вероятно, оказывает некоторое собственное фиксирующее действие на цепи коллагенов. Элюция коллагенов в этом растворе не наблюдается даже при полном удалении красителя. При переводе в 0,1% ДСН фиксация, которая произошла в растворе I, скажется на эффективности диффузии (она снижается в 4 раза). При электроэлюции степень фиксации раствором I выражена меньше и эффективность ее снижается всего на 30% по сравнению с таковой в контроле.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что для бромцианового пептидного картирования с расщеплением цепей коллагеновых белков в кусочках гелей можно использовать прямые методы выявления полипептидов в геле. После окрашивания в растворе I эффективность элюции для цепи $\alpha 1(1)$ снижается приблизительно на 30%, при окрашивании в 2% уксусной кислоте — на 20%, при радиоавтографии высушенных гелей —

всего на 10—13%. Для цепи $\alpha 2(1)$ потери еще меньше. В то же время прямое определение положения белковых полос указанными способами значительно упрощает эксперименты и позволяет достигать более высокого разрешения.

Иная ситуация наблюдается при необходимости извлечения цепи коллагенов из геля с помощью диффузии. В данном случае окрашивание гелей существенно снижает эффективность выхода цепей коллагенов из геля. Так, при окрашивании в растворе 1 скорость элюции для цепей $\alpha 1(1)$ и $\alpha 2(1)$ снижается приблизительно в 4 раза. Лучшие результаты дает окрашивание в 2% уксусной кислоте — скорость элюции $\alpha 1(1)$ снижается менее чем в 2 раза, скорость элюции $\alpha 2(1)$ практически не снижается.

Пептидное картирование. На основании полученных данных нами предложены следующие способы пептидного картирования. Поскольку энергия излучения трития слишком мала для прямой радиоавтографии, с целью пептидного картирования коллагеновых белков, продуцируемых культурами фибробластов, мы использовали меченые ^{14}C -пролином либо ^{14}C -глицином. Меченные ^{14}C -аминокислотами тотальные белки культуральной среды, в которой культивировали фибробласты, подвергали электрофорезу в 5% ПААГ. После радиоавтографии в течение ночи из высушенных нефиксированных гелей вырезали кусочки гелей, содержащие индивидуальные цепи коллагеновых белков, и обрабатывали бромцианом, как описано в разделе «Методика». Полученные в результате гидролиза пептиды разделяли электрофорезом в ПААГ. Гели подвергали флюорографии. На рис. 1, см. вклейку приведены полученные таким образом пептидные карты цепей проколлагена I типа. Как видно из рис. 1, на электрофореграммах представлены все высокомолекулярные бромциановые пептиды цепи про $\alpha 1(1)$ (СВ 7, СВ 8, рСВ 6, СВ 3) и цепи про $\alpha 2(1)$ (СВ 4, рСВ 3.5).

Пептидное картирование немеченых коллагенов проводили следующим образом: 150 мкг коллагена I типа подвергали электрофорезу в 5% ПААГ. Гели окрашивали кумасси, либо в 2% уксусной кислоте, либо в растворе 1, затем промывали водой.

Кусочки гелей, содержащие цепи $\alpha 1(1)$ и $\alpha 2(1)$, вырезали и обрабатывали бромцианом. После разделения бромциановых пептидов электрофорезом в ПААГ гели окрашивали аммонийным комплексом серебра (рис. 2, см. вклейку). Как видно из рис. 2, электрофореграммы пептидов, полученных при расщеплении цепей, вырезанных из гелей, окрашенных кумасси в растворе 1 и в 2% уксусной кислоте, не различаются. На них представлены все крупные бромциановые пептиды $\alpha 1(1)$ и $\alpha 2(1)$. Эти же пептиды видны и на электрофореграмме, полученной после расщепления не фракционированного на цепи коллагена I типа в растворе. На электрофореграммах видны также и продукты частичного расщепления цепей коллагенов. При расщеплении в геле их относительное количество несколько выше, чем при расщеплении в свободном растворе. Частично это обусловлено, вероятно, тем, что в растворе гидролиз проходит более количественно, чем в геле. Кроме того, в процессе обработки бромцианом и при последующей подготовке кусочков гелей к электрофорезу происходит вымывание пептидов в реакционную среду и в промывающий буфер. Контрольные эксперименты с мечеными коллагенами показали, что в процессе расщепления в раствор бромциана из кусочков гелей переходит около 30% радиоактивного материала. При этом элюируются в основном продукты полного гидролиза, имеющие меньшую молекулярную массу, чем продукты частичного гидролиза коллагеновых полипептидов. Преимущественным вымыванием пептидов с небольшими размерами объясняется, по-видимому, и снижение относительной интенсивности полосы, обусловленной наиболее низкомолекулярным пептидом цепи $\alpha 1(1)$ — СВ 3. Однако, поскольку основной характеристикой, анализируемой при пептидном картировании, является электрофоретическая подвижность пептидов, изменение относительного количества пептидов не препятствует сравнительному анализу.

Принципиальные отличия описанных в настоящем сообщении методов бромцианового пептидного картирования коллагеновых белков от метода [1] состоят в следующем: 1) разрабо-

танные нами методы позволяют проводить анализ бромциановых пептидов индивидуальных цепей не только меченных радиоактивными аминокислотами коллагеновых белков, полученных в культуре клеток, но и немеченных коллагенов, выделенных из тканей и органов; 2) вырезание кусочков гелей и обработка бромцианом проводятся после прямого выявления цепей коллагенов в геле, в котором осуществляется их разделение. Благодаря возможности точно вырезать кусочки гелей, содержащие индивидуальные белки, в последующем в одной пластине геля размером 16×16 см удается провести анализ пептидов до 20 разных полипептидов, располагая их в желаемом порядке, что повышает точность сравнения электрофоретической подвижности. Возможность группировать кусочки гелей в соответствии с количеством материала, которое они содержат (и при необходимости уменьшать его, расчленяя кусочки), позволяет избежать затенения дорожек с малым количеством материала дорожками с большим количеством материала. Кроме того, уменьшение размеров кусочков гелей за счет повышения точности вырезания позволяет снизить расход бромциана, что повышает безопасность работ.

Описанные методы могут быть использованы, вероятно, для анализа и неколлагеновых белков.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Barsh G. S., Peterson K. E., Byers P. H.* // *Collagen Relat. Res.* — 1981. — Vol. 1. — P. 543—548.
2. *Burgeson R. E., Hollister D. W.* // *Biochem. biophys. Res. Commun.* — 1979. — Vol. 87. — P. 1124—1131.
3. *Byers P. H., Shapiro J. R., Rowe D. W., David K. E.* // *J. clin. Invest.* — 1983. — Vol. 71. — P. 689—697.
4. *Deak S. B., Nicholls A. C., Pope F. M., Prockop D. J.* // *J. biol. Chem.* — 1983. — Vol. 258. — P. 15192—15197.
5. *Fiedler-Nagy C., Bruckner P., Hayashi T.* et al. // *Ibid.* — 1982. — Vol. 257. — P. 9181—9198.
6. *Higgins R. C., Dahnuijs M. E.* // *Analyt. Biochem.* — 1979. — Vol. 93. — P. 257—260.
7. *Laemmli I. K.* // *Nature.* — 1970. — Vol. 227. — P. 680—685.
8. *Oakley B. R., Kirsch D. R., Morris N. R.* // *Analyt. Biochem.* — 1980. — Vol. 105. — P. 361—366.
9. *Stolle C. A., Pyeritz R. E., Myers J. C., Prockop D. J.* // *J. biol. Chem.* — 1985. — Vol. 260. — P. 1937—1944.
10. *Takahama Y., Hayashi T., Konomi M., Ari-ma M.* // *Analyt. Biochem.* — 1985. — Vol. 145. — P. 188—191.

Поступила 18.07.86

CYANOGEN BROMIDE PEPTIDE MAPPING OF COLLAGEN POLYPEPTIDES AFTER SEPARATION BY MEANS OF ELECTROPHORESIS IN POLYACRYLAMIDE GEL AND DETECTION USING STAINING OR RADIOAUTOGRAPHY

B. M. Sher, B. P. Sokolov

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

Influence of various procedures for detection of collagen chains after electrophoresis in polyacrylamide gel on efficiency of their subsequent electroelution from the gel slices into gel of the second direction was studied. Staining of the gels with Coomassie R-250 under mild conditions or radioautography of the gels dried after electrophoresis decreased only slightly the electroelution efficiency as compared with the untreated gels. This observation suggests that direct procedures, which simplified distinctly the experiments, might be used for detection of the polypeptides in initial gel when peptide mapping was carried out using degradation of collagens by means of cyanogen bromide immediately in the gel slices. The procedures were developed, which enabled to perform mapping of collagen individual chains both labelled with ¹⁴C-amino acids and unlabelled fractions after their electrophoresis in polyacrylamide gel and the direct detection of polypeptides.

РЕЦЕНЗИЯ

УДК 612.124+616.153.96/(035)(049.32)

В. К. Кухта, Э. И. Олецкий, А. Н. Стожаров. **Белки плазмы крови** — Минск: Беларусь, 1986. — Тираж 3500

Несмотря на то что белки плазмы крови, которых не менее 100, являются важнейшими

показателями многочисленных патологических состояний и непрерывно расширяется круг используемых в качестве лечебных препаратов белков плазмы крови человека, до сих пор в СССР не было издано справочника, посвященного этим веществам. Между тем необходи-