

ТОМ XXXIV

ВЫПУСК 2

МАРТ — АПРЕЛЬ

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

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

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



2 жз

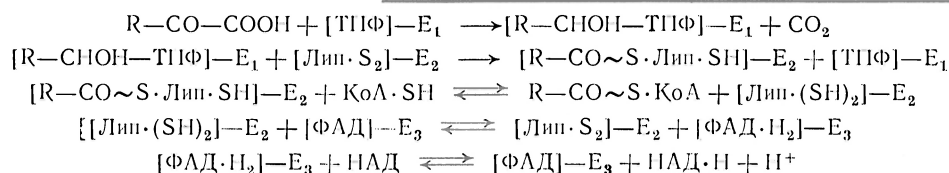
С. А. Струмило

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ОКСОГЛУТАРАТДЕГИДРОГЕНАЗНОГО КОМПЛЕКСА ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ (обзор)

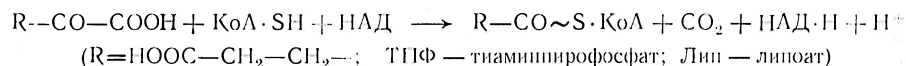
Институт биохимии АН БССР, Гродно

Полиферментный оксоглутаратдегидрогеназный комплекс (ОГДК), состоящий из оксоглутаратдегидрогеназы [КФ 1.2.4.2] (E_1), липоатсукцинилтрансферазы [КФ 2.3.1.61] (E_2) и липоамиддегидрогеназы [КФ 1.6.4.3] (E_3), катализирует многоэтапный процесс окислительного декарбоксилирования 2-оксоглутарата [5, 35]:

ОГДК комплексов животного происхождения, то до упомянутого времени они оставались практически неизученными в плане регуляции активности. Лишь при исследовании кинетического механизма ОГДК из сердца свиньи было отмечено ингибирующее действие сукцинил-КоА и НАД·Н [25], которое может иметь регуляторное значение. Од-



Суммарно:



Являясь неотъемлемым функциональным звеном цикла Кребса и лимитируя в нем, по некоторым данным [24], поток субстратов, ОГДК в то же время непосредственно генерирует такие важные в биоэнергетическом и биосинтетическом аспектах продукты, как сукцинил-КоА и НАД·Н. Все это, естественно, предопределяет интерес к изучению функционирования и регуляции ОГДК, которое стало возможным в связи с разработкой в ряде лабораторий [8, 38, 40, 42] методов выделения и очистки ОГДК и его компонентов из разных источников.

Цель настоящего обзора — обобщение результатов современных исследований регуляции ОГДК животного происхождения.

Следует отметить, что до конца 70-х годов сведения о путях и механизмах регуляции ОГДК были крайне скудными. Имелись только данные об отдельных регуляторных свойствах ОГДК из *Acinetobacter lwoffii* [33], цветной капусты [43] и оксоглутаратдегидрогеназы летательной мышцы мухи [26]. Что касается

нако было отмечено [25, 36] существование разных типов ингибирования ОГДК восстановленным НАД. Таким образом, в отношении полиферментного комплекса из сердечной мышцы не было окончательно ясно, на какие его компоненты направлено влияние конечного продукта реакции. К настоящему времени многие вопросы регуляции ОГДК прояснились благодаря работам энзимологов из МГУ [2, 3, 10, 11], некоторых зарубежных исследователей [27, 28, 31, 43], а также данным [12, 14, 17, 19], полученным в нашей лаборатории на примере играющей важную роль в процессах кортикостероидогенеза одноименного комплекса из надпочечников быка [15].

Регуляторные свойства ОГДК находятся в неразрывной связи с его кинетическими свойствами, поскольку они реализуются исключительно в процессе функционирования комплекса без участия специальных модуляторных ферментов типа киназы и фосфатазы пируватдегидрогеназы [22, 39], которые в

составе ОГДК из разных источников никем не были обнаружены [3, 19, 23, 31]. ОГДК животного происхождения проявляет тем не менее высокую чувствительность к компонентам, отражающим степень фосфорилированности аденилатной системы.

Наиболее действенным положительным эффектором является АДФ [3, 12, 27, 31]. Если, воздействуя на ОГДК из тканей млекопитающих, АДФ понижает в основном величину концентрации полунасыщения $[S]_{0,5}$ 2-оксоглутаратом [19, 27, 31], то в отношении комплекса из грудной мышцы голубя он, кроме того, увеличивает максимальную скорость реакции, а также устраняет кооперативность по НАД в присутствии НАД·Н [31]. Активирующее действие АДФ, зависящее от концентрации 2-оксоглутарата, реализуется на уровне пускового оксоглутаратдегидрогеназного компонента комплекса. Это подтверждено исследованием модельной реакции с 2,6-дихлорфенолиндифенолом [12], восстановление которого в присутствии субстрата осуществляет первый компонент ОГДК [9].

С использованием ОГДК из надпочечников изучен характер зависимости скорости окислительного декарбоксилирования 2-оксоглутарата от концентрации АДФ. Выяснилось, что при низкой концентрации субстрата (0,1 мМ) зависимость v от $[АДФ]$ выглядит S-образной [19]. Коэффициент Хилла при этом превышает 2, что является кинетическим признаком положительной кооперативности во взаимодействии фермента и активатора. Данные по связыванию меченого радиоактивными веществами АДФ оксоглутаратдегидрогеназным комплексом [20] подтверждают результаты кинетического исследования и позволяют с большей уверенностью делать вывод о кооперативности. Причем сигмоидальный вид зависимости от $[АДФ]$ как v , так и функции связывания с увеличением концентрации 2-оксоглутарата изменяется на гиперболический.

Положительное кооперативное взаимодействие центров, акцентирующих АДФ, в условиях низкой концентрации 2-оксоглутарата имеет, очевидно, существенный регуляторный смысл. Он состоит в выделении диапазона концентраций АДФ (0,01—0,2 мМ), при которых наблюдается высокая чувствительность активности ОГДК к их колебаниям. Характерно, что этот диапазон соответст-

вует содержанию АДФ в животных тканях [45], поэтому данный механизм регуляции ОГДК вполне реален *in situ*. Отсутствие даже отдаленного сходства в строении молекул АДФ и 2-оксоглутарата свидетельствует в пользу аллостерической природы регуляторного влияния эффектора. Вместе с тем посредством обработки изолированной оксоглутаратдегидрогеназы ацетил-ацетоном [16] и 2,3-бутадионом [41] под защитой каталитического центра субстратом достигнута полная ее десенсибилизация к АДФ с сохранением базальной активности, что служит прямым доказательством аллостерии. А поскольку 2,3-бутадион является довольно специфичным реагентом на аргининовые остатки [1], то есть основания полагать, что аргинин принимает участие в формировании аллостерического центра фермента для АДФ.

Аналогичным образом АДФ понижают величину K_m или $[S]_{0,5}$ для 2-оксоглутарата без изменения максимальной скорости реакции ОГДК поны фосфата [17, 27], которые совместно с адениновыми нуклеотидами определяют энергетический потенциал фосфорилирования [6]; причем действительны относительно невысокие (до 3 мМ) концентрации Φ_n , величины которых находятся в пределах содержания неорганического фосфата в тканях [23, 45]. Наблюдаемая частичная аддитивность эффектов Φ_n и АДФ [17] служит аргументом в пользу представления о существовании различных точек приложения их действия.

Диаметрально противоположный аденозиндифосфату и Φ_n индикатор энергетического состояния клетки — АТФ — существенно ингибирует ОГДК из сердца свиньи [31] и почек быка [27] при субоптимальных концентрациях 2-оксоглутарата. Для одноименного комплекса из грудной мышцы голубя [3] и надпочечников быка [12] это нехарактерно. Однако имеются другие возможности регуляторного влияния АТФ в отношении ОГДК из последнего источника. При регистрации зависимости v от концентраций КоА и НАД в условиях насыщения ОГДК 2-оксоглутаратом выяснилось, что АТФ ингибирует комплекс по смешанному типу, изменяя в большей степени K_{in} для КоА и НАД и в меньшей мере — максимальную скорость реакции. Величины K_i для АТФ составляют 1,8 мМ в отношении КоА и 2,2 мМ в отношении НАД [14]. Кроме того, АТФ конкурентным образом противодей-

ствует активирующему влиянию АДФ при низких концентрациях 2-оксоглутарата, одновременно устраняя кооперативность центров, связывающих положительный эффектор [18]. Наряду с этим АМФ, который является самым сильным положительным эффектором оксоглутаратдегидрогеназ бактериального [44] и растительного [43] происхождения, совершенно не влияет на активность ОГДК из животных источников. В общем, за исключением АМФ, все компоненты, отражающие степень фосфорилирования адениновых нуклеотидов и входящие в показатель так называемого «фосфатного потенциала» — $[ATP]/([ADP] \cdot [P_n])$, регулируют соответствующим образом функционирование ОГДК из различных тканей. Ведущую регуляторную роль среди них выполняют, очевидно, положительные эффекторы (АДФ и P_n), действующие по аллостерическому механизму, в то время как тормозное влияние АТФ на активность ОГДК реализуется более опосредованными способами. Гуаниновые нуклеотиды значительно уступают адениновым по эффективности действия на ОГДК [27].

Интересные результаты получены при изучении регуляторных возможностей конечного продукта реакций ОГДК — НАД·Н. Оказалось, что НАД·Н ингибирует ОГДК из грудной мышцы голубя [3], почек [28] и надпочечников [19] быка на уровне как липоамиддегидрогеназного, так и оксоглутаратдегидрогеназного компонента комплекса. Первый путь базируется на конкурентоспособности НАД·Н в отношении не только НАД, но и дигидролипоатных групп [21], проникающих в активные центры липоамиддегидрогеназы в процессе каталитического акта ОГДК. Более того, в присутствии НАД·Н ОГДК и его липоамиддегидрогеназный компонент проявляют S-образный характер кинетики по НАД, что служит свидетельством кооперативных взаимодействий активных центров липоамиддегидрогеназы [3], являющейся димерным ферментом, с неэквивалентными центрами связывания НАД [30]. Примечательно, что АДФ в присутствии НАД·Н трансформирует зависимость скорости реакции, катализируемой мышечной липоамиддегидрогеназой, от концентрации НАД из S-образной в гиперболическую [3]. Изолированную липоамиддегидрогеназу удалось десенсибилизировать многократным

низкотемпературным воздействием или выдерживанием в растворе сульфата аммония [3], в результате чего она полностью утратила кооперативные свойства, имеющие аллостерическую природу. При десенсибилизации липоамиддегидрогеназы в составе ОГДК наряду с устранением S-образности по НАД ингибирование НАД·Н сохраняется, правда, в несколько меньшей степени, становясь чисто конкурентным в отношении НАД, что свидетельствует о его реализации в этом случае в активных центрах фермента.

Второй путь ингибирующего действия НАД·Н направлен на оксоглутаратдегидрогеназный компонент комплекса. Это нашло прямое доказательство в экспериментах с регистрацией оксоглутаратдегидрогеназной реакции при использовании искусственных акцепторов электронов [3] и меченого $[1-^{14}C]$ -2-оксоглутарата [19, 28]. Влияние НАД·Н заключается в преимущественном повышении величины концентрации полунасыщения $[S]_{0.5}$ 2-оксоглутаратом [19] при небольшом снижении максимальной скорости реакции ОГДК. Сложное кинетическое поведение изолированной 2-оксоглутаратдегидрогеназы из грудной мышцы голубя, зависящее от концентрации ферментного белка в реакционной смеси [10], в присутствии НАД·Н утрачивает такую зависимость [3]. На этом основании эффект НАД·Н связывают с воздействием на процессы ассоциации — диссоциации, которые вызывают смещение равновесия между олигомерными формами фермента, обладающими различными кинетическими свойствами. Для ОГДК из надпочечников быка это, по-видимому, нехарактерно, поскольку противоположные эффекторные влияния НАД·Н и АДФ, мишенью которых является оксоглутаратдегидрогеназа, сохраняются при различных концентрациях комплекса в мало изменяющейся степени [19]. Интересно, что ингибитор дополнительно расширяет концентрационный диапазон (0,01—0,1 мМ), в пределах которого в отсутствие ионов фосфата и АДФ наблюдается положительная кооперативность ($p_n = 1,5$) центров надпочечникового ОГДК, акцентирующих 2-оксоглутарат. Кроме того, при низких концентрациях НАД·Н проявляется кинетический признак ($p_n > 1$) кооперативного взаимодействия центров, связывающих ингибитор, которое возрастает с повышением

концентрации 2-оксоглутарата и в присутствии АДФ [19]. АДФ в определенной мере препятствует НАД·Н-ингибированию оксоглутаратдегидрогеназы, но полностью его не предотвращает даже при значительном избытке в среде, что может свидетельствовать о влиянии этих эффекторов через различные регуляторные центры [3, 28].

Таким образом, в регуляции ОГДК с участием конечного продукта реакции НАД·Н принцип отрицательной обратной связи реализуется дважды: короткая обратная связь существует в пределах липоамиддегидрогеназы, а более длинная распространяется на пусковой фермент комплекса. Это дублирование, очевидно, обусловлено особой важностью контроля активности ОГДК окислительно-восстановительным состоянием никотинамидных коферментов.

В противовес НАД·Н на уровне оксоглутаратдегидрогеназы выступают не только АДФ и Φ_{II} , но и ионы кальция [13, 27, 28, 31, 34]. Являясь положительным эффектором, Ca^{2+} сильно повышает сродство ОГДК к 2-оксоглутарату. Ранее существовало представление о необходимости для полноценного функционирования оксоглутаратдегидрогеназы ионов магния. Однако эксперименты с применением комплексона ЭГТА, хелатирующего предпочтительнее Ca^{2+} по сравнению с Mg^{2+} , убедительно показали, что именно ионы кальция, а не магния обладают эффективностью в отношении ОГДК из сердца свиньи [31], почек [27, 34] и надпочечников [13] быка. Причем действительны невысокие микромолярные концентрации Ca^{2+} , что подчеркивает его большие регуляторные возможности *in situ* в митохондриях. Аналогично кальцию сродство оксоглутаратдегидрогеназы к субстрату повышают ионы Sr^{2+} , но величина кажущейся K_m для Sr^{2+} ($15,1 \pm 1,3 \text{ M}^{-6}$) гораздо больше, чем для Ca^{2+} ($1,03 \pm 0,10 \text{ M}^{-6}$) [31]. Не изменяя максимальную скорость реакции, Ca^{2+} в концентрации $\sim 10 \text{ мкМ}$ снижает показатель $IS_{0,5}$ ОГДК из почек быка для 2-оксоглутарата в 63 раза. Если в среде присутствуют другие положительные эффекторы (АДФ и Φ_{II}), то величина $IS_{0,5}$ для субстрата под влиянием Ca^{2+} также уменьшается, т. е. наблюдается аддитивность действия эффекторов [27, 28]. На липоатсукцинилтрансферазный и липоамиддегидрогеназный компоненты ОГДК ионы кальция влияния не оказывают [34]. В микро-

молярных концентрациях Ca^{2+} понижает ингибирование оксоглутаратдегидрогеназы под действием [28]. При связывании ионов 1 ЭГТА и наличии НАД·Н в среде ОГДК из надпочечников проявляет положительную кинетическую кооперативность по 2-оксоглутарату [13]. Наряду с этим для ОГДК из почек быка в отсутствие Ca^{2+} характерна отрицательная кооперативность ($n_H = 0,72$) центров, акцептирующих 2-оксоглутарат. Она сохраняется и в присутствии положительных эффекторов, но в несколько меньшей степени [27, 28]. Очевидно, активность почечного ОГДК не должна быть мало чувствительной к изменению внутримитохондриального уровня 2-оксоглутарата, но должна реагировать на энергетическое состояние митохондрий через фосфатный потенциал $[ATP]/([ADP] \cdot [\Phi_{II}])$ и соотношение НАД·Н/НАД. Менее чем 3-кратное изменение этих соотношений вызывает 2–3-кратное изменение активности ОГДК при фиксированной концентрации 2-оксоглутарата. Ca^{2+} в свою очередь участвует в коррекции и усилении сигнала, отражающего энергетическое состояние митохондрий. Интересно, что ионы кальция не оказывают практически никакого влияния на ОГДК из летательной мышцы мухи, из кишечной палочки и картофеля [32]. Полагают, что ОГДК из митохондрий позвоночных приобрел дополнительную способность к регуляции под действием Ca^{2+} . Молекулярный механизм этой способности остается пока неясным и требует изучения природы Ca^{2+} -связывающего локуса в ферменте.

Показатель $IS_{0,5}$ по 2-оксоглутарату ОГДК из разных источников понижается при снижении величины рН среды [19, 27, 31, 34]. Иначе говоря, ионы H^+ также способствуют увеличению сродства ОГДК к субстрату, что может иметь регуляторное значение, особенно для ОГДК, локализованного в митохондриях почечной ткани, где происходят значительные колебания рН, связанные с различной природой экскретируемых веществ [29].

Совокупность полученных в разных лабораториях данных свидетельствует о принадлежности оксоглутаратдегидрогеназы, входящей в состав ОГДК млекопитающих, к разряду аллостерических регуляторных ферментов « K_m -типа». Влияние всех установленных эффекторов оксоглутаратдегидрогеназы транс-

формируется в изменение ее сродства к субстрату (K'_m ; $IS_{0,5}$) без значительных колебаний скорости каталитического распада фермент-субстратного комплекса (V). Этого, очевидно, вполне достаточно для тонкой регуляции активности пускового компонента ОГДК, поскольку диапазон изменений K'_m ОГДК для 2-оксоглутарата весьма широк. Например, для ОГДК из надпочечников быка в отсутствие всех положительных эффекторов величина K'_m составляет 25 мМ, ионы Ca^{2+} и фосфата порознь снижают ее до 0,21—0,23 мМ, а присоединение к ним АДФ доводит показатель K'_m до 0,09—0,11 мМ [13, 19]. Однако 250-кратное различие не предел: оно еще более увеличивается при участии отрицательного эффектора — НАД·Н. Очень важно, что нижний уровень величины K'_m ОГДК для 2-оксоглутарата близок к концентрации данного субстрата в животных тканях [45]. Это создает благоприятные условия для реализации почти максимальной активности ОГДК при сочетанном влиянии только положительных эффекторов, а также для проявления разнообразнейшей ее гаммы в сторону уменьшения при ослаблении позитивного действия аллостерических лигандов и присоединении влияния ингибиторов. Физиологичность выявленных механизмов аллостерического контроля активности ОГДК подтверждается еще тем, что действенные концентрации эффекторов реальны для тканей. Повышение же чувствительности ОГДК к небольшим колебаниям концентрации регуляторов достигается посредством положительной кооперативности центра их связывания. Интересно, что аллостерические механизмы регуляции активности ОГДК на уровне оксоглутаратдегидрогеназного и липоамиддегидрогеназного компонентов дополняются ретроингибированием липоатсукцинилтрансферазы сукцинил-КоА, которое осуществляется по конкурентному типу в отношении КоА [3, 25, 36].

В общем, контроль активности ОГДК животного происхождения достигается интегративным действием целого ряда естественных эффекторов, отражающих в той или иной мере энергетический статус митохондрий. Уместно добавить, что, несмотря на относительно прочную связь оксоглутаратдегидрогеназы с тиаминпирозинфосфатом, отмечаемую *in vitro* [4, 42], существует реальная возмож-

ность замещения коэнзима антикоферментными производными в результате введения их предшественников *in vivo* с целью ингибирования ОГДК. Этот экспериментально показанный нами факт [15] базируется, очевидно, на быстрой обменяемости ТПФ в активных центрах оксоглутаратдегидрогеназы *in situ*.

Другой аспект — гормональная регуляция ОГДК — остается еще практически неизученной. Имеется лишь работа [37], свидетельствующая об активации оксоглутаратдегидрогеназы печени крыс вазопрессинном, которая в значительной мере опосредуется ионами кальция.

Итак, анализ опубликованных данных позволяет уверенно сделать заключение о наличии у ОГДК животного происхождения разнообразных путей контроля активности, среди которых ведущую роль играют аллостерические механизмы регуляции. По вопросу функционирования цикла Кребса пока доминирует представление о том, что основными его регуляторными звеньями являются цитратсинтетаза и НАД-изоцитратдегидрогеназа [5—7]. Между тем с достаточным основанием можно уже дополнить картину регуляции цикла Кребса эффективными регуляторными механизмами на уровне оксоглутаратдегидрогеназного комплекса, о чем убедительно свидетельствуют накопившиеся результаты исследований ОГДК из разных животных источников.

ЛИТЕРАТУРА

1. Асриянц Р. А., Бенкевич Н. В., Наградова Н. К. // Биохимия. — 1983. — Т. 48. № 2. — С. 193—200.
2. Буник В. И., Гомазкова В. С. // Там же. — 1985. — Т. 50. — № 10. — С. 1668—1675.
3. Гомазкова В. С., Красовская О. Э. // Там же. — 1979. — Т. 44. — № 6. — С. 1126—1135.
4. Гомазкова В. С., Стафеева О. А., Лауфер А. И., Северин С. Е. // Докл. АН СССР. — 1981. — Т. 259. — № 2. — С. 477—480.
5. Ленинджер А. Основы биохимии: Пер. с англ. — М., 1985. — Т. 2. — С. 477—507.
6. Мецлер Д. Биохимия: Пер. с англ. — М., 1980. — Т. 2. — С. 406.
7. Розанов А. Я., Трещинский А. И., Хмелевский Ю. В. Ферментативные процессы и их коррекция при экспериментальных состояниях. — Киев, 1985. — С. 165—167.
8. Северин С. Е., Гомазкова В. С. // Биохимия. — 1971. — Т. 36. — № 6. — С. 1099—1106.
9. Северин С. Е., Гомазкова В. С., Красовская О. Э., Мельникова О. Ф. // Докл.

- АН СССР. — 1976. — Т. 229. — № 3. — С. 755—757.
10. Северин С. Е., Гомазкова В. С., Красовская О. Э., Стафеева О. А. // Биохимия. — 1978. — Т. 43. — № 12. — С. 2241—2248.
 11. Стафеева О. А., Гомазкова В. С., Северин С. Е. // Там же. — 1982. Т. 47. — № 8. — С. 1358—1365.
 12. Струмило С. А. // Докл. АН БССР. — 1980. — Т. 24. — № 6. — С. 562—564.
 13. Струмило С. А. // Укр. биохим. журн. — 1983. — Т. 55. — № 4. — С. 415—419.
 14. Струмило С. А., Виноградов В. В., Сенкевич С. Б. // Там же. — 1980. — Т. 52, № 3. — С. 321—324.
 15. Струмило С. А., Сенкевич С. Б., Галицкий Э. А., Виноградов В. В. // Бюл. экспер. биол. — 1983. — № 11. — С. 42—44.
 16. Струмило С. А., Сенкевич С. Б., Таранда Н. И. // Конференция биохимиков Прибалтийских республик, БССР и Ленинграда, 6-я: Тезисы докладов. — Рига, 1981. — С. 191—192.
 17. Струмило С. А., Таранда Н. И., Виноградов В. В. // Биохимия. — 1981. — Т. 46. — № 1. — С. 156—161.
 18. Струмило С. А., Таранда Н. И., Виноградов В. В. // Вопр. мед. химии. — 1982. — № 4. — С. 59—61.
 19. Струмило С. А., Таранда Н. И., Виноградов В. В. // Биохимия. — 1982. — Т. 47. — № 5. — С. 724—732.
 20. Струмило С. А., Таранда Н. И., Виноградов В. В. // Докл. АН БССР. — 1983. — Т. 27. — № 3. — С. 269—271.
 21. Струмило С. А., Таранда Н. И., Виноградов В. В. // Изв. АН БССР, сер. биол. — 1984. — № 4. — С. 111—112.
 22. Хайлова Л. С., Фейгина М. М., Северин С. Е. // Структура и функция ферментов. — М., 1973. — Вып. 2. — С. 88—105.
 23. Beretta E., Klein W. // Acta vitaminol. enzymol. — 1968. — Vol. 10, N 1. — P. 138—146.
 24. Cooney G. J., Taegtmeyer H., Newsholme E. A. // Biochem. J. — 1981. — Vol. 200, N 3. — P. 701—703.
 25. Hamada M., Koike K., Nakaula Y. et al. // J. Biochem. (Tokyo). — 1975. — Vol. 77, N 5. — P. 1047—1056.
 26. Hansford R. G. // FEBS Lett. — 1972. — Vol. 21, N 9. — P. 139—152.
 27. Lawlis V. B., Roche T. E. // Biochemistry (Wash.). — 1981. — Vol. 20, N 9. — P. 2512—2518.
 28. Lawlis V. B., Roche T. E. // Ibid. — P. 2519—2524.
 29. Lowry M., Ross B. D. // Biochem. J. — 1980. — Vol. 190, N 3. — P. 771—780.
 30. Matthews R. G., Ballou D. P., Williams C. H. // J. biol. Chem. — 1979. — Vol. 254, N 12. — P. 4974—4981.
 31. Mc Cormack J. G., Denton R. M. // Biochem. J. — 1979. — Vol. 180, N 3. — P. 533—544.
 32. Mc Cormack J. G., Denton R. M. // Ibid. — 1981. — Vol. 196, N 2. — P. 619—624.
 33. Parker M. G., Weitzman P., David J. // Ibid. — 1973. — Vol. 135, N 1. — P. 215—223. —
 34. Pawelczyk T., Angielski S. // Acta biochim. pol. — 1984. — Vol. 31, N 3. — P. 289—305.
 35. Severin S. E., Feigina M. M. // Advanc. Enzyme Regulat. — 1977. — Vol. 15. — P. 1—21.
 36. Smith C. M., Bryla J., Williamson J. R. // J. biol. Chem. — 1974. — Vol. 249, N 5. — P. 1497—1505.
 37. Staddon J. M., Mc Givan J. D. // Biochem. J. — 1984. — Vol. 217, N 2. — P. 477—483.
 38. Stanley C. J., Perham R. N. // Ibid. — 1980. — Vol. 191, N 1. — P. 147—154.
 39. Stepp L. R., Pettit F. H., Yeaman S. J., Reed L. J. // J. biol. Chem. — 1983. — Vol. 258, N 15. — P. 9454—9458.
 40. Strumilo S. A., Taranda N. I., Senkevich S. B., Vinogradov V. V. // Acta biol. med. germ. — 1981. — Bd 40, N 3. — S. 257—264.
 41. Strumilo S. A., Taranda N. I., Vinogradov V. V. // Biomed. biochim. Acta. — 1984. — Vol. 43, N 2. — P. 237—240.
 42. Tanaka N., Koike K., Hamada M. et al. // J. biol. Chem. — 1972. — Vol. 247, N 12. — P. 4043—4049.
 43. Wedding R. T., Black M. E. // Ibid. — 1971. — Vol. 246, N 6. — P. 1638—1643.
 44. Weitzman P. D. // FEBS Lett. — 1972. — Vol. 22, N 3. — P. 323—334.
 45. Williamson D. H., Prosnan J. T. // Methods. of Enzymatic Analysis. — New York. — 1974. — Vol. 4. — P. 2266—2302.

Поступила 10.10.86

REGULATION OF THE ANIMAL OXO-GLUTARATE DEHYDROGENASE COMPLEX ACTIVITY

S. A. Strumilo

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

Recent data on regulation of the multi-enzyme oxoglutarate dehydrogenase complex from pigeon breast muscle, porcine heart, bovine adrenal glands and kidney are reviewed. The most characteristic property of the complex consists in activation of the trigger oxoglutarate dehydrogenase component by ADP, P_i , Ca^{2+} , H^+ and inhibition by NADH and ATP. Action of these agents is more pronounced at low concentrations of 2-oxoglutarate and is directed towards alteration of the substrate half-saturation value $S_{0.5}$. The adrenal oxoglutarate dehydrogenase complex exhibits positive cooperativity of allosteric ADP-binding sites which improved its sensitivity to variations in the effector concentration. The oxoglutarate dehydrogenase complex appears to be not only an important functional component but also is a regulatory unit of the Krebs cycle.

СТРУКТУРНЫЕ АСПЕКТЫ ТРАНСПОРТНОЙ ФУНКЦИИ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА (обзор)

Кафедра биологической химии Симферопольского университета

Уникальная способность молекулы сывoroточного альбумина (СА) связывать обширный круг органических и неорганических лигандов определяет одну из основных функций этого белка — транспорт физиологических метаболитов и лекарственных веществ, а также регуляцию их уровня в крови. Молекулярные механизмы связывания СА с различными лигандами еще не раскрыты полностью, но в последние годы достигнуты заметные успехи в идентификации лиганд-связывающих участков белковой молекулы. Раскрытие первичной структуры СА позволило получить точную информацию о локализации некоторых связывающих участков и познать тонкие структурные механизмы их взаимодействия с низкомолекулярными веществами [68]. В результате взаимодействия с разнообразными лигандами молекула СА претерпевает изменения, которые зависят от химических свойств связываемых веществ и характера образующихся связей [15, 73]. При этом происходят изменения физико-химических свойств как белка, так и самих лигандов, следствием чего может быть, например, ослабление или, наоборот, усиление действия лекарственных веществ в организме.

Основой таких взаимодействий является структурная подвижность молекулы СА, обеспеченная уникальной петлевой укладкой единственной полипептидной цепи белка [18]. В результате образова-

ния 17 дисульфидных мостиков между 34 из 35 остатков цистеина в молекуле СА формируется структурная единица, содержащая 2 большие и 1 малую петли (субдомены), которая трижды почти точно повторяется в виде 3 индивидуальных глобулярных областей — доменов (рис. 1). Домены и субдомены соединены связывающими звеньями, обеспечивающими относительную подвижность этих регулярных сегментов полипептидной цепи. Изолированные домены сохраняют функциональную специализацию, характерную для целой молекулы СА [71]. Связывающие центры не являются независимыми и при взаимодействии с белком некоторых лигандов проявляется эффект кооперативности [32, 53]. Зависимость связывания лигандов от молекулярной организации СА подтверждается данными, что эквимоларная смесь двух фрагментов бычьего СА с последовательностями 1—306 и 307—581 имеет более высокую по сравнению с индивидуальными фрагментами способность к связыванию длинноцепочечных жирных кислот [36]. Показано также, что связывание триптофана комплексом из указанных фрагментов СА вдвое выше простой суммы связывающих способностей индивидуальных фрагментов [53]. Более широкие исследования функции фрагментов белка явились основанием для представления о том, что нативная структура СА формируется из отдельных структурных областей, способных независимо сворачиваться, образуя глобулярные области во множественных участках полипептидной цепи [32, 77].

Таким образом, решающим в связывающей способности СА является характерное для глобулярных белков свойство находиться в различных молекулярных состояниях, обусловленных изменениями геометрии молекулы. Конформационные изменения могут носить локальный характер и затрагивать тот или иной связывающий центр, что в ряде случаев индуцирует более глубокие и обширные структурные пертурбации всей белковой глобулы [1, 7].

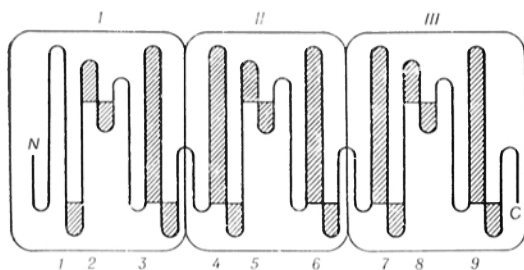


Рис. 1. Схема расположения доменов (I—III) и субдоменов (1—9) в молекуле СА.

Заштрихованные участки — большие и малые двойные петли, образованные дисульфидными мостиками (поперечные черточки между участками изгибающейся полипептидной цепи).

Структурно-функциональные свойства СА будут рассмотрены ниже на примерах взаимодействия с некоторыми наиболее охарактеризованными к настоящему времени лигандами, транспортируемыми белком в крови.

Жирные кислоты (ЖК). Связывание ЖК с СА не является взаимодействием по строго специфичным центрам белковой молекулы, но насыщение участков связывания сопровождается снижением их сродства к данным лигандам. Это может служить основанием для представления возможности распределения ЖК между несколькими участками связывания с постепенным их насыщением.

Молекулярные механизмы связывания ЖК белком изучены на примере образования модельных комплексов СА с синтетическими спин-меченными аналогами [46]. Установлено, что связывание ЖК с СА происходит за счет электростатических и особенно гидрофобных взаимодействий. Возможность связывания за счет электростатических сил была показана при модификации СА ацетилированием или амидированием [66], а также при исследовании взаимодействия белка с незаряженными аналогами ЖК [67]. Способность ЖК к гидрофобному взаимодействию с СА установлена на модельных реакциях белка с ЖК [62], детергентами [20] и красителями [37]. На этом основании механизм связывания ЖК рассматривается как взаимодействие углеводородной цепи ЖК с неполярными радикалами аминокислотных остатков в гидрофобных областях белковой молекулы [54]. Карбоксильная группа ЖК может взаимодействовать с катионными группами СА, локализованными на поверхности белковой глобулы вблизи от гидрофобного «кармана». Известна аминокислотная последовательность связывающего органические анионы участка, примыкающего к единственному остатку триптофана в СА человека (ЧСА) [33, 69]. Этот участок содержит 5 неполярных остатков, очевидно, образующих область, которая ограничена катионными группами боковых цепей лизина и аргинина, расположенными у «входа» в гидрофобную область: -Lys -Ala -Trp -Ala -Val -Ala -Arg- (рис. 2). Такое представление о механизме связывания ЖК хорошо согласуется с доменной моделью СА [18], допускающей возможность формирования внутридоменных гидрофобных областей с полярными участками на по-

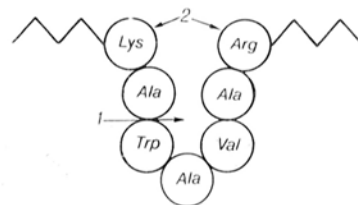


Рис. 2. Схематическая модель структурной организации участка связывания анионов ЖК. 1 — область гидрофобного взаимодействия; 2 — участки электростатического взаимодействия.

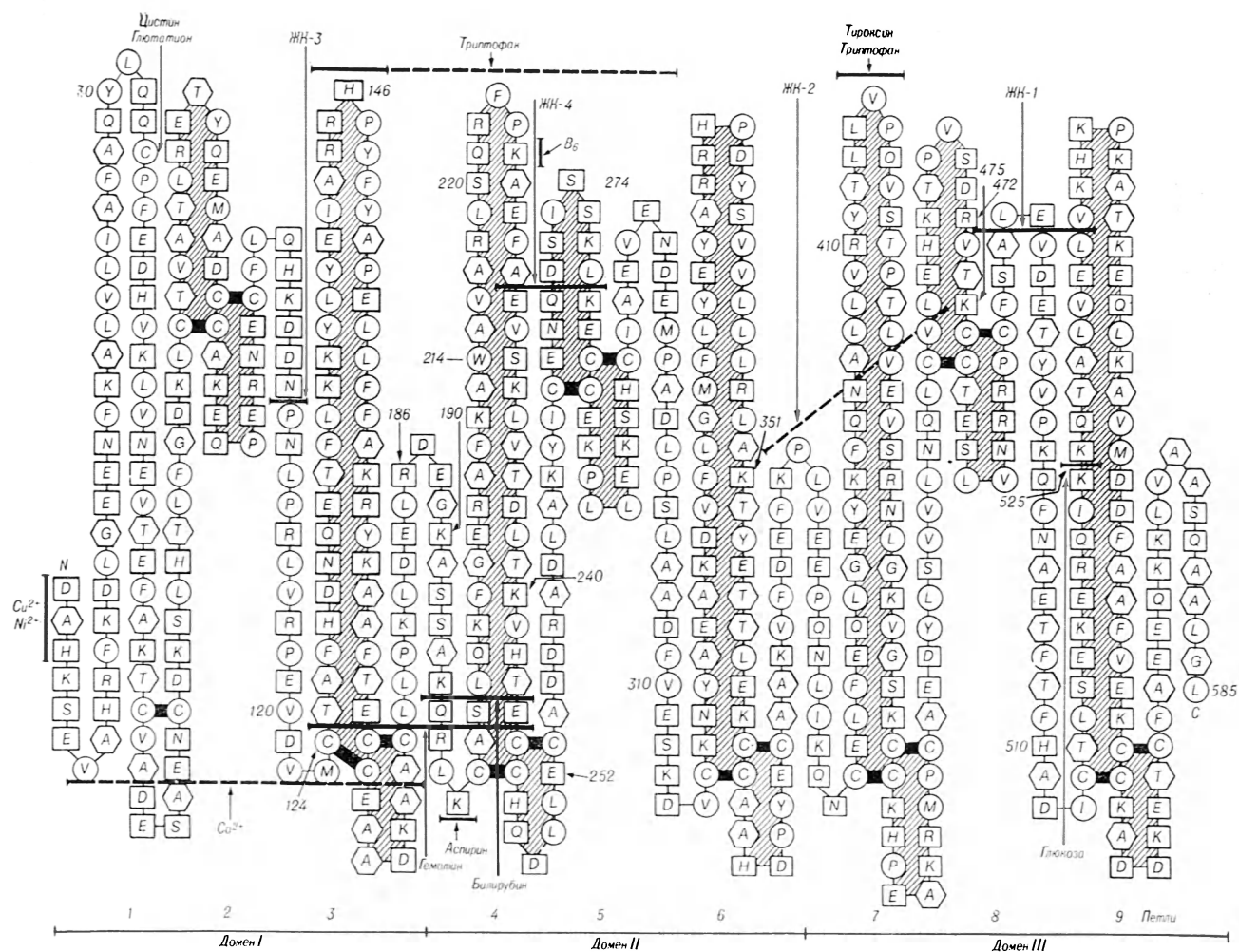
верхности. Можно представить, что в процессе рассматриваемого молекулярного взаимодействия алифатическая часть молекулы ЖК входит в гидрофобный «карман» домена, а карбоксильная группа вступает в ионное взаимодействие с основными боковыми радикалами крайних аминокислотных остатков этого связывающего участка. В недавней публикации [57] на основании исследований кинетики ассоциации — диссоциации ЧСА с длинноцепочечными ЖК предложена возможная последовательность этапов связывания белка с ЖК. Первый этап — это быстрое неспецифическое связывание ЖК с «наружной» поверхностью белка. Вероятно, на этом этапе осуществляется ионное взаимодействие карбоксильных групп ЖК с аминогруппами основных аминокислот. Второй этап — транслокация ЖК из «наружной» поверхности белка во «внутреннюю», где осуществляется гидрофобное взаимодействие.

В физиологических условиях молекула СА связывает 1—2 молекулы ЖК и транспортирует их в русле крови [65]. На основании достаточно детализированной информации о связывании ЖК с СА сложилось представление о том, что взаимодействие этих лигандов с белком происходит в 4 специфических участках [21, 34, 44]. Взаимодействие белка с физиологически обусловленным числом молекул ЖК осуществляется в первичном, наиболее прочном специфическом участке, но с ростом количества ЖК, взаимодействующих с белком, связывание происходит дополнительно на других 3 участках с последовательно снижающимся сродством к лиганду. Все 4 связывающих участка распределены в различных доменах, занимая в них определенные области [25, 48].

Первичный участок может быть образован в середине домена III при формировании здесь гидрофобной области за

Рис. 3. Аминокислотная последовательность ЧСА (I—III — домены, 1—9 — петли).

Аминокислотные остатки: квадратик — гидрофильные, кружочки — гидрофобные, многоугольники — со средней гидрофильностью. А — Ala, С — Cys, D — Asp, F — Glu, K — Phe, G — Gly, H — His, I — Ile, K — Lys, L — Leu, M — Met, N — Asn, P — Pro, Q — Gln, R — Arg, S — Ser, T — Thr, V — Val, W — Trp, Y — Tyr. (цит. [14]).



счет пространственной укладки петель 7, 8 и 9 (рис. 3, ЖК-1). На основании известной аминокислотной последовательности ЧСА [43] можно выделить в домене III участок полипептидной цепи между остатками Arg-472 и Lys-525, в котором из 52 аминокислотных остатков 29 относятся к гидрофобным или обладают средней гидрофобностью. Эти данные согласуются с представлением о формировании в средней части домена III гидрофобного «кармана» с основными остатками по его краям.

Вторичный участок ЧСА может занимать в петле 6 область вблизи Lys-351. Если условно выделить в аминокислотной последовательности по 10 остатков, то 7 из них являются гидрофобными или имеют среднюю гидрофобность (см. рис. 3; ЖК-2). Кроме того, установлено, что в ЧСА Lys-475 (петля 8) имеет такую же активность в отношении связывания меченой пальмитиновой кислоты, как и Lys-351. Петля 8 на участке между Cys двух дисульфидных мостиков содержит всего 27 остатков, из которых 15 являются гидрофобными или имеют среднюю гидрофобность. Таким образом, окрестности Lys-351 петли 6 и Lys-475 петли 8 отличаются выраженной гидрофобностью. Это послужило основанием для предсказания возможности сближения петель 6 и 8 при организации трехмерной структуры доменов II и III. В этом случае вторичный участок связывания ЖК может иметь междоменную локализацию и формироваться за счет неполярных участков петель 6 и 8. Lys-351 и Lys-475 должны определять первичное электростатическое взаимодействие между карбоксильными группами ЖК и белком.

Третий участок связывания ЖК локализован в отрезке полипептидной цепи между петлями 2 и 3 (см. рис. 3, ЖК-3). В аминокислотной последовательности этого участка содержится 22 остатка, в том числе 11 гидрофобных. Ранее было показано, что His-146 ЧСА (петля 3) участвует в связывании длинноцепочечных ЖК (цит. [48]). His-146 локализован в области изгиба длинной ветви петли 3 и своим взаимодействием с карбоксильной группой ЖК может способствовать дальнейшему перемещению ее неполярной части в гидрофобное окружение между петлями 2 и 3 домена I.

Локализация четвертого участка установлена с помощью исследования конкурентного взаимодействия с билиру-

бином [79] и по изменению флюоресценции Tgr-212 бычьего СА (Tgr-214 ЧСА) [61]. Предполагается, что четвертый участок занимает срединную область домена II в районе петель 4 и 5 (см. рис. 3, ЖК-4). В полном взаимодействии с ЖК может участвовать в ЧСА остаток Lys-274, вероятно, обеспечивающий интернализацию неполярной части ЖК в гидрофобный район петель 4 и 5, в котором из 90 остатков 46 имеют гидрофобные свойства.

Таким образом, взаимодействие СА с длинноцепочечными ЖК происходит в 4 специфических участках, неравноценных по прочности связывания. Эти участки могут быть расположены в середине доменов I, II и III, а также в районе между доменами II и III. Молекулярные механизмы взаимодействия ЖК с СА, получившие в последнее время более конкретные формы, могут служить обоснованием для представления об аллостерическом эффекте влияния ЖК на активность других связывающих участков на белке. Анализ спектральных характеристик комплексов СА с ЖК и синтетическими спин-мечеными анионными лигандами показал, что присоединение к белку каждой молекулы ЖК влияет на конформацию белка и его взаимодействие с другими лигандами, имеющими на СА самостоятельные участки. Например, присутствие ЖК в ЧСА повышало на 80 % связывание спин-меченого анионного лиганда [63] или вызывало снижение связывания белком фенола красного [38].

Билирубин (БР). Физиологическое значение связывания БР с СА обусловлено нерастворимостью этого естественного метаболита и токсичностью его в свободном состоянии. Низкая растворимость БР в водных растворах объясняется способностью этого вещества образовывать внутримолекулярные водородные связи между карбоксильными группами остатков пропионовой кислоты и азотом пирролов в каждой половине дипирролов (рис. 4, а). Связывание с СА сопровождается разрывом таких водородных связей, раскручиванием и растягиванием молекулы БР с образованием полярной формы. Взаимодействие СА с БР является единственным путем, посредством которого БР транспортируется в печеночные клетки, где конъюгируется с глюкуроновой кислотой и секретируется.

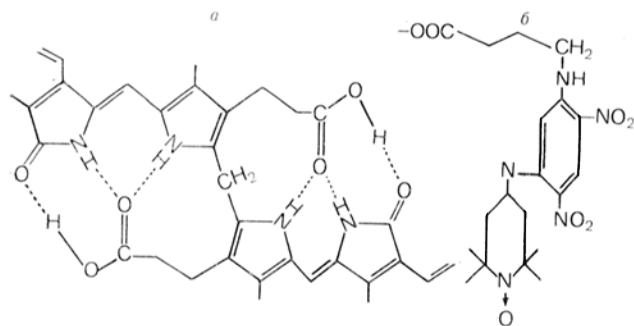


Рис. 4. Структурные формулы билирубина (а) и GABA-DNB-SL (б)

В серии работ [2, 3, 10] показано, что взаимодействие БР с СА проходит по гидрофобному механизму и сопровождается проникновением мицелл лиганда в неполярную область белковой глобулы [40].

БР обратимо связывается с СА одним первичным наиболее специфичным участком, где поглощается 1—2 молекулы лиганда, а также одним или двумя центрами, связывающими БР менее прочно. Кроме того, имеется неопределенное число неспецифических участков, связывающих до 10 молекул БР и более [27, 29]. Методом ЭПР изучено стереоспецифическое связывание энантимеров БР. Показано, что первичный связывающий участок имеет наибольшее сродство к L-энантимеру БР, а 2 вторичных участка — к D-энантимеру.

Первичный БР-связывающий участок находится в области петли 4 [68]. Для идентификации аминокислотных остатков, локализованных в этом участке, было изучено сродство БР к СА, химически модифицированному по аминокетам [30, 31]. Показано, что остатки Arg, His, а также Tug непосредственно локализованы в первичном участке или находятся вблизи от него. На основании данных по связыванию лигандов фрагментами СА [52] первичный участок связывания БР в ЧСА может занимать часть аминокислотной последовательности от 190 до 252 остатка с преобладанием основных остатков (14 остатков из 63 на данном отрезке цепи) и локализацией в этой области высокоактивных остатков Arg-222 и Lys-240 [31, 48].

Таким образом, взаимодействие СА с БР осуществляется за счет гидрофобных и электростатических сил. Особенностью первичного участка, очевидно, является наличие по крайней мере одной реактивной аминокетам группы белка, способной реагировать с карбоксиллом БР [31]. Такая возможность показана при исследовании связывания моноанионного

спин-меченного соединения GABA-DNB-SL (см. рис. 4, б) [64]. Кроме того, установлено, что первичный участок ЧСА обладает способностью взаимодействовать с двумя моноанионными спинными метками, что свидетельствует о возможности участия двух карбоксильных групп БР в связывании с СА.

Гематин (ГМ). Гем (ферропротопорфирин) относится к физиологически важным тетрапирролам и является предшественником билирубина. Гем, освобождающийся из гемоглобина при распаде эритроцитарных клеток, взаимодействует с СА. При этом ферроформа гема имеет меньшее сродство к СА, чем ферригем (гематин) [45]. ГМ высвобождается из метгемоглобина, появляющегося в результате аутоокисления в крови гемоглобина, не связанного с гаптоглобином. ГМ в комплексе с СА образует метгемальбумин [11]. Еще в 1950 г. появились данные о том, что ЧСА имеет 2 специфических центра связывания ГМ [55]. Взаимодействие происходит за счет связи карбоксильной группы остатка пропионовой кислоты ГМ с гистидиновым остатком ЧСА. Успехи в расшифровке аминокислотной последовательности ЧСА [43] и использование сравнительных данных о связывающей способности белка и его протеолитических фрагментов позволили обнаружить вероятную локализацию гем-связывающего участка в области 124—252 остатков [47]. Исследование кинетики связывания ГМ цельной молекулой ЧСА и 3 бромциановыми фрагментами также показало, что гем-связывающий участок занимает область петель 3 и 4 в доменах I и II соответственно (см. рис. 3) [28].

Триптофан. Тироксин. Триптофан является единственной аминокислотой, связывающейся с белками плазмы крови и в основном с СА [41]. С помощью аффинной хроматографии на колонках с СА, иммобилизованным сефарозой 4В, и с использованием меченых энантио-

меров DL- ^{14}C -триптофана было установлено, что СА млекопитающих более прочно связывает L-триптофан, в то время как СА птиц взаимодействует с D-триптофаном [39, 42].

Изучение связывания L-триптофана нативным и модифицированным ЧСА, а также с фрагментами белковой молекулы показало, что первичный триптофан-связывающий участок расположен в районе остатков 124—298 (см. рис. 3) [60]. В этом участке высокую активность проявляет His-146 (петля 3) и окружающие его остатки Arg-144, Arg-145 и Tyr-148, Tyr-150. Кроме того, на связывающую активность влияют остатки Lys-190 и Lys-195, расположенные в районе участка, связывающего петли 3 и 4 [24, 60].

Тироксин в плазме крови специфически связывается с глобиновой фракцией (тироксинсвязывающий белок), но взаимодействует также с преальбумином и СА [70]. Связывание L-тироксина с СА происходит в одном общем с L-триптофаном участке, но с большим сродством к нему тироксина. Локализован этот участок в петле 7 домена III ЧСА. Активными остатками в связывании являются Tyr-411 и Lys-414 [72].

Ионы металлов. В основном связывание этих видов лигандов происходит в результате электростатического взаимодействия ионов некоторых металлов со специфическими центрами на СА (см. рис. 3).

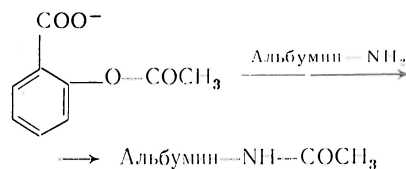
Связывание ионов Ca^{2+} зависит от концентрации СА в сыворотке крови, а также от состояния структуры этого белка [16]. Изменение конформации ЧСА, возникающее при связывании белком различных ЖК, увеличивает способность связывать кальций, влияя на уровень в крови свободных ионов Ca^{2+} [12]. Имеются данные о том, что взаимодействие Ca^{2+} с СА является сложным процессом, осуществляемым множественными связывающими участками, варьирующими по их сродству и связывающей способности [16]. Предполагается, что сравнительно более выраженный суммарный отрицательный заряд домена I, равный -10 , против -8 в домене II и 0 в домене III [48], может определять связывание ионов Ca^{2+} в N-концевой области СА.

Специфический участок связывания ионов Cu^{2+} локализован в N-концевом трипептиде бычьего СА: $\text{NH}_2\text{-Asp-Thr-His-...}$ [17, 56] и соответственно в ЧСА:

$\text{NH}_2\text{-Asp-Ala-His-...}$ Атомами, лигандирующими медь, являются в СА азот ϵ -аминогруппы N-концевого остатка Asp, 2 атома азота NH-групп двух пептидных связей в концевом трипептиде и π -атом азота имидазольной группы остатка His [49]. Уникальное строение Cu^{2+} -связывающего участка было детально изучено с помощью электрон-спин-резонансных спектров комплексов ионов Cu^{2+} с синтетическими аналогами N-концевого трипептида: Asp-Ala-His-метиламид и Gly-Gly-His-метиламид, а также спектров комплексов Cu^{2+} с ЧСА и СА собаки, с характерным для последнего отсутствием His в третьем положении N-концевого трипептида (N-Gly-Ala-Tyr...) [51]. Показано, что Cu^{2+} -связывающий участок геометрически представляет собой планарное кольцо, образованное координационными связями Cu^{2+} с 4 атомами азота N-концевого трипептида СА. Кроме того, методом ЯМР с использованием ^{13}C и D_2O в модельном пептиде Asp-Ala-His-N-метиламид было показано, что $\beta\text{-COOH}$ — N-концевого остатка Asp также участвует в связывании Cu^{2+} с образованием пентакоординационной структуры [48].

Ni^{2+} так же, как и Cu^{2+} , проявляет координационные свойства, связываясь в области N-концевого трипептида СА, содержащего в третьем положении His [48].

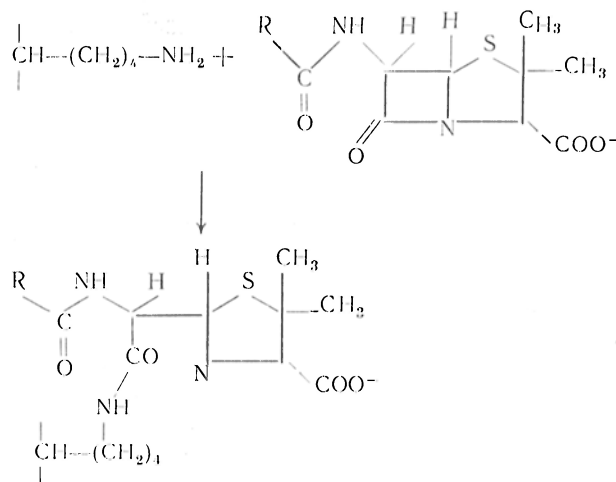
Ковалентно связанные лиганды. Среди широкого круга низкомолекулярных веществ, которые взаимодействуют с СА с различной степенью прочности и специфичности, можно выделить некоторые лиганды, образующие с отдельными аминокислотными остатками белка ковалентные связи (см. рис. 3). Примером такого взаимодействия является ацетилирование ЧСА ацетилсалициловой кислотой (аспирин). Участком ацетилирования на ЧСА служит Lys-199 [75]. Реакция происходит за счет $\epsilon\text{-NH}_2$ -группы лизина с образованием модифицированного ацетилированием СА [26]:



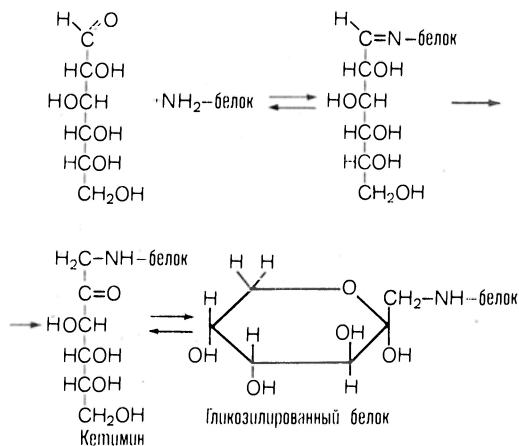
Пенициллин ковалентно связывается с ЧСА, существенно влияя при этом на конформацию белковой молекулы. Взаимодействие может происходить за счет

реакции между ϵ -NH₂-группами остатков лизина белка и β -лактамовым кольцом пенициллина [26]:

ресценции триптофана с одновременным сдвигом максимума флюоресценции, что может отражать структурные изменения



При неэнзиматическом гликозилировании СА происходит ковалентное связывание глюкозы с белковой молекулой [19]. Химизм взаимодействия глюкозы с белком основан на реакции между альдегидной группой глюкозы и ϵ -NH₂-группой остатка лизина в белке [58]. При этом первоначально образуется альдимин (шиффово основание), который может либо диссоциировать, либо перестраиваться в более стабильный кетимин [78]:



Взаимодействие ЧСА с глюкозой характеризуется высокой специфичностью. Участком связывания на белке является Lys-525 (петля 9) [59]. Исследование внутренней флюоресценции остатке Trp показало, что при гликозилировании *in vivo* и *in vitro* спектр флюоресценции белка изменяется [59]. Гликозилирование приводит к снижению флюо-

в окружении единственного в ЧСА остатка Trp-214 (петля 4). Кроме того, при гликозилировании снижается почти в 2 раза сродство ЧСА к билирубину, участок связывания которого находится в домене II. Таким образом, гликозилирование может индуцировать конформационные изменения в области II и III доменов СА.

Связывание пиридоксаль-5-фосфата (коферментная форма витамина B₆) с СА и транспорт этого витамина в русле крови установлены сравнительно недавно [13]. Взаимодействие происходит с образованием ковалентной связи альдегидной группы пиридоксала с ϵ -NH₂-группой лизина по типу шиффово основания [74]. Вероятным аминокислотным остатком, локализованным в связывающем участке ЧСА, может быть Lys-225.

Единственная свободная в СА SH-группа Cys-34 может ковалентно реагировать с низкомолекулярными тиолами (цистин, глутатион), присутствующими в крови, образуя смешанные дисульфиды [22, 35].

Приведенные примеры взаимодействия наиболее изученных физиологических метаболитов и некоторых лекарственных веществ с ЧСА свидетельствуют о том, что механизм связывания лигандов определяется наличием на белке специфических участков. Реакции связывания обеспечиваются в основном за счет гидрофобных и электростатических взаимодействий. Некоторые реакции могут носить ковалентный характер и вызывать химические модификации

боковых цепей аминокислотных остатков. Связывание естественных лигандов и лекарственных веществ СА вызывает в молекуле СА конформационные изменения, сопровождающиеся появлением эффекта его молекулярной гетерогенности [5, 6, 8, 9, 14, 50], влияет на метаболизм как самого белка [76], так и связанных с ним лигандов [4].

ЛИТЕРАТУРА

1. Абатуров Л. В., Вариавский Я. М. // Молекул. биол. — 1978. — Т. 12, № 1. — С. 36—42.
2. Кобзарева В. П., Шаповаленко Е. П., Колосов И. В. // Биоорг. химия. — 1978. — Т. 4, № 12. — М. 1635—1640.
3. Колосов И. В., Шаповаленко Е. П. // Там же. — 1976. — Т. 2, № 12. — С. 1660—1664.
4. Луйк А. Н., Лукьянчук В. Д. // Докл. АН УССР. Сер. Б. — 1981. — № 11. — С. 80—83.
5. Соркина Д. А. // Вопр. мед. химии. — 1967. — Т. 13, вып. 3. — С. 263—270.
6. Соркина Д. А., Троицкий Г. В., Каминская Г. А. // Биохимия. — 1968. — Т. 33, № 2. — С. 226—227.
7. Тринус Ф. П., Бравер-Чернобульская Б. С., Луйк А. Н. и др. // Вопр. мед. химии. — 1984. — Т. 30, вып. 4. — С. 48—50.
8. Троицкий Г. В., Соркина Д. А. // Биохимия. — 1956. — Т. 21, вып. 6. — С. 784—792.
9. Троицкий Г. В. // Молекул. биол. — Киев, 1972. — Вып. 8. — С. 3—11.
10. Шаповаленко Е. П., Колосов И. В. // Биоорг. химия. — 1978. — Т. 4, № 4. — С. 514—522.
11. Adachi K., Asakuba T. // Biochim. biophys. Acta. — 1976. — Vol. 427, N 2. — P. 546—548.
12. Aguanno J. J., Ladenson J. H. // J. biol. Chem. — 1982. — Vol. 257, N 15. — P. 8745—8748.
13. Anderson J. A., Chang H. W., Crandjeon C. J. // Biochemistry. — 1971. — Vol. 10, N 12. — P. 2408—2415.
14. Andersson L.-O. // Plasma Proteins. — Stockholm, 1981. — P. 43—72.
15. Aoki K., Okabayashi H., Maezawa Sh., Mizuno T. // Biochim. biophys. Acta. — 1982. — Vol. 703, № 1. — P. 11—16.
16. Besarab A., Deguzman A., Swanson J. W. // J. clin. Path. — 1981. — Vol. 34, N 12. — P. 1361—1367.
17. Bradshaw R. A., Shearer W. T., Gurd N. // J. biol. Chem. — 1968. — Vol. 223, № 14. — P. 3817—3826.
18. Brown J. R. // Fed. Proc. — 1975. — Vol. 34. — P. 591. — Abstr. 2105.
19. Day J. F., Thorpe S. R., Baynes J. W. // J. biol. Chem. — 1979. — Vol. 254, N 2. — P. 595—597.
20. Decker R. V., Foster J. F. // Ibid. — 1967. — Vol. 242, N 7. — P. 1526—1532.
21. Doody M. C., Gotto A. M., Smith L. C. // Biochemistry. — 1982. — Vol. 21, № 1. — P. 28—33.
22. Edwards F. B., Rombauer R. B., Campbell B. J. // Biochim. biophys. Acta. — 1969. — Vol. 194, N 1. — P. 234—245.
23. Fadda F., Biggio G., Liquori G. // Experimentia. — 1974. — Vol. 30, N 6. — P. 635—637.
- 24a. Gambhir K. K., McMenamy R. H., Watson F. // J. biol. Chem. — 1975. — Vol. 250, № 19. — P. 6711—6719.
25. Giesow M. // New Sci. — 1978. — Vol. 9, № 1120. — P. 777—779.
26. Harding J. J. // Advanc. Protein Chem. — 1985. — Vol. 37. — P. 248—334.
27. Hrcal Z., Kodicek M., Vodrazka Z. et al. // Int. J. Biochem. — 1978. — Vol. 9, № 5. — P. 349—355.
28. Hrcal Z., Klementova S. // Ibid. — 1984. — Vol. 16, № 7. — P. 799—804.
29. Hsia J., S. S. Er, Tan C. T., Tinker D. O. // J. biol. Chem. — 1982. — Vol. 257, № 4. — P. 1724—1729.
30. Jacobsen C. // Europ. J. Biochem. — 1972. — Vol. 27, № 3. — P. 513—519.
31. Jacobsen C. // Int. J. Peptide Res. — 1976. — Vol. 8, N 3. — P. 295—303.
32. Johanson K. O., Wellaufer D. B., Reed R. G., Peters Th. Jr. // J. biol. Chem. — 1981. — Vol. 256, N 1. — P. 445—450.
33. Jones A., Weber G. // Biochemistry. — 1971. — Vol. 10, N 10. — P. 1335—1339.
34. Keuper H. J. K., Klein R. A., Spenez F. // Chem. Phys. Lipids. — 1983. — Vol. 32, N 2. — P. 153—164.
35. King T. P. // J. biol. Chem. — 1961. — Vol. 236, N 2. — P. C5.
36. King T. P., Spenser M. // Ibid. — 1970. — Vol. 245, N 22. — P. 6134. — 6148.
37. Klotz J. M., Ayers J. // J. Amer. chem. Soc. — 1952. — Vol. 74. — P. 6788—6180.
38. Kragh-Hansen U. // Biochem. J. — 1981. — Vol. 195, N 3. — P. 603—613.
39. Lagercrantz C., Lars T., Denfors I. // Comp. Biochem. Physiol. — 1981. — Vol. 69C, N 2. — P. 375—376.
40. Lamola A. A., Flores J. // J. Amer. Chem. Soc. — 1982. — Vol. 104, N 9. — P. 2530—2534.
41. McMenamy R. H., Oncley J. L. // J. biol. Chem. — 1958. — Vol. 233. — N 6. — P. 1436—1447.
42. McMenamy R. H., Watson F. // Comp. Biochem. Physiol. — 1968. — Vol. 26, N 1. — P. 329—335.
43. Meloun B., Moravek L., Kostka V. // FEBS Lett. — 1975. — Vol. 58, N 1. — P. 134—137.
44. Metcall E. C., Crow B., Dean D. G. // Biochem. J. — 1981. — Vol. 199, N 3. — P. 465—472.
45. Morgan W. T., Hengliem H., Sutor R. P., Muller-Eberhard U. // Biochim. biophys. Acta. — 1976. — Vol. 44, N 2. — P. 435—445.
46. Muller N., Mead R. J. // Biochemistry. — 1973. — Vol. 12, N 16. — P. 3831—3835.
47. Peters T., Blumenstock F. A. // J. biol. Chem. — 1967. — Vol. 242, N 7. — P. 1574—1578.
48. Peters T. Serum albumin // The Plasma Proteins. — New York, 1975. — Vol. 1. — P. 133—181.
49. Peters T., Reed R. G. // Transport by Proteins. — Berlin, 1978. — P. 57—78.
50. Peters T. // Advanc. Protein Chem. — 1985. — Vol. 37. — P. 161—245.
51. Rakhit G., Sarcar B. // J. inorg. Biochem. — 1981. — Vol. 15, N 3. — P. 233—241.

52. Reed R. G., Feldhoff R. C., Clute O. L., Peters T. // Biochemistry. — 1975. — Vol. 14, N 16. — P. 4578—4583.
53. Reed R. G., Feldhoff R. C., Peters T. // Ibid. — 1976. — Vol. 15, N 24. — P. 5394—5398.
54. Rodrigues de Miranda J. F., Eikelboom T. D. // Molec. Pharmacol. — 1976. — Vol. 12, N 3. — P. 454—462.
55. Rosenfeld M., Surgenor D. M. // J. biol. Chem. — 1950. — Vol. 183, N 2. — P. 663—677.
56. Sarcar B., Dixon H. B. F., Webster D. // Biochem. J. — 1978. — Vol. 13, N 3. — P. 895—897.
57. Scheider W. // J. phys. Chem. — 1980. — Vol. 84, N 8. — P. 925—928.
58. Schwartz H. M., Lea C. H. // Biochem. J. — 1962. — Vol. 50, N 5. — P. 713—716.
59. Shaktai N., Garlick R. L., Bunn H. F. // J. biol. Chem. — 1984. — Vol. 259, N 8. — P. 3812—3817.
60. Sjöholm I., Ljungstedt I. // Ibid. — 1973. — Vol. 248, N 24. — P. 8434—8441.
61. Sklar L. A., Hudson B. S., Simoni R. P. // Biochemistry. — 1977. — Vol. 16, N 23. — P. 5100—5108.
62. Soetewey F., Rosseneu-Motreff M., Lamoite R., Pecters H. // J. Biochem. (Tokyo). — 1972. — Vol. 71, N 4. — P. 705—710.
63. Soltys B. J., Hsia J. C. // J. biol. Chem. — 1977. — Vol. 252, N 12. — P. 4043—4048.
64. Soltys B. J., Hsia J. C. // Ibid. — 1978. — Vol. 253, N 7. — P. 3029—3034.
65. Spector A., John K. M., Fletscher J. E. // J. Lipid Res. — 1969. — Vol. 10, N 1. — P. 56—67.
66. Spector A., Saboroff J. M. // Ibid. — 1972. — Vol. 14, N 8. — P. 790—796.
67. Spector A. // Ibid. — 1975. — Vol. 16, N 3. — P. 165—179.
68. Sudlow G. // Biochemical Clinical Pharmacology. — Oxford, 1979. — P. 113—123.
69. Swaney J. B., Klotz I. M. // Biochemistry. — 1970. — Vol. 9, N 13. — P. 2570—2574.
70. Tabachnik M. // J. biol. Chem. — 1967. — Vol. 242, N 7. — P. 1646—1650.
71. Teale J. M., Benjamin D. C. // Ibid. — 1976. — Vol. 251, N 15. — P. 4609—4615.
72. Tritsch G. L., Tritsch N. E. // Ibid. — 1963. — Vol. 238, N 1. — P. 138—142.
73. Uchida H., Hanono M. // Chem. pharm. Bull. — 1974. — Vol. 22, N 7. — P. 1571—1579.
74. Wald F. // Ann. Rev. Biochem. — 1981. — Vol. 50. — P. 783—814.
75. Walker J. E. // FEBS Lett. — 1976. — Vol. 66, N 1. — P. 173—175.
76. Wallevik K. // Acta physiol. scand. — 1979. — Vol. 107, Suppl. 471. — P. 5—45.
77. Wetlaufer D. B. // Advanc. Protein Chem. — 1981. — Vol. 34. — P. 76—83.
78. Wieland O. H. // Hämostaseologie. — 1983. — Bd 3. — S. 92—96.
79. Wooley P. V., Hunter M. J. // Arch. Biochem. — 1970. — Vol. 140, N 2. — P. 197—209.

Поступила 09.10.86

УДК 615.361.844.7.015.4:616-006-005-007.15

И. А. Лисняк

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ИНГИБИТОРА НЕОВАСКУЛЯРИЗАЦИИ ИЗ СТЕКЛОВИДНОГО ТЕЛА

Институт проблем онкологии им. Р. Е. Кавецкого АН УССР, Киев

Из гиалинового хряща и аорты крупного рогатого скота выделены вещества, обладающие свойством ингибировать процессы неоваскуляризации [8, 9]. Они характеризуются низкой молекулярной массой (1000—50 000). Помимо хряща, ингибирующее действие на процессы неоваскуляризации оказывает и другая, аваскулярная ткань организма — стекловидное тело глаз [2]. Однако ингибирующее начало из этой ткани выделено не было.

Получение ингибиторов неоваскуляризации имеет важное значение, в частности для онкологии, поскольку рост опухоли зависит от степени прорастания ее кровеносными сосудами окружающих тканей [5, 6]. Подавление процессов неоваскуляризации может служить одним из путей контроля роста новообразования [4].

Методика

Глаза крупного рогатого скота, необходимые для выделения ингибитора процессов неоваскуляризации из стекловидного тела, извлекали сразу после забоя и сохраняли при 4 °С; через 12 ч извлекали стекловидное тело. Собранную жидкость интенсивно перемешивали для растворения гелеобразных сгустков и центрифугировали при 6000 об/мин в течение 20 мин. Надосадочную жидкость подвергали ультрафильтрации через мембрану ИМ-20 («Amicon», США) при постоянном перемешивании и 4 °С. Материал, прошедший через мембрану, лиофилизировали и использовали для получения ингибитора. Основным этапом в его получении была сорбция на трипсине, связанном с полимеризованным бычьим сывороточным альбумином (аналогично аффинной хроматографии), поскольку известно, что ингибиторы неоваскуляризации принадлежат к классу неспецифических ингибиторов протениаз [7].

Полученный полимер альбумина измельчали в гомогенизаторе и многократно отмывали большими объемами буфера, чередуя с

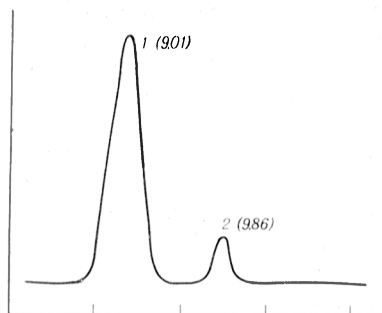


Рис. 1. Хроматография высокого давления ингибитора неоваскуляризации из стекловидного тела глаз.

1 — компонент с мол. м. 12 000; 2 — компонент с мол. м. 9000. По оси абсцисс — время выхода (в мин); по оси ординат — оптическая плотность при 280 нм.

0,1 н. HCl и 0,1 н. NaOH, пока промывной раствор не становился абсолютно прозрачным.

К взвешенному в рабочем буфере гелю полимера альбумина (1 г/5 мл) прибавляли

раствор трипсина (50 мг/мл) и в смесь при постоянном перемешивании медленно вводили 20% глутаральдегид до конечной концентрации 0,2%. Смесь размешивали на мешалке в течение 20 ч при 4 °C и многократно промывали буфером. Свободные валентности глутаральдегида блокировали добавлением 100 мМ моноэтаноламина, после чего промывали буферным раствором (0,15 М NaCl, pH 7,2). Промывку прекращали, когда по данным спектрофотометрии при длине волны 280 нм промывной раствор не содержал примесей белков. Использованный метод незначительно отличается от приведенного в литературе [11]. Сорбент предварительно центрифугировали (3000 об/мин, 20 мин, 18—20 °C) и надосадочную жидкость сливали. Сорбцию проводили в центрифужных стаканах вместимостью 250 мл. Липофиллизированный материал из стекловидного тела глаз, растворенный в забуференном 0,15 М NaCl (0,3 мг/мл), вносили в стакан с сорбентом и инкубировали в течение 1 ч при 37 °C и постоянном перемешивании. После инкубации смесь центрифугировали при том же режиме, надосадочную жидкость, содержащую несвязанные компоненты стекловидного тела, сливали. Сорбент

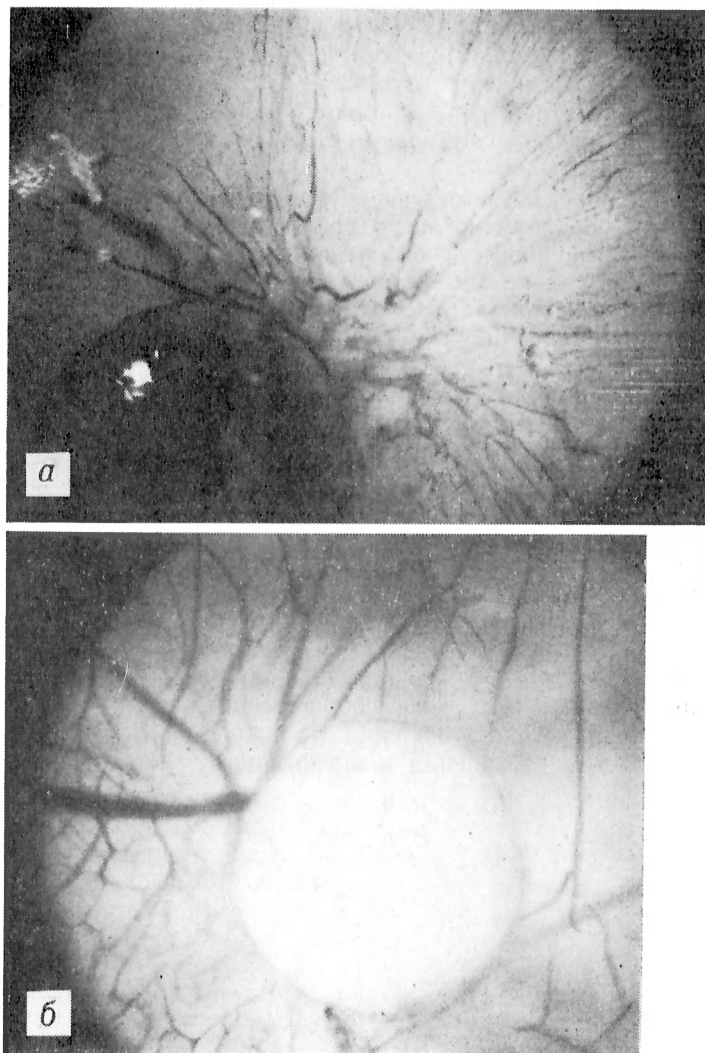


Рис. 2. Подавление неоваскуляризации на хорион-аллантоисной мембране куриных эмбрионов ингибитором из стекловидного тела.

a — диск из фильтровальной бумаги, смоченной ангиогенным фактором (контроль); *b* — диск из фильтровальной бумаги, смоченной раствором ангиогенного фактора и ингибитора из стекловидного тела.

многократно отмывали от несвязанных компонентов рабочим буфером, центрифугировали и к осадку прибавляли 50 мМ аммоний-ацетатный буфер, pH 3,7. Объем буфера соответствовал объему, в который добавляли материал из стекловидного тела. Смесь инкубировали 20 мин при комнатной температуре, перемешивали, центрифугировали (3000 об/мин, 20 мин) и надосадочную жидкость, содержащую детергированный ингибитор васкуляризации, сливали и лиофилизировали. Содержание ингибитора составляло 10 мг на 100 мл стекловидного тела.

Полученное вещество подвергали хроматографии высокого давления на хроматографе HPLG (фирма LKB, Швеция) с использованием колонки I-60, предназначенной для разделения пептидов, с целью выяснения гетерогенности материала, полученного сорбцией. Хроматографию проводили при скорости 1 мл/мин, λ 280 нм с использованием трис-HCl-буфера, pH 7,2 в качестве элюента. На колонку наносили раствор вещества в элюирующем буфере в объеме 100 мкл.

Результаты и обсуждение

Результаты хроматографического разделения представлены на рис. 1. На хроматографической кривой видны 2 пика. Их соотношение составляет 87,8 и 12,2 % соответственно. Молекулярная масса этих двух компонентов 12 000 и 9000.

Фракции, соответствующие отдельным пикам, собирали согласно времени выхода из колонки, лиофилизировали и оценивали способность каждой фракции ингибировать процессы неоваскуляризации. Для этого использовали известный из литературы прием — определение влияния изучаемого фактора на процессы неоваскуляризации в хорион-аллантоисной мембране куриных эмбрионов [10]. Полученные результаты отражены на рис. 2. Видно, что вокруг диска из фильтровальной бумаги, пропитанного фактором (50 мкг в 50 мкл 0,15 М NaCl), стимулирующим рост капилляров (выделенный нами ранее по методу [3] из карциномы Lewis ангиогенный фактор), возникли радиально направленные к нему, вновь образованные сосуды. Подобного явления не наблюдалось при добавлении к ангиогенному

фактору ингибитора (50 мкг в 50 мкл 0,15 М NaCl) с мол. м. 12 000. Фракция с мол. м. 9000 свойством ингибировать процессы неоваскуляризации не обладала.

Таким образом, из стекловидного тела глаз крупного рогатого скота удалось выделить относительно гомогенный белок с мол. м. 12 000, обладающий свойством ингибировать процессы неоваскуляризации.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Avrameas S., Ternynck T.* // *Immunochimistry.* — 1969. — Vol. 6, № 1. — P. 53—66.
2. *Felton S. M., Brown G. C., Felberg T. T., Federman J. L.* // *Arach. Ophthal.* — 1979. — Vol. 97, № 2. — P. 1710—1713.
3. *Folkman J., Merler M. D., Abernathy Ch., Williams G.* // *J. exp. Med.* — 1971. — Vol. 133, № 2. — P. 275—288.
4. *Folkman J.* // *Ann. Surg.* — 1972. — Vol. 175, № 3. — P. 409—416.
5. *Folkman J., Hochberg M.* // *J. exp. Med.* — 1973. — Vol. 138, № 4. — P. 745—753.
6. *Folkman J.* // *Advanc. Cancer Research.* — 1974. — Vol. 19. — P. 331—358.
7. *Kuettner K. E., Bendicht U. P.* // *Development of the Vascular System.* — London, 1983. — P. 163—173.
8. *Langer R., Conn H., Vacanti J. et al.* // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.* — 1980. — Vol. 77, № 7. — P. 4331—4335.
9. *Miller A., Kuettner K. E.* // *Amer. J. Path.* — 1973. — Vol. 73, № 4. — P. 765—774.
10. *Phillips P., Kumar S.* // *Int. J. Cancer.* — 1979. — Vol. 23, № 1. — P. 82—88.

Поступила 02.06.87

ISOLATION AND PROPERTIES OF THE NEOVASCULARIZATION INHIBITOR FROM VITREOUS BODY

I. A. Lisnyak

Institute of Oncology Problems, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Inhibitor of neovascularization was isolated from bovine vitreous body by means of adsorption on immobilized trypsin. The substance isolated was analyzed using high pressure chromatography; molecular weight of the component with antivascular activity was about 120,000.

СРАВНЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЭТАНОЛА И АЦЕТАЛЬДЕГИДА С КОМПОНЕНТАМИ ХРОМАТИНА ЯДЕР КЛЕТОК ПЕЧЕНИ КРЫС

НИИ неврологии и психиатрии, Харьков

Алкоголь оказывает многостороннее неблагоприятное действие на биохимические системы организма. Интоксикация этанолом вызывает существенные нарушения процессов трансляции и транскрипции. Угнетаются активирование и транспорт аминокислот в цитоплазме клеток, связанные с изменением функции аминоацил-РНК-синтетаз, наблюдается дезагрегация полисом до мономерных единиц, изменяется синтез хроматиновых белков и всех классов РНК [4, 8]. Есть основания предполагать, что при алкоголизации нарушаются структура и функция генома клеток. Вопрос о том, этанол или продукты его превращения играют ведущую роль в действии на генетический аппарат клеток, остается невыясненным. В связи с этим была поставлена задача сравнить взаимодействие этанола и ацетальдегида с ядерными структурами клеток в условиях применения экзогенных препаратов и изменения концентраций эндогенного ацетальдегида.

М е т о д и к а

В опытах использовали 80 беспородных крыс-самцов массой 200—250 г. Ядра хроматин выделяли из клеток печени по методу [1]. Хроматин, диссоциированный в 0,1 М натрийфосфатном буфере (НФБ) pH 8,0, который содержал 5 М мочевины и 2 М NaCl, фракционировали хроматографией на гидроксилантате [1]. Гистоны элюировали исходным буфером, фракцию негистоновых белков (НГБ) — 0,05 М НФБ, который содержал 5 М мочевины и 2 М NaCl. Остаточный ДНК-белковый комплекс (ОДБК) хроматина получали элюцией 0,3 М НФБ pH 6,8. Собранные фракции хроматиновых белков, а также материал карноплазмы диализовали в течение 1 сут против дистиллированной воды. Солевой раствор для отмывки белков и рибонуклеопротеидов ядерного сока, а также среда для инкубации ядер в опытах *in vitro* содержали ингибиторы протеолиза — 5 мМ бисульфит натрия и 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторид. Все операции по выделению ядер и хроматина проводили при температуре 4 °С.

Гидролиз белков проводили проназой. Для этого ОДБК суспендировали в стандартном солевом растворе (0,15 М NaCl — 0,015 М цитрат натрия) pH 7,4 и добавляли предварительно инкубированный в течение 30 мин

при 37 °С раствор фермента (200 мкг/мг ДНК, 100 мкг/мл суспензии) [2]. Суспензию выдерживали 1 ч при 37 °С. После этого добавляли равный объем смеси хлороформ — изоамиловый спирт (24 : 1), встряхивали 10 мин и центрифугировали. Денатурированные белки (в том числе проназа) формировали осадок на границе раздела водной и хлороформной фаз. Водную фазу собирали и обработку хлороформом повторяли до исчезновения осадка в промежуточном слое.

Одна из групп животных за 2 ч до начала исследования получала этанол — 3 г на 1 кг массы тела (20% раствор, внутрибрюшинно), другая — такие же дозы этанола в течение 15 дней. Указанные дозы этанола близки к наиболее часто используемым при исследовании экспериментального алгоритма и характеризуются как дозы средней токсичности (половина полудетальной дозы) [5]. Время начала эксперимента соответствовало наибольшей концентрации этанола в крови после внутрибрюшинного введения его [9]. Контрольным животным вводили физиологический раствор. Увеличение содержания эндогенного ацетальдегида достигалось ингибированием альдегиддегидрогеназы (АлДГ) тетрамом, который животные получали внутрибрюшинно (200 мг на 1 кг массы тела) в суспензии 1,5% крахмального геля. С целью эффективного ингибирования АлДГ тетрамом вводили 3 раза ежедневно. Последнюю инъекцию препарата животные получали за сутки перед введением меченого этанола [10].

Опыты с меченым этанолом и ацетальдегидом выполняли в 3 отдельных постановках экспериментов: 1) взаимодействие этих препаратов с белковыми компонентами хроматина *in vivo* исследовали после внутрибрюшинного введения за 2 ч до начала эксперимента. (1,2-¹⁴C)этанол вводили из расчета 4 МБк на 100 г массы тела, (1,2-¹⁴C)ацетальдегид — 2,3 МБк на 100 г массы тела. Радиоактивность выражали в распадах в 1 мин на 1 мг белка каждой исследованной фракции; 2) динамику связывания ацетальдегида с белками ядерных структур исследовали в условиях инкубации изолированных ядер клеток печени с (1,2-¹⁴C)ацетальдегидом, который добавляли в инкубационную среду из расчета 0,03 МБк на 1 мг ДНК. Ядра инкубировали при 37 °С в течение 10, 30, 60 и 180 мин в среде следующего состава: 20 мМ трис-HCl-буфер pH 7,5, 20% глицерин, 2,5 мМ KCl, 3 мМ MgCl₂. Далее для удаления несвязавшейся метки ядра трижды промывали 0,25 М раствором сахарозы. После получения белков хроматина регистрировали суммарную радиоактивность каждой фракции. Значение этого показателя наглядно иллюстрировало временную кинетику распределения радиоактивной метки среди белков ядерных структур; 3) в третьей постановке экспериментов изучали связывание меченых этанола и аце-

Таблица 1

Действие тетурама на связывание радиоактивной метки с компонентами хроматина и кардиолазмы ядер клеток печени крыс после введения ^{14}C -этанола (в расч. мин на 1 мг белка $\cdot 10^{-3}$)

Условия опытов	Гистоны	Негистоно- вые белки	Остаточный ДНК-белковый комплекс	Кардиолазма
Без предварительной алкоголизации: контроль	$2,0 \pm 0,1$	$8,3 \pm 1,7$	$15,7 \pm 3,0$	$4,7 \pm 1,1$
опыт	$7,2 \pm 0,6^*$	$14,1 \pm 0,6^*$	$32,1 \pm 4,8^*$	$6,3 \pm 0,5$
Однократное введение нерадиоактивного этанола: контроль	$1,8 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,2$	$9,3 \pm 0,6$	$1,7 \pm 0,1$
опыт	$3,4 \pm 0,4^*$	$4,7 \pm 0,2^*$	$13,9 \pm 1,2^*$	$2,3 \pm 0,1$
Алкоголизация в течение 15 сут: контроль	$3,7 \pm 0,1$	$14,8 \pm 0,3$	$23,6 \pm 0,6$	$7,1 \pm 0,3$
опыт	$8,0 \pm 0,3^*$	$15,0 \pm 1,0$	$30,7 \pm 2,7$	$6,9 \pm 0,2$

Примечание. 1. Время экспозиции ^{14}C -этанола 2 ч. 2. В каждой постановке экспериментов значение радиоактивности в контроле представляет собой величину связывания ^{14}C -этанола в отсутствие инъекций тетурама. «Опыт» — величина связывания этанола на фоне действия тетурама. 3. Нерадиоактивный этанол — 3 г на 1 кг массы тела. 4. Звездочка — изменение статистически значимо по сравнению с контролем.

талядегида с частицами изолированного хроматина. Для этого препарат хроматина, суспендированный в деионизованной воде, выдерживали 30 мин при 10°C с 66 МБк на 1 мг ДНК ^{14}C -этанола (100 ммоль/л). Ацетальдегид (100 ммоль/л) добавляли в количестве 0,09 МБк на 1 мг ДНК. После инкубации с мечеными препаратами несвязавшуюся метку удаляли многократным переосаждением хроматина 0,14 М раствором NaCl и диализом против дистиллированной воды. Далее собирали пробу для регистрации общей радиоактивности образцов. Радиоактивность выражали в распадах в 1 мин на 1 мг ДНК. Белки хроматина фракционировали и определяли радиоактивность каждой фракции. Радиоактивность при этом выражали в распадах в 1 мин на 1 мг белка.

Концентрацию белка определяли методом [13], ДНК — по методу [11]. Радиоактивность измеряли на сцинтилляционном счетчике СБС-2 с эффективностью 33%. Статистический анализ проводили по методу Фишера — Стьюдента [6].

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что после введения интактным животным ^{14}C -этанола радиоактивная метка содержалась в кардиолазме и хроматине

ядер клеток печени (табл. 1). Среди компонентов хроматина в расчете на 1 мг белка наибольшей величиной радиоактивности характеризовался ОДБК. Менее интенсивно метка связывалась с фракцией НГБ. Промежуточной величиной радиоактивности характеризовалась кардиолазма.

Ранее было установлено, что в результате введения подопытным животным ^{14}C -ацетальдегида в сходных условиях экспериментов наблюдалось подобное распределение величины радиоактивности среди компонентов хроматина и кардиолазмы. Удельная радиоактивность прямо пропорциональна скорости синтеза хроматиновых белков: гистоны $< \text{НГБ} < \text{ОДБК}$ [8]. Как видно из табл. 2, значение относительной величины удельной радиоактивности, выраженной в процентах к сумме всех фракций, гистонов, НГБ, ОДБК и кардиолазмы после введения животным этанола и ацетальдегида было практически одинаковым. Этот факт дает основание предположить, что источником радио-

Таблица 2

Сравнение величины связывания радиоактивной метки с компонентами хроматина и кардиолазмой ядер клеток печени крыс после введения ^{14}C -этанола и ^{14}C -ацетальдегида (в % к сумме всех фракций)

Препарат	Гистоны	Негистоно- вые белки	Остаточный ДНК-белковый комплекс	Кардиолазма
Этанол	$6,4 \pm 0,3$	$27,1 \pm 1,5$	$51,2 \pm 2,3$	$15,2 \pm 0,8$
Ацетальдегид*	$5,8 \pm 0,2$	$26,0 \pm 1,4$	$52,9 \pm 2,3$	$15,3 \pm 0,9$

Примечание. 1. Экспозиция ^{14}C -этанола и ^{14}C -ацетальдегида 2 ч. 2. Звездочка — данные работы [8].

Суммарная радиоактивность структур ядра клеток печени крыс после инкубации с ^{14}C -ацетальдегидом (в расп/мин) 10^{-3}

Время инкубации, мин	Гистоны	Негистоновые белки	Остаточный ДНК-белковый комплекс	Карноплазма
10	$10,0 \pm 0,5$	$5,5 \pm 0,6$	$1,7 \pm 0,2$	$23,7 \pm 6,5$
30	$21,0 \pm 0,2^*$	$13,3 \pm 0,2^*$	$3,5 \pm 0,1^*$	$38,3 \pm 0,1$
60	$30,1 \pm 0,5^*$	$14,3 \pm 0,5^*$	$3,6 \pm 0,1^*$	$35,1 \pm 1,1$
180	$60,2 \pm 3,1^*$	$25,0 \pm 3,2^*$	$4,5 \pm 0,1^*$	$32,5 \pm 2,9^{**}$

* Изменение значимо по сравнению с начальным временем исследования.

** Изменение значимо по сравнению с максимальной величиной радиоактивности.

активности хроматина ядер клеток при введении этанола является ацетальдегид. По-видимому, действие этанола на внутриядерные структуры происходит только после его окисления в результате дегидрогеназной реакции. Это предварительное заключение подтвердилось в последующих экспериментах.

Было установлено, что ацетальдегид легко проникает в ядра клеток. Результаты, представленные в табл. 3, свидетельствуют, что уже через 10 мин инкубации ядер с ^{14}C -ацетальдегидом радиоактивная метка обнаруживалась во всех исследованных фракциях хроматина и высокомолекулярных компонентах карноплазмы. Вначале основная доля меченого вещества связывается с карноплазматическими элементами, и только к 60 мин суммарная радиоактивность белков хроматина начинает превышать уровень, характерный для карноплазмы. Кинетика связывания ацетальдегида с ядерными структурами характеризовалась следующей особенностью: радиоактивность хроматина в интервале времени 10—180 мин постепенно нарастала; в карноплазме уже через 30 мин наблюдалось максимальное значение суммарной радиоактивности, величина которой в дальнейшем несколько уменьшалась. Следует отметить, что практически весь ацетальдегид, содержащийся в карноплазме, находился в связанном состоянии с высокомолекулярными ее компонентами. На это указывал тот факт, что более 90 % радиоактивности после добавления трихлоруксусной кислоты оказывалось в осадке.

Изменяется ли уровень радиоактивности ядерных структур при введении меченого этанола в условиях, способствующих накоплению эндогенного ацетальдегида? Чтобы ответить на этот вопрос, мы блокировали АлДГ при по-

монци тетрама, который, связывая реактивную сульфгидрильную группу в каталитическом центре, выступает в качестве мощного ингибитора активности фермента. Данные о возрастании радиоактивности на фоне действия тетрама свидетельствовали бы в пользу предположения о том, что с хроматином радиоактивная метка связывается в составе ацетальдегида, а не этанола. Как следует из табл. 1, влияние тетрама действительно приводило к существенному увеличению (почти вдвое) удельной радиоактивности всех исследованных фракций хроматина. Заметим, что наиболее выраженный эффект тетрама мы наблюдали у интактных животных. Однако действие его на фоне острой и хронической алкоголизации также было вполне отчетливым. Увеличение суммарной радиоактивности ядерных структур по сравнению с контролем составляло 95, 41 и 23% соответственно. Поскольку ингибирование АлДГ препятствует окислению ацетальдегида, надо полагать, что в присутствии тетрама должна уменьшаться концентрация образовавшегося из этанола ацетил-КоА. Таким образом, полученные данные можно рассматривать также в качестве косвенного свидетельства независимости возрастания включения метки в хроматин от изменения количества этого метаболита этанола.

Ранее было показано, что ацетальдегид образует ковалентные связи с белками хроматина, возникающие в результате неферментативных реакций. Механизм транспорта ацетальдегида в ядра клеток также характеризуется отсутствием стадий, катализируемых ферментами, и, вероятно, осуществляется путем простой диффузии [7, 10]. Это послужило основанием для исследования взаимодействия этанола и ацетальдегида

с изолированным хроматином. Концентрация ацетальдегида в этих экспериментах соответствовала значениям, которые наблюдаются в тканях организма при введении невысоких доз этанола [12].

По нашим данным, после инкубации хроматина в растворе, содержащем 100 мкмоль/л ацетальдегида, исследованные образцы характеризовались высоким уровнем радиоактивности. После удаления несвязавшейся метки оказалось, что радиоактивность хроматина составляла 30 175 расп/мин на 1 мг ДНК. Таким образом, *in vitro* с хроматином связывается около 1% внесенного в инкубационную среду ацетальдегида. Радиоактивную метку содержали все исследованные компоненты хроматина: гистоны, НГБ, ОДБК (1832, 6077 и 8385 расп/мин на 1 мг белка соответственно). В отличие от этого в опытах с ^{14}C -этанолом *in vitro*, даже если его концентрация на 3 порядка превышала количество ацетальдегида (100 ммоль/л), радиоактивная метка в составе хроматина не обнаруживалась. Радиоактивность гистонов, НГБ и ОДБК не отличалась от фоновой. Осаждение хроматина из инкубационной среды, содержащей ^{14}C -этанол, приводило к тому, что 99,9% радиоактивности оказывалось в надосадочной жидкости. Ее величина соответствовала значению внесенного в инкубационную среду меченого углерода в составе этанола — $2,8 \cdot 10^{10}$ расп/мин.

Таким образом, модификация хроматина и связанные с этим нарушения структуры и функции генетического аппарата клеток, которые наблюдаются в условиях этаноловой интоксикации, преимущественно обусловлены действием ацетальдегида, а не прямыми эффектами этанола. Это согласуется с данными о свойстве альдегидов вызывать образование межмолекулярных белок-белковых сшивок в хроматине [7]. Связывание ацетальдегида в составе хроматина с белковыми компонентами подтверждается результатами опытов по обработке меченого ^{14}C -альдегидом ДНК-белкового комплекса протеолитическими ферментами. Его удельная радиоактивность в зависимости от времени экспозиции ядер в присутствии ацетальдегида варьировала в пределах 225 ± 23 — 581 ± 36 расп/мин на 1 мг ДНК. Между тем оказалось, что после инкубации с проназой радиоактивность в исследованных образцах практически отсутствовала.

Как уже упоминалось, величина прироста радиоактивности хроматина после введения ^{14}C -этанола на фоне действия тетурама была различной у интактных животных и при алкоголизации их. Ее значение уменьшалось в случае однократного введения этанола по сравнению с таковым у интактных животных и было еще меньше в условиях хронической алкоголизации (см. табл. 1). Анализируя эти факты, следует принимать во внимание разведение радиоактивной метки в составе этанола и образованного из него ацетальдегида эндогенными нерадиоактивными продуктами. Вместе с тем можно предположить, что менее отчетливый эффект тетурама в условиях длительной алкоголизации обуславливается изменением активности метаболизирующих этанол ферментов — алкогольдегидрогеназы (АДГ) и АлДГ. Первые этапы этаноловой интоксикации характеризуются индукцией АДГ, что приводит к первичному накоплению ацетальдегида. В дальнейшем наблюдается снижение активности АДГ и, что особенно существенно, значительное угнетение АлДГ, связанное с прямым действием этанола и ацетальдегида, а также с появлением в клетках печени эндогенных ингибиторов активности ферментов. Это вызывает вторичное, более существенное увеличение в тканях концентрации ацетальдегида [3]. По этой причине на фоне низкого уровня активности АлДГ в условиях хронической алкоголизации ингибирующее действие тетурама будет менее выраженным по сравнению с таковым у интактных животных. Надо полагать, что высокая концентрация ацетальдегида при длительной этаноловой интоксикации у животных способствует заполнению мест его связывания в хроматине и, следовательно, приводит к уменьшению взаимодействия радиоактивного метаболита по сравнению с таковым у животных, предварительно не получавших этанола.

Полученные результаты свидетельствуют о взаимодействии ацетальдегида с ядерными структурами, согласуются с данными о важной роли его в патогенезе этаноловой интоксикации и способствуют, таким образом, выяснению механизмов действия этанола на генетический аппарат клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Божко Г. Х., Доманский Н. Н., Пунда Н. Г., Шелестин В. А. // Укр. био-

- хим. журн. — 1978. — Т. 50, № 5. — С. 621—626.
2. Брыков В. А., Вольфсон В. Г., Шатренко Е. Г., Воробьев В. И. // Молек. биол. — 1978. — № 6. — С. 1299—1311.
 3. Кершенгольц Б. Н., Алексеев В. Г., Гаврилова Е. М., Ли Н. Г. // Вопр. мед. химии. — 1985. — № 1. — С. 47—51.
 4. Ткаченко В. В., Пащенко С. З. О некоторых молекулярно-биологических и генетических аспектах алкоголизма. — М. — 1981.
 5. Успенский А. Е. // Токсикология. — М. — 1984. — Т. 13. — С. 6—56.
 6. Фишер А. А. Статистические методы исследования: Пер. с англ. М. — 1958.
 7. Хоменко Е. И., Божко Г. Х. // Докл. АН УССР. Сер. Б. — 1983. — № 1. — С. 72—75.
 8. Хоменко Е. И., Божко Т. Х. // Укр. биохим. журн. — 1984. — Т. 56, № 2. — С. 191—194.
 9. Bloom F., Lad P., Pittman Q., Rogers J. // Brit. J. Pharmacol. — 1982. — Vol. 75, № 1. — P. 1—22.
 10. Brien J. F., Loomis C. W. // Canad. J. Physiol. — 1983. — Vol. 61, № 1. — P. 1—22.
 11. Dicshe L., Shetles L. B. // J. biol. Chem. — 1948. — Vol. 175, № 7. — P. 595—603.
 12. Eriksson C. J., Sippel H. W. // Biochem. Pharmacol. — 1977. — Vol. 26, № 1. — P. 241—247.
 13. Miller G. L. // Analyt. Chem. — 1959. — Vol. 31, № 5. — P. 964—966.

Поступила 07.04.87

УДК 612.353 + 612.35.014.21-06:612.349.7.0181:612.66/67

Л. М. Мажуль, С. М. Якубовский, С. С. Самбурский,
Г. Г. Егупкин, Г. Г. Гацко

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ ИНСУЛИНОМ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МЕМБРАН ПЕЧЕНИ

Сектор геронтологии АН БССР, Минск

Гормональная регуляция метаболизма зависит от ряда факторов, среди которых важную роль играет структурно-функциональное состояние мембран. Одним из основных механизмов повреждения мембранных структур клетки является перекисное окисление липидов (ПОЛ). Это связано с тем, что 40% структурных липидов составляют ненасыщенные жирные кислоты (ННЖК) с большим числом двойных связей [6]. Последние и являются субстратами ПОЛ. Появление перекисных групп в липидах оказывает влияние на связи липидов и белка в мембране, что сопровождается изменением ее физико-химических свойств [3]. В связи с этим изменяется и активность ферментов мембран, что в свою очередь приводит к нарушению активного транспорта и клеточного ме-

INTERACTION OF ETHANOL AND ACETALDEHYDE WITH CHROMATIN COMPONENTS IN RAT LIVER CELL NUCLEI

G. Kh. Bozko, E. I. Khomenko

Institute of Neurology and Psychiatry, Kharkov

Interaction of ethanol and acetaldehyde with structures of rat liver cells nuclei was studied in vivo and in vitro using labelled compounds. After injection of ^{14}C -ethanol and ^{14}C -acetaldehyde into control and alcohol-consuming animals the radioactivity was found in carioplasm, non-histone proteins and residual DNA-protein complex. Relative value of specific radioactivity of all the chromatin components studied was practically similar after administration of either ethanol or acetaldehyde. The effect of such aldehyde dehydrogenase inhibitor as teturam led to a significant increase of the label incorporation into chromatin proteins. Acetaldehyde was shown to bind intensively with the isolated chromatin matrix. At the same time, radioactivity was not found in chromatin after incubation with labelled ethanol. The data obtained suggest that alterations in structure and functions of genetic cell apparatus under conditions of ethanol intoxication occurred mainly due to the action of acetaldehyde as a result of ethanol reduction

таболизма. Вышеназванные процессы, возможно, играют важную роль в реализации биологических эффектов инсулина.

Задача настоящего исследования состояла в изучении влияния инсулина на физико-химические свойства плазматических мембран печени молодых и старых крыс.

Опыты проведены на молодых (5—6 мес) и старых (24—26 мес) белых крысах-самцах. Плазматические мембраны печени выделяли по методу [8]. Текучесть плазматических мембран оценивали по поляризации флуоресценции 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриена. Измерение поляризации флуоресценции проводили на спектрофлуориметре SLM (США) при длине волны возбуждения λ 360 нм и эмиссии λ 430 нм. Анизотропию флуоресценции рассчитывали по формуле:

$$P_s = \frac{2p}{3-p}$$

Таблица 1

Анизотропия флюоресценции 1,6-дифенил-1, 3,5-гексатриена в плазматических мембранах печени крыс разного возраста ($\bar{X} \pm S_x$)

Серия опытов	Молодые крысы	Старые крысы
Контроль (n = 6)	0,279 \pm 0,003	0,249 \pm 0,004**
Инсулин (n = 6)	0,289 \pm 0,002*	0,252 \pm 0,003

* $p < 0,05$ между интактными и подопытными животными.

** $p < 0,05$ между молодыми и старыми животными.

где p — поляризация флюоресценции 1,6-дифенилгексатриена. Липиды экстрагировали методом [9], холестерин определяли по методу [12], фосфолипидный фосфор — методом [11], белок — методом [10]. О состоянии процесса ПОЛ судили по содержанию малонового диальдегида (МДА) [4]. Анализ жирных кислот после их метилирования проводили методом газожидкостной хроматографии на хроматографе «Хром-5» (ЧССР). Идентификацию жирных кислот осуществляли с помощью соответствующих стандартов. Содержание жирных кислот оценивали по площади жирно-кислотных пиков [1].

Модель гиперинсулинемии воспроизводили внутрибрюшинным введением инсулина в дозе 2 ЕД на 100 г массы тела за 1 ч до депривации.

Результаты обрабатывали методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований обнаружены возрастные изменения физико-химических свойств плазматических мембран печени. У старых контрольных животных по сравнению с молодыми отмечается снижение анизотропии флюоресценции на 10%, свидетельствующее об увеличении с возрастом текучести мембран (табл. 1). Одновременно происходит изменение химического состава мембран. Уменьшается содержание ННЖК во фракции как липидов, так и фосфолипидов (табл. 2). Снижается молярное отношение холестерина/фосфолипидный неорганический фосфат P_n за счет уменьшения содержания холестерина, количество фосфолипидов в процессе старения не изменяется (табл. 3). Поскольку холестерин и ННЖК являются субстратами ПОЛ, изменение их содержания сказывается и на скорости ПОЛ. Как показано в табл. 3, при старении снижается содержание МДА в препаратах мембран, что может свидетельствовать об ослаблении интенсивности этого процесса с возрастом.

Наблюдаемые структурно-функциональные сдвиги могут быть причиной возрастного изменения гормонрецепторного взаимодействия, а также чувствительности мембраносвязанных ферментов к их субстратам. Для ферментов,

Таблица 2

Жирно-кислотный состав общих липидов плазматических мембран печени крыс разного возраста (в % к общим липидам) ($\bar{X} \pm S_x$)

Жирные кислоты	Молодые крысы		Старые крысы	
	контроль	инсулин	контроль	инсулин
C _{12:0}	0,1 \pm 0,03	0,1 \pm 0,02	0,1 \pm 0,05	0,1 \pm 0,03
C _{14:0}	0,3 \pm 0,02	0,2 \pm 0,01	0,2 \pm 0,04	0,1 \pm 0,01
C _{15:0}	0,1 \pm 0,05	Следы	0,1 \pm 0,01	Следы
C _{16:0}	38,1 \pm 1,34	45,6 \pm 1,52**	0,5 \pm 0,02	38,1 \pm 1,35
C _{16:1}	0,5 \pm 0,01	0,2 \pm 0,01***	0,5 \pm 0,02	0,3 \pm 0,02
C _{18:0}	23,7 \pm 1,47	20,1 \pm 0,56	24,7 \pm 1,12	35,4 \pm 1,64***
C _{18:1}	6,4 \pm 0,31	12,3 \pm 0,36***	4,1 \pm 0,24***	5,9 \pm 0,41***
C _{18:2}	12,3 \pm 0,67	5,6 \pm 0,45***	12,4 \pm 0,79	4,5 \pm 0,37***
C _{20:4}	18,5 \pm 0,91	15,9 \pm 0,31*	17,8 \pm 0,93	15,0 \pm 1,35
НЖК	62,3	66,0	65,2	73,7
ННЖК	37,7	34,0	34,8	26,3
ННЖК/НЖК	0,61	0,52	0,53	0,36

Примечание. НЖК — насыщенные жирные кислоты. Здесь и в табл. 3 одна звездочка — $p < 0,05$, две — $p < 0,01$, три — $p < 0,001$.

Содержание холестерина, фосфолипидов (в нмоль на 1 мг белка) и МДА (в нмоль МДА на 1 мг белка) в плазматических мембранах печени крыс разного возраста ($\bar{X} \pm S_x$)

Серия опытов	Молодые крысы				Старые крысы			
	фосфо-липидный Р _н	холестерин	холестерин/фосфо-липидный Р _н	МДА	фосфо-липидный Р _н	холестерин	холестерин/фосфо-липидный Р _н	МДА
Контроль Инсулин	547±46 616±39	162±13 279±53*	0,296±0,017 0,423±0,058*	13,85±2,06 20,80±2,93*	522±8 602±18	113±7** 156±11	0,216±0,016** 0,266±0,021	4,82±1,7** 8,77±1,7*

локализованных на поверхности мембран, снижение микровязкости мембран приводит к снижению сродства фермента к субстрату, а увеличение микровязкости — к его повышению. Обратная ситуация наблюдается для ферментов, локализованных внутри липидного бислоя мембраны [7].

Возрастные структурно-функциональные изменения мембран отражаются на динамике изучаемых показателей при экспериментальной гиперинсулинемии.

Внутрибрюшинное введение инсулина приводит к повышению анизотропии флюоресценции, что свидетельствует об уменьшении текучести мембран. При этом увеличивается молярное отношение холестерина / фосфолипидный Р_н преимущественно за счет увеличения содержания холестерина. Описанные изменения достоверны у молодых животных, у старых они менее выражены, отмечается лишь однонаправленная тенденция.

Для изучаемой модели также характерна взаимосвязь между изменением структуры мембран и скоростью окисления липидов. Под влиянием инсулина происходит достоверное увеличение содержания продуктов ПОЛ в препаратах мембран печени, причем у молодых содержание МДА увеличивается на 50%, а у старых — на 70%. Активация процесса ПОЛ сопровождается резким снижением содержания полиненасыщенных жирных кислот, являющихся субстратами ПОЛ, особенно выраженным у старых животных.

Необходимо отметить, что реакция плазматических мембран на введение инсулина связана с возрастом животных. В более интенсивно обменивающихся мембранах молодых крыс быстрее происходят структурные изменения при действии стрессорного фактора. Они носят адаптационный характер. Высокое содержание продуктов ПОЛ у старых крыс при этом является, по-видимому, следствием снижения активности антиоксидантных систем организма и

может свидетельствовать о выраженном повреждающем влиянии высоких доз инсулина на мембраны.

Полученные результаты еще раз подтверждают положение о том, что в организме существует система регуляции метаболизма, основанная на взаимосвязи структурно-функционального состояния мембран и скорости ПОЛ. Последовательность возникающих изменений до настоящего времени является предметом предположений и дискуссий. Так, одни авторы [5] считают, что перестройка физической структуры мембран обусловлена окислением ННЖК и выходом их из фосфолипидного бислоя, благодаря чему доля ННЖК в бислое возрастает. Другие [2] высказывают предположение, что первичны изменения микроокружения мембранных рецепторов, вследствие чего изменяется их свойство связывать биологически активные вещества. Далее происходят структурные перестройки мембран, благодаря чему изменяются скорость ПОЛ, липидный состав мембран и функционирование всей мембраны. Однако независимо от последовательности возникающих изменений структурные перестройки мембран и изменение в них интенсивности свободнорадикальных процессов способствуют переходу всех клеточных структур на новый метаболический уровень.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берцифилд Т., Сторрс Э. Газовая хроматография в биохимии: Пер. с англ. — М., 1964.
2. Бурлакова Е. Б., Хохлов А. П. // Биол. мембраны. — 1985. — Т. 2, № 6. С. 557—565.
3. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М., 1972.
4. Гаврилов В. Б., Мажудь Л. М., Гацко Г. Г., Конев С. В. Способ количественного определения продуктов перекисного окисления в сыворотке крови // А. с. 1179225 СССР
5. Деев А. И., Добрецов Т. Е., Владимиров Ю. А. // Вопр. мед. химии. 1977. — № 4. — С. 545—549.

6. Плацер З., Видлакова М., Кутела О. // Чехослов. мед. обзор. — 1970. Т. 16. — № 1. — С. 30—41.
7. De Melian E. M., Massa E. M. // FEBS Lett. — 1978. — Vol. 92, № 1. — P. 143—146.
8. Dorling P. R., Page R. N. // Biochim. biophys. Acta. — 1973. — Vol. 318. — P. 33—34.
9. Folch Z., Zies M., Sloane-Stanley G. M. // J. biol. Chem. — 1957. — Vol. 226. — P. 497—509.
10. Markwell M. A., Haas S. H., Sieber Z. Z., Tolbert N. E. // Analyt. Biochem. — 1978. — Vol. 87, № 1. — P. 206—210.
11. Vaskovsky V. E. // J. Chromatogr. — 1975. — Vol. 114. — P. 129—141.
12. Zlatkis A., Zak B. // Analyt. Biochem. — 1969. — Vol. 29, № 1. — P. 143—148.

Поступила 15.11.86

AGE PECULIARITIES IN THE EFFECT OF INSULIN ON PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF LIVER CELL MEMBRANES

L. M. Mazhul, S. M. Yakubovsky, S. S. Sam-bursky, G. G. Egutkin, G. G. Gatsko

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

Alterations in physico-chemical properties of rat liver plasmatic membranes induced by insulin were shown to be age-dependent. The experiments showed also that high doses of the hormone impaired distinctly the membranes in old animals. The relationship between structural alterations in plasmatic membranes and the rate of lipid peroxidation was observed.

УДК 612.351.11+612.352.31.014.46:615.277.3:546.92

Л. В. Резник, Е. М. Мязина, Ю. В. Наточин

СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКА И АКТИВНОСТЬ Na, K-АТФазы В ТКАНИ ПОЧКИ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ ЦИС-ПЛАТИНЫ

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова АН СССР, Ленинград

Широкое применение цис-платины при лечении ряда форм злокачественных опухолей показало, что одним из наиболее частых побочных эффектов является нефротоксичность [3]. В числе возможных причин развивающейся острой почечной недостаточности называют нарушение гемодинамики почки [11], ингибирование Na, K-АТФазы в клетках канальцев [2, 5], блокаду SH-групп [6], перекисное окисление липидов [10]. Очевидно, в основе дисфункции почки могут лежать повреждение отдельных сторон ее метаболизма, изменение регуляции почечной функции, деструкция ее паренхимы. Задачей настоящей работы явилось исследование тканевого содержания воды, электролитов, белков в почке и активности в ней АТФаз в процессе развития нефротоксикоза после введения цис-платины.

Методика

Опыты проведены на самках белых крыс Вистар массой 170—200 г. Животным внутривенно вводили растворенную в 0,9% растворе NaCl цис-платину в дозе 5 мг на 1 кг массы тела. В ряде опытов до введения цис-платины животным внутривенно вводили хлористый холин в дозе 290 мг на 1 кг массы тела. Через 5 сут животных декапитировали под легкой эфирной анестезией, определяли концентрацию мочевины в сыворотке крови диацилмонооксидным методом. Кор-

ковый слой, сосочки почки и кусочки двуглавой мышцы бедра высушивали в термостате при 105 °С для определения содержания воды. В сыворотке крови и тканях почки и мышцы после озоления концентрированной азотной кислотой определяли концентрацию натрия и калия на пламенном фотометре Цейсса-111, содержание кальция и магния на атомно-абсорбционном спектрофотометре «Хита-чи» (модель 508). Активность Na, K-АТФазы измеряли в гомогенате вещества коры почки, приготовленном на среде, содержащей 0,25 М сахарозу, 5 мМ трис-HCl, 2 мМ ЭДТА и 0,15% дезоксихолата Na. Инкубационная среда содержала 100 мМ Na⁺, 20 мМ K⁺, 6 мМ Mg²⁺, 100 мМ трис-HCl pH 7,4, 0,5 мМ ЭДТА и 3 мМ динатриевой соли АТФ. Для ингибирования активности Na, K-АТФазы в инкубационную среду вносили 1 мМ оубаина. Реакция продолжалась 30 мин при 30 °С, затем ее останавливали добавлением трихлоруксусной кислоты в конечной концентрации 5%. Содержание неорганического фосфора в пробах определяли по методу [11], содержание белка — по методу [17].

Результаты и обсуждение

На 5-е сутки после введения цис-платины у крыс развивалась почечная недостаточность, наступала азотемия. В то же время концентрация электролитов в сыворотке крови изменялась мало (табл. 1). Существенные изменения наблюдались в почках, масса которых увеличивалась на 57,9% (табл. 2), что было обусловлено не только набуханием почки (табл. 3), но и большим содержанием

Концентрация мочевины и электролитов (в ммоль/л) в сыворотке крови на 5-е сутки после введения крысам 5 мг/кг цис-платины

Условия опыта	n	Мочевина	Натрий	Калий	Кальций	Магний
Контроль	9	4,76±0,22	149±1,26	6,5±0,16	2,67±0,38	0,88±0,24
Цис-платина	9	29,9±4,71*	142±0,51*	6,3±0,37	2,58±0,05	1,20±0,11
Цис-платина + холин	9	9,80±1,18*	145±1,16**	5,8±0,23	2,81±0,09	1,18±0,11

* $p < 0,001$.** $p < 0,05$.

в ней сухого вещества, которое возросло на 24,5% (см. табл. 2). Такой неожиданный результат требовал специального анализа. Определение содержания белка в сыром веществе коры почки показало, что оно снизилось по сравнению с контролем (см. табл. 2). Это было обусловлено отеком коры почки, так как при расчете на сухое вещество не наблюдалось различий в содержании белка. Следовательно, можно предположить, что при поражении почки в ней увеличивается количество углеводов или липидов. Увеличение массы почки могло также зависеть от повышения ее кровенаполнения.

Учитывая данные о преимущественном поражении цис-платиной 2-го и 3-го сегментов проксимального канальца [4], в наших опытах было изучено состояние тканей коры и внутреннего мозгового вещества почки, в котором нет проксимальных канальцев. Установлено, что кора почки набухает, содержание воды в ней возрастает на 28,6%, во внутреннем мозговом веществе количество воды, напротив, снижается (см. табл. 3). Резко изменяется содержание электролитов — при расчете на сухое вещество повышается количество натрия и практически остается постоянным уровень калия; концентрация в ткани кальция и магния не претерпевает односторонних изменений (см. табл. 3). Эти изменения содержания воды и ионов в ткани коры почки свидетельствуют о том, что происходит отек ткани, в ней возрастает количество натрия. Сопоставление электролитного состава мышцы у контрольных крыс и животных, которым вводили цис-платину, не выявило различий между ними (см. табл. 3). При этом в сыворотке крови концентрация натрия и калия остается стабильной; следовательно, сдвиги содержания натрия и калия зависят от патологических процессов, происходящих в самой почке.

К числу таких процессов можно было отнести нарушение энергоснабжения ионного транспорта, деструкцию ткани, изменение соотношения вне- и внутриклеточных жидкостей.

Определение активности АТФаз в коре почки показало, что у животных, получавших цис-платину, активность Na, K-АТФазы падает на 37,5%, Mg^{2+} -АТФазы — на 14,7% (см. табл. 2). Снижение активности АТФаз могло зависеть

Т а б л и ц а 2

Активность АТФаз и изменение содержания белка в почке после введения цис-платины

Исследуемый показатель	n	Контроль	Цис-платина
Белок			
мг на 1 г сырого вещества коры почки	10	176,7±7,0	152,2±2,7*
мг на 1 г сухого вещества коры почки	10	812,8±32,2	830,0±12,0
Масса почек			
г сухого вещества на 100 г массы тела	9	679±20,3	1067±105,6*
г сухого вещества на 100 г массы тела	7	159±4,61	198±14,0**
Масса тела в день инъекции			187±9,5
5 дней спустя	9	167±10,5	174±7,5
Na, K-АТФаза, мкмоль P_H на 1 мг белка в 1 ч	10	2,77±0,26	1,73±0,13*
Mg^{2+} -АТФаза, мкмоль P_H на 1 мг белка в 1 ч	10	4,04±0,21	3,45±0,12

* $p < 0,01$.** $p < 0,05$.

Содержание воды на 1 г сухого вещества и электролитов (в мкмоль/г) в почке и мышце после введения цис-платины

Объект исследования	n	Вода	Натрий	Калий	Кальций	Магний
Кора						
контроль	9	2,99±0,06	225,9±5,96	265,0±9,37	5,94±0,65	34,3±2,80
цис-платина	9	3,72±0,12*	304,9±10,1**	273,0±5,96	4,29±0,30***	38,0±0,42
Внутреннее мозговое вещество						
контроль	9	6,66±0,17	545,2±70,5	410,9±24,9	8,05±0,74	38,7±1,51
цис-платина	9	5,80±0,13**	525,9±5,81	355,9±1,52	7,01±0,52	39,3±2,35
Мышца						
контроль	9	3,29±0,02	78,9±3,95	483,0±15,1	2,76±0,11	15,8±0,63
цис-платина	9	3,18±0,03***	76,5±1,36	464,8±8,02	2,98±0,92	14,0±0,22

* $p < 0,001$.** $p < 0,01$.*** $p < 0,05$.

от непосредственного действия тяжелого металла на фермент в почке, а также от иных нарушений в метаболизме клеток, патологических изменений плазматических мембран, распада ткани почки. Приведенные выше данные, действительно, указывают на относительно большее угнетение активности Na, K-АТФазы, чем сдвиги содержания белка и калия в тех же частях почки. Это позволяет думать, что имеются большие резервные возможности активности транспортной АТФазы в почке, позволяющей поддерживать концентрацию калия в клетках (и тем самым в ткани), несмотря на падение ее активности более чем на 30%.

Чтобы проверить предположение о маркерном значении активности Na, K-АТФазы в генезе повреждения почки при действии цис-платины, были поставлены эксперименты с определением тех же показателей при улучшении функционального состояния почки с помощью холина. В опытах на срезах почки было показано, что органические катионы в отличие от органических анионов уменьшают накопление цис-платины [9]. В связи с этими данными были поставлены эксперименты, в которых за 40 мин до цис-платины внутрибрюшинно вводили 290 мг/кг хлористого холина. Через 5 дней концентрация мочевины в сыворотке крови была в 3 раза ниже, чем при введении одной цис-платины (см. табл. 1). Определение в ткани коры почек у этих крыс Na, K-АТФазы показало, что ее активность составляла $2,21 \pm 0,16$ мкмоль P_n на 1 мг белка в 1 ч ($n=10$) и она была до-

стоверно выше ($p < 0,05$), чем при введении одной цис-платины (см. табл. 2). Данные этих экспериментов убеждают в том, что изменение активности Na, K-АТФазы отражает степень нарушения гомеостатической функции почки при разном уровне нефротоксичности.

Таким образом, поражение почки при действии цис-платины сопровождается отеком, увеличением содержания в ней воды и натрия, возрастанием массы почки и количества в ней сухого вещества при стабильном уровне белка, уменьшением активности Na, K-АТФазы.

Механизмы внутриклеточного действия цис-платины, определяющие уменьшение скорости роста опухолевых клеток и вызывающие токсический эффект в почке, могли быть различными. В первом случае речь идет о воздействии на генетический аппарат клетки, во втором — об иных точках приложения и не только цис-платины, но и ее метаболитов. Вероятно, следует учитывать ряд последовательных звеньев в развитии нефротоксичности. Поскольку цис-платина повреждает не все типы клеток, а селективно влияет преимущественно на клетки проксимального отдела нефрона, внутреннего уха и ряда других, в то время как клетки иных частей почки, мышц не подвержены повреждению этой дозой препарата, можно думать о трофности, зависящей от поступления цис-платины именно в эти клетки. Следующий этап после проникновения в клетку — воздействие на определенные ультраструктуры клетки, химические превращения, инактивацию или удаление платины. Показано, что в клетках проксимального

канальца платина попадает в ядро, лизосомы и цитоплазму, ее депозиты постепенно накапливаются в матриксе микротелец; в то же время платина не обнаруживается в аппарате Гольджи и митохондриях [8]. Наши результаты в полной мере сопоставимы с этими данными об ультраструктурной локализации цис-платины, поскольку набухание клеток и падение активности Na,K-АТФазы могли определяться преимущественным накоплением платины в плазматических мембранах и органических компонентах цитоплазматического матрикса. Характер действия цис-платины определяется и временем после ее введения, так как наступающая репарация клеток может приводить к изоляции платины в микротельцах. Таким образом, изменения ткани почки, вызванные введением цис-платины, определяются ее действием на ряд биохимических процессов в клетке, среди которых существенное значение имеет ингибирование Na,K-АТФазы, вторичное изменение электролитного состава клетки, последующее накопление воды, вызывающее ее набухание.

Авторы благодарят П. А. Ченцова за предоставление цис-платины для проведения опытов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Baykov A. A., Avacva S. M. // Euro p J. Biochem. — 1973. — Vol. 32, № 1. — P. 136—142.
2. Daley-Gates P. T., McBrien D. C. H. // Chem. Biol. Interact. — 1982. — Vol. 40, № 3. — P. 325—334.
3. Dentino M., Luft F. C., Yum M. N. et al. // Cancer (Philad.). — 1978. — Vol. 41, № 4. — P. 1274—1281.
4. Dobyan D. C., Levi J., Jacobs C. et al. // J. Pharmacol. exp. Ther. — 1980. — Vol. 213, N 3, — P. 551—556.
5. Guarino A. M., Miller D. S., Arnold S. T. et al. // Cancer Treatm. Rep. — 1979. — Vol. 63, № 9—10. — P. 1475—1483.
6. Levi J., Jacobs C., Kalman S. M. et al. // J. Pharmacol. exp. Ther. — 1980. — Vol. 213, № 3. — P. 545—550.
7. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, № 1. — P. 265—275.
8. Makita T., Itagaki S., Ohokawa T. // Jap. J. Cancer Res. — 1985. — Vol. 76. — P. 895—901.
9. Safirstein R., Miller P., Gattenplan J. B. // Kidney int. 1984. — Vol. 25, № 5. — P. 753—758.
10. Sugihara K., Gemba M. // Jap. J. Pharmacol. — 1986. — Vol. 40, № 2. — P. 353—355.
11. Winston J. A., Safirstein R. // Amer. J. Physiol. — 1985. — Vol. 249, № 4. — P. F490—F496.

Поступила 16.12.86

PROTEIN CONCENTRATION AND ACTIVITY OF Na,K-ATPASE IN RAT RENAL TISSUE AFTER CISPLATINUM ADMINISTRATION

L. V. Reznik, E. M. Myazina, Yu. V. Nalochin
I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Leningrad

Concentrations of protein and electrolytes as well as activity of Na,K-ATPase were studied in renal tissue of rats within 5 days after cisplatin administration (5 mg/kg of body mass, intraperitoneally). There were a significant reduction in the ATPase activity and an increase in water content and sodium concentration in renal cortex tissue, while K^+ , Ca^{2+} and Mg^{2+} were unaltered. At the same time, concentration of electrolytes did not shift in blood serum and muscle tissue. After intraperitoneal administration of choline chloride at a dose of 290 mg/kg of body mass within 40 min before the cisplatin treatment less distinct alterations were observed in the urea content and in the Na,K-ATPase activity.

УДК 616.831.254 + 616.839.191.-008.93:577.121.7

В. А. Кашуба, Н. Ф. Трусова, Э. Н. Лаврова

СОСТОЯНИЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА В СТРУКТУРАХ ЗРИТЕЛЬНОГО АНАЛИЗАТОРА И НЕЙРОНАХ СИМПАТИЧЕСКОГО ГАНГЛИЯ ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ ГЛАЗА НИЗКОИНТЕНСИВНЫМ ИНФРАКРАСНЫМ ЛАЗЕРНЫМ ИЗЛУЧЕНИЕМ БЛИЖНЕЙ ОБЛАСТИ СПЕКТРА

Московский медицинский стоматологический институт им. Н. А. Семашко

В последние годы в медицине используют низкоинтенсивное инфракрасное лазерное излучение ближней области

спектра. Механизм положительных результатов лечения, а также характер биоэффектов, возникающих у лиц, про-

фессионально контактирующих с таким излучением, практически не изучены [2, 3], что обуславливает актуальность исследований в этом направлении.

В целях изучения особенностей действия на организм данного вида излучения исследовали состояние окислительно-восстановительных процессов по активности ферментов: лактатдегидрогеназы (ЛДГ), глутаматдегидрогеназы (ГлДГ) сукцинатдегидрогеназы (СДГ), супероксиддисмутазы (СОД), глутатионпероксидазы (ГПО). Объектами исследования были глаз, зрительная кора (учитывая чувствительность органа зрения к излучению) и верхний шейный симпатический ганглий. Анализ полученных эффектов позволил выяснить возможность непосредственного, прямого действия низконтентивного лазерного излучения на мозг через глаз. Раннее таких исследований не проводилось.

Методика

Опыты проводили на кроликах породы шиншилла массой 2,5—3,5 кг. Глаз (правый) облучали полупроводниковым инжекционным лазером типа 32ДЛ-103 на арсениде галлия, генерирующем излучение длиной волны 0,80—0,87 мкм; расходимость пучка составила 50°, мощность 2,6 мВт. Плотность потока мощности излучения на уровне роговицы равнялась $10,5 \cdot 10^{-3}$ Вт/см². Оптические оси лазерного луча и глаза совпадали. Расстояние между центром роговицы и местом выхода излучения составляло 5 мм, длительность облучения — 5 и 20 мин. Применяемые параметры излучения не вызывали болевой и оборонительной реакций, в связи с чем животные во время облучения находились в естественном состоянии, без фиксации. Кроликов декапировали через 1 ч после облучения. Исследованию подвергали оба глаза, кору мозга обоих больших полушарий и верхние шейные ганглии.

Биохимические исследования проводили на 27 кроликах. В энуклеированных глазах (облученных и противоположных) вырезали роговицу по лимбу и отслаивали сетчатку. Путем соскоба по методу [14] получали эпителий и эндотелий роговицы, который гомогенизировали с 9-кратным, а целую роговицу, сетчатку и кусочки мозга — с 19-кратным объемом 0,15 М раствора хлорида натрия. В полученной после центрифугирования гомогената надосадочной жидкости определяли активность ЛДГ по методу [11], ГлДГ — по [15], лактат — по [12], СОД — методом [10], ГПО — по [9].

Цитохимические исследования проводили на 16 кроликах. Кусочки коры мозга контрольного и облученного животных монтировали на одном блоке. Применяли свежемороженые криостатные срезы. ЛДГ и ГлДГ выявляли по [5], СДГ — по [13]. Количественный цитохимический анализ производили с помощью зондового цитофотометра (на базе люам-ИЗ). Активность ферментов оценивали

в условных единицах оптической плотности.

Результаты подвергали статистической обработке с использованием критерия Стьюдента. Гистологические срезы коры мозга и симпатического ганглия окрашивали гематоксилином и эозином. Применяли также нейрогистологический метод Ниссля, как описано в работе [1].

Результаты и обсуждение

Как показали результаты исследования, в эпителии роговицы (т. е. в структуре первой, контактирующей с излучением) через 1 ч после 5-минутного облучения глаза активность ЛДГ заметно снижалась; $p < 0,001$ (рис. 1). В эндотелии роговицы и сетчатке отмечена лишь тенденция к снижению активности этого фермента. Угнетение активности ЛДГ сопровождалось снижением содержания лактата в роговице и сетчатке ($p < 0,001$).

В тех же условиях (см. рис. 1) активность ГлДГ в эпителии роговицы увеличивалась ($p < 0,05$). Несколько возрас- тала она в эндотелии роговицы и

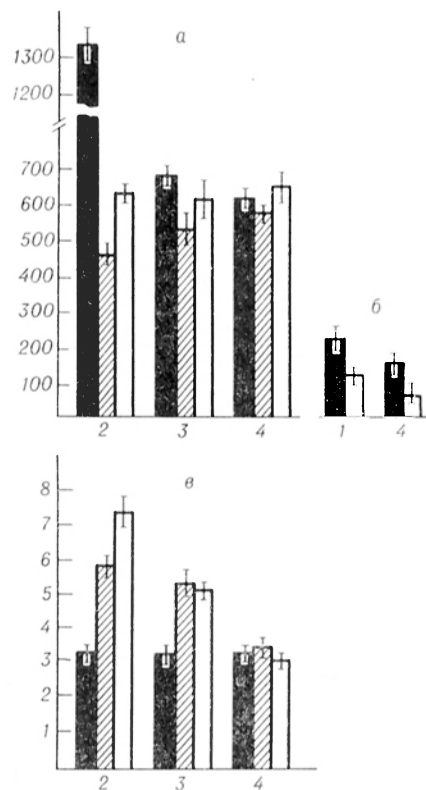


Рис. 1. Активность ЛДГ (а) и ГлДГ (б; в мкмоль на 1 г в 1 мин), концентрация лактата (в, в нмоль/г) в тканях животных — интактных и подвергнутых лазерному облучению. 1 — роговица; 2 — эпителий и 3 — эндотелий; 4 — сетчатка. Темные столбики — интактные животные (контроль), заштрихованные — животные, облученные 5 мин, светлые — животные, облученные 20 мин.

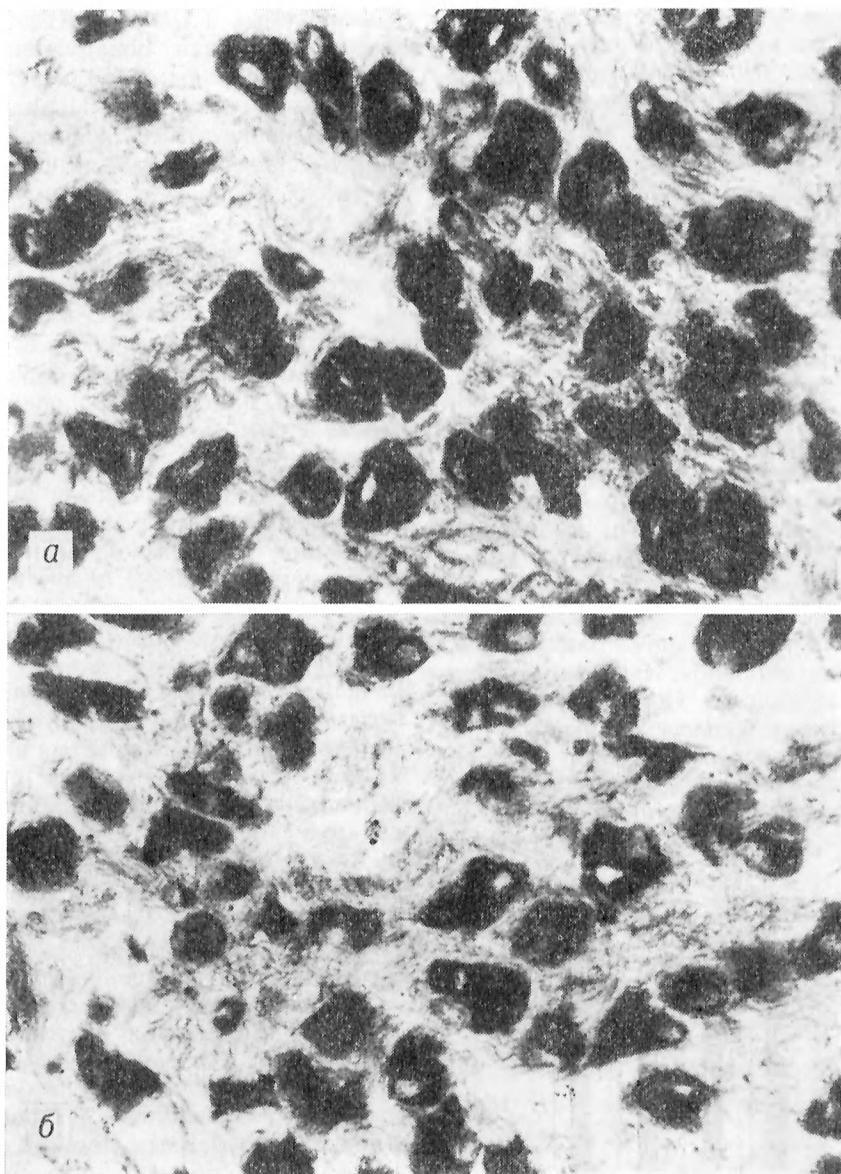


Рис. 2. Влияние лазерного излучения на активность ЛДГ.
 а — ЛДГ в нейронах верхнего шейного ганглия контрольного кролика. Ув. 180; б — уменьшение интенсивности окрашивания на ЛДГ в нейронах верхнего шейного ганглия кролика при 20-минутном воздействии на глаз низкоинтенсивного лазерного ИК-излучения. Ув. 180.

почти не изменялась в сетчатке. Следует отметить, что описанные изменения в такой же мере обнаруживались в противоположном, необлученном глазе.

После 20-минутного облучения количественно и качественно обнаруживали практически те же эффекты, что и после 5-минутного воздействия. Иными словами, полученные эффекты незначительно зависели от длительности облучения.

В нейронах зрительной коры обоих полушарий отмечали аналогичные изме-

нения активности ферментов. По данным количественного цитохимического анализа, через 1 ч после облучения глаза в течение 5 мин активность ЛДГ в этих клетках снижалась до $0,10 \pm 0,01$ против $0,15 \pm 0,06$ в контроле ($p < 0,01$). Активность ГлДГ возрастала с $0,12 \pm 0,008$ до $0,16 \pm 0,008$ ($p < 0,01$), а СДГ — с $0,06 \pm 0,006$ до $0,13 \pm 0,008$ ($p < 0,01$). Интересно отметить, что в нейронах верхних симпатических ганглиев обнаружилось та же закономерность — снижение активности ЛДГ с $0,24 \pm 0,014$ в

контроле до $0,16 \pm 0,01$ в опыте ($p < 0,05$; рис. 2). При этом активность ГлДГ повышалась до $0,15 \pm 0,008$ опт. ед. против $0,081 \pm 0,007$ в контроле ($p < 0,05$) и СДГ — до $0,12 \pm 0,006$ против $0,08 \pm 0,006$ ($p < 0,05$).

Характерно, что увеличение длительности облучения до 20 мин и в этих опытах также не привело к усилению эффектов.

При микроскопическом изучении гистологических срезов коры мозга отмечено, что через 1 ч после 5 и 20 мин облучения глаза в зрительной коре при хорошем кровенаполнении сосудов, правильности клеточных пластин и нормальной структуре подавляющего числа нейроцитов имели место явления периваскулярного и перинеллюлярного отеков, более выраженные при 20-минутном облучении. Отдельные клетки были в состоянии острого набухания. Отмечен частичный хроматоллиз небольшого числа нейронов, выявлены гиперхромные нейроны. После 20-минутного воздействия большее количество нейронов находилось в состоянии тигролиза. Характерно также уменьшение ЛДГ-позитивных нейронов. Отмечено увеличение интенсивности реакций, ка-

тализируемых ГлДГ и СДГ. В симпатическом ганглии обнаруживали двуядерные нейроны, ядра нередко были смещены к периферии. Наряду с нормально окрашенными нейронами встречались гиперхромные и чаще, чем в контроле, нейроны с явлениями тигролиза.

Усиление окислительных процессов влечет за собой появление высокоактивных форм кислорода и его метаболитов: O_2^+ , H_2O_2 и OH^{\cdot} , в связи с чем данные о состоянии антиоксидантной защиты в исследуемых структурах представляют определенный интерес.

Из полученных результатов следует (рис. 3), что через 1 ч после 20-минутного облучения глаза активность СОД снижалась (в ед. на 1 мг белка в 1 мин): в роговице до $9,65 \pm 0,72$ против $12,52 \pm 0,96$ в контроле ($p < 0,05$); в сетчатке — до $7,30 \pm 0,44$ против $11,06 \pm 0,67$ ($p < 0,001$). В контралатеральном глазу отмечали тот же эффект. В зрительной коре мозга и гипоталамусе активность СОД не изменялась. В то же время активность ГПО в роговице обоих глаз заметно повышалась (в нмоль на 1 мг белка в 1 мин; см. рис. 3): в облученном глазу — до $48,8 \pm 4,2$, в контралатеральном — до $52,8 \pm 4,9$, в контроле — соответственно $30,3 \pm 3,3$ и $33,9 \pm 3,4$ ($p < 0,01$). В сетчатке обоих глаз активность ГПО практически не изменялась, в то же время она значительно повышалась в зрительной коре. Повышение активности ГПО, по-видимому, связано с накоплением в результате усиления свободно-радикального окисления гидроперекисей липидов — субстрата данного фермента.

Выявленный сдвиг в системе антиоксидантной защиты свидетельствует об активации свободно-радикального окисления, высокореактивные продукты которого могут быть в определенных условиях причиной повреждения структур клеток и тканей под влиянием излучения.

Таким образом, одностороннее однократное облучение глаза низкочастотным ИК-лазерным излучением ближней области спектра через 1 ч вызывает стереотипные изменения не только в облученном и контралатеральном глазах, но и в нейронах зрительной коры мозга обоих полушарий и верхних шейных симпатических ганглиях (при отсутствии нарушений мозгового кровообращения). Характер выявленных сдвигов показы-

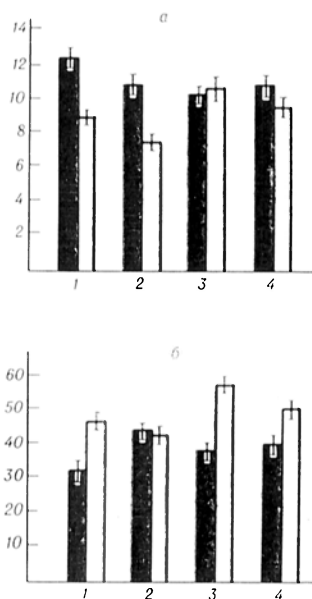


Рис. 3. Активность СОД (в ед. на 1 мг белка в 1 мин) (а) и ГПО (в нмоль на 1 мг белка в 1 мин) (б) животных контрольных и подвергнутых лазерному облучению через глаз в течение 20 мин (спустя 1 ч).

1 — роговица; 2 — сетчатка; 3 — зрительная кора; 4 — гипоталамус. Темные столбики — контрольные животные, светлые — облученные 20 мин.

вает, что лазерное излучение активирует метаболические системы, осуществляющие окисление. Интенсификация процессов окисления, в частности в дыхательной цепи митохондрий (увеличение активности ГлДГ, СДГ, снижение концентрации лактата), приводит к возбуждению функциональной активности исследуемых объектов. Подтверждает это, в частности, установленный факт стимуляции структур роговицы при лечении ее дистрофий низкоинтенсивным лазерным излучением [7]. Выявленные изменения в энергообеспечении структур глаза, мозга и симпатического ганглия отражают, по-видимому, общую метаболическую реакцию организма на лазерное излучение.

Механизм метаболических реакций на лазерное воздействие связан с нейрорефлекторными трофическими влияниями, на что указывают сдвиги в энергетическом обмене нейронов коры мозга и верхних шейных симпатических ганглиев. Включением общих нейрорефлекторных механизмов можно объяснить и аналогичные сдвиги в контралатеральном глазу и коре мозга обоих полушарий. Связь между глазом и мозгом посредством нервных импульсов через оптико-вегетативную систему отмечена ранее [4, 8]. Однако проведенные совместно с Н. Ф. Шапошниковой и А. В. Черкасовым эксперименты на 15 кроликах с использованием гелий-неонового лазера типа ЛГ-126, генерирующего излучение с длинами волн 0,63 и 1,15 мкм (мощность 4 мВт), а также средств качественной (цветные фотопленки Agfa-400 и Kodak-5036) и количественной регистрации, описанной в работе [6], позволили установить, что лазерное излучение видимого и ИК-диапазона проникает через глаз в полость черепа (от роговицы отражается 3—4% излучения) и вызывает при длине волны 0,63 мкм заметное свечение его костей (рис. 4). Суммарно задняя полусфера свежесекционированного глазного яблока пропускает 63% излучения с длиной волны 1,15 мкм и 15% при длине волны 0,63 мкм. Через окружающие глаз ткани и кости черепа 0,2—0,9% лазерного излучения достигает коры головного мозга, преимущественно обонятельной и лобной долей. Наличие светопроводящей способности у зрительного нерва (наблюдали его свечение), как и у других тканей, позволяет рассматривать нерв в качестве возможного проводника

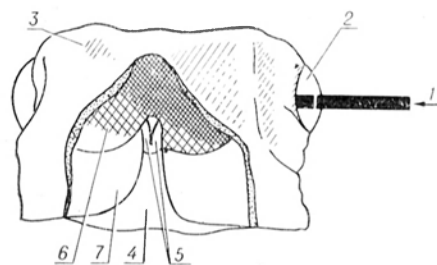


Рис. 4. Свечение внутренней поверхности основания черепа кролика (выходные световые реперы) при облучении глаза низкоинтенсивным лазерным лучом с длиной волны 0,63 мкм (головной мозг удален).

1 — коллимированный лазерный пучок; 2 — глаз; 3 — голова; 4 — трепанационное отверстие в теменной области; 5 — зрительные нервы; 6 — передняя и 7 — задняя черепные ямки; продольные штрихи — свечение поверхности головы; перекрестная штриховка — свечение костей в полости черепа.

света к соответствующим образованиям мозга. Кроме того, в силу анатомических особенностей строения черепа кролика излучение из одного глаза может достигать противоположного глаза (см. рис. 4), что также может служить причиной вызываемых в нем биоэффектов. Вышеописанные метаболические изменения в коре мозга могли быть также следствием и прямого, непосредственного действия лазерного излучения на мозг через глаз и вовлечения таким путем в процесс нервных образований, имеющих отношение к системам, стимулирующим аэробное окисление.

Приведенные материалы представляют интерес для клинических и профилактических дисциплин, изучающих состояние метаболических процессов в организме человека при действии на него лазерного излучения (света).

ЛИТЕРАТУРА

1. Викторов И. В. // Арх. пат. — 1978. — № 5. — С. 73—76.
2. Кашуба В. А., Польский О. Г. // Гиг. труда. — 1986. — № 4. — С. 37—40.
3. Лазеры в клинической медицине. — М., 1981.
4. Маркелов Г. И. // Невропатол. и психiatr. — 1945. — Т. 14, № 3. — С. 3—11.
5. Пирс Э. Гистохимия: Пер. с англ. — М., 1972.
6. Полонский А. К. и др. // Науч. докл. высш. школы. Биол. науки. — 1984. — № 10. — С. 108—111.
7. Семенов А. Д. и др. // Гигиенические аспекты использования лазерного излучения в народном хозяйстве. — М., 1982. — С. 65—67.

8. Чазов Е. Н., Исаченков В. А. Эпифиз: место и роль в системе нейроэндокринной регуляции. — М., 1974.
9. Emesson P. M., Mason D. J., Cuthbert G. E. // Brit. J. Haemat. — 1972. — Vol. 22. — P. 667—680.
10. Tridolovich J. // Ann. Rev. Biochem. — 1975. — Vol. 44. — P. 147—159.
11. Henry P. J., Chialmory N., Golul J., Berkman S. // Amer. J. clin. Path. — 1960. — Vol. 34. — P. 381—389.
12. Hoharst N. J. // Methoden der enzymatischen Analyse / Hrsg. H. U. Bergmeyer. — Berlin, 1970. — Bd. 2. — S. 1425—1429.
13. Nachlas M., Grawford D., Seligman A. // J. Histochem. — 1957. — Vol. 5. — P. 264—278.
14. Smelser G. R. // The Fransporecy of the Cornea. — Oxford, 1960. — P. 125—134.
15. Schmidt E. // Methoden der enzymatischen Analyse / Hrsg. H. U. Bergmeyer. — Weinheim, 1974. — Bd 1. — S. 689—696.

Поступила 16.07.86

THE STATE OF ENERGY METABOLISM IN STRUCTURES OF VISUAL ANALYZER AND NEURONES OF SYMPATHIC GANGLION AFTER IRRADIATION OF EYE BY LOW-INTENSIVE INFRARED LASER WITH NEAR SPECTRAL REGION

V. A. Kashuba, N. F. Trusova, E. N. Lavrova
Medical Stomatological School, Moscow

After irradiation of one eye by low-intensive infrared laser with near spectral region within 5 and 20 min an increase in aerobic oxidation (activation of glutamate- and succinate dehydrogenases, decrease in activity of lactate dehydrogenase and in content of lactate) as well as alterations in the antioxidant activity were observed in structures of both eyes (irradiated and untreated), in visual cortex of both hemispheres and in neurocytes of upper cervical sympathetic ganglions. These results suggest that generalized metabolic reactions are developed in a body in response to laser irradiation. Mechanism of these reactions appears to involve not only the neuro-reflex pathways but it related also to the direct effect of the radiation on structures of eye and brain. The low-intensive laser radiation penetrated into brain through eye retrobulbular tissues and bones.

УДК 616.127-002-056.43-092.9-07:[616.12+616.155.25]-098.931:577.152.633

В. П. Мирошниченко, И. К. Ряпосова, И. А. Чарахьян,
Г. В. Крюкова, И. С. Северина

СОПОСТАВЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГУАНИЛАТЦИКЛАЗЫ СЕРДЦА И ТРОМБОЦИТОВ В НОРМЕ И ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АЛЛЕРГИЧЕСКОМ МИОКАРДИТЕ

НИИ медицинской физиологии АМН СССР, Москва

Гуанилатциклаза — фермент, катализирующий биосинтез циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) из гуанозинтрифосфата (ГТФ). цГМФ — один из основных регуляторов метаболизма и функциональной активности клеток, выполняющий самостоятельную, отличную от циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) роль. В отличие от цАМФ, хорошо известного активатора протеникиназы, цГМФ, как полагают, является внутриклеточным регулятором окислительно-восстановительных процессов [7].

Известно, что увеличение содержания цГМФ в ткани миокарда ослабляет сократительную деятельность сердца, а в других тканях способствует возникновению и развитию патологических состояний [11, 12].

Установлено, что повышение уровня цГМФ происходит в основном за счет

активации гуанилатциклазы, механизм действия и регуляция активности которой неизвестны. Для выяснения роли цГМФ в норме и при патологии важны сведения не столько о содержании этого активного нуклеотида в тканях, сколько об активности гуанилатциклазы, функции которой в норме и при патологии изучены недостаточно.

Гуанилатциклаза в ткани миокарда представлена в двух формах — мембранно-связанной и растворимой. Ранее нами были найдены черты сходства и различий этих форм фермента в сердце кролика [4]. Установлены нарушения в активности гуанилатциклазы и ее регуляции при аллергическом повреждении сердца кроликов (АПС) на стадии репарации — 14-й день патологии. Эти нарушения касались в основном растворимой формы гуанилатциклазы, что позволило сделать вывод о большей физиологической

значимости именно этой формы фермента. Полученные данные свидетельствовали о необходимости более детального изучения гуанилатциклазы при этом патологическом состоянии.

Изменения активности ферментов в органах и тканях часто проявляются также и в форменных элементах крови, например в тромбоцитах. Последние характеризуются высокой активностью гуанилатциклазы, находящейся в этой ткани на 95% в растворимой форме [9]. Известно, что функции тромбоцитов при патологических состояниях миокарда (инфарктная болезнь сердца, аллергические состояния) нарушены [1, 3].

Целью настоящей работы было исследование активности растворимой формы гуанилатциклазы одновременно в ткани миокарда и тромбоцитах крови кролика в норме и при АПС в динамике развития заболевания.

Методика

Подопытными животными служили 12 кроликов-самцов. Животных декапитировали и вызывали АПС следующим образом [8]. Животных сенсибилизировали 4-кратным подкожным введением 2 мл лошадиной сыворотки с интервалом 4—5 дней. Через 2—3 нед кролику вводили разрешающую дозу (1 мл) этой сыворотки внутривенно в краевую вену уха.

Активность гуанилатциклазы миокарда и тромбоцитов определяли в норме и в динамике развития аллергического миокардита: на стадии сенсибилизации перед введением разрешающей дозы сыворотки; в острой стадии — через 2 ч после введения последней (1-й день патологии) и на стадии репарации — 14-й день патологии.

Растворимую форму гуанилатциклазы сердечной мышцы получали по ранее описанной методике [4]. Для изучения гуанилатциклазы тромбоцитов брали кровь (10 мл) из красной вены уха, используя в качестве антикоагулянта 400 мМ раствор ЭДТА в 0,9% NaCl pH 7,4 в соотношении с кровью 1:10. Все последующие процедуры до озвучивания тромбоцитов проводили при 20 °С. Богатую тромбоцитами плазму (БТП) получали центрифугированием цельной крови при 400 *g* в течение 10 мин. Тромбоциты выделяли с использованием Ficoll — Paque («Pharmacia», Швеция).

БТП насаивали на Фикол — Пак в соотношении 1:1 и центрифугировали 30 мин при 500 *g*. Образовавшееся на границе раздела фаз «тромбоцитарное кольцо» отбирали и суспендировали в равном объеме буфера А (20 мМ трис-HCl pH 7,4, 5 мМ ЭДТА, 0,9% NaCl) и центрифугировали при 900 *g* 30 мин. Полученный осадок тромбоцитов дважды промывали 1 мл буфера А, каждый раз центрифугируя 30 мин при 900 *g*.

Количество и чистоту выделенных тромбоцитов устанавливали микроскопированием в камере Горяева. Омытые тромбоциты суспендировали в 1 мл 50 мМ трис-HCl pH 7,6 с

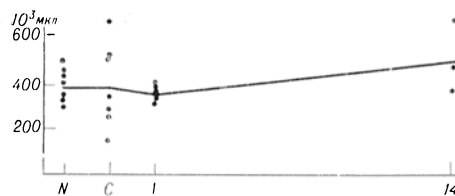


Рис. 1. Содержание тромбоцитов в крови кролика в динамике развития АПС.

Здесь и на рис. 2—3 по оси абсцисс — стадии и сроки развития АПС: (в днях) по оси ординат — содержание тромбоцитов (количество клеток в 1 мкл крови).

добавлением дитиотрейтола до конечной концентрации 0,2 мМ.

Для получения растворимой формы гуанилатциклазы суспензию тромбоцитов озвучивали 2 раза по 10 с при 4—6 °С с использованием УЗ-дезинтегратора фирмы MSE 5-78 (Великобритания). Озвученную суспензию центрифугировали 60 мин при 105 000 *g*. Надосадочную фракцию использовали в качестве источника растворимой формы фермента.

Белок определяли по методу Лоури [10], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин фирмы «Sigma».

Активность гуанилатциклазы устанавливали по количеству цГМФ, образовавшегося из ГТФ в 150 мкл инкубационной среды, состав которой описан ранее [4]. В случае миокарда количество белка в пробе составляло около 40 мкг, время инкубации — 10 мин, в случае тромбоцитов — соответственно 5 мкг и 7 мин. Реакцию начинали добавлением субстрата — комплекса ГТФ с катионами металлов Mn^{2+} или Mg^{2+} в соотношении 1:4 соответственно; останавливали нагреванием проб в кипящей бане в течение 2 мин с последующим охлаждением в ледяной бане и центрифугированием при 1400 *g* в течение 15 мин. В аликвотной порции центрифугата определяли содержание цГМФ.

На рис. 1—3 и в таблицах приведены средние данные 5—9 однозначных опытов.

Результаты и обсуждение

На схеме представлены стадии выделения тромбоцитов из цельной крови

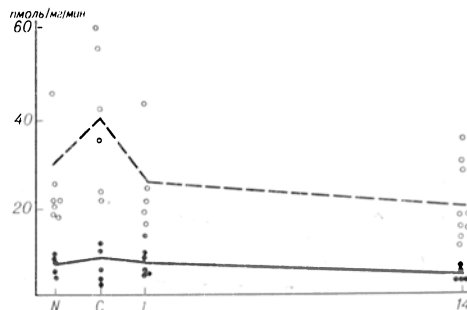
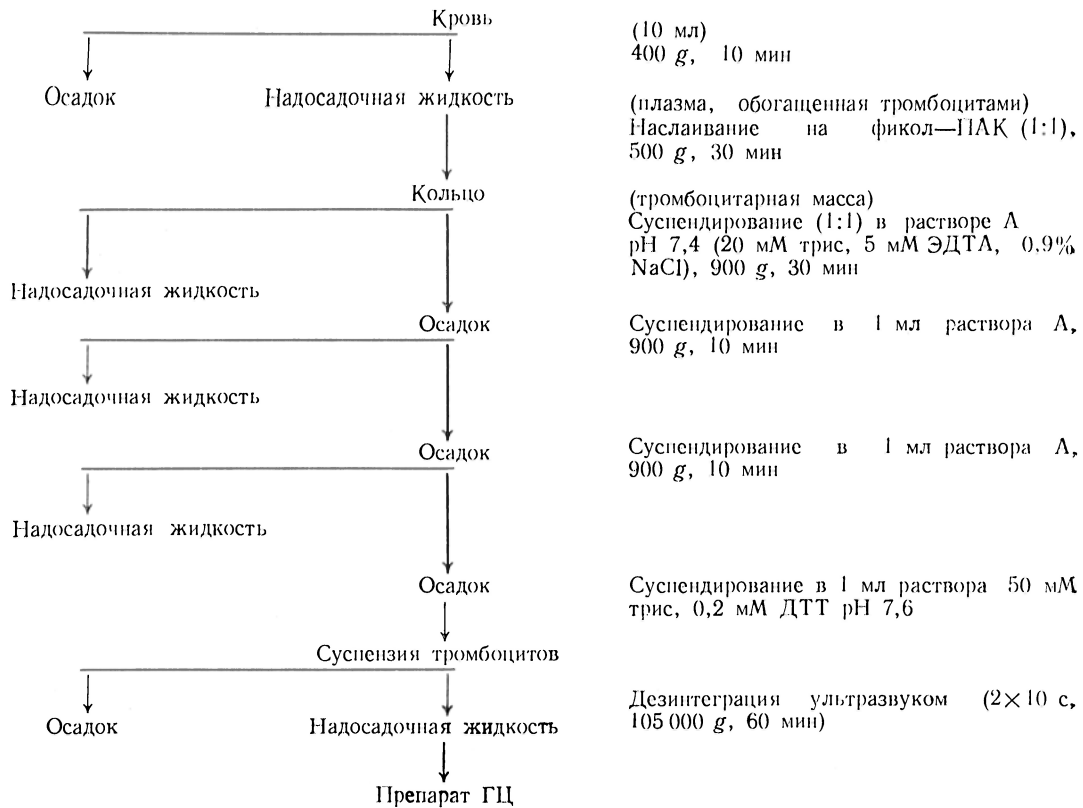


Рис. 2. Активность гуанилатциклазы в сердце кролика в динамике развития АПС.

Здесь и на рис. 3 по оси ординат — количество образовавшегося цГМФ (в нмоль на 1 мг белка в 1 мин). 1 и 2 — активность фермента, определенная в присутствии Mn^{2+} и Mg^{2+} соответственно.

Схема выделения тромбоцитов крови кролика



кролика. В БТП обнаружено 45—75% тромбоцитов, содержащихся в цельной крови. Количество тромбоцитов на последней стадии выделения перед озвучиванием в 1 мл 50 мМ трис-НСI составляет около 30% от содержания их в крови. Выделенные тромбоциты характеризовались высокой степенью чистоты и

практически не содержали примесей других форменных элементов крови.

Как видно из рис. 1, содержание тромбоцитов в крови нормальных кроликов составляет в среднем 370 000 клеток в 1 мкл. Это количество тромбоцитов сохраняется практически неизменным на всех исследованных стадиях заболевания.

Удельная активность растворимой формы гуанилатциклазы тромбоцитов в норме в 15—20 раз выше таковой в

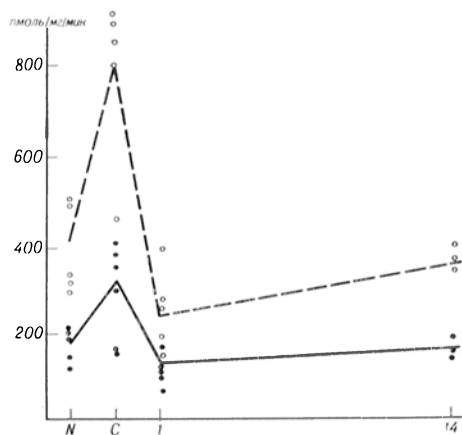


Рис. 3. Активность гуанилатциклазы в тромбоцитах крови кролика.

Таблица 1

Активность гуанилатциклазы сердца и тромбоцитов кролика в норме (в пмоль на 1 мг белка в 1 мин)

Источник фермента	Активность		УЛ _т /УЛ _с	
	Mn ²⁺	Mg ²⁺	Mn ²⁺	Mg ²⁺
Тромбоциты	400 (5)	140 (5)	17	22
Сердце	23 (9)	6 (8)		

Примечание. УЛ_т — удельная активность тромбоцитов, УЛ_с — то же сердца. Здесь и в табл. 2 в скобках — число определений.

Таблица 2

Активность гуанилатциклазы сердца и тромбоцитов в норме и при АПС (в пмоль на 1 мг белка в 1 мин)

Группа животных	Сердце		Тромбоциты	
	Mn ²⁺	Mg ²⁺	Mn ²⁺	Mg ²⁺
Норма	22 (9)	4,9 (8)	450 (5)	200 (5)
АПС (14-й день)	17,3 (8)	4,0 (6)	380 (5)	140 (5)

миокарде вне зависимости от используемого иона металла в качестве кофактора (табл. 1).

Сопоставление активности гуанилатциклазы сердца и тромбоцитов кролика в норме и при аллергическом миокардите на стадии репарации показало синхронное снижение базальной активности фермента в ткани миокарда и тромбоцитах в присутствии как Mn²⁺, так и Mg²⁺ (табл. 2). Результаты этих исследований указали на необходимость более детального изучения изменений активности фермента при АПС в динамике развития этой патологии.

На рис. 2 представлены данные изменения активности гуанилатциклазы в сердечной мышце кроликов на разных стадиях развития аллергического миокардита. Как видно из рисунка, наблюдается некоторое повышение активности фермента на стадии сенсибилизации, незначительное снижение в острой стадии с последующей постепенной нормализацией активности до контрольного уровня на стадии репарации. Эти колебания в базальной активности гуанилатциклазы более выражены в присутствии Mn²⁺, чем при Mg²⁺.

На рис. 3 представлены результаты аналогичных опытов с гуанилатциклазой тромбоцитов кроликов. В этом случае отмечены значительно более резко выраженные изменения активности фермента в зависимости от стадии заболевания. Обращает на себя внимание значительное (двукратное) увеличение активности гуанилатциклазы (более выраженное с Mn²⁺, чем с Mg²⁺) на стадии сенсибилизации, до введения разрешающей дозы сыворотки. К 1-му дню патологии активность фермента резко снижается, причем становится ниже нормы, а на стадии репарации (14-й день патологии) приближается к величинам базальных активностей, характерных для нормы.

При развитии экспериментального аллергического миокардита введение разрешающей дозы считают 1-м днем патологии или острой стадией заболевания, при которой ткань сердечной мышцы неоднородна из-за венозного полнокровия и наличия лейкоцитов. На этой стадии впервые появляются клинические показатели: нарушения в сократительной деятельности сердца и ЭКГ. На стадии репарации (14-й день патологии) мышечная ткань уже однородна, но по клиническим показателям сохраняется состояние, близкое к миокардиту. На стадии сенсибилизации, до введения лошадиной сыворотки, еще не наблюдается никаких клинических показателей аллергического миокардита [5].

В медицинской практике аллергический миокардит встречается очень часто как осложнение различных простудных и вирусных заболеваний. Клинические признаки этого патологического состояния обычно появляются только на 5—12-е сутки заболевания. Ранняя диагностика аллергического миокардита отсутствует [6]. Обнаруженная нами высокая активность гуанилатциклазы в тромбоцитах (см. табл. 1), вероятно, обусловлена важной функцией фермента в этих форменных элементах крови.

Полученные нами данные (см. табл. 2, рис. 2 и 3) о синхронных изменениях активности растворимых форм гуанилатциклазы в сердечной мышце и тромбоцитах, указали на правомерность сопоставления свойств фермента в ткани миокарда и использованных форменных элементах крови.

В то же время сравнительные исследования активности гуанилатциклазы в динамике развития АПС выявили высокую чувствительность гуанилатциклазы тромбоцитов к изменениям, происходящим в организме животного при развитии патологического состояния. На это указывает обнаруженное нами резкое повышение активности фермента в тромбоцитах на стадии сенсибилизации с последующим снижением активности в острый период — 1-й день патологии (см. рис. 3).

Резкий подъем активности гуанилатциклазы тромбоцитов на стадии сенсибилизации представляет особый интерес, поскольку при этом отсутствуют клинические показатели АПС? Чем это может быть обусловлено. Известно, что гуанилатциклаза активируется такими

соединениями, как ненасыщенные жирные кислоты, продукты их перекисного окисления, другие системы, генерирующие свободные радикалы [7]. Перекисное окисление липидов резко повышено при ишемических поражениях сердца, воспалительных процессах в миокарде [2].

Отмеченный нами резкий всплеск активности гуанилатциклазы на стадии сенсibilизации дает основание предположить, что усиление перекисного окисления липидов может быть наиболее выражено на стадиях, предшествующих заболеванию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балуда В. П. // Актуальные проблемы гемостазиологии. — М., 1979. — С. 14—26.
2. Бурлакова Е. Б. // Кардиология. — 1980. — № 7. — С. 48—52.
3. Люсов В. А., Белоусов Ю. Б., Парфенов А. С. // Актуальные проблемы гемостазиологии. — М., 1979. — С. 140—146.
4. Мирошниченко В. П., Крюкова Г. В., Зубовская А. М., Шарлова И. Л. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 2. — С. 109—114.
5. Мультияров П. Я., Гроздова М. Д., Старостина Л. К. // Кардиология. — 1975. — № 11. — С. 48—53.
6. Сидоренко М. И., Семенович Н. И., Каликиштейн Д. Б. // Там же. — 1979. — № 6. — С. 22—27.
7. Bohme S., Gerser R. et al. // Horm. Cell Regulat. — 1983. — Vol. 7. — P. 147—161.
8. Fassbender H. G. // Acta allerg. (Kbh.). — 1955. — Suppl. 4. — P. 4—54.
9. Glass D. B., Frey W. 2-d, Carr D. W.

et al. // J. biol. Chem. — 1977. — Vol. 252. — P. 1279—1285.

10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
11. Opie L. H. // Cardiovasc. Res. — 1982. — Vol. 16. — P. 483—507.
12. Turner G. A., Ellis R. D., Guthrie D. et al. // J. clin. Path. 1982. — Vol. 35. — P. 800—806.

Поступила 16.12.86

ACTIVITY OF GUANYLATE CYCLASE FROM HEART AND THROMBOCYTES UNDER CONDITIONS OF NORMAL STATE AND EXPERIMENTAL ALLERGIC MYOCARDITIS

V. P. Miroshnichenko, I. K. Ryaposova,
I. A. Charakhch'yan, G. V. Kryukova, I. S. Se-
verina

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

Activity of soluble forms of guanylate cyclase from rabbit heart and thrombocytes was studied under conditions of normal state and in dynamics of heart allergic impairment: at the step preceding the impairment (step of sensitization), at the acute period (1-st day of the allergy) and at the step of reparation (14 day of the disease). The enzymatic activity was found to be 15-20-fold higher in thrombocytes as compared with that of heart muscle. Two-fold activation of the thrombocyte guanylate cyclase was detected at the step of sensitization; at the acute period the enzyme activity was distinctly decreased (below the values of normal state) and then normalized to the step of reparation. The similar but less distinct trend was observed in alterations of activity of myocardial guanylate cyclase. The data obtained suggest the conformity of the enzymatic properties in myocardium and thrombocytes under conditions of normal and pathological states.

УДК 612.115.33/35+616.151.55

Б. А. Кудряшов, Л. А. Ляпина, В. Е. Пасторова

ЗНАЧЕНИЕ КОМПЛЕКСА АНТИТРОМБИН III-ГЕПАРИН-ТРОМБИН В ЗАЩИТНОЙ РЕАКЦИИ ПРОТИВОСВЕРТЫВАЮЩЕЙ СИСТЕМЫ

МГУ им. М. В. Ломоносова

Ранее было установлено, что инактивация значительных количеств тромбина может осуществляться как комплексными соединениями гепарина с белками крови, аминами и другими биологически активными веществами [3], так и антитромбином III (АТ III) [8] и другими ингибиторами протениаз. В присутствии гепарина происходит более интенсивное ингибирование фермента тромбина *in vitro* с помощью АТ III с

образованием комплексного соединения [11, 14]. При этом «потребление» АТ III в ходе реакции нейтрализации тромбина увеличено по сравнению с его использованием для ингибирования тромбина в отсутствие гепарина [14].

В условиях опытов *in vitro* были получены двухкомпонентные комплексы гепарина с очищенным АТ III, выделенным из крови крупного рогатого скота, а также трехкомпонентные комплексы

АТ III-гепарин-тромбин (АТ III-Г-Т) [4]. Подобно другим комплексам гепарина с белками крови [3] эти комплексы также проявляли антикоагулянтные и неферментативные фибринолитические свойства, что свидетельствует о значении АТ III не только как антикоагулянта, но и как компонента, принимающего участие в осуществлении неферментативного фибринолиза (НФ) [8]. Антикоагулянтная активность трехкомпонентных комплексов зависела от количества включаемого в комплекс тромбина [3].

Внутривенное введение крысам с экспериментальным атеросклерозом гепарина предварительно перед инфузией тканевого тромбопластина вызывало не только ускоренную реакцию и снижение уровня АТ III в процессе нейтрализации тромбина, но и мобилизацию реакции противосвертывающей системы (ПСС) на генерированный тромбин [9]. Многократное введение гепарина здоровым животным сопровождается активацией как суммарного (СФ), так и НФ, а также снижением уровня АТ III [5]. Эти результаты, а также данные о более интенсивном снижении уровня АТ III при введении гепарина животным в процессе нейтрализации тромбина свидетельствуют о его возможном участии в комплексообразовании с гепарином в условиях организма [6].

Цель настоящего исследования — выделение из крови животных в разных условиях эксперимента (при активации и депрессии функции ПСС), а также из крови детей с ожогами или травматическим шоком комплексного соединения АТ III-Г-Т и изучение его свойств.

Методика

В опытах использовали 48 белых крыс-самцов с массой тела 180—200 г и 25 крыс с массой тела 300—350 г в возрасте 15—18 мес.

Животным с массой тела 180—200 г вводили внутривенно тканевый тромбопластин, приготовленный из мозга крыс, со свертывающей активностью 13—14 с (время свертывания на крысиной плазме) в объеме 0,4 мл на 200 г массы тела. Крысам другой группы — физиологический раствор хлорида натрия. Внутривенные инъекции животным препаратов осуществляли в *v. jugularis* и брали кровь с цитратом натрия в соотношении 9:1 из той же вены до введения и через 7—10 мин после введения тканевого тромбопластина.

В опытах использована кровь от детей (возраст от 4 до 11 лет) с ожогом или травматическим шоком, взятая в 1-й день травмы до лечения и через 24 и 48 ч после поступления в стационар.

В образцах плазмы крови животных и детей определяли суммарную фибринолитическую активность (СФА) и НФ [2], концентрацию фибриногена [1], ферментативную фибринолитическую активность эуглобулиновой фракции плазмы крови [10], показатели T_1 , T_2 и T коагулограммы, время образования свободного тромбина [12], активность АТ III [13].

Для выделения комплекса АТ III-Г-Т использовали 1 мл цитратной плазмы, дефибринированной нагреванием при 56 °С в течение 3—4 мин, из которой затем удаляли протромбин и факторы протромбинового комплекса методом адсорбции. Из дефибринированной и депротромбированной плазмы удаляли эуглобулиновую фракцию подкислением уксусной кислотой до pH 5,3—5,4. Осадок отбрасывали, а супернатант вновь подкисляли до pH осаждения комплекса АТ III-Г-Т [4]. Полученный небольшой осадок комплекса после центрифугирования растворяли в 0,6 мл фосфатного буфера pH 7,2—7,4.

В выделенном комплексе АТ III-Г-Т определяли СФА и неферментативную фибринолитическую активность (НФА) на нестабилизированных фибриновых пластинках [2] и антикоагулянтную активность общепринятым способом по тромбиновому времени свертывания 0,3% раствора фибриногена.

Результаты и обсуждение

Из данных, представленных в табл. 1, видно, что у животных после внутривенной инъекции тканевого тромбопластина через 7—10 мин резко снижались уровень фибриногена в 2,4 раза, активность АТ III — в 1,6 раза, повысились СФА плазмы — в 1,6 раза и ее НФ — в 2 раза по сравнению с показателями контрольной группы, получавшей инъекцию физиологического раствора NaCl. Эти изменения характеризуют активацию ПСС. Активность свободного тромбина в этот период эксперимента была значительно снижена вследствие ее инактивации компонентами ПСС по сравнению с таковой, наблюдаемой в 1-ю минуту после инъекции тромбопластина [7]. Однако она превышала значение контрольного уровня активности тромбина (время образования тромбина в опытных образцах короче, чем в контрольных), что свидетельствует о наличии микроколичеств фермента в кровотоке ($p < 0,05$). Полная инактивация тромбина обычно завершается к 15-й минуте после введения животным тромбопластина [7]. В комплексе АТ III-Г-Т, выделенном в период активации функции ПСС, обнаружена достаточно высокая НФА, превышающая таковую комплекса, выделенного из крови контрольных крыс, в 1,8 раза (см. табл. 1).

НФА комплекса АТ III-Г-Т в крови крыс после внутривенной инъекции тканевого тромбопластина (0,4 мл на 200 г массы тела) в период активации функций ПСС и у старых (15—18 мес) крыс при депрессии функции ПСС

Группа животных	Число жи- вотных	Показатели в плазме животных					НФА выде- ленного комплекса АТ III-Г-Т, мм ²
		фибрино- ген, мг %	время об- разования тромбина, с	АТ III, %	СФА, мм ²	НФ, мм ²	
Опыт — введение тром- бопластина	18	121±13*	321±18*	66±4,8*	88±5,3*	59±4,6*	41,5±5,1*
Контроль — введение физиологического раствора NaCl	15	293±19	438±23	104±4,1	54±4,2	28,7±2,0	22,5±3,7
Опыт — старые жи- вотные	20	423±23*	321±16**	114,5±5,3**	30,9±3,1*	12,4±0,9*	16±1,2*
Контроль — молодые животные	15	278±19	372±15	122±5,1	44,6±2,7	25,7±1,2	25,3±1,3

* $p < 0,01$ по отношению к показателям контрольной группы животных;

** $p < 0,05$ по отношению к контролю.

Следовательно, при лавинообразной генерации тромбина в кровотоке и активации функции ПСС вследствие внутривенного введения тканевого тромбопластина в крови животных обнаружена повышенная неферментативная литическая активность комплекса АТ III-Г-Т.

Выделенный комплекс АТ III-Г-Т, кроме того, обладал антикоагулянтной активностью, превышающей время свертывания контрольной смеси, содержащей вместо комплекса буфер (время свертывания раствора фибриногена тромбином в присутствии комплекса — 158 с, в контрольной смеси — 10 с), однако эта активность комплекса не превышала антикоагулянтную активность комплекса, выделенного из крови контрольных крыс.

В последующих экспериментах комплекс АТ III-Г-Т выделяли из крови старых крыс (возраст 15—18 мес) с депрессией функции ПСС, которая наблюдается при физиологическом старении организма и сопровождается медленным тромбогенезом и наличием микроколичеств тромбина в кровотоке. Как видно из данных, представленных в табл. 1, у старых крыс резко повышено содержание фибриногена в плазме крови — в 1,8 раза, снижены уровни СФА и НФ плазмы соответственно в 1,5 и 2 раза по сравнению с показателями молодых контрольных крыс. Уровень активности АТ III при этом практически не был изменен. Комплексы АТ III-Г-Т,

выделенные из крови старых подопытных животных, обладали вдвое пониженной НФА по сравнению с таковой в аналогичных комплексах, выделенных из крови контрольных молодых животных (см. табл. 1). В комплексах, выделенных из крови старых и молодых крыс, отмечалось наличие антикоагулянтной активности, которая превышала время свертывания раствора фибриногена в контрольной смеси, содержащей вместо комплекса буфер (тромбиновое время свертывания фибриногена в присутствии комплекса — 38,5 с в его отсутствие — 25,3 с; $p < 0,01$).

В комплексах АТ III-Г-Т, выделенных из крови животных, обнаружено присутствие всех трех компонентов. После диссоциации комплекса АТ III-Г-Т при его хранении в течение 3—4 дней при 4 °С было выявлено присутствие АТ III и гепарина. Подщелачивание недиссоциированного комплекса АТ III-Г-Т до pH 8,3 приводило к его диссоциации и создавало возможность определения активности присутствующего в комплексе тромбина, о чем судили по укорочению тромбинового времени свертывания 0,3% раствора фибриногена при добавлении в среду комплекса по сравнению с контрольной также подщелоченной смесью (тромбиновое время свертывания пробы до подщелачивания — 43,6 с, после подщелачивания — 31,1 с; $p < 0,01$; в контрольной до подщелачивания — 25,7 с, после подщела-

Таблица 2

НФА комплексов АТ III-Г-Т, выделенных из крови больных детей, и показатели ПСС крови в разные сроки заболевания ($M \pm m$)

Показатель	Срок исследования	
	при поступлении в стационар	через 2 сут
Время образования тромбина, с	272 \pm 17	196 \pm 17
СФА, мм ²	85 \pm 9,1	67 \pm 5,3
НФ, мм ²	53 \pm 7,2	35 \pm 4,8
Концентрация фибриногена, мг %	240 \pm 15	475 \pm 29
Активность АТ III, %	82 \pm 7,1	99,5 \pm 5,6
Фибринолитическая активность эуглобулиновой фракции плазмы, мм ²	104 \pm 23	26 \pm 3,5
НФА комплекса АТ III-Г-Т, мм ²	51 \pm 4,1	22 \pm 1,8

чивания — 27,0 с). Однако следует отметить, что некоторые выделенные комплексы после подщелачивания не давали эффекта укорочения времени свертывания фибриногена, что свидетельствует об отсутствии в них тромбиновой активности. По-видимому, в этих случаях имело место образование лишь двухкомпонентных комплексов АТ III-гепарин (АТ III-Г), которые могут осаждаться в тех же условиях, что и трехкомпонентные комплексы АТ III-Г-Т и которые обладают антикоагулянтной активностью и НФА [4].

При анализе активности комплексов АТ III-Г-Т, выделенных из крови детей с ожогом или травматическим шоком (состояния, при которых в кровь поступает значительное количество тромбопластических компонентов из поврежденных тканей), установлено, что в период активации функции ПСС, отмечаемой обычно в первый период развития патологии (через несколько часов), НФА комплексов увеличена по сравнению с таковой комплексов АТ III-Г-Т, выделенных из крови больных в период гиперкоагуляции, отмечаемой в более поздние сроки (через 2 сут после ожога или травмы) и сопровождающейся значительным образованием микроколичеств тромбина и депрессией функции ПСС (табл. 2). О депрессии функции ПСС в этот период свидетельствует повышение в крови концентрации фибриногена, снижение уровня СФА и НФ, а также фибринолитической активности эуглобулиновой фракции плазмы.

Таким образом, и при клинических наблюдениях видно, что в период активации функции ПСС активность комплекса АТ III-Г-Т выше, чем при депрессии функции ПСС.

Полученные экспериментальные и клинические наблюдения свидетельствуют о том, что в крови людей и животных присутствуют как трехкомпонентные комплексы АТ III-Г-Т, так и двухкомпонентные комплексы АТ III-Г, которые можно рассматривать в качестве гуморальных агентов ПСС, участвующих наряду с другими комплексами гепарина в устранении действия тромбина и предотвращения возможного тромбообразования. В период активации функции ПСС образуются комплексы АТ III-Г-Т, обладающие значительной НФА. Более низкая НФА комплексов АТ III-Г-Т, выделенных из крови человека и животных в период депрессии функции ПСС, указывает на ограниченные комплексообразования при этом состоянии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреско Г. В. // Лаб. дело. — 1962. — № 5. — С. 3—7.
2. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А. // Там же. — 1971. — № 6. — С. 326—329.
3. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А. // Биохимия животных и человека. Киев, 1982, вып. 6. — С. 64—73.
4. Кудряшов Б. А., Пасторова В. Е., Ляпина Л. А. // Биохимия. — 1981. — Т. 46, № 11. — С. 2024—2027.
5. Кудряшов Б. А., Пасторова В. Е., Ляпина Л. А. // Вopr. мед. химии. — 1985. — № 3. — С. 37—41.
6. Кудряшов Б. А., Пасторова В. Е., Базыян Г. Г., Ляпина Л. А. // Там же. — 1984. — № 1. — С. 82—86.
7. Пасторова В. Е. // Вестн. Моск. ун-та, сер. биол. — 1980. — № 1. — С. 18—24.
8. Пасторова В. Е. // Успехи совр. биол. — 1983. — Т. 96, Вып. 1 (4). — С. 69—84.
9. Пасторова В. Е., Базыян Г. Г. // Вестн. Моск. ун-та, сер. биол. — 1981. — № 3. — С. 37—42.
10. Astrup T., Müllertz S. // Arch. Biochem. — 1952. — Vol. 40. — P. 346—350.
11. Feinman R. D., Li E. H. // Fed. Proc. — 1977. — Vol. 36. — P. 51—54.
12. Glueck H. J. // J. appl. Physiol. — 1954. — Vol. 6. — P. 650—657.
13. Kaulla E., Kaulla K. N. // Amer. J. clin. Path. — 1967. — Vol. 48. — P. 69—80.
14. Marciniak E. // Thrombos. Haemost. — 1977. — Vol. 38. — P. 486—492.

ROLE OF THE COMPLEX ANTITHROMBIN III-HEPARIN-THROMBIN IN THE PROTECTIVE REACTION OF THE ANTICOAGULATION SYSTEM

B. A. Kudryashov, L. A. Lyapina, V. E. Pastorova

M. V. Lomonosov State University, Moscow

Complexes antithrombin III-heparin-thrombin exhibiting the anticoagulation and no-

nenzymatic fibrinolytic activities were isolated from human blood children of 4-11 years old with burns or with traumatic shock and from rat blood. The complexes antithrombin III-heparin-thrombin with high nonenzymatic fibrinolytic activity were shown to develop during activation of the anticoagulation system. In depression of the anticoagulation system these complexes, isolated from blood, demonstrated the lower nonenzymatic fibrinolytic activity, thus indicating that complex-formation is restricted.

УДК 616.12-005.4-02:616.132.2-004.61-07:616.153:577.112.8561-074

*Н. С. Парфенова, Л. Г. Петрова-Маслакова, А. С. Кузнецов,
Д. В. Иоффе, Е. Г. Алкснис, В. А. Носкин, М. А. Иванова,
И. В. Криворученко*

НАРУШЕНИЕ ХОЛЕСТЕРИН-АКЦЕПТОРНОЙ ФУНКЦИИ ЛИПОПРОТЕИДОВ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА

Институт экспериментальной медицины АМН СССР
Институт ядерной физики им. Б. П. Константинова, Институт физиологии
им. И. П. Павлова АН СССР, Ленинград

В настоящее время хорошо известно существование отрицательной корреляционной зависимости между содержанием липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) и заболеваемостью коронарным атеросклерозом [14]. Предполагается, что антиатерогенная функция ЛПВП обусловлена их свойством акцентировать холестерин (ХС) из клеток интимы артерий [4]. В наших предыдущих работах [4, 5] показано, что фракция ЛПВП₃ в наибольшей мере проявляет эту функцию. Представляло интерес выяснить, не снижается ли холестеринакцепторная функция ЛПВП в условиях коронарного атеросклероза. Поэтому мы сравнили холестеринакцепторную способность ЛПВП₃ у здоровых доноров и у пациентов, имеющих атеросклероз коронарных артерий, подтвержденный ангиографией, и страдающих ишемической болезнью сердца (ИБС).

Методика

Подфракцию ЛПВП₃ выделяли из плазмы крови здоровых доноров и пациентов с ИБС. Диагноз ИБС ставили на основании клинической картины, данных ЭКГ и подтверждали с помощью коронарографии. В каждом образце плазмы определяли содержание общего ХС на автоанализаторе АА-2 фирмы «Техникон». ЛПВП₃ выделяли методом препаративного ультрацентрифугирования [13] на центрифуге «Spinco L-265B» ротор 50-3 из плазмы, содержащей 1 мг/мл ЭДТА. Выделение липопротеинов (ЛП) производили в диапазоне солевой плотности NaBr 1,125—1,21 г/см³ при 18 °C в течение 24 ч после пред-

варительного удаления из нее ЛП очень низкой и низкой плотности, а также подфракции ЛПВП₂. Выделение ЛП диализовали против 0,9 % раствора NaCl при 4 °C. Эритроциты, выделенные из крови других доноров, дважды промывали двойным объемом 0,9% NaCl с последующим центрифугированием при 4 °C в течение 30 мин при 1500 об/мин. Лейкоцитарный слой отбрасывали; «упакованные» эритроциты перемешивали и полученную массу делили на равные объемы. Инкубационная среда содержала 1 мл «упакованных» эритроцитов, 8—10 мг (по белку) ЛПВП₃, трис-HCl-буфер, содержащий 150 мкМ NaCl и 5 мкМ CaCl₂, ее общий объем составлял 3 мл. Инкубацию проводили в водяной бане при 37 °C с медленным покачиванием проб в течение 3 ч. Затем пробы подвергали центрифугированию при 1500 об/мин в течение 15 мин при 4 °C для отделения эритроцитов. Плотность полученной подосадочной жидкости доводили сухим NaBr до 1,21 г/см³. Ультрацентрифугирование проводили при условиях, указанных выше. Выделенные ЛПВП₃ диализовали против 0,9% раствора NaCl.

Эритроциты после инкубации дважды промывали 0,9% NaCl. Процедура промывания была аналогична доинкубационной. «Упакованные» клетки разводили в 3 раза 0,9% NaCl, полученную взвесь использовали для подсчета клеток в камере Горяева и экстракции ХС изопропиловым спиртом [6].

Флюоресцентный аналог ХС — холеста- = 5,7,9(11)-триен3β-ол, сокращенно названный нами «триеном», был синтезирован и охарактеризован ранее [2]. В настоящей работе этот зонд наряду с пиреном использовали для оценки холестеринакцепторных свойств ЛПВП₃ до и после инкубации с эритроцитами. Измерения проводили на спектрофлуориметре «Hitachi MPF-2» (Япония) в цилиндрических кюветах; флюоресценцию возбуждали при 325 нм в случае триена и при 340 нм в случае пирена после добавления 20 мкг

зонда в 0,05 мл этанола к 4 мл раствора ЛП (200 мкг белка).

Размеры получаемых ЛП измеряли методом квазиупругого рассеяния лазерного света (КРЛС) [3]. КРЛС является наиболее экспрессным и точным методом определения коэффициентов диффузии (D) рассеивающих объектов. Коэффициент диффузии (в предположении сферических рассеивателей) связан с гидродинамическим размером R_h частиц через уравнение Эйнштейна — Стокса:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h},$$

где k — постоянная Больцмана, T — абсолютная температура, η — вязкость растворителя.

В случае рассеяния света на полидисперсной системе частиц применение регуляризирующей процедуры [12] для математической обработки получаемых спектров КРЛС позволяет получить функцию распределения $A(D)$ частиц по коэффициентам диффузии с учетом их рассеивающей способности. А функция $A(D)$ связана с функцией распределения размеров ЛПВП по числу частиц $N(R)$ соотношением $A(D)dD \sim N(R)M^2 f(0, R)dR$, где M — масса частиц, $f(0, R)$ — формфактор, θ — угол рассеяния.

Поскольку ЛПВП можно аппроксимировать моделью сферических рассеивателей, то $M \sim R^3$. Таким образом, зная $A(D)$, всегда можно рассчитать $N(R)$.

Результаты и обсуждение

Проведено сравнительное изучение способности ЛПВП₃ акцентировать ХС из мембран эритроцитов в норме и у пациентов с ИБС. О холестеринакцепторной способности судили по встраиванию в частицы ЛПВП₃ флуоресцентных зондов, по убыли ХС из мембран эритроцитов и по увеличению размеров ЛП, измеренных методом КРЛС. Содержание общего ХС в плазме крови доноров колебалось от 180 до 204 мг%, у пациентов с ИБС — от 288 до 350 мг%.

С целью выявления различий в способности ЛПВП встраивать ХС было изучено взаимодействие флуоресцентного аналога ХС с ЛПВП₃ донора до и после инкубации с эритроцитами. На рис. 1 представлены спектры флуоресценции триена в 0,15 М NaCl в этом же растворителе в присутствии ЛПВП₃ после инкубации с эритроцитами и в присутствии ЛПВП₃ до инкубации с эритроцитами. Отмечается значительное различие в интенсивности флуоресценции во всех трех пробах: в физиологическом растворе зонд практически не флуоресцирует в ЛПВП₃ до инкубации с эритроцитами отмечается значительная флуоресценция вследствие встраивания триена в частицу ЛП, однако в ЛПВП₃, ин-

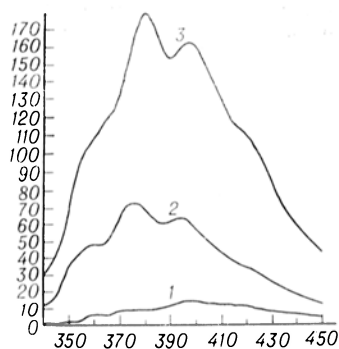


Рис. 1. Спектры флуоресценции триена. 1 — в 0,15 М NaCl, 2 — в том же растворителе в присутствии ЛПВП₃ донора после инкубации с эритроцитами, 3 — в присутствии ЛПВП₃ до инкубации с эритроцитами. Здесь и на рис. 2: по оси абсцисс — длины волн (в нм); по оси ординат — интенсивность флуоресценции (в отн. ед.).

кубированных с эритроцитами, площадь спектра флуоресценции была в 2,5 раза ниже по сравнению с исходными ЛП. Это может свидетельствовать о затруднении включения зонда в ЛП вследствие их насыщения ХС, поступившим из мембран эритроцитов. У пациентов с ИБС до и после инкубации ЛП с клетками не изменялась степень эксимеризации пирена (отношение F_{440}/F_{390}), что может свидетельствовать об отсутствии в данном случае акцепторных свойств ЛПВП₃ по отношению к ХС (рис. 2).

Результаты опытов с флуоресцентными зондами, на наш взгляд, весьма показательны, так как демонстрируют непосредственно захват ХС частицей ЛП. Это тем более важно, что часто доказательство акцепторных свойств ЛПВП ограничивалось демонстрацией переноса радиоактивного ХС из тканей на ЛПВП. Показано, что захват ХС из сосудистой ткани и макрофагов происходит также *in vivo* [15]. Это первые прямые данные, свидетельствующие о том, что события, наблюдаемые *in vitro*, отражают нормальный процесс обратного транспорта ХС в организме.

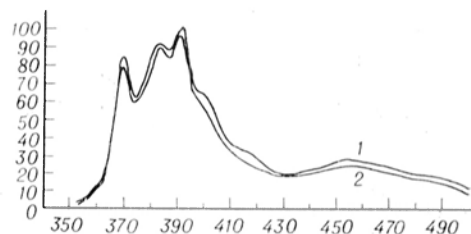


Рис. 2. Эксимеризация пирена в ЛПВП₃ больных с ИБС.

1 — до взаимодействия с эритроцитами, 2 — после взаимодействия с эритроцитами.

**ХС эритроцитов после инкубации с ЛПВП₃
здоровых доноров и пациентов с ИБС
($\cdot 10^{-13}$ г на клетку)**

Контроль (инкубация эритроцитов с физиологическим раствором)	Инкубация с донорскими ЛПВП ₃	Инкубация с ЛПВП ₃ пациентов с ИБС
1,20	1,01	1,21
1,29	1,09	1,21
1,22	1,09	1,38
1,25	1,11	1,31
1,28	1,03	1,28
1,29	1,13	1,19
1,17	1,05	1,36
1,21	1,14	1,32
1,24	1,15	1,36
$1,24 \pm 0,014$	$1,09 \pm 0,017^*$	$1,29 \pm 0,032^{**}$

Примечание. Одна звездочка — $p < 0,001$, две — $p > 0,05$ по отношению к контролю.

В следующей серии опытов переход ХС из эритроцитов на ЛПВП₃ оценивали на основании прямого определения убыли ХС в самих эритроцитах. В этих опытах инкубация эритроцитов с ЛПВП₃, выделенными из плазмы крови практически здоровых людей, привела к потере части ХС клетками: среднее содержание ХС в эритроцитах после инкубации составило $1,09 \pm 0,017 \cdot 10^{-13}$ г на клетку и было существенно ниже ($p < 0,001$), чем в контрольных образцах инкубировавшихся с физиологическим раствором, — $1,24 \pm 0,014 \cdot 10^{-13}$ г на клетку (см. таблицу). Очевидно, потеря ХС эритроцитами при инкубации с ЛП

объясняется переходом части ХС из эритроцитарной мембраны на ЛПВП₃. При инкубации ЛПВП₃, выделенных из плазмы крови пациентов с ИБС, с эритроцитами содержание ХС в последних не изменилось (см. таблицу). Это еще раз подтверждает предположение о том, что при ИБС, сопровождающейся гиперхолестеринемией, утрачивается способность ЛПВП акцентировать ХС.

Результаты экспериментов с холестатином, а также данные о существенном снижении содержания ХС в мембранах эритроцитов при инкубации с ЛПВП₃ позволяют предположить, что в условиях наших опытов происходит истинный транспорт ХС (net transport) из клеток на ЛПВП.

Захват ХС частицей ЛП сопровождается увеличением ее размера [5]. Известно, что свободный ХС, поступивший из клеток в частицу ЛПВП₃, эстерифицируется и в силу своей гидрофобности устремляется в ядро, увеличивая его объем, а следовательно, и размер самой частицы. Необходимо отметить, что средний размер частиц ЛПВП₃, выделенных из плазмы больных ИБС, оказался несколько меньше, чем у здоровых лиц (рис. 3). Это представляет определенный интерес и согласуется с предположением, что изменения структуры монослоя частиц ЛПВП₃ при ИБС создают препятствия для проникновения образующихся эфиров ХС в ядро ЛП. Однако наши данные показывают, что первичной причиной появления уменьшенных частиц ЛПВП при ИБС является почти полное отсутствие перехода свободного ХС из клетки на ЛПВП₃ и, естественно, последующего его эстерифицирования. На рис. 3 показано распределение по размерам ЛПВП₃ до и после их инкубации с эритроцитами, полученное методом КРЛС. Из рисунка видно, что после инкубации ЛПВП₃ здоровых лиц с эритроцитами среднечисленный радиус увеличился с 4,11 до 6,41 нм, что, очевидно, является следствием перехода части ХС с мембраны эритроцита на ЛПВП₃. Размер ЛПВП₃, выделенных из плазмы крови пациентов с ИБС, после инкубации с эритроцитами не изменился.

Таким образом, тремя независимыми методами получены данные об утрате ЛПВП₃ больных с ИБС холестеринацепторной функции.

Обнаруженное резкое снижение способности ЛПВП₃ акцентировать ХС лег-

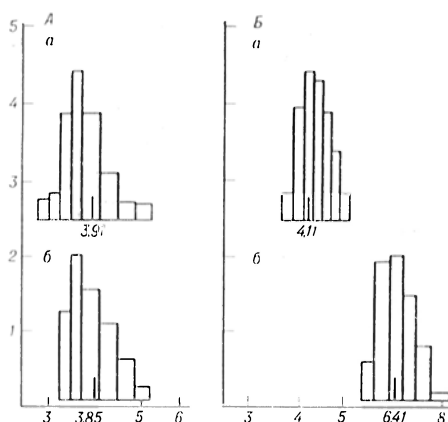


Рис. 3. Распределение ЛПВП₃ по размерам (справа) у больных ИБС (А) и у здоровых лиц (Б).

а — до инкубации с эритроцитами, б — после инкубации с эритроцитами. По оси абсцисс — средний радиус (в нм) частиц ЛП; по оси ординат — N (R) (в отн. ед.). Жирной линией указано среднее значение радиуса ЛП.

че всего было бы объяснить большей насыщенностью частицы ЛП ХС при ИБС, однако у больных с ИБС обнаружено снижение загруженности частиц ЛПВП ХС в расчете на апо-А-I [1, 10].

Недавно появился ряд работ, демонстрирующих изменения структурных особенностей частиц ЛП при ИБС. Показано нарушение холестеринакцепторной функции частиц ЛПВП при гипоальфалипотеинемии. При изменении уровня ХС в ЛПВП наблюдаются специфические структурные перестройки в ЛПВП₂ и ЛПВП₃, влияющие на способность акцентировать спин-меченные жирные кислоты и стероиды [8]. В ЛПВП₂ и ЛПВП₃ больных с ИБС происходит увеличение микровязкости поверхностного монослоя, о чем свидетельствует снижение отношения лецитин/сфингомиелин в этих частицах ЛП [11]. В этих же подклассах ЛПВП, выделенных из плазмы больных с ИБС, происходит уменьшение полярности микроокружения спинового фрагмента на глубине 0,8 нм от поверхности частицы ЛП [7]. Изменения белок-липидных взаимодействий и структуры ЛП-монослоя должны оказывать влияние на процессы взаимодействия ЛП с клетками.

Таким образом, нарушение холестеринакцепторной функции ЛПВП₃ при ИБС, по-видимому, обусловлено существенными изменениями структурного состояния липидов и липид-белковых взаимодействий в частице ЛП. Наши результаты согласуются с данными, полученными ранее [9] и свидетельствующими о том, что при инкубации эритроцитов, выделенных от больных с ИБС, с ЛПВП₂ и ЛПВП₃, полученных от тех же больных, молярное отношение ХС/ФЛ снижалось в меньшей степени, чем при инкубации эритроцитов с соответствующими подклассами ЛПВП, выделенными от здоровых лиц [9].

Необходимо отметить, что по последним представлениям ЛПВП взаимодействуют с клеткой посредством рецепторов [16], однако для эритроцитов такие рецепторы не обнаружены.

Результаты настоящего исследования позволяют предположить, что при атеросклерозе теряется способность ЛПВП, а именно фракции ЛПВП₃, акцентировать ХС из клеточных мембран. Дальнейшее выяснение причин, лежащих в основе утраты этой важной функции, позволит подойти к пониманию механизмов развития атеросклероза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Герасимова Е. Н., Перова Н. В., Курданов Х. А., Полесский В. А. // *Вопр. мед. химии.* — 1984. — Т. 30, № 6. — С. 71—76.
2. Иоффе Д. В., Лапин Е. Н., Добрецов Г. Е., Кузнецов А. С. // *Биол. мембраны.* — 1985. — Т. 2, № 9. — С. 944—949.
3. Камминс Г. З. Спектроскопия оптического смещения и корреляция фотонов: Пер. с англ. — М., 1978.
4. Климов А. Н., Петрова-Маслакова Л. Г., Мамонтова И. Ф. и др. // *Вопр. мед. химии.* — 1982. — Т. 20, № 2. — С. 122—125.
5. Климов А. Н., Шмелев Г. Е., Носкин В. А. и др. // *Биофизика.* — 1982. — Т. 27, № 3. — С. 458—462.
6. Климов А. Н., Алкснис Е. Г., Лозовский В. Т. // *Вопр. мед. химии.* — 1984. — Т. 30, № 4. — С. 71—74.
7. Панасенко О. М., Азизова О. А., Торховская Т. И., Дудаев В. А. // *Там же.* — № 6. — С. 40—45.
8. Руге Э. К., Герасимова Е. Н., Горшкова И. Н., Перова Н. В. // *Липопротеиды высокой плотности и атеросклероз.* — М., 1983. — С. 103—113.
9. Торховская Т. И., Горбатенкова Е. А., Дудаев В. А. и др. // *Вопр. мед. химии.* — 1986. — Т. 32, № 2. — С. 101—105.
10. Усатенко М. С., Олейник И. А., Денисенко А. Д. // *Кардиология.* — 1980. — Т. 20, № 8. — С. 20—23.
11. Фам Тхи Май. Фосфолипидный состав липопротеидов высокой плотности у больных ишемической болезнью сердца: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 1983.
12. Braginskaja T. G., Dobichin P. D., Ivanova M. A. et al. // *Phys. scripta.* — 1983. — Vol. 26, № 3. — P. 309—315.
13. Havel R. J., Eder H. A., Bragdon Y. // *J. clin. Invest.* — 1955. — Vol. 34, № 9. — P. 1343—1353.
14. Miller N. E. // *Lipids.* — 1978. — Vol. 13. — № 12. — P. 914—919.
15. Miller N. E., Ville A. L., Crook D. // *Nature.* — 1985. — Vol. 314, № 6006. — P. 109.
16. Oram J. F., Brinton E. A., Bierman E. L. // *J. clin. Invest.* — 1983. — Vol. 72. — P. 1611—1621.

Поступила 21.11.86

IMPAIRMENT OF CHOLESTEROL ACCEPTOR FUNCTION OF HIGH DENSITY LIPOPROTEINS IN PATIENTS WITH ISCHEMIC HEART DISEASE

N. S. Parfenova, L. G. Petrova-Maslakova, A. S. Kuznetsov, D. V. Ioffe, E. G. Alksnis, V. A. Noskin, M. A. Ivanova, I. V. Krivoruchenko

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

An ability of high density lipoproteins HDL₃ to accept cholesterol from erythrocyte

membranes was studied in healthy persons and in patients with ischemic disease of heart. The cholesterol-acceptory function was estimated as follows: by incorporation of fluorescent probes (cholestatrene and pyrene) into particles of HDL₃, by elimination of cholesterol from erythrocyte membranes and by increase of the lipoproteins size evaluated

using the method of quazi-resilient dispersion of laser light. In ischemic disease of heart the property of high density lipoproteins, specifically of HDL₃ fraction, to accept cholesterol from cell membranes was impaired. Middle size of HDL₃ particles was decreased in the patients with ischemic heart disease as compared with that of healthy persons.

УДК 616.33-002.44-092.9-085.355:577.152.344.042.2]-036.8:616.33-018.73-008.931:577.152.344

В. У. Дзодзуашивили

ВЛИЯНИЕ КОНТРИКАЛА НА АКТИВНОСТЬ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ПРОТЕИНАЗ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ЖЕЛУДКА КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЯЗВЕ

Медицинский стоматологический институт, Москва

Изучение биохимических механизмов ulcerогенеза на различных метаболических уровнях является необходимым этапом для разработки эффективных методов консервативного лечения язвенной болезни желудка (ЯБЖ), среди которых значительное место занимают приемы местного лечения в случае неэффективности обычной терапии [4, 9, 12, 13]. Поскольку нарушение целостности слизистой оболочки желудка (СОЖ) при ulcerогенезе в значительной степени определяется функциональным состоянием лизосомальной протеолитической системы СОЖ [1—3, 10], в работе была поставлена задача исследовать характер влияния одного из ингибиторов протеиназ медицинского назначения — контрикала на структурную целостность лизосом СОЖ и активность лизосомальных протеиназ на модели экспериментальной ЯБЖ у крыс, так как предварительные исследования *in vitro* и *in situ* дали основание рассматривать контрикал как адекватное средство при местном лечении язвы желудка [6].

Методика

ЯБЖ у крыс Вистар с массой тела 200—250 г вызывали путем двукратного внутрибрюшинного введения индометацина («Sigma», США) в суммарной дозе 6 мг на 100 г массы тела с интервалом между инъекциями 6 ч в сочетании с обездвиживанием [15, 17]. Спустя 36 ч после первого введения животным, предварительно голодавшим 24 ч при свободном доступе к воде, под эфирным наркозом вскрывали брюшную полость, желудок и в область язвенных поражений вводили микрошприцем 50 мкл контрикала в дозе 1000 АТрЕ или наносили 50 мкл контрикала в комплексе с пластификатором — клеем МК-8. Комплекс контрикал — клей МК-8 готовили в соотношении 1:7, с конечной концентрацией контрикала 16000 АТрЕ/мл.

Животным контрольных групп вводили аналогичное количество физиологического раствора или наносили только клей МК-8. Общим контролем служили оперированные животные, которым за 36 и 30 ч до операции вводили физиологический раствор.

Желудок и брюшную полость зашивали, а затем спустя от 6 до 36 ч после оперативного вмешательства, животных деканитировали, СОЖ отделяли от серозной оболочки в местах язвенного поражения и гомогенизировали по стандартной методике, используя в качестве среды гомогенизации 0,25 М раствор сахарозы рН 7,4, содержащий 1 мМ ЭДТА [11]. В полученных гомогенатах устанавливали общую активность основных лизосомальных протеиназ катепсинов А, В и С спектрофлуориметрическим методом [5] с использованием в качестве субстратов соответственно N-КБЗ-глу-L-тир; N-бензонил-D, L-arg-β-нафтиламида, гли-фен-β-нафтиламида («Serva», ФРГ) и активность катепсина D спектрофотометрическим методом [14] с использованием в качестве субстрата гемоглобина («Sigma», США), а также концентрацию белка [16]. В надосадочной жидкости, полученной при 105 000 g, 60 мин, определяли неседиментируемую активность лизосомальных протеиназ.

Результаты и обсуждение

Из анализа результатов определения уровня неседиментируемой активности лизосомальных протеиназ в СОЖ, представленных в таблице, видно, что наиболее существенные нарушения структурной целостности лизосомального аппарата имели место у животных с язвенным поражением желудка и при аппликации в места поражения клея МК-8, не содержащего контрикала. В этих случаях на всех сроках исследования уровень неседиментируемой активности относительно контроля составлял в среднем для катепсина А 144—176 %, для катепсина В 146—181 %, для катепсина С 144—178 % и для катепсина D

Неседиментируемая активность (в %) лизосомальных протеиназ в СОЖ при действии контрикала на фоне экспериментальной ЯБЖ

Категории	Контроль	ЯБЖ			ЯБЖ + МК-8		
		12 ч	24 ч	36 ч	12 ч	24 ч	36 ч
A	9,18 ± 0,51	14,06 ± 0,63***	15,10 ± 0,81***	16,36 ± 0,72***	13,21 ± 0,42**	17,07 ± 0,62***	16,20 ± 0,54***
B	3,02 ± 0,18	4,87 ± 0,28***	5,47 ± 0,30***	5,34 ± 0,31***	4,42 ± 0,20**	5,37 ± 0,41***	5,02 ± 0,24***
C	5,07 ± 0,30	8,34 ± 0,32***	7,95 ± 0,28***	9,00 ± 0,47***	8,74 ± 0,45***	7,28 ± 0,36**	8,50 ± 0,60***
D	7,05 ± 0,36	12,90 ± 0,70***	12,14 ± 0,57***	13,41 ± 0,63***	12,54 ± 0,73***	13,69 ± 0,64***	11,85 ± 0,58***

Продолжение

Категории	Контроль	ЯБЖ + (МК-8 + контрикал)			ЯБЖ + контрикал			
		12 ч	24 ч	36 ч	6 ч	12 ч	18 ч	24 ч
A	9,18 ± 0,51	13,10 ± 0,60*	11,40 ± 0,57*	10,82 ± 0,58	15,46 ± 0,70***	14,48 ± 0,61***	12,36 ± 0,54*	11,84 ± 0,58*
B	3,02 ± 0,18	4,59 ± 0,24**	4,12 ± 0,27*	3,75 ± 0,21*	4,96 ± 0,29***	5,20 ± 0,20***	4,70 ± 0,31**	4,00 ± 0,24*
C	5,07 ± 0,30	7,80 ± 0,37**	6,39 ± 0,43*	5,89 ± 0,28	8,12 ± 0,49***	7,57 ± 0,61***	6,58 ± 0,39*	6,18 ± 0,47
D	7,05 ± 0,36	11,96 ± 0,44***	9,38 ± 0,65*	8,36 ± 0,48	12,30 ± 0,80***	12,48 ± 0,62***	11,05 ± 0,74**	9,40 ± 0,69*

Примечания. Представлены средние ($M \pm m$) данные из 6—8 опытов. Одна звездочка — $p < 0,05$; две — $p < 0,01$, три — $p < 0,001$.

168—194%. Следует отметить, что для большинства ферментов наибольший уровень неседиментируемой активности выявлен через 24 и 36 ч после оперативного вмешательства и, соответственно, через 30 и 72 ч после введения индометацина.

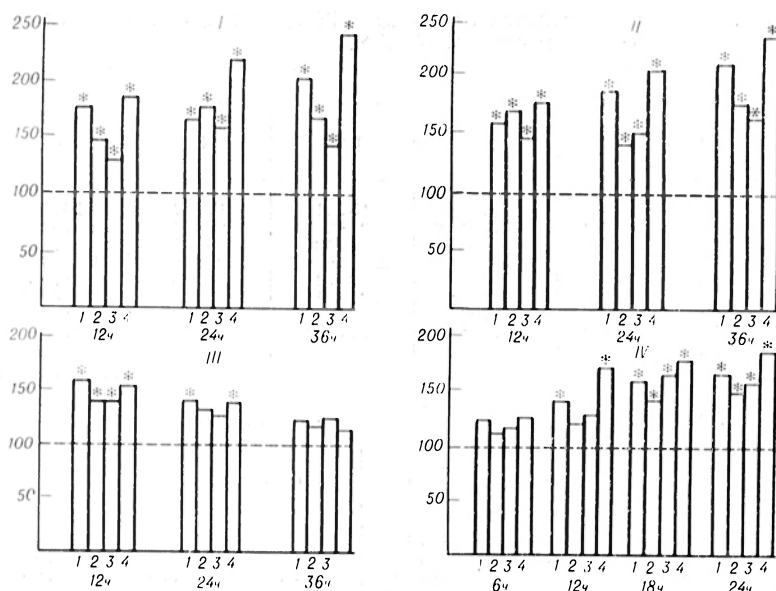
Эти данные свидетельствуют о выраженном деструктурировании лизосомальных мембран и выходе лизосомальных гидролаз (в том числе кислых пептидгидролаз) во внеклеточное пространство, что является одним из существенных факторов развития язвы СОЖ [3].

Обнаружена определенная тенденция к снижению уровня неседиментируемой активности протеиназ лизосом в СОЖ при введении контрикала и прежде всего при использовании в качестве средства местного лечения сочетания контрикала с клеем МК-8. В последнем случае отмечена нормализация уровня неседиментируемой активности ферментов лизосом к 36-му часу экспозиции комплекса контрикал — клей МК-8.

Полученные данные могут рассматриваться с точки зрения активизации репаративных процессов в СОЖ при действии контрикала, причем использование данного ингибитора протеиназ, по-видимому, способствует пролонгированному действию используемого препарата, по крайней мере в отношении лизосомального аппарата СОЖ. В этой свя-

зи следует отметить, что лизосомальный аппарат клетки отличается высокой интенсивностью обновления — в пределах 24 ч [7], отражением чего и является, вероятно, нормализация структурной целостности мембран лизосом на поздних сроках использования контрикала и комплекса контрикал — клей МК-8.

Существенный интерес представляют результаты определения в СОЖ общей активности протеолитических ферментов лизосом (см. рисунок). Как видно, в зоне язвообразования обнаружено отчетливое увеличение активности лизосомальных протеиназ во все сроки исследования. При этом наиболее значимое увеличение активности (до 158—202% от контроля) было характерно для категорий A и D, тогда как активность категорий B и C изменялась в меньшей степени и составляла в среднем 132—173% от контроля. Следует отметить практически аналогичный характер изменения активности всех лизосомальных протеиназ у животных как в интактной зоне язвообразования, так и при аппликации в область язвенного поражения клея МК-8. Полученные данные согласуются с имеющимися представлениями об инициации процесса язвообразования в результате активации системы лизосомальных протеиназ, что может являться следствием повреждения лизосомальных, а также плазматиче-



Общая активность катепсинов А (1), В (2), С (3) и D (4) в СОЖ крыс при экспериментальном язвообразовании на фоне действия контрикала.

По оси абсцисс — время (в ч), по оси ординат — активность ферментов (в % от контроля). I — ЯБЖ; II — ЯБЖ + МК-8; III — ЯБЖ + контрикал с МК-8; IV — ЯБЖ + контрикал. Звездочкой отмечено $p < 0.005$ — 0.001 .

ских мембран СОЖ [1, 3]. В пользу последнего свидетельствует резкое увеличение в желудочном содержимом у больных ЯБЖ активности щелочной фосфатазы, которая практически не определяется у здоровых людей [8].

Характер изменения общей активности лизосомальных протеиназ при введении в область язвенного поражения контрикала и аппликации в зону язвообразования комплекса контрикал — клей МК-8 был различным. В первом случае выявлено определенное снижение активности всех протеиназ через 6 ч после инъекции ингибитора (уровень активности ферментов не превышал 109—125% от контроля). На более поздних сроках исследования (к 12-му часу) уровень активности протеиназ несколько возрастал, а через 18 и 24 ч он был лишь незначительно меньше активности, выявленной у животных в зоне язвообразования, которым не вводили контрикал (140—182% от контроля). Во втором случае динамика изменения протеиназ лизосом имела обратную зависимость от времени. Через 12 ч после аппликации в зону язвообразования комплекса контрикал — клей МК-8 не обнаружено значимых изменений в активности протеиназ лизосом по сравнению с уровнем в области «интактной» язвы и при аппликации только клея МК-8 (139—157%). По мере увеличения времени экспозиции пластификатора с ингибитором в области язвообразования, активность ферментов постепенно снижалась и к 36-му часу составляла лишь

112—122% от контроля. Вероятно, в первом случае снижение эффекта ингибирующего действия контрикала с увеличением времени, прошедшего от инъекции, связано с уменьшением его локальной концентрации в области язвообразования. В свою очередь аппликация контрикала в комплексе с клеем МК-8 обеспечивает более продолжительное его удержание в зоне язвообразования.

Таким образом, результаты проведенного исследования дают основание рассматривать контрикал, а также его использование в комплексах с пластификаторами медицинского назначения как средство, нормализующее структурно-функциональное состояние лизосомального аппарата при язвообразовании в СОЖ. При этом сочетание введения контрикала и его аппликация с клеем МК-8 в области язвенного поражения, по-видимому, будет способствовать эффективности действия ингибитора, что может найти применение в практике местного лечения ЯБЖ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Амиров Н. Ш., Белостоцкий Н. И. // Пат. физиол. — 1984. — № 2. — С. 47—50.
2. Амиров Н. Ш., Трубицына Н. Е., Антонов Д. В. // Там же. — 1978. — № 3. — С. 31—33.
3. Белостоцкий Н. И., Амиров Н. Ш. // Структура и функции лизосом. — М., 1986. — С. 13—14.
4. Блинков И. Л., Луцевич Э. В., Карелина Е. А. и др. А. С. 115982 А, СССР.

5. Васильев А. В., Капелевич Т. А., Тумельян В. А. // Вопр. мед. химии. — 1983. — № 3. — С. 127—130.
6. Дзодзуашвили В. У. // Там же. — 1987. — № 5. — С. 91—93.
7. Дин Р. Процессы распада в клетке: Пер. с англ. — М., 1981.
8. Иванов Г. Г. // Вопр. мед. химии. — 1978. — № 2. — С. 206—210.
9. Казантисев Н. К., Гаджикулиев А. С. // Сов. мед. — 1986. — № 8. — С. 52—57.
10. Львов И. Ф., Левицкий А. П. Мир Саид Ахмед // Физиол. журн. — 1981. — № 2. — С. 169—171.
11. Покровский А. А., Арчаков А. Н. // Современные методы в биохимии. — М., 1968. — Т. 2. — С. 5—58.
12. Рыс Е. С. // Клин. мед. — 1986. — № 8. — С. 18—27.
13. Соколов Л. К., Никифоров П. А., Василенко М. О. и др. // Сов. мед. — 1985. — № 8. — С. 107—109.
14. Barrett A. J., Heath M. F. // Lysosomes: A Laboratory Handbook / Ed. J. T. Dingler. — Amsterdam, 1977. — P. 19—45.
15. Kobayashi K., Arakawa T., Satoh H. et al. // Prostaglandins. — 1985. — Vol. 30, N 4. — P. 609—618.
16. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
17. Nafradi J., Balint G. A., Csali S., Varro V. // Agents a. Actions. — 1984. — Vol. 15, N 5—6. — P. 549—550.

Поступила 07.08.87

EFFECT OF CONTRICAL ON ACTIVITY OF LYSOSOMAL PROTEINASES IN GASTRIC MUCOSE OF RATS WITH EXPERIMENTAL ULCER

V. U. Dzodzuashvili

Medical Stomatological School, Moscow

Total and non-sedimentable activities of lysosomal proteinases were studied in rat gastric mucose under conditions of normal state and of ulcer development as well as after treatment of the ulcer area with contrical and with the mixture containing contrical and medical glue MK-8. Both total activity of cathepsins A, B, C and D and their non-sedimentable activity were increased by 32-102% and 44-94%, respectively, under conditions of ulcerogenesis. Contrical and the mixture of the drug with glue MK-8 normalized the enzymatic activity studied; the mixture containing the inhibitor was the most effective. Inhibitors of proteinases combined with medical plastificators might be used in local treatment of stomach ulcerous disease.

УДК 618.2-07:616.154.453:616.153.961-074

Г. В. Ловакумов, Н. В. Матвеевцева, Н. Н. Вашкевич,
С. В. Врубель

ИССЛЕДОВАНИЕ СВЯЗАННОЙ С БЕРЕМЕННОСТЬЮ РАЗНОВИДНОСТИ ТРАНСКОРТИНА ЧЕЛОВЕКА

Институт биоорганической химии АН БССР, Минск

Специфическое связывание глюкокортикоидов и прогестиннов плазмой крови человека обусловлено присутствием в ней кортикостероидсвязывающего глобулина (транскортина). Содержание этого гликопротеина в крови при беременности увеличивается в 2—3 раза [2]. Обнаружено [2, 3], что беременность сопровождается также появлением разновидности транскортина, отличающейся строением углеводного компонента от транскортина нормальной крови доноров. Содержание этой разновидности транскортина в сыворотке ретроплацентарной крови достигает 10% от общего содержания транскортина [2, 3].

Представляло интерес провести детальное исследование физико-химических и иммунологических свойств связанной с беременностью разновидности транскортина в сравнении со свойствами транскортина нормальной крови доноров.

Методика

Сыворотку нормальной крови доноров в возрасте 20—38 лет получали на Белорусской республиканской станции переливания крови, сыворотку ретроплацентарной крови — из родильных отделений клиник Минска. Транскортин выделяли, как описано ранее [1], а разновидность транскортина, связанную с беременностью, получали с помощью аффинной хроматографии на конканавалин А-сефарозе [2].

Электрофоретические исследования проводили в приборе модели GE 2/4 фирмы «Pharmacia» (Швеция). Стандартные методики электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в отсутствие и в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) описаны ранее [5, 12]. Электрофорез в крупнопористом геле (0,3% бис-акриламида) осуществляли по методике [8]. Изоэлектрофокусирование проводили в столбиках 7,5% ПААГ, содержащего 1,8% сервалита AG 2-4 и 0,2% сервалита AG 3—7 фирмы «Serva» (ФРГ), используя прибор ПЭФА-1 в режиме постоянной мощности с ограничением напряжения до 400 В. Для измерения градиента pH вдоль столбика геля после фокусирования гель извлекали из стеклянной трубки, разрезали на кусочки

длиной 0,5 см и элюировали сывалиты дистиллированной водой (1 мл на каждый кусочек геля).

Аминокислотный состав гликопротеидов определяли после гидролиза 5,7 н. HCl в течение 24 ч в запаянных ампулах при 110 °C с помощью автоматического анализатора модели 3201 фирмы LKB (Швеция). N-концевые аминокислотные остатки выявляли в виде дансильных производных [13]. Для определения C-концевых аминокислотных остатков использовали карбоксипептидазу Y фирмы «Pierce» (США) [17].

Равновесный диализ проводили в течение 48 ч при 4 °C [8]. Радиоактивность ³H-производных стероидов измеряли с помощью жидкостно-сцинтилляционного счетчика модели «Mark-III» фирмы «Tracor Eнгора» (Голландия).

Гликопротеины радиойодировали с использованием йодогена фирмы «Pierce», как описано ранее [6]. Для измерения радиоактивности меченных ¹²⁵I гликопротеидов применяли гамма-счетчик модели «Ria-Gamma» фирмы «LKB — Wallac» (Финляндия). Для получения антисывороток к транскартину и его разновидности, связанной с беременностью, проводили иммунизацию этими гликопротеинами кроликов новозеландской породы по методике [2]. Взаимодействие гликопротеинов с антисыворотками изучали следующим образом. В пробирках инкубировали в течение 3 ч при комнатной температуре возрастающие количества одного из гликопротеинов и его меченное ¹²⁵I производное (30 000—40 000 имп/мин на 1 пробу) с раствором антисыворотки в разведении, обеспечивающем связывание метки на 70—80%. Для разделения фракций свободного и связанного антисывороткой гликопротеина в пробирки прибавляли раствор полиэтиленгликоля-6000 до конечной концентрации 18%. После центрифугирования (2000 g, 10 мин) надосадочную жидкость отбрасывали и измеряли радиоактивность осадка. Константы ассоциации определяли графическим построением по методу [9].

Результаты и обсуждение

При диск-электрофорезе в ПААГ при стандартных условиях препараты связанной с беременностью разновидности транскартина давали одну полосу в зоне α-глобулинов, совпадающую по своему положению с полосой транскартина нормальной крови доноров (R_f 0,62 и 0,41 в 7,5% и 10% гелях соответственно). При электрофорезе в присутствии ДСН полосы обоих гликопротеинов также совпадали (M_r = 55 000). В крупнопористом ПААГ при условиях, когда транскартин нормальной крови доноров разделялся на два электрофоретических варианта [8], разновидность транскартина давала одну полосу, совпадающую по своему положению с полосой более подвижного электрофоретического варианта транскартина нормальной крови доноров (рис. 1).

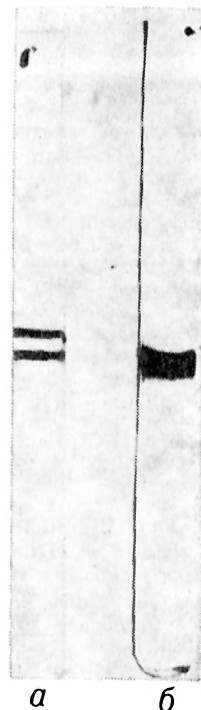


Рис. 1. Электрофорез в крупнопористом ПААГ транскартина нормальной крови доноров (а) и разновидности транскартина, связанной с беременностью (б), в отсутствие ДСН.

Ранее было установлено [11], что связанная с беременностью разновидность транскартина содержит только трехантенные олигосахаридные цепи N-ацетиллактозаминного типа и соответственно большее число терминальных остатков N-ацетилнейраминной кислоты на молекулу гликопротеина, чем транскартин нормальной крови доноров, в составе которого лишь 2 из 5 углеводных цепей являются трехантенными (остальные — двухантенные) [4, 10]. Поэтому при изоэлектрическом фокусировании данной разновидности, а также суммарного транскартина ретроплацентарной крови можно было ожидать появления дополнительных полос в области более низких значений pH по сравнению с полосами, получаемыми при изоэлектрофокусировании транскартина нормальной крови доноров. Как видно на рис. 2, в препаратах транскартина ретроплацентарной крови действительно наблюдалась полоса при pH 3,5, отсутствующая в транскартине нормальной крови доноров. Эта же полоса обнаруживалась и при фокусировании связанной с беременностью разновидности транскартина (см. рис. 2). Кроме того, о более глубоком сialiровании разновидности транскартина свидетельствует отсутствие полосы при pH 4,2, проявляющейся как в транскартине нормальной крови доноров, так и в суммарном

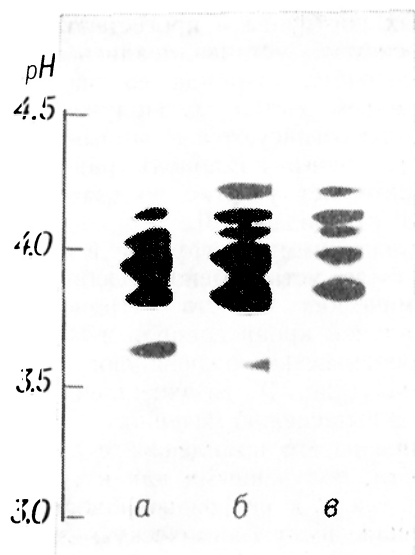


Рис. 2. Изоэлектрическое фокусирование разновидностей транскортина, связанной с беременностью (а), и транскортина ретроплацентарной (б) и нормальной крови доноров (в).

транскортине ретроплацентарной крови. В целом же проявляющаяся при электрофокусировании микрогетероген-

Аминокислотный и моносахаридный состав транскортина и его разновидности, связанной с беременностью

Аминокислоты, моносахариды**	Содержание гликопротеина, моль/моль*	
	транскортин	разновидность
Asp	33,2	31,2
Thr	21,8	20,4
Ser	27,2	26,0
Glu	30,4	25,3
Pro	9,8	10,2
Gly	18,7	18,1
Ala	20,4	20,3
Val	21,5	18,9
$\frac{1}{2}$ Cys	1,9	1,9
Met	9,3	7,6
Ile	17,3	15,5
Leu	32,6	30,4
Tyr	8,5	8,7
Phe	17,2	16,2
His	9,5	7,7
Lys	12,6	13,3
Arg	7,7	7,4
Trp	3,7	3,6
Fuc	1,2	1,2
Man	15,0	15,0
Gal	12,1	14,8
GlcNAc	22,1	24,3
NewAc	10,3	12,7

* Приведены средние значения по результатам двух независимых определений.

** Углеводный состав определен ранее [2].

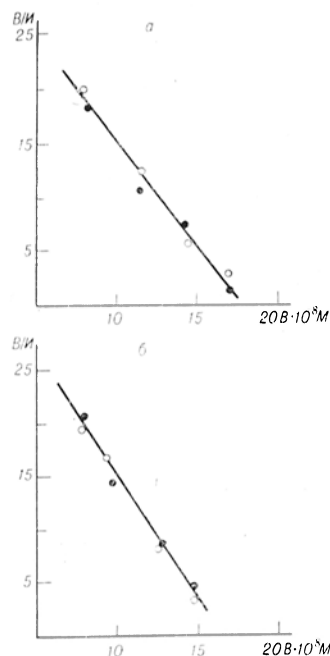


Рис. 3. Скэтчардовский график для взаимодействия транскортина (светлые кружочки) и его разновидности (темные кружочки) с кортизолом (а) и прогестероном (б).

B — концентрация стероида, связанного белком; U — равновесная концентрация свободного стероида.

ность, очевидно, связана с типичным для гликопротеидов частичным десалированием углеводных цепей.

Как видно из таблицы, аминокислотный состав связанной с беременностью разновидности транскортина практически совпадает с составом гликопротеина нормальной крови доноров ($r=0,99$). Найдено, что как и у обычного транскортина [2], в полипептидной цепи его разновидности N-концевое положение занимает остаток метионина, а С-концевое — остаток лейцина.

Измерение оптической плотности белковых растворов известной концентрации показало, что коэффициент экстинкции при длине волны 280 нм ($A_{280, 1\text{ см}}^{1\%}$) разновидности транскортина совпадает с ранее определенным значением для суммарного транскортина ретроплацентарной крови [2] и составляет 6,9.

Как видно на рис. 3, транскортин и его разновидность с одинаковым сродством связывают как кортизол, так и прогестерон. Дополнительное подтверждение тождественности стероидсвязывающих свойств этих гликопротеинов было получено в специальных экспериментах с использованием метода равновесного диализа, когда внешний и внутрен-

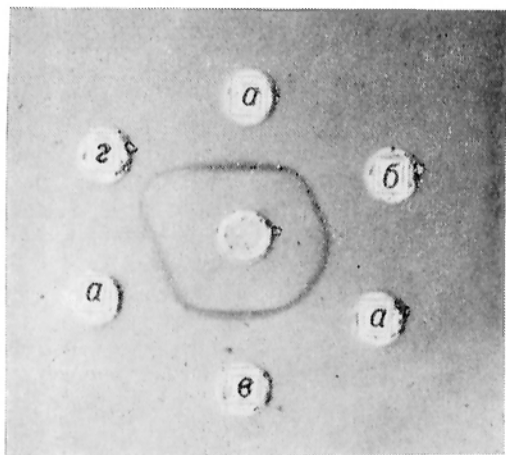


Рис. 4. Иммунодиффузия в агаровом геле разновидности транскортина, связанной с беременностью (а), и транскортина ретроплатцитарной (б) и нормальной крови доноров (в).

В центральной лунке кроличья антисыворотка к транскортину, в лунке (с) физиологический раствор.

ний растворы диализной системы содержали в равных концентрациях соответственно транскортин и его разновидность. При всех изученных концент-

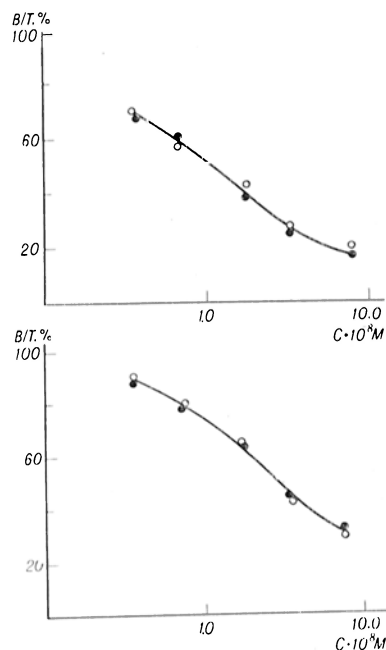


Рис. 5. Ингибирование связывания ^{125}I -транскортина антисывороткой к транскортину (а) и антисывороткой к связанной с беременностью разновидности (б) немеченым транскортином (светлые кружочки) и разновидностью транскортина (темные кружочки).

B/T — доля ^{125}I -транскортина, связанного антисывороткой; C — концентрация немеченого гликопротеина.

рациях кортизола и прогестерона в такой системе устанавливались равные концентрации стероида во внешнем и внутреннем растворах. Полученные результаты согласуются с данными о том, что углеводный компонент транскортина не принимает участия во взаимодействии со стероидами [8].

Методом иммунодиффузии в агаровом геле было установлено подобие иммунохимических свойств транскортина нормальной крови доноров и связанной с беременностью разновидности транскортина (рис. 4). Количественные данные по вытеснению меченого ^{125}I транскортина из его комплексов с антисыворотками, полученными как к транскортину, так и к его разновидности, подтвердили иммунохимическую идентичность этих гликопротеинов (рис. 5). Для обоих гликопротеинов константа ассоциации с антисывороткой к транскортину составила $1,0 \pm 0,2 \cdot 10^9$ л/моль ($n=6$), а с антисывороткой к связанной с беременностью разновидности транскортина — $1,8 \pm 0,3 \cdot 10^9$ л/моль ($n=6$).

Таким образом, результаты настоящей работы свидетельствуют о тождественности полипептидных компонентов транскортина нормальной крови доноров и связанной с беременностью разновидности этого гликопротеина. Следовательно, появление при беременности особой разновидности транскортина связано с изменениями характера гликозилирования этого гликопротеина в данном физиологическом состоянии организма. В дальнейшем предстоит выяснить конкретное место биосинтеза разновидности транскортина и факторы, регулирующие ее содержание в крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ахрем А. А., Авакумов Г. В., Кукушкина И. И. и др. // Изв. АН БССР, сер. хим. наук. — 1977. — № 6. — С. 111—115.
2. Ванкевич И. И., Матвеевцева И. В., Авакумов Г. В., Стрельченко О. А. // Биохимия. — 1984. — Т. 49, № 12. — С. 1977—1985.
3. Стрельченко О. А., Авакумов Г. В., Ахрем А. А. // Докл. АН СССР — 1983. — Т. 272, № 1. — С. 233—236.
4. Akhrem A. A., Avakumov G. V., Akhrem L. B. et al. // Biochim. biophys. Acta. — 1982. — Vol. 714, № 1. — P. 177—180.
5. Davis B. J. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1964. — Vol. 121, pt 2. — P. 404—427.
6. Fraker P. J., Speck J. C. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1978. — Vol. 80, № 4. — P. 849—857.

7. Hayashi R. // Meth. Enzymol. — 1977. — Vol. 47. — P. 84—93.
8. Mickelson K. E., Harding G. B., Forshoejel M., Westphal U. // Biochemistry (Wash.). — 1982. — Vol. 21, № 4. — P. 654—660.
9. Scatchard G. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1949. — Vol. 51, № 2. — P. 660—672.
10. Strel'chyonok O. A., Avvakumov G. V., Matveentseva I. V. et al. // Biochim. biophys. Acta. — 1982. — Vol. 705, № 1. — P. 167—173.
11. Strel'chyonok O. A., Avvakumov G. V., Akhrem A. A. // Carbohydr. Res. — 1984. — Vol. 134, № 1. — P. 133—140.
12. Weber K., Osborn M. J. // J. biol. Chem. — 1969. — Vol. 244, № 16. — P. 4406—4412.
13. Woods K., Wang K. // J. Biochim. biophys. Acta. — 1967. — Vol. 133, № 2. — P. 369—370.

Поступила 12.12.86

VARIETY OF HUMAN TRANSCORTIN RELATED TO PREGNANCY

G. V. Avvakumov, I. V. Matveentseva, I. I. Vashekovich, S. V. Vrubel

Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Minsk

Properties of the human transcortin variety related to pregnancy were studied. The transcortin variety has been found in retroplacental blood serum and differed from the glycoprotein of healthy donors by the structure of carbohydrate moiety. Physico-chemical and immunochemical properties of the transcortin variety studied, specific mainly to its polypeptide component, were similar to the properties of transcortin from blood of healthy donors.

УДК 616.155.1-008.931:577.152.2

А. А. Сокольников, В. М. Коденцова, Г. П. Гулидова,
Г. Д. Миронова

АКТИВНОСТЬ Na, K-АТФазы В ТЕНЯХ ЭРИТРОЦИТОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ В ПРИСУТСТВИИ АЛАМЕТИЦИНА И П-НИТРОФЕНИЛФОСФАТА

Институт прикладной молекулярной биологии Минздрава СССР, Институт биологической физики АН СССР, Москва

Эритроциты нередко используют при исследованиях механизмов функционирования различных ферментов, в том числе Na,K-АТФазы. Характер и направленность изменений свойств этого фермента в эритроцитах отражает в определенной степени направленность изменения активности Na,K-АТФазы в других тканях [10]. Активность Na,K-АТФазы в эритроцитах может являться критерием прогноза и диагностики ряда заболеваний в связи с чем определение активности данного фермента в эритроцитах представляется важным. Однако мембраны эритроцитов характеризуются низкой плотностью натриевых насосов (от 200 до 1000 молекул Na,K-АТФазы на эритроцит), которая в 170 раз ниже таковой в мембранах мозга и в 400 раз ниже, чем в мембранах почек [8]. Эта особенность эритроцитов (так же как и то, что их мембрана непроницаема для экзогенного АТФ и продуктов АТФазной реакции, а каталитический центр фермента находится с внутренней ее стороны) обуславливает трудность определения активности Na,K-АТФазы в интактных эритроцитах млекопитающих. Для выявления активности этого фермента в эритроцитах предлагают по-

вторное замораживание — оттаивание [8], обработку эритроцитов детергентами [2, 12], ЭДТА [2], получение теней эритроцитов [2, 3]. Сущность всех этих методов состоит в нарушении целостности мембраны эритроцитов, что обеспечивает доступность АТФ к гидролитическому центру Na,K-АТФазы. За последние годы появились работы, в которых в качестве агента, повышающего проницаемость мембран для ионов и АТФ (но в отличие от детергентов не нарушающего в низких концентрациях белок-липидные взаимодействия в мембране), использовали пептидный антибиотик — аламетицин [4, 13]. Особый интерес представляют данные об успешном использовании этого антибиотика для более полного выявления активности Na,K-АТФазы в препаратах сарколеммальных везикул сердца [13].

Целью данной работы был подбор условий для более полного выявления активности Na,K-АТФазы путем обработки мембран эритроцитов аламетицином, а также при использовании в качестве субстрата для Na,K-АТФазы п-нитрофенилфосфата, способного проникать через эритроцитарную мембрану [11].

В работе использовали крыс-самцов породы Спрэг — Доули. Эритроциты выделяли из смешанной артериальной и венозной крови [2, 3], полученной после декапитации животных. В качестве антикоагулянта использовали гепарин (200 ед/мл). Тени эритроцитов получали с помощью гипосмотического гемолиза клеток 10 мМ трис-НСl-буфером pH 7,4, содержащим 0,5 мМ ЭДТА [2]. Конечный осадок теней эритроцитов разводили 10 мМ трис-НСl-буфером pH 7,4 до 2 объемов от первоначального объема эритроцитов. Полученные фракции мембран эритроцитов хранили при -70°C .

Содержание белка в мембранных препаратах определяли по методу [14] в присутствии додецилсульфата натрия.

Преникубацию теней эритроцитов с аламетицином (аламетицин растворяли в дважды перегнанном этаноле) проводили при комнатной температуре в среде следующего состава: 60 мМ трис-НСl pH 7,4, 0,5 мг/мл белка теней эритроцитов, 0,4% этанола, 0—0,4 мг/мл аламетицина.

АТФазную реакцию начинали добавлением 1 мл среды инкубации, содержащей 4 мМ АТФ, 4 мМ MgCl_2 , 120 мМ NaCl, 30 мМ KCl, 30 мМ трис-НСl pH 7,4 при 37°C . Активность АТФазы определяли по нарастанию в среде инкубации неорганического фосфата по методу [15]. Активность Na,K-АТФазы рассчитывали по разнице между суммарной активностью АТФазы и активностью АТФазы, измеренной в присутствии 1 мМ уабаина. Время инкубации (30 мин) было в пределах, в которых сохраняется линейность нарастания продукта АТФазной реакции.

K⁺-п-нитрофенилфосфатазную активность определяли методом непрерывной регистрации изменения оптической плотности образующегося при гидролизе п-нитрофенола при 410 нм на спектрофотометре «Ultrospec-4050» (I.K.B., Швеция). Состав среды инкубации (объем 2,4 мл): 5 мМ п-нитрофенилфосфат, 5 мМ MgCl_2 , 20 мМ KCl, 25 мМ имидазол pH 7,6, в присутствии 1 мМ уабаина или без него, 25°C . В пробу вносили 300 мкг белка теней эритроцитов. Для расчета активности использовали коэффициент молярной экстинкции п-нитрофенола, равный 17 500 [5].

Результаты и обсуждение

Удельная активность Na,K-АТФазы препаратов мембран эритроцитов человека и животных, по данным разных авторов, колеблется в широком диапазоне [6, 9]. Это обусловлено, по-видимому, различиями самих препаратов, неодинаковыми способами обработки мембран эритроцитов и условиями определения активности Na,K-АТФазы (температура, соотношение ионов Na^+ и K^+ в среде и т. д.). Известно, что активность Na,K-АТФазы зависит от соотношения Na^+/K^+ и достигает максимального значения при соотношении этих элементов

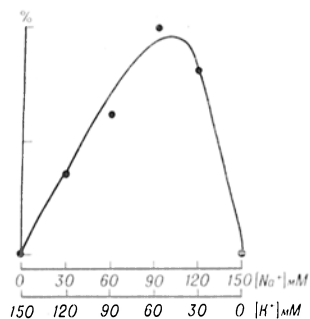


Рис. 1. Зависимость активности Na,K-АТФазы теней эритроцитов крысы от соотношения ионов Na^+ и K^+ в среде инкубации. По оси ординат — активность Na,K-АТФазы (в %).

120/30 [1]. Исследование зависимости Na,K-АТФазной активности теней эритроцитов крысы от соотношения ионов в среде показало, что эта зависимость аналогична таковой для Na,K-АТФазы, выделенной из других органов и тканей (рис. 1) [1]. Поэтому в дальнейшем Na,K-АТФазную активность определяли при соотношении $\text{Na}^+/\text{K}^+ = 120/30$. Удельная активность Na,K-АТФазы в указанных условиях эксперимента составила 0,13 мкмоль P_i на 1 мг белка теней эритроцитов крысы в 1 ч. При этом MgАТФазная активность была равна 0,96 мкмоль P_i на 1 мг белка в 1 ч. Следовательно, отношение MgАТФазной к активности Na,K-АТФазы приближается к 10, что затрудняет измерение активности Na,K-АТФазы в используемом препарате.

В работе [13] было показано, что преникубация в течение 20 мин микросом сердца с аламетицином приводила к заметному повышению активности Na,K-АТФазы и практически не влияла на базальную MgАТФазную активность.

На рис. 2 и 3 представлены результаты экспериментов по изучению степени изменения активностей Na,K- и Mg-АТФаз в зависимости от соотношения концентраций аламетицина и белка мембранных фракций эритроцитов крыс в среде преникубации (20 мин при комнатной температуре). Как следует из полученных данных (см. рис. 2), зависимость Na,K-АТФазной активности от соотношения аламетицин/белок мембран представляет собой колоколообразную кривую с выраженным максимумом при соотношении аламетицин/белок 0,3. При данной концентрации антибиотика наблюдается в среднем 2,5-кратное увели-

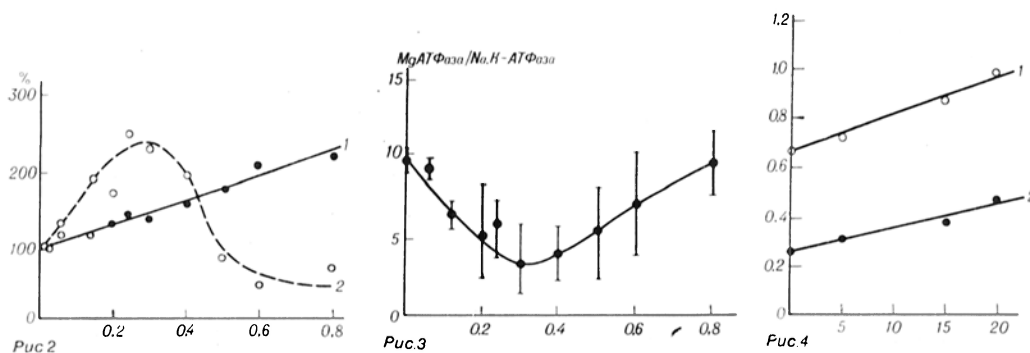


Рис. 2. Зависимость Mg-АТФазной (1) и Na,K-АТФазной (2) активностей от соотношения аламетицина и белка (в мг/мг) в среде преникубации.

Условия эксперимента указаны в разделе «Методика», время преникубации 20 мин.

Рис. 3. Соотношение активностей Mg-АТФазы и Na,K-АТФазы теней эритроцитов крысы в зависимости от соотношения аламетицина/белок (в мг/мг) в среде преникубации.

Рис. 4. Степень активации Mg-АТФазы (1) и Na,K-АТФазы (2) в зависимости от времени преникубации.

Соотношение аламетицина / белок (в мг/мг) 0,3, остальные условия указаны в разделе «Методика». По оси абсцисс — время преникубации (в мин), по оси ординат — АТФазная активность (в мкмоль Φ_{II} на 1 мг белка в 1 ч).

чение Na,K-АТФазной активности. В то же время активность Mg-АТФазы медленно нарастает во всем диапазоне используемых концентраций аламетицина. При исследовании зависимости соотношения активности Mg-АТФазы к Na,K-АТФазы от соотношения концентраций аламетицина и белка мембранных фракций эритроцитов в среде преникубации минимальная величина этого отношения ($3,4 \pm 1,6$) отмечена при соотношении аламетицина / белок мембран приблизительно 0,3 (см. рис. 3). Полученная величина совпадает с данными работы [13] о максимальной активации Na,K-АТФазы микросом сердца при соотношении аламетицина/белок фракции 0,25.

Следующим этапом работы было исследование степени активации Na,K- и Mg-АТФаз в зависимости от времени преникубации мембранного препарата с аламетицином. Как следует из данных, представленных на рис. 4, с увеличением времени преникубации мембранного препарата с аламетицином активность обеих АТФаз возрастает практически параллельно. Таким образом, длительная преникубация с аламетицином, хотя и приводит к активации Na,K-АТФазы, но не изменяет соотношения Mg-АТФазной и Na,K-АТФазной активностей, в связи с чем длительная преникубация теней эритроцитов с аламетицином не всегда обязательна и зависит, по-видимому, от источника препарата.

Другим подходом к более полному выявлению активности Na,K-АТФазы в тенях эритроцитов является использование экзогенного субстрата, свободно проникающего через мембрану эритроцитов. Таким субстратом является, в частности, п-нитрофенилфосфат [11]. Исследовали активность $K^+ \pm$ п-нитрофенилфосфатазы в ходе гидролиза п-нитрофенилфосфата. Известно, что K^+ -п-нитрофенилфосфатазная активность, чувствительная к уабанну, в определенной степени коррелирует с Na,K-АТФазной активностью [8], что позволяет использовать ее для косвенной характеристики последней. Установлено, что п-нитрофенилфосфатазная активность, чувствительная к уабанну, была равна 0,057 мкмоль Φ_{II} на 1 мг белка мембран теней эритроцитов в 1 ч. Соотношение п-нитрофенилфосфатазной активности, не чувствительной к уабанну и чувствительной к нему, составило 4. Низкая величина соотношения и возможность непрерывной регистрации п-нитрофенилфосфатазной активности делают этот метод удобным для определения и характеристики свойств Na,K-АТФазы в тенях эритроцитов.

Суммируя полученные данные, можно заключить, что оба предлагаемых нами подхода (обработка мембран теней эритроцитов аламетицином и использование в качестве субстрата п-нитрофенилфосфата) дают близкие результаты, и могут быть успешно использованы в

экспериментальных и клинических исследований.

Выражаем искреннюю благодарность В. Б. Ритову за предоставленный препарат аламетидина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Болдырев А. А. Биохимические аспекты электромеханического сопряжения. — М., 1977.
2. Казеннов А. М., Маслова М. Н., Шалободов А. Д. // Биохимия. — 1984. — Т. 49. — С. 1089—1095.
3. Лишко В. К., Мальшева М. К., Гревизирская Т. И. // Там же. — 1974. — Т. 39. — С. 60—66.
4. Ритов В. Б., Мурзахметова М. К. // Там же. — 1983. — Т. 48. — С. 415—427.
5. Транспортные аденозинтрифосфатазы. / Под ред. А. А. Болдырева. — М., 1977. — С. 177—178.
6. Чеснокова Н. П., Куляш Г. Ю. // Бюл. экпер. биол. — 1982. — Т. 94, № 9. — С. 29—31.
7. Brewer G. J., Eaton J. W., Beck C. C. et al. // J. Lab. clin. Med. — 1968. — Vol. 71. — P. 744—753.
8. Cavieres J. D. // Membrane Transport in Red Cells. — New York, 1977. — P. 1—37.
9. Charalambous B. M., Mir M. A. // Biochim. biophys. Acta. — 1982. — Vol. 691 — P. 71—82.
10. Edelman G. M., Reeke G. N. Jr. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1982. — Vol. 79. — P. 2091—2095.

11. Garrahan P. J., Rega A. F. // J. Physiol. (Lond.). — 1972. — Vol. 223. — P. 595—617.
12. Hanahan D. J., Ekholm J. // Arch. Biochem. — 1978. — Vol. 187. — P. 170—179.
13. Jones L. R., Maddock S. W., Besch H. R. // J. biol. Chem. — 1980. — Vol. 255. — P. 9971—9980.
14. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
15. Rathbun W. B., Bellach M. V. // Analyt. Biochem. — 1969. — Vol. 28. — P. 436—442.

Поступила 12.12.86

NA,K-ATPASE ACTIVITY IN ERYTHROCYTE GHOSTS OF MAMMALS IN PRESENCE OF ALAMETHICIN AND P-NITROPHENYL PHOSPHATE

A. A. Sokol'nikov, V. M. Kodentsova, G. P. Gulidova, G. D. Mironova

Institute of Applied Molecular Biology, Ministry of Public Health of the USSR, Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

After preincubation of erythrocyte ghosts isolated from Sprag-Dowly rats activity of Na,K-ATPase was more successfully manifested, being elevated about 2,5-fold, while the ratio Mg-ATPase/Na,K-ATPase was decreased 3-fold. Optimal ratio of alamethicin/protein was equal to 0.3. The similar results were obtained if p-nitrophenyl phosphate, easily penetrating through the erythrocyte membrane, was used as an exogenous substrate.

УДК 615.263:547.587.511.015.4:612.111+612.397.71.014.462.1

Л. Н. Бездетная, А. И. Нагиев, А. Я. Потапенко

ВЛИЯНИЕ ФОТООКИСЛЕННОГО ПСОРАЛЕНА НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ И ЛИПОСОМ

И ММИ им. Н. И. Пирогова

Псоралены (фурокумарины) в сочетании с УФ-А-излучением (315—400 нм) успешно используют в дерматологических клиниках для лечения псориаза, витилиго, гнездной плешивости и др. (ПУФА-терапия). ПУФА-терапия сопровождается побочными эффектами (эритема и др.), в основе которых лежат фотоокислительные реакции псораленов. Фотодинамические эффекты псораленов могут осуществляться через стадию образования фотоокисленного псоралена (ФОП) [6].

В настоящей работе показано, что ФОП создает каналы проницаемости в мембранах эритроцитов, но не влияет на проницаемость мембран липосом. Эффекты ФОП на мембранах эритроцитов

и липосом сопоставлены с эффектами хорошо исследованного гемолитика дигитонина.

Методика

Суммарную фракцию фосфолипидов яичного желтка, содержащую главным образом фосфатидилхолин (лецитин), выделяли по модифицированному методу Блая и Дайера. Липосомы формировали в буферном растворе (10 мМ Na₂HPO₄—HCl, pH 7,4) по методу Бэнгхема, как описано в работе [7]. Перед получением лецитинхолестериновых липосом к раствору фосфолипидов в петролейном эфире добавляли навеску холестерина так, чтобы молярное соотношение фосфолипидов и холестерина («Sigma», США) равнялось 1 : 2.

Кровь человека брали из пальца гепаринизированной пипеткой. Эритроциты дважды отмывали центрифугированием в солевом буферном растворе (145 mM NaCl, 10 mM фосфатный буфер, pH 7,4) и доводили до концентрации 10^6 клеток/мл.

Раствор псоралена (получен от Н. К. Абу-бакирова из Института химии растительных веществ АН Узбекской ССР) в этаноле ($3,3 \times 10^{-3}$ M) облучали при 366 нм либо на воздухе, либо после продувания раствора азотом с целью удаления кислорода (ртутно-кварцевая лампа сверхвысокого давления СВД-120А; светофильтр «Hg Моп 365», Йена, ГДР; толщина кюветы 0,1 см; 20 °C). Интенсивность УФ-излучения, составлявшая 60 Вт/м², была измерена по Паркеру [2].

Влияние облученного псоралена на эритроциты изучали следующим образом. В 3,5 мл суспензии эритроцитов, инкубированных при 37 °C, микропипеткой вводили (плавное в течение 30 с при интенсивном перемешивании суспензии магнитной мешалкой) 35 мкл раствора псоралена. Аналогично вводили раствор ФОП в суспензию липосом.

Гемолиз регистрировали, измеряя мутность суспензии при 630 нм на калориметре КФО-У.4.2, в кюветное отделение которого была вмонтирована магнитная мешалка. Колориметр был соединен с усилителем и самописцем для непрерывной записи кинетики изменения мутности.

О проницаемости липосом для ионов судили по изменению мутности суспензии после введения в нее гипертонических растворов NaCl. Мембраны немодифицированных липосом обладают высокой проницаемостью для молекул воды и низкой — для ионов. Поэтому липосомы являются хорошими осмометрами. При повышении концентрации солей в среде они сжимаются, что сопровождается увеличением мутности (уменьшением светопропускания). Если в мембране образуются каналы проницаемости для ионов, то после добавления соли осмотическое сжатие липосом уменьшается или совсем не происходит [17].

Результаты и обсуждение

Введение в суспензию эритроцитов этанольного раствора фотоокисленного псоралена вызывало гемолиз. При 37 °C кинетическая кривая гемолиза выходила на плато в течение 5—10 мин. Если псорален фотоокисляли более 2,5 мин, то лизировали все клетки. При дозах менее 2,5 мин лизировала только часть клеток. При дозах УФ-А-облучения псоралена менее 1 мин гемолиз не наступал совсем. Гемолитический эффект обнаружил только ФОП, тогда как псорален, облученный в атмосфере азота (дозы до 10 мин), гемолиза не вызывал. Долю лизировавших клеток после выхода кинетической кривой на плато обозначали как амплитуду гемолиза. Зависимость амплитуды гемолиза от дозы облучения псоралена приведена на рис. 1. Кри-

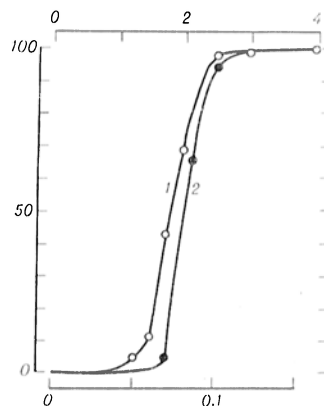


Рис. 1. Зависимость амплитуды гемолиза, вызванного ФОП (1) или дигитонином (2), от времени облучения псоралена или от концентрации дигитонина.

По оси абсцисс — верхняя шкала — время облучения псоралена (в мин); нижняя шкала — концентрация дигитонина (в мг/мл); по оси ординат — амплитуда гемолиза (в %).

вая 1 фактически отражает зависимость степени гемолиза от концентрации ФОП, так как при использованных дозах облучения количество продуктов фотоокисления возрастало линейно с дозой УФ-А-излучения. Совершенно аналогичные сигмоидные концентрационные зависимости гемолиза известны для сапонинов [10], сапогенинов, нейтральных стероидов [8] и полиеновых антибиотиков [9]. В наших опытах воспроизведена зависимость амплитуды гемолиза от концентрации добавленного дигитонина (см. рис. 1).

Сапонины (к ним относится и дигитонин) образуют в мембранах эритроцитов крупные поры диаметром около 10 нм [15]. Гемолитическое действие дигитонина является результатом высокоспецифического взаимодействия с холестерином мембран [9]. На рис. 2 показано, что добавление дигитонина не влияло на осмотические свойства не содержащих холестерин лецитиновых липосом. В то же время лецитинхолестериновые липосомы в присутствии дигитонина утрачивают свойство осмометров — способность сжиматься при добавлении в среду соли (см. рис. 2). Эти данные свидетельствуют о том, что если в мембранах липосом содержится холестерин, то их проницаемость возрастает в присутствии дигитонина.

Ранее [1] при помощи K^+ -селективных электродов было установлено увеличение ионной проницаемости лецитинхолестериновых липосом в присутствии другого связывающегося с холестери-

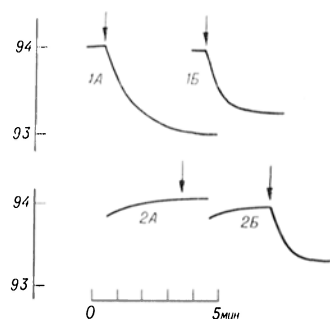


Рис. 2. Действие дигитонина на осмотические свойства липосом (0,02 мг/мл) разного состава.

А — лецитинхолестериновые липосомы; Б — лецитиновые липосомы. 1 — липосомы без дигитонина; 2 — липосомы, обработанные дигитонином. Стрелками указаны моменты введения NaCl. По оси абсцисс — время (в мин); по оси ординат — светопропускание (в %).

ном агента — голотурин А. В настоящей работе показана применимость для этих же целей более простого метода — измерения мутности при добавлении соли.

Изучено осмотическое поведение лецитинхолестериновых липосом (рис. 3) после обработки их ФОП. Добавление к липосомам псоралена или ФОП не изменяло осмотических свойств липидных везикул. Аналогичные результаты получены на лецитиновых липосомах. На рис. 3 показано сжатие липосом при введении в среду NaCl. Ранее [3] нами было показано, что обработка липосом фотоокисленным 8-метоксипсораленом приводила к увеличению отрицательного поверхностного заряда липосом и что способность вызывать окисление липидов липосом убывала для фотоокис-

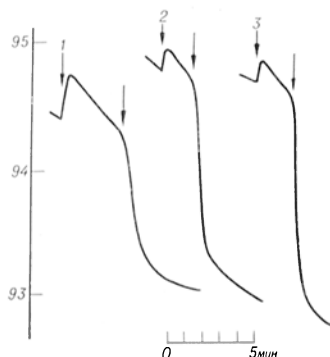


Рис. 3. Кинетика изменения мутности суспензии лецитинхолестериновых липосом, обработанных ФОП.

К 4,5 мл суспензии липосом (0,02 мг/мл) в буферном растворе добавляли 4 мкл раствора этанола (1), необлученного псоралена (2), ФОП (3). Стрелками указаны моменты введения ФОП и NaCl. По оси ординат — пропускание (в %).

ленных фурукумаринов в ряду псорален > ангелицин > 8-метоксипсорален [4]. Следовательно, хотя ФОП и вызывает заметное окислительное повреждение липосомальных мембран, но не приводит к увеличению их ионной проницаемости независимо от наличия в их составе холестерина.

Таким образом, можно предполагать, что механизмы гемолитического действия дигитонина и ФОП различны. Если дигитонин формирует каналы проницаемости за счет образования высокоспецифических комплексов с холестерином, то ФОП, по-видимому, изменяет проницаемость мембран эритроцитов путем взаимодействия не с холестерином, а с какими-то другими компонентами биомембран.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иванов А. С., Мольнар А. А., Петров В. В. и др. // Липосомы и их взаимодействие с клетками и тканями. — М., 1981. — С. 115—123.
2. Паркер С. Фотолюминесценция растворов: Пер. с англ. — М., 1972. — С. 89.
3. Парнев О. М., Бездетная Л. И., Потапенко А. Я. и др. // Биофизика. — 1982. — Т. 27. — С. 848—850.
4. Сухоруков В. Л., Потапенко А. Я., Захарова В. А. // Вопр. мед. химии. — 1983. — № 5. — С. 75—78.
5. Inamitsu T., Ohtsuki I. // Europ. J. Biochem. — 1984. — Vol. 145. — P. 115—121.
6. Potapenko A. Ya., Sukhorukov V. L. // Stud. Biophys. — 1984. — Vol. 101. — P. 89—98.
7. Putvinsky A. V., Potapenko A. Ya., Puchkov E. O. et al. // Ibid. — 1977. — Vol. 64. — P. 17—32.
8. Segal R., Milo-Goldzweig I. // Biochem. Pharmacol. — 1971. — Vol. 20. — P. 2163—2167.
9. Strom R., Crifo C., Bozzi A. // Ibid. — 1979. — Vol. 28. — P. 2427—2432.
10. Thron C. D. // J. Pharmacol. exp. Therap. — 1964. — Vol. 145. — P. 194—202.

Поступила 05.1.87

INFLUENCE OF PHOTOOXIDIZED PSORALEN ON PERMEABILITY OF LIPOSOMES AND ERYTHROCYTE MEMBRANES

L. N. Bezdetnaya, A. I. Nagiev, A. Ya. Potapenko

II Medical School, Moscow

Hemolysis of erythrocytes was induced after addition of ethanol solution of photooxidized psoralen, while the substance irradiated in absence of oxygen did not cause the cells hemolysis. The rate of hemolysis correlated with concentration of photooxidized psoralen in a sigmoid type. Similar concentration-dependent effect has been known for digi-

tonin. Digitonin elevated the ionic permeability of lecithin-cholesterol liposomes but did not affect the permeability of lecithin liposomes. Photooxidized psoralen did not ef-

fect apparently on liposomes of both types. These data suggest that hemolytic effect of photooxidized psoralen did not relate to the substance interaction with cholesterol.

УДК 616.12-005.4-07:616.155.25-008.939.15-39

Л. В. Шатилина, М. Ф. Баллюзек, В. С. Гуревич

НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ТРОМБОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА

НИИ кардиологии Минздрава РСФСР, Ленинград

Исследованиями последних лет показано, что тромбоциты играют важную роль в патогенезе ишемической болезни сердца (ИБС) [6, 13]. Повышение адгезивной и агрегационной способности тромбоцитов приводит к механической обструкции коронарных артерий, а выброс в плазму активированными тромбоцитами вазоконстрикторных соединений — к их спазму. Активация тромбоцитов сопряжена также с изменением липидного состава мембран и образованием продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [12], которые оказывают на нее повреждающее действие [1]. Наиболее часто активность ПОЛ в тромбоцитах оценивают по накоплению малонового диальдегида (МДА) [15, 16], так как изменение содержания МДА хорошо коррелирует с кинетикой реакции ПОЛ [5]. Считается, что важную роль в системе антиокислительной защиты клетки играет способность супероксиддисмутазы (СОД) обезвреживать супероксидные анион-радикалы путем их дисмутации в перекись водорода и триpletный кислород [7]. Антиоксидантная система препятствует как спонтанному, так и индуцированному неспецифическими агентами свободнорадикальному окислению липидов [3].

Поскольку взаимосвязь активации ПОЛ с антиоксидантной системой в тромбоцитах при сердечно-сосудистой патологии не изучена, мы попытались в настоящей работе исследовать соотношение между активностью СОД и уровнем МДА у лиц с различными формами ИБС.

Методика

Обследовано 32 мужчины в возрасте от 40 до 60 лет. 12 пациентов страдали нестабильной стенокардией, 8 — острым инфарктом миокарда (обследованы в первые дни). Диагноз устанавливали на основании дан-

ных ЭКГ, лабораторного обследования и клинического наблюдения. Из терапии были исключены антиоксиданты, антиагреганты, антагонисты кальция. Контрольную группу составили 12 здоровых доноров.

Тромбоциты выделяли из плазмы, богатой тромбоцитами, дифференциальным центрифугированием [10]. Осадок тромбоцитов отмывали буфером Тироде pH 6,2 следующего состава: 0,136 М NaCl, 2,7 мМ KCl, 0,4 мМ NaHPO₄, 2 мМ MgCl₂, 5,6 мМ глюкоза и альбумин — 3,5 мг/мл [8]. Отмытые тромбоциты ресуспендировали в том же буфере, но с pH 7,4 без альбумина и использовали в дальнейших экспериментах.

Образование в тромбоцитах МДА оценивали по методу [16], используя в качестве прооксидантов НАДФ·Н или аскорбиновую кислоту, а также ионы Fe²⁺. В состав инкубационной смеси входили: 50 мМ трис-HCl pH 7,4, 1 мМ НАДФ·Н или 0,5 мМ аскорбиновая кислота, 0,7 мМ FeSO₄, 0,2 мМ Na₂P₂O₇.

Активность СОД устанавливали по методу, основанному на способности фермента ингибировать восстановление нитросинего тетразолия в присутствии НАДФ·Н и феназинметасульфата [14]. Величину активности рассчитывали по формуле: $A = T\% / (100\% - T\%)$ и выражали по приросту условных единиц на 1 мг тромбоцитарного белка в 1 мин; T% — величина торможения реакции восстановления нитросинего тетразолия в пробе за 1 мин [11]. Белок определяли микробиуретовым методом [4].

Результаты и обсуждение

Результаты исследования интенсивности ПОЛ тромбоцитов у больных ИБС приведены в таблице. Установлено, что концентрация МДА тромбоцитов в группе больных нестабильной стенокардией и острым инфарктом миокарда достоверно выше, чем у здоровых людей. Накопление МДА тромбоцитами больных, по видимому, осуществляется за счет увеличения скорости свободнорадикального окисления липидов [9].

Известно, что ПОЛ в различных биологических объектах резко усиливается в присутствии двухвалентного железа [1]. Мы исследовали зависимость накопления МДА в тромбоцитах здоровых

Исследуемый показатель	Контроль	Нестабильная стенокардия	Острый инфаркт миокарда
Концентрация МДА:			
без инициации, 4 моль на 1 мг белка	$0,49 \pm 0,04$	$1,28 \pm 0,12^*$	$1,93 \pm 0,13^*$
аскорбатзависимое иницирование, 4 моль на 1 мг белка за 10 мин	$3,50 \pm 0,41$	$5,46 \pm 0,33^*$	$7,45 \pm 0,61^*$
НАДФ·Н-зависимое иницирование, 4 моль на 1 мг белка за 10 мин	$8,11 \pm 0,43$	$15,35 \pm 0,69^*$	$21,88 \pm 1,51^*$
Активность супероксиддисмутазы, на 1 мг белка за 1 мин	$11,12 \pm 0,41$	$6,03 \pm 0,51$	$5,06 \pm 0,32^*$

* $p < 0,001$.

доноров от концентрации FeSO_4 (рис. 1). Оказалось, что количество МДА постепенно возрастает, приближаясь при концентрации закисного железа $7 \cdot 10^{-4}$ моль к насыщению. Для дифференциации ферментативного и неферментативного ПОЛ в среду инкубации вводили НАД·Н или аскорбиновую кислоту. Перекисное окисление, индуцированное двухвалентным железом как в присутствии НАД·Н, так и аскорбата, полностью завершается через 10 мин инкубации (рис. 2). Однако по ферментативному пути МДА в тромбоцитах образуется больше, чем по неферментативному. Одновременное введение в инкубационную смесь аскорбиновой кислоты и НАДФ·Н приводит к резкому увеличению уровня МДА до концентрации 11,9 нмоль МДА на 1 мг белка. Это указывает на существование различных центров радикалообразования в реакциях ферментативного (НАДФ·Н-зависимого) и неферментативного (аскорбатзависимого) перекисного окисления фосфолипидов в тромбоцитах. Можно сделать вывод, что как при нестабильной стенокардии, так и при остром инфаркте миокарда имеет место преимущественная активация свободнорадикальных процессов по ферментативному пути.

Сведения об уровне активности СОД при повышенном свободнорадикальном

окислении липидов достаточно противоречивы. При термических поражениях, отравлениях амитриптилином, фосфорорганическими соединениями, спотворными и т. д. наблюдается повышение активности СОД в плазме, а при ишемии печени, почки, миокарда, скелетных мышц — снижение активности данного фермента [7].

Проведенное исследование показало, что активность СОД тромбоцитов у больных нестабильной стенокардией и острым инфарктом миокарда была достоверно ниже, чем в контрольной группе (см. таблицу). Установлена корреляция между активностью СОД и накоплением МДА в тромбоцитах (рис. 3). У здоровых людей выявлена положительная корреляционная связь между активностью СОД и уровнем МДА ($r_1 = +0,699$, $p < 0,1$), что, по-видимому, следует рассматривать как адаптивный механизм, направленный на постоянную защиту клеточных структур и стабилизацию ПОЛ. В свою очередь на фоне активации ПОЛ в тромбоцитах при нестабильной стенокардии и остром инфаркте миокарда происходит инверсия корреляционных взаимоотношений между накоплением МДА и активностью СОД ($r_2 = -0,642$, $p < 0,05$; $r_3 = -0,726$, $p < 0,1$ соответственно). Можно предположить, что при изменении концент-

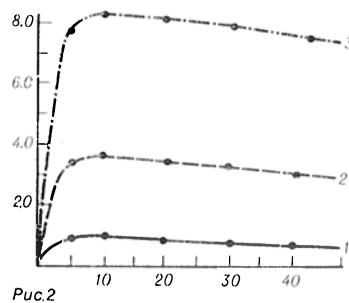
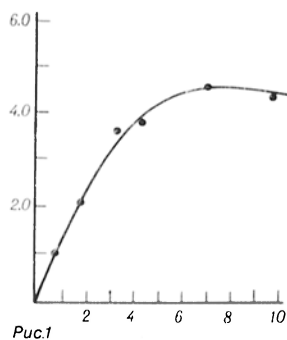


Рис. 1. Зависимость интенсивности индуцированного ПОЛ тромбоцитов здоровых доноров от концентрации FeSO_4 .

По оси абсцисс: концентрация FeSO_4 ($\cdot 10^{-4}$ М). Здесь и на рис. 2 и 3: по оси ординат: концентрация МДА (нмоль на 1 мг белка); каждой точке соответствует среднее значение 4 опытов.

Рис. 2. Зависимость интенсивности ПОЛ тромбоцитов здоровых доноров от времени инкубации.

По оси абсцисс: время инкубации при 37°C (в мин).

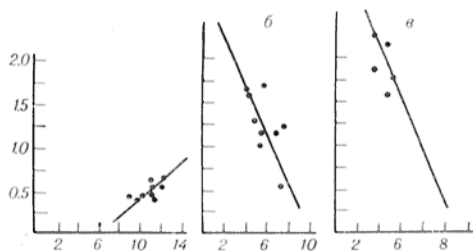


Рис. 3. Зависимость между содержанием МДА и активностью СОД тромбоцитов человека в норме (а), при нестабильной стенокардии (б) и при остром инфаркте миокарда (в).

По оси абсцисс: активность СОД (в усл. ед. в 1 мин на 1 мг белка).

рации активных форм кислорода и их перекисных соединений при ишемии, тромбоциты по типу кардиомиоцитов теряют часть ферментного белка в результате повреждения мембраны. Это свидетельствует о необходимости введения больным экзогенных антиоксидантов для предотвращения дальнейшей активации ПОЛ.

Таким образом, приведенные данные подтверждают мнение об универсальной роли усиления процессов ПОЛ в патогенезе целого ряда заболеваний [1]. Обнаруженная корреляция между концентрацией МДА и активностью СОД свидетельствует о взаимосвязи этих показателей с клинической картиной заболевания. Изучение данных параметров может быть использовано для прогнозирования тяжести течения нестабильной стенокардии и острого инфаркта миокарда, а также при оценке эффективности терапии препаратами, подавляющими ПОЛ, в частности антиоксидантами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю. А., Арчаков А. А. Перекисное окисление липидов биологических мембран. — М., 1972.
2. Кожеевников Ю. Н. // Вопр. мед. химии. — 1985. — № 5. — С. 2—7.

3. Козлов Ю. П. // Липиды: Структура, биосинтез, превращения и функции. — М., 1977. — С. 80—93.
4. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. — М., 1980. — С. 223—224.
5. Ланкин В. З., Гуревич С. М. // Биоантиокислители. — М., 1975. — С. 73—78.
6. Люсов В. А., Белоусов Ю. Б. // Кардиология. — 1977. — № 5. — С. 8—13.
7. Макаревич О. П., Голиков П. П. // Лаб. дело. — 1983. — № 6. — С. 24—27.
8. Розенберг А. Е., Марков Х. М. // Кардиология. — 1983. — № 2. — С. 56—58.
9. Храпова Н. Г. // Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и при патологии. — М., 1982. — С. 59—73.
10. Черняк Н. Б., Евлентьева Н. Е., Гуртовой И. М. // Пробл. гематол. — 1979. — № 11. — С. 54—56.
11. Beauchamp C., Fridovich I. // Analyt. Biochem. — 1971. — Vol. 44. — P. 276.
12. Gillet M. P. T. // Atherosclerosis. — 1975. — Vol. 22. — P. 111—124.
13. Neri L. // Cardiovasc. Res. — 1981. — Vol. 15. — P. 287—295.
14. Nishikimi N., Rao N. A., Yagi K. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1972. — Vol. 46. — P. 846.
15. Okuma M., Steiner M., Baldini M. // J. Lab. clin. Med. — 1970. — Vol. 75. — P. 283—296.
16. Smith J. B., Ingberman C. M., Silver M. J. // Ibid. — 1976. — Vol. 88. — P. 167—172.

Поступила 27.04.87

SOME PATTERNS OF LIPID PEROXIDATION IN THROMBOCYTES OF PATIENTS WITH HEART ISCHEMIC DISEASE

L. V. Shatilina, M. F. Ballyuzek, V. S. Gurevich

Institute of Cardiology, Ministry of Public Health of the RSFSR, Leningrad

Interaction between lipid peroxidation activation and the antioxidant system was studied in thrombocytes of patients with cardiovascular pathology. Positive correlation between superoxide dismutase activity and malonic dialdehyde content was found in healthy persons, while in patients with unstable stenocardia and acute myocardial infarction an inversion of the correlation parameters occurred. The data obtained may be used for prognosis of heart ischemic disease development.

УДК 616.899-053.2-07:[616.153.1:577.152.143]-074

Э. Ю. Мисионжник, М. А. Вартапетян, Н. Ф. Турова

К АМИНОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТКИ КРОВИ У ДЕТЕЙ С ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

Московский НИИ психиатрии Минздрава РСФСР, Москва

В формировании психической патологии немалое место отводится нарушению метаболизма биогенных аминов, в част-

ности изменению активности ключевого фермента их метаболизма — моноаминоксидазы [4]. Имеются эксперименталь-

ные и клинические наблюдения, свидетельствующие об определенной взаимосвязи между аминоксидазной активностью и состоянием интеллектуальной сферы [10—12]. Немалая роль в качестве фактора риска интеллектуальной недостаточности отводится перинатальной патологии [6], которая, очевидно, оказывает влияние на аминоксидазную активность. К настоящему времени обнаружено несколько форм аминоксидаз, отличающихся по субстратной специфичности и действию ингибиторов [3, 13].

В задачу настоящей работы входило исследование активности аминоксидазы сыворотки крови детей с разной степенью интеллектуальной недостаточности, обусловленной в высокой степени перинатальной патологией (недоношенность, токсикоз беременности, родовая асфиксия, алкоголизм матери) и изучение изменений активности фермента под влиянием лечения препаратами метаболитического действия (энцефабол, ноотропил). В доступной литературе мы не встретили аналогичных работ. Одновременно проводилось экспериментальное изучение изменений аминоксидазной активности в развивающемся мозге животных с перинатальной патологией и возможностей их коррекции ноотропилем.

Знание особенностей изменения аминоксидазной активности под влиянием патологии и фармакологических средств может в определенной мере способствовать разработке патогенетически более обоснованной терапии и критериев прогноза.

Методика

Объектом исследования служила сыворотка крови 74 детей 7—11 лет с разной степенью интеллектуальной недостаточности, наблюдавшихся в стационаре Московского НИИ психиатрии Минздрава РСФСР. У 12 больных в анамнезе отмечена недоношенность (7 человек с 1-й степенью недоношенности и 5 — со 2-й). У 6 детей этой группы наблюдалась пограничная интеллектуальная недостаточность (ПИН), у 6 — олигофрения в степени дебильности. 10 больных с олигофренией составили группу с так называемым алкогольным синдромом плода. Контрольная группа состояла из 9 доношенных больных детей с иной перинатальной патологией (асфиксия, токсикоз беременных и др.). В этой группе олигофрения отмечена у 4 больных, ПИН — у 5.

Для терапии рассматриваемого контингента больных использовали энцефабол [бис-(2-метил-3-оксн-4-оксиметил-5-метил-пирридил)-дисульфида дигидро-хлорид] или ноотропил

[2-оксо-1-пирролидин-ацетамид]. Препараты давали *per os*.

Среди обследованных больных 24 человека (9 с ПИН и 15 с олигофренией) получали энцефабол (суточная доза 300 мг), 19 (6 — ПИН, 13 — олигофрения) — ноотропил (пирацетам; суточная доза 1200 мг). Курс лечения обоими препаратами 40—50 дней. Исследования проводили в динамике: до лечения (фон), в процессе терапии, 20—30 дней от ее начала (пик) и после отмены терапии, обычно через 7 дней. Активность аминоксидазы сыворотки крови определяли по методике А. И. Балаклеевского [11]. Кровь брали в утренние часы из локтевой вены, натощак.

Экспериментальные исследования выполнены на 194 белых пельевых крысах. Однократную антенатальную гипоксию вызывали по методике [9]. Ноотропил вводили перорально из расчета 48 мг на 1 кг массы тела, начиная с 14-дневного возраста и до забоя животных. Исследовали мозг 30- и 60-дневных животных после их декапитации. Митохондрии из коры и ствола мозга крыс выделяли методом дифференциального центрифугирования. Активность моноаминоксидазы (МАО) митохондрий (субстрат серотонин) определяли по количеству выделившегося аммиака, с реактивом Несслера [5] и выражали в нанолях на 1 мг белка в 1 мин. Содержание белка определяли по Лоури [14]. Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики по Стьюденту.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования показывают (табл. 1), что активность аминоксидазы сыворотки крови может в определенной мере находиться в соответствии со степенью интеллектуальной недостаточности. Более выраженный интеллектуальный дефект сопровождался более низкой активностью фермента (олигофрения в сравнении с ПИН) независимо от перинатальной патологии.

Таблица 1

Активность аминоксидазы сыворотки крови (в нмоль бензальдегида на 1 мл сыворотки в 1 ч при 37 °С, субстрат-бензиламин) у детей с интеллектуальной недостаточностью

Группа обследованных	ПИН	Олигофрения
Дети с недоношенностью в анамнезе ($n = 12$)	$10,8 \pm 0,50$	$6,66 \pm 1,66^*$
Доношенные дети с перинатальной патологией (контроль; $n = 9$)	$9,32 \pm 1,35$	$6,25 \pm 0,95^*$
Дети с алкогольным синдромом плода ($n = 10$)	—	$6,00 \pm 1,09$

Примечание. Звездочкой отмечены величины, достоверно отличающиеся от группы детей с ПИН. В скобках — число обследованных.

Таблица 2

Влияние ноотропила на активность МАО
(в нмоль NH_3 на 1 мг белка в 1 мин; 37 °С,
субстрат—серотонин) митохондрий развивающегося мозга крыс с перинатальной гипоксией

Обследованные группы	Кора	Ствол
30-дневные животные		
Контроль	$2,11 \pm 0,10$	$2,53 \pm 0,05$
Гипоксия	$0,80 \pm 0,20^*$	$0,68 \pm 0,14^*$
Гипоксия+ноотропил	$0,60 \pm 0,07^*$	$0,60 \pm 0,062^*$
60-дневные животные		
Контроль	$1,55 \pm 0,09$	$1,52 \pm 0,18$
Гипоксия	$0,80 \pm 0,27^*$	$1,13 \pm 0,51$
Гипоксия+ноотропил	$0,43 \pm 0,10^*$	$0,30 \pm 0,056^*$
Ноотропил	$1,36 \pm 0,27^*$	$0,80 \pm 0,10^*$

Примечание. В каждой группе от 20 до 40 животных; каждая величина — среднее из 6—10 определений на объединенных навесках тканей от нескольких крыс. Звездочкой отмечены величины, статистически достоверно отличающиеся от контроля.

При этом, как показано ранее [8], у детей с олигофренией катаболизм катехоламинов (дофамина, адреналина и норадреналина) в их конечные продукты (гомованилиновую и ванилилминдальную кислоты) происходит на значительно более низком уровне, чем у детей с ПИИ, что также может косвенным образом свидетельствовать о разноразличной активности ферментов, катаболизирующих биогенные моноамины, в том числе МАО.

Экспериментальные исследования, результаты которых представлены в табл. 2, также свидетельствуют в пользу указанного предположения, поскольку под влиянием антенатальной гипоксии активность МАО коры мозга крыс снижалась на протяжении относительно длительного интервала жизни.

У интактных животных с возрастом активность МАО обоих отделов мозга снижалась. При этом имевшие место в 30-дневном возрасте региональные различия сглаживались.

Применение с терапевтической целью энцефабола в группе больных с интеллектуальной недостаточностью даже при наличии удовлетворительного терапевтического эффекта не оказывало влияния на активность аминоксидазы сыворотки крови (табл. 3). При слабом терапевтическом эффекте отмечалось снижение активности с последующим восстановлением ее до фоновых значений после отмены препарата. Вследствие этого у больных со слабым терапевтическим эффектом в период лечения энцефаболом активность аминоксидазы была достоверно ниже, чем у пациентов с удовлетворительным терапевтическим эффектом ($p < 0,05$). Эти данные позволяют рассматривать аминоксидазную активность сыворотки крови на пике лечения этим препаратом как показатель, который может быть использован для прогноза результатов терапии.

Лечение ноотропилом (см. табл. 3) сопровождалось снижением активности аминоксидазы. При этом терапевтический эффект был слабым. Применение ноотропила у экспериментальных животных либо не давало эффекта (в случае 30-дневных животных), либо способствовало еще большему снижению активности фермента, как это наблюдалось у 60-дневных животных с антенатальной гипоксией и интактных (см. табл. 2). Несмотря на то что ноотропил считается признанным антигипоксантом [12], полученные результаты свидетельствуют о том, что он не способен регулировать нарушенную под влиянием антенатальной гипоксии активность амин-

Таблица 3

Изменение активности аминоксидазы сыворотки крови (в нмоль бензальдегида на 1 мл сыворотки в 1 ч при 37 °С, субстрат—бензиламин) под влиянием лечения у детей с интеллектуальной недостаточностью

Препарат	Фон	Пик лечения	Отмена препарата
Энцефабол;			
больные с удовлетворительным терапевтическим эффектом	$8,70 \pm 1,84$ (9)	$8,49 \pm 0,97$ (10)	$9,75 \pm 0,76$ (7)
больные со слабым терапевтическим эффектом	$9,33 \pm 1,04$ (15)	$5,77 \pm 0,55^*$ (13)	$8,20 \pm 0,85$ (13)
Ноотропил	$8,15 \pm 1,02$ (18)	$4,47 \pm 0,40^*$ (19)	$3,70 \pm 0,32^*$ (18)

Примечание. Звездочкой отмечены величины, отличающиеся достоверно от фона.

пексидазы, на что указывает и отсутствие терапевтического эффекта при его применении у детей с олигофренией.

Снижение активности аминоксидазы сыворотки и МАО мозга под влиянием ноотропила, являющегося циклическим аналогом ГАМК, можно предположительно объяснить, исходя из данных Н. А. Корень и соавт. [7], о способности ГАМК слабо ингибировать МАО (субстрат — бензиламин) в мозге животных.

Таким образом, проведенные исследования выявили определенную взаимосвязь между степенью интеллектуальной недостаточности и активностью аминоксидазы сыворотки крови. Отмечена взаимосвязь между терапевтическим эффектом при ведении детей с интеллектуальной недостаточностью на препаратах метаболической терапии и активностью аминоксидазы сыворотки крови.

Показано, что антенатальная гипоксия приводит к снижению активности МАО митохондрий развивающегося в постнатальном онтогенезе мозга крысят.

Применение ноотропила как в эксперименте, так и в клинике приводило к снижению аминоксидазной активности, что ставит вопрос о необходимости подбора соответствующих коррекционных мероприятий при терапии этим препаратом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балаклеевский А. И. // Здоровье. Белоруссии. — 1974. — № 6. — С. 74—75.
2. Гицургия К. // Клиническое значение препарата ноотропил. — М., 1976. — С. 9—20.
3. Горкин В. З. // Вопр. мед. химии. — 1974. — № 3. — С. 397—403.
4. Горкин В. З. Аминоксидазы и их значение в медицине. — М., 1981.

5. Горкин В. З. // Вопр. мед. химии. — 1982. — № 2. — С. 2—9.
6. Дементьева Н. Ф., Сазонова Н. С., Перельмутер К. А. // Журн. невропатол. и психиатр. — 1981. — Т. 81, № 10. — С. 1564—1573.
7. Корень Н. А., Новикова Л. М., Петренко С. В., Селезнев Е. А. // Фармакология производных гаммааминомасляной кислоты. — Тарту, 1983. — С. 71—72.
8. Мисюнэжик Э. Ю., Коган Р. Д., Баландина Ю. Б. и др. // Журн. невропатол. и психиатр. — 1985. — Т. 85, № 3. — С. 388—394.
9. Тuroва Н. Ф., Барышников В. А. // Вопр. мед. химии. — 1979. — № 5. — С. 622—626.
10. Breakefield X. O., Costiglione C. M., Edelstein S. B. // Science. — 1976. — Vol. 192. — P. 1018—1020.
11. Dalton K. // Brit. J. Psychiat. — 1976. — Vol. 129. — P. 438—442.
12. Franz J. R., Hull E. M., Snyder A. M., Roth J. A. // Brain Res. — 1978. — Vol. 152. — P. 397—406.
13. Lewinson R., Böhm K. H., Glover V., Sandler M. // Biochem. Pharmacol. — 1978. — Vol. 27. — P. 1857—1863.
14. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.

Получила 23.12.86

AMINE OXIDASE ACTIVITY IN BLOOD SERUM OF CHILDREN WITH MENTAL DEFICIENCY

E. Yu. Misionzhnik, M. A. Varlapelyan, N. F. Turova

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

Correlation between a degree of mental deficiency and an activity of amine oxidase in blood serum as well as therapeutic efficiency of encephahole were found in children with mental deficiency of various genesis. Nootropile decreased the blood serum amine oxidase activity in the patients as well as the drug lowered the monoamine oxidase activity in brain mitochondria of young rats with antenatal hypoxia.

УДК 616.155.1-008.939.53-02:613.8631-074

Э. М. Микаелян, К. Г. Карагезян, С. С. Овакимян

ДИНАМИКА КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ СУММАРНЫХ И ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ФОСФОЛИПИДОВ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ БЕЛЫХ КРЫС В РАЗЛИЧНЫЕ СТАДИИ СТРЕССОРНОЙ РЕАКЦИИ ОРГАНИЗМА

Ереванский медицинский институт, Институт биохимии АН Армянской ССР

Фосфолипидный бислой биологической мембраны имеет важное значение для нормального развития в ней многочисленных физиологических процессов [1,

2]. Особого внимания заслуживают мембраносвязанные липидзависимые и липидсодержащие ферменты [1, 2]. Известна их чувствительность к отклоне-

ниям от существующих в норме фосфолипид-фосфолипидных (ФЛ-ФЛ) соотношений, например при патологических состояниях, сопровождающихся повышением интенсивности процессов свободнорадикального окисления (СРО) липидов [14]. Весьма важно изучение механизмов воздействия продуктов липидной перекиссации на биологические мембраны [7—10, 16], в частности при стрессорной реакции, развивающейся при действии различных экстремальных факторов среды.

Целью настоящего исследования было изучение закономерностей количественных сдвигов суммарных и индивидуальных ФЛ, общего холестерина (ХС), коэффициента отношения содержания ХС к ФЛ (ХС/ФЛ), интенсивности СРО липидов, уровня эндогенного α -токоферола (Т) в мембранах эритроцитов при остром и хроническом (повторяемом) стрессе.

Методика

Имобилизационный стресс (ИМС) вызывали, как описано в работе [19], острый стресс — с помощью 30- и 150-минутной иммобилизации, повторяемый — путем ежедневной однократной иммобилизации животных в течение 150 мин на протяжении 5 и 40 дней.

Мембраны эритроцитов изолировали, очищали и идентифицировали по [20], ФЛ экстрагировали по [18], фракционирование их осуществляли методом одномерной восходящей хроматографии на бумаге Filtrak-FN-II (ГДР), пропитанной кремниевой кислотой [22], в модификациях [15] и [6].

Об интенсивности течения процессов СРО липидов судили по выходу малонового диальдегида (МДА) в ферментативной — НАДФН (НЗП) и неферментативной — аскорбатзависимой (АЗП) системах перекисления липидов [3]. Об изменениях проницаемости мембран эритроцитов судили по состоянию суммарной пероксидазной активности (СПА) и активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФД) в плазме крови [5, 13]. Определение общего ХС проводили по [14], белка — по [21], Т в мембранах эритроцитов и плазме крови — по [17] с использованием флуоресцентного флуорометра фирмы «Hitachi» (MP-2A).

Результаты и обсуждение

Острый и повторяемый ИМС сопровождается заметным активированием процессов СРО липидов в мембранах эритроцитов (табл. 1). При остром ИМС степень увеличения количества МДА оказалась различной в зависимости от продолжительности иммобилизации. При повторяемом ИМС также наблюдали активирование процесса СРО. При 40-

Таблица 1
Активность процессов СРО липидов в мембранах эритроцитов (в нмоль МДА на 1 мг белка) и содержание Т (в мг на 100 мл плазмы и в мкг на 1 мг белка мембран эритроцитов) при остром и повторяемом стрессе

Показатель	Контроль	Острый стресс		Повторяемый стресс	
		30 мин ИМС	150 мин ИМС	5 ИМС по 150 мин	40 ИМС по 150 мин
СРО липидов эритроцитарных мембран	АЗП	2.47 ± 0.1 (+25.4)*	2.779 ± 0.25 (+41)*	4.37 ± 0.09 (+122)*	4.61 ± 0.13 (+134)*
	НЗП	3.38 ± 0.079 (+38.5)*	4.1 ± 0.17 (+68)*	5.78 ± 0.08 (+137)*	2.78 ± 0.046 (+14)*
α -токоферол	плазма	2.8 ± 0.11 (+21.8)*	1.81 ± 0.038 (-48.6)*	3.31 ± 0.12 (-7.54)*	3.096 ± 0.14 (-13.5)*
	эритроцитарные мембраны	3.58 ± 0.15 (+20)*	2.494 ± 0.07 (-16.3)*	2.92 ± 0.056 (-2)	2.237 ± 0.23 (-25)*

Примечание. Здесь и в табл. 2—4 в скобках — разница по сравнению с контролем; звездочкой отмечена достоверность различий по сравнению с контролем.

Т а б л и ц а 2

Содержание суммарных фосфолипидов (в мкг липидного фосфата на 1 г сухого остатка мембран эритроцитов), холестерина (в мкг на 1 мг белка) в эритроцитарных мембранах при остром и повторяемом стрессе

Показатель	Контроль	Острый стресс		Повторяемый стресс	
		30 мин ИМС	150 мин ИМС	5 ИМС по 150 мин	40 ИМС по 150 мин
Сумма ФЛ	967,23 ± 7,23	2558,53 ± 8,27 (+164,5)*	1379,56 ± 5,2 (+42,6)*	833,8 ± 7,5 (-13,8)*	1645,7 ± 12,18 (±70,1)*
Общий ХС	50,65 ± 1,38	55,32 ± 0,19 (+9,2)*	79,4 ± 0,4 (+56,7)*	82,84 ± 1,4 (+63,5)*	29,01 ± 0,46 (-42,1)*
ХС/ФЛ	0,05	0,02 (-60)	0,057 (+14)	0,099 (+98)	0,017 (-66)

Т а б л и ц а 3

Содержание ФЛ (в мкг липидного фосфора на 1 г сухого остатка мембран эритроцитов) при остром и повторяемом стрессе

Показатель	Контроль	Острый стресс		Повторяемый стресс	
		30 мин ИМС	150 мин ИМС	5 ИМС по 150 мин	40 ИМС по 150 мин
ЛФХ	187,3 ± 0,9	421,63 ± 7,3 (+125)*	253,84 ± 5,15 (+36,5)*	199,82 ± 4,3 (+6,7)*	322,36 ± 3,9 (+72)*
Монофосфонизит	223,35 ± 5,95	369,78 ± 4,58 (+65,6)*	211,4 ± 3,47 (-5,4)*	110,46 ± 3,3 (-50,5)*	197,58 ± 2,36 (-11,5)*
Сфингомиелин	143,18 ± 2,2	576,77 ± 1,98 (+302,8)*	312,93 ± 4,48 (+118,5)*	162,84 ± 1,89 (+13,7)*	342,08 ± 3,67 (+138,9)*
Фосфатидилхолин	336,33 ± 6,7	927,01 ± 3,19 (+175)*	417,12 ± 3,84 (+2,4)*	283,37 ± 4,2 (-15,7)*	677,85 ± 4,02 (+101,5)*
ФС	77,05 ± 2,33	263,32 ± 1,83 (+241)*	181,68 ± 6,2 (+136)*	77,36 ± 2,4 (-)	105,85 ± 2,36 (+37,3)*
Нейтральные	666,82 ± 9,9	1925,4 ± 12,4 (+188,7)*	983,89 ± 4,5 (+47,5)*	646,03 ± 10,4 (-3)	1342,3 ± 11,6 (+101,3)*
КФЛ	300,41 ± 8,29	633,1 ± 6,4 (+110,7)*	395,6 ± 9,7 (+31,7)*	187,82 ± 5,7 (-37,5)*	303,4 ± 2,9 (-)
Отношение НФЛ/КФЛ	2,2	3 (+36)	2,48 (+12,7)	3,44 (+56,4)	4,42 (+100,9)
Суммарные ФЛ	967,23 ± 7,23	2558,53 ± 8,27 (+164,5)*	1379,56 ± 5,2 (+42,6)*	833,86 ± 7,5 (-13,8)*	1645,7 ± 12,18 (+70,15)*

Т а б л и ц а 4

Активность СОД крови (в ед. активности на 1 мг белка), СПА (в ед. опт. пл. на 1 мл плазмы), активность Г-6-ФД (в нмоль НАДФ-Н на 1 мл плазмы в 1 мин) при остром и повторяемом стрессе

Показатель	Контроль	Острый стресс		Повторяемый стресс	
		30 мин ИМС	150 мин ИМС	5 ИМС по 150 мин	40 ИМС по 150 мин
СОД	33,75 ± 0,97	36,47 ± 1,18 (+8)	15,94 ± 0,6 (-52,7)*	26,98 ± 0,97 (-20,3)*	25,91 ± 1,03 (-23,3)*
СПА	10,59 ± 1,098	41,16 ± 3,03 (+288)*	19,28 ± 1,3 (+82)*	32,14 ± 2,52 (+203)*	20,07 ± 1,79 (+89,5)*
Г-6-ФД	3,4 ± 0,07	18 ± 1,34 (+429)*	32 ± 1,2 (+841)*	24 ± 2 (+605)*	14,72 ± 0,46 (+332,9)*

кратной иммобилизации выход МДА продолжает нарастать лишь в ЛЗП, а в НЗП отмечается тенденция к спаду.

По нашим данным (см. табл. 1), уровень Т в плазме крови при этом постепенно снижается вплоть до 5-го ИМС. Интересно отметить, что количество антиоксиданта в мембранах эритроцитов компенсаторно, по-видимому, нарастает при 30 мин ИМС. По мере увеличения числа ИМС, вплоть до 40, убыль содержания Т обнаруживается не только в плазме крови, но и в мембранах эритроцитов.

Описанные нарушения развиваются на фоне изменений содержания ФЛ мембран эритроцитов (табл. 2). При остром стрессе (30 мин ИМС) отмечено статистически достоверное увеличение содержания суммарных ФЛ приблизительно на 164,5%. При 5-кратном ИМС уровень суммарных ФЛ падает по сравнению с контрольным приблизительно на 13,8%. Коэффициент ХС/ФЛ затем нормализуется и в дальнейшем превышает норму, демонстрируя картину волнообразности в соответствии с кривой количественных изменений как суммарных ФЛ, так и общего ХС.

Нам было показано увеличение содержания в мембранах эритроцитов лизофосфатидилхолинов (ЛФХ; табл. 3) только при остром ИМС.

Аналогичные закономерности отмечены при исследованиях фосфатидилсеринов (ФС) как кислых фосфолипидов (КФЛ) мембран эритроцитов. Мы обнаружили увеличение уровня ФС в мембранах эритроцитов экспериментальных животных, переживающих состояние острого стресса. При повторяемом стрессе отмечается нормализация уровня ФС. Однако декомпенсированные формы хронического стресса сопровождаются повторным возрастанием содержания ФС.

Важными показателями мембранолитического эффекта, развивающегося при стрессорной реакции организма, могут быть изменения активности супероксиддисмутазы (СОД) в цельной крови, а также СПА и Г-6-ФД в плазме крови. По нашим данным (табл. 4), СОД оставалась в пределах контрольных величин только при 30 мин ИМС. В остальных случаях обнаруживали заметное понижение активности СОД, что в целом хорошо согласуется с состоянием животного. Что касается уровней СПА и активности Г-6-ФД, то при всех изученных формах ИМС обнару-

живается их увеличение в плазме крови.

Таким образом, стрессорные реакции организма (как остро протекающая, так и хроническая) характеризуются существенными нарушениями компенсаторно-приспособительных функций организма. Полученные результаты говорят об отчетливых отклонениях в картине филогенетически стабилизированного постоянства соотношений ФЛ-ФЛ, что, как уже отмечалось, имеет существенное значение в предопределении нормального течения ряда физиологических функций организма. В молекулярном механизме этих нарушений фигурируют многие факторы, среди которых наибольшего внимания заслуживает факт активирования фосфолипазы A_2 . Об этом свидетельствуют, с одной стороны, активация процессов СРО липидов, возможная лишь при увеличении пула неэстерифицированных жирных кислот — процесса, катализируемого фосфолипазой A_2 , с другой — параллельное возрастание содержания ЛФХ. Липидные перекиси обладают мощным мембранолитическим эффектом, проявляющим отрицательную роль при экстремальных состояниях организма, в том числе при стрессорных срывах. Наличие отмеченных факторов, а также нарушение целостности клеточной мембраны в сочетании с резким падением фона антирадикальных систем защиты клетки — уменьшением уровня эндогенного Т, активности СОД — выступают в роли тех патогенетических факторов, которые нередко являются причиной серьезных дисфункций. Вышеизложенное является объективной основой совершенствования мероприятий по предотвращению дальнейшего усугубления стрессорной реакции организма. Среди них первостепенное значение отводится мерам, способствующим сохранению и восполнению утраченных компонентов антирадикальной защиты клетки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурлакова Е. Б., Архипова Г. Б., Голощапов А. Н. и др. // Биантиоксиданты в регуляции метаболизма в норме и патологии. — М., 1982. — С. 74—83.
2. Бурлакова Е. Б., Джалибова М. И., Гвахария В. О. и др. // Там же. — С. 113—141.
3. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М., 1972.
4. Воскресенский О. Н. // Биантиоксиданты. — М., 1975. — С. 121—125.

5. Захарьин Ю. Л. // Лаб. дело. — 1976. — № 6. — С. 327.
6. Карагезян К. Г. // Там же, 1969. — № 1. — С. 23—25.
7. Карагезян К. Г., Билян Л. Ф., Овакимян С. С. и др. // Гематол. и трансфузиол. — 1984. — № 5. — С. 19—22.
8. Карагезян К. Г., Билян Л. Ф., Осипова Э. П., Погосян А. С. // Там же. — 1985. — № 12. — С. 28—31.
9. Карагезян К. Г., Енгибарян А. А., Овакимян С. С. // Вопр. мед. химии. — 1985. — Т. 31, вып. 1. — С. 43—47.
10. Карагезян К. Г., Овсепян Л. М., Адонц К. Г. // Там же. — Вып. 2. — С. 62—64.
11. Крепс Е. М. Фосфолипиды клеточных мембран нервной системы в развитии животного мира. — Л., 1967.
12. Крепс Е. М. Липиды клеточных мембран. — Л., 1981.
13. Покровский А. А. // Биохимические методы исследования в клинике. — М., 1969. — С. 349.
14. Сентебова Г. А. // Лаб. дело. — 1977. — № 6. — С. 375.
15. Смирнов А. А., Чирковская Е. В., Манукян К. Г. // Биохимия. — 1961. — Т. 26, вып. 6. — С. 1023—1027.
16. Тадевосян Ю. В., Карагезян К. Г., Геворкян Г. А., Батилян Т. Б. // Бюл. экпер. биол. — 1985. — № 11. — С. 553—554.
17. Duggan D. D. // Arch. Biochem. — 1954. — Vol. 84, N 1. — P. 116—126.
18. Folch J. // J. biol. Chem. — 1949. — Vol. 177, № 2. — P. 497—501.
19. Kvetnansky R., Mikulaj L. // Endocrinology. — 1970. — Vol. 87, P. 738—743.
20. Limber G. R., Davie R. F., Bacer A. M. S. // Blood. — 1970. — Vol. 36. — № 2. — P. 111—118.
21. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, № 1. — P. 265—275.
22. Marinetti G. V., Stoltz E. // Biochim. biophys. Acta. — 1956. — Vol. 21. — P. 168—173.

Поступила 19.11.86

DYNAMICS IN THE CONTENT OF TOTAL AND INDIVIDUAL PHOSPHOLIPID FORMS FROM RAT ERYTHROCYTE MEMBRANES DURING VARIOUS STEPS OF STRESS REACTIONS

E. M. Mikaelyan, K. G. Karaguezyan, S. S. Novakimyan

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

Stress reactions of a body were accompanied by mobilization of its potential reactivity, which involved stabilization of the cell membranes metabolic activity. The stabilization of membrane phospholipid-phospholipid interactions appears to be of importance among other factors responsible for normalization of physiological activity under conditions of stress.

УДК 617-001.17-008.6-07:616.153.1:577.152.14 + 577.152.344

А. К. Однопозов, Р. И. Лифшиц, В. З. Горкин

АКТИВНОСТЬ СЫВОРОТОЧНЫХ АМИНОКСИДАЗ И γ-ГЛУТАМИЛТРАНСПЕПТИДАЗЫ ПРИ ОЖГОВОЙ БОЛЕЗНИ

Челябинский медицинский институт, Областной ожоговый центр при медсанчасти металлургического комбината, Челябинск, Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Разработка новых энзиматических тестов для объективизации оценки течения и прогноза ожоговой болезни является актуальной задачей клинической биохимии. В литературе имеются сведения об изменениях при ожогах активности аминоксидаз крови не только экспериментальных животных [13], но и людей [14]. В клинике термических поражений определяли также активность сывoroточной γ-глутамилтранспептидазы (ГТП) [12]. Неизвестно, однако, можно ли использовать получаемые результаты для оценки тяжести поражений и прогнозирования возможных исходов ожоговой болезни. Настоящая работа была предпринята в целях получения ответа на эти вопросы.

Методика

Активность аминоксидаз и ГТП определяли в сыворотке крови 32 здоровых доноров в возрасте от 20 до 59 лет (16 мужчин и 16 женщин) и 72 пациентов (37 мужчин и 35 женщин) с различными по локализации, глубине и площади термическими ожогами. Условно различали 3 группы пациентов в зависимости от величины индекса Франка — суммы утроенной площади глубокого ожога и площади поверхностного ожога — характеризующего степень тяжести ожоговой травмы (разделение на группу представлено в табл. 1) [9]. У 4 пациентов, отнесенных к 3-й группе, были диагностированы сопутствующие ожоги дыхательных путей. Летальность в этой группе была максимальной (32%); течение заболевания осложнялось сепсисом, желудочно-кишечными кровотечениями, психозами, гнойными артритами, остеомиелитами и т. д.

Пробы венозной крови для определения

Группировка пациентов по степени тяжести ожоговой травмы

Группа обследуемых	Пол	Возраст, годы			Общее число пациентов	Индекс Франка, ед.	Трансаминазы крови, ммоль/л/ч		Характеристика ожогов
		20—39	40—59	старше 60					
1-я	М.	6	5	3	27	10—20	0,3—0,8	0,5—1,0	Поверхностные, ограниченные
	Ж.	9	2	2					
2-я	М.	4	5	3	24	20—40	0,5—1,0	0,9—1,7	Глубокие, ограниченные или поверхностные обширные
	Ж.	3	6	3					
3-я	М.	5	4	2	21	60—120	0,8—1,3	1,2—1,8	Глубокие, обширные
	Ж.	4	6	нет					

Примечание. Активность трансаминаз была исследована через 1—3 сут после поступления пациентов в стационар.

активности ферментов брали в день поступления пациентов в стационар или на следующие сутки, а затем у пациентов первых двух групп еженедельно, у пациентов 3-й группы — ежедневно в периоде шока, каждые 48—72 ч в периоде токсемии, еженедельно в периодах септикотоксемии и реконвалесценции.

Активность аминоксидаз определяли спектрофотометрически с гидрохлоридами бензил-аминна (БА) или 4-нитробензиламина (НБА) и гидробромидом 4-диметиламинометилбензиламина (ДБА) в качестве субстратов, экстрагируя продукты реакции гексаном [5]. Конечная концентрация субстратов в пробах составляла 1 мМ. В пробы вносили 0,2—0,5 мл сыворотки или плазмы крови, которые при необходимости сохраняли в замороженном состоянии, но не более 5 сут. Пробы инкубировали при 37 °С от 1 до 3 ч в зависимости от активности. Гепарин удаляли из плазмы крови криопреципитацией при —4 °С. Гексановые экстракты спектрофотометрировали против контроля на субстрат и на источник фермента при 241 нм (субстраты БА и НБА) или при 250 нм (субстрат ДБА). Используя соответствующие коэффициенты молярной экстинкции [2], активность аминоксидаз выражали в микромолях субстрата, подвергшегося окислительному дезаминированию за 1 ч инкубации в расчете на 1 л сыворотки крови.

При определении активности ГТП в качестве акцептора глутамильных групп использовали глицил-глицин в щелочной среде [15]. Общее содержание белка в сыворотке

крови определяли биуретовым методом [6], активность трансаминаз крови — модифицированным колориметрическим методом [4].

Результаты обрабатывали статистически по непараметрическим критериям [3] и при помощи методов вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента [10].

Результаты и обсуждение

Данные, представленные в табл. 2, свидетельствуют о корреляции между тяжестью ожоговой травмы и активностью аминоксидаз, определенной в течение 1—3 сут после поступления пациентов в клинику. Наиболее демонстративно (более чем в 20 раз по сравнению с нормой) нарастание активности, измеренной с ДБА в качестве субстрата (характеризует диаминоксидазную активность [5]) в сыворотке крови пациентов 3-й группы, т. е. при особенно тяжелой ожоговой травме. Для облегчения оценки соотношения между различными типами аминоксидаз был введен коэффициент, представляющий собой отношение выраженных в одинаковых единицах результатов измерений активности аминоксидаз в пробах с БА (субстрат митохондриальных моно-

Таблица 2

Активность аминоксидаз (в ммоль/ч/л; $M \pm m$) сыворотки крови здоровых доноров и пациентов с ожоговыми травмами различной тяжести (1—3-я группы)

Группа обследуемых	Субстрат			
	БА	НБА	ДБА	БА/ДБА
Доноры	16,2±3,8	1,2±0,3	0,8±0,05	19,06±3,2
1-я	12,5±1,6*	1,4±0,5	1,5±0,1*	8,3±0,4*
2-я	7,2±2,3*	2,7±0,8*	9,7±0,3*	0,7±0,2*
3-я	3,5±1,8*	7,5±1,3*	17,5±1,6*	0,2±0,08*

* $p < 0,05$ по сравнению с показателями доноров.

аминоксидаз типа Б и АО крови [2]) и с ДБА (субстрат диаминоксидаз). Подобный подход широко применяют для дифференциальной диагностики в клинической энзимологии [1]. Если в норме указанный коэффициент составляет в среднем 19, то у пациентов с ожоговой травмой, отнесенных к 1-й группе (см. табл. 1), его величина снижалась до 0,2. При этом имело место статистически достоверное снижение активности аминоксидаз при одновременном нарастании диаминоксидазной активности (субстрат ДБА).

Подобные разнонаправленные изменения активности различных аминоксидаз были описаны ранее [2]. Так, например, воздействия различных окислителей на препараты очищенных митохондриальных аминоксидаз, приводя к частичному обратимому окислению их тиоловых групп, качественно изменяли каталитическую активность указанных ферментов. Одним из результатов такой модификации ферментативных свойств было снижение моноаминоксидазной активности при одновременном нарастании диаминоксидазоподобной активности [2]. Однако подобные явления при исследовании очищенных аминоксидаз сыворотки крови пока не были обнаружены. Поэтому интерпретировать на этой основе результаты исследований, сообщаемых в данной работе, представляется преждевременным.

В целях выяснения возможного значения результатов определения активности аминоксидаз в сыворотке крови для оценки эффективности лечебных мероприятий при ожоговой травме нами были исследованы изменения активности указанных ферментов у пациентов, отнесенных к группам 2-й и 3-й, которым в комплексе дезинтоксикационной терапии проводили экстракорпоральную гемосорбцию [8]. Клинический эффект этой операции выражался в снижении температуры тела, купировании психотических явлений, нормализации сна, аппетита, функций желудочно-кишечного тракта и т. д.

Изменения активности аминоксидаз сыворотки крови в условиях гемосорбции у больных 3-й группы представлены на рис. 1. По нашим данным, нормализация активности аминоксидаз в сыворотке крови таких больных начиналась уже через сутки после проведения гемосорбции и заканчивалась через 2—4 нед. У больных, которым такое лече-

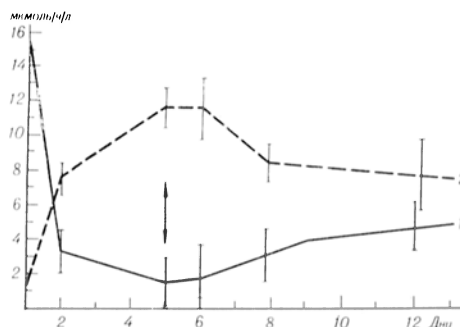


Рис. 1. Изменения активности аминоксидаз в сыворотке крови пациентов с ожоговой травмой (3-я группа).

По оси абсцисс — дни с момента ожога; по оси ординат — активность аминоксидаз (в мкмоль/ч/л); $M \pm m$. 1 — субстрат БА; 2 — субстрат ДБА. Стрелками указан момент проведения гемосорбции.

ние по разным причинам не проводили, нормализация активности аминоксидаз происходила значительно медленнее и во многих случаях не завершалась даже к моменту выписки больных из стационара.

Особенно информативной оказалась динамика изменений диаминоксидазной активности (субстрат ДБА) в тех случаях, когда исход был летальным. Если при благоприятном течении ожоговой травмы указанная ферментативная активность обнаруживала тенденцию к постепенному снижению после завершения периода токсемии (10—14 сут с момента ожога), то при неблагоприятном течении отмечалось повторное, значительное увеличение активности АО (до 4,5—6,8 при норме 0,8 мкмоль/ч/л), которое предшествовало гибели пациентов на 14—96 ч. Аналогичное явление наблюдалось и у тех пациентов, которым в процессе лечения проводили экстракорпоральную гемосорбцию, но которые погибли, несмотря на интенсивные лечебные мероприятия.

Возможные причины повышения диаминоксидазной активности в сыворотке крови при термических ожогах еще не изучены. В этой связи важное значение приобретает гипотеза о роли токсических продуктов, накапливающихся при терминальных состояниях [7], а также дисфункции печени при ожоговой болезни [7, 12].

Последнее предположение находится в согласии с нашими данными об изменениях активности ГТП при термической травме. Как видно из рис. 2, имеется положительная корреляция между тяжестью ожоговой травмы и актив-

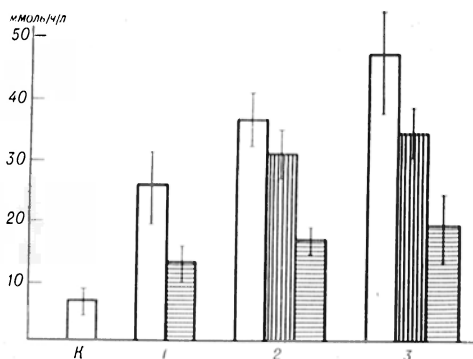


Рис. 2. Активность ГТП в сыворотке крови пациентов с ожоговой травмой.

По оси абсцисс — группы обследуемых: К — контроль; по оси ординат — активность ГТП (в ммоль/ч/л: $M \pm m$). Светлые столбики — при поступлении в стационар, заштрихованные вертикальными линиями — через сутки после гемосорбции, горизонтальными — перед выпиской из стационара.

ностью в сыворотке крови ГТП, изменения которой (как правило, повышение) свидетельствуют о заболеваниях печени [11, 12]. Мы отметили также, что при успешном лечении ожогов происходила нормализация ГТП. По-видимому, уже через 1—3 сут после ожоговой травмы функции печени нарушаются, хотя активность трансаминаз в это время обнаруживает относительно небольшие изменения (табл. 1). Наши данные о преимуществах исследования активности ГТП как показателя состояния печени при ожогах по сравнению с исследованием активности трансаминаз согласуются с данными литературы [12]. При ожоговой болезни на фоне выраженной гипопротениемии и гиперпептидемии [7] повышение активности ГТП может быть обусловлено не только поражением биомембран клеток печени, но и нарастанием концентрации эндогенных субстратов данного фермента.

Таким образом, активность аминоксидаз (субстрат БА) сыворотки крови может служить клинико-биохимическим критерием тяжести ожоговой болезни у человека. Результаты исследования динаминоксидазной активности (субстрат ДБА) могут быть использованы для объективной биохимической оценки направленности патологического процесса и прогнозирования его течения. Использование различных субстратов для измерения активности аминоксидаз и вычисление соответствующих коэффициентов способствуют объективизации оценки эффективности специальной терапии при лечении тяжелообожженных.

Определение активности ГТП в сыворотке крови пациентов с термическими ожогами можно использовать как дополнительный способ лабораторной оценки степени тяжести ожоговой болезни и ее возможных осложнений, в частности нарушений функции печени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вилкинсон Дж. Принципы и методы диагностической энзимологии: Пер. с англ. — М., 1981. — С. 256—267.
2. Горкин В. З. Аминоксидазы и их значение в медицине. — М., 1981.
3. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. — Л., 1973.
4. Иванов И. И., Коровкин Б. Ф., Маркелов И. М. Введение в клиническую энзимологию. — Л., 1974. — С. 204.
5. Киркель А. З., Романюк Ю. П., Давыдова Г. А. и др. // Вопр. мед. химии. — 1986. № 2. — С. 118—125.
6. Колб В. Г., Камышиников В. С. Справочник по клинической химии. — Минск, 1982. — С. 31—33.
7. Лифшиц Р. И. // Метаболические основы острой ожоговой токсемии. — Омск, 1977. — С. 135—141.
8. Николаев В. Г. Метод гемокарбонперфузии в эксперименте и клинике. — Киев, 1984.
9. Рудовский В., Назировский В., Зинкевич В., Зинкевич К. Теория и практика лечения ожогов. — М., 1980.
10. Урбах В. Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. — М., 1975.
11. Goldberg D. M., Martin J. M. // Digestion. — 1975. — Vol. 83. — P. 233—246.
12. Kōnigova E. R., Dolinayova L. // Rozhl. Chir. — 1980. — Vol. 59. — P. 312—316.
13. Lahiri S. C., Basu A., Banerjee S. // Biochem. Pharmacol. — 1971. — Vol. 20. — P. 3225—3230.
14. Lewinson R. // Clin. chim. Acta. — 1977. — Vol. 81. — P. 247—256.
15. Wlasiuk M. // Diagnost. Lab. — 1982. — Vol. 18. — P. 237—244.

Поступила 29.09.86

ACTIVITY OF AMINE OXIDASES AND γ-GLUTAMYL TRANSPEPTIDASE IN BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH BURNS TRAUMA

A. K. Odnopozov, R. I. Lifshits, V. Z. Gorkin

Medical School, Burns Centre at the Hospital of Metallurgical Works, Chelyabinsk, Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Activities of amine oxidases (benzylamine, 4-nitrobenzylamine, 4-dimethylamine methylbenzylamine used as substrates) and of

γ -glutamyl transpeptidase were studied in blood serum of 72 patients with thermic burns of various intensity and degree. Severity of the disease correlated with the rate of amine oxidases activity alteration. Distinct and long-term decrease in oxidation of benzylamine as well as simultaneous stimulation of 4-dimethylamine methylbenzylamine oxidation were observed in severe forms of the burns disease,

thus suggesting the increase in diamine oxidase activity. This phenomenon proved to be an unfavourable prognostic indication of the disease. Alterations in activity of γ -glutamyl transpeptidase corresponded to severity of the burns disease. Estimation of the enzymatic activity might be used in evaluation of the impairments severity as well as in prognosis of burns disease development.

УДК 616-055.5/7-02:575.224.231-07:618.33-008.939.629-073.916

М. И. Фрейдин, Н. В. Соловьева, В. И. Кухаренко,
А. А. Дельвиц

СЕКРЕЦИЯ ^{14}C -ПРОКОЛЛАГЕНА ЭМБРИОНАЛЬНЫМИ ФИБРОБЛАСТАМИ ЧЕЛОВЕКА С ДИПЛОИДНЫМ И ТРИСОМНЫМ НАБОРОМ ХРОСОМ

Институт медицинской генетики АМН СССР, НИИ медицинской энзимологии АМН СССР, Москва

Хромосомные аномалии у человека могут быть причиной различных нарушений морфогенеза: от незначительных пороков развития до полного прекращения развития плода и его гибели [4]. Важным фактором, влияющим на протекание элементарных реакций морфогенеза, таких, как пролиферация, миграция и дифференцировка клеток, является состояние межклеточного матрикса. Показано, что состояние межклеточного матрикса влияет на длительность митотического цикла клеток *in vitro* [13], а распределение компонентов матрикса по крайней мере отчасти определяет направление движения клеток [20]. Синтез эмбриональными фибробластами человека одного из основных компонентов межклеточного матрикса — коллагена является биохимическим показателем их дифференцировки [11]. Так как от степени развития межклеточного матрикса зависят такие важные процессы, как пролиферация, миграция и дифференцировка клеток [14], представляло интерес сравнение скоростей секреции и накопления проколлагена в межклеточном матриксе культивируемых фибробластов человека с нормальным и аномальным набором хромосом. Поскольку известно, что цитоскелет участвует в поддержании морфологической и функциональной целостности секреторного аппарата [8, 12] и в удержании гликопротеинов матрикса на поверхности клеток [19], мы исследовали соотношение поли- и деполимеризованного тубулина, являющегося важным компонентом одного из элементов цитоскелета — микро-

трубочек [6]. Обнаружено, что при равных скоростях секреции ^{14}C -проколлагена он накапливается в матриксе диплоидных клеток и не задерживается в матриксе анеуплоидных клеток.

Методика

Объектом исследования служили диплоидные эмбриональные фибробласты человека, полученные из материала медицинских абортусов [штаммы ЛЦЧ-814 (46, XX) и ЛЦЧ-821 (46, XY)] и эмбриональные фибробласты человека с анеуплоидным набором хромосом [штаммы ЛЦЧ-162 (47, XY+7) и ЛЦЧ-522 (47, XY+7)], полученные из материала спонтанных абортусов человека. В экспериментах использовали штаммы в логарифмической фазе роста (18—24-й пассаж). Клетки культивировали как описано в работе [2]. Клетки инкубировали с ^{14}C -пролином (10 мКи/ммоль, UVVR, СССР) в течение 10 ч, после чего культуральную среду удаляли, клетки 3 раза промывали средой Игла, содержащей 2 мМ глутамин, 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты («Merk», ФРГ), 12 мМ немеченого пролина (L-пролин, «Reanal», ВНР). В одной части чашек Петри (2 чашки Петри) клетки снимали резиновым скребком или трипсином (0,25% раствор, 10 мин при 37 °C). Клетки суспендировали в 0,5 мл раствора ЭДТА и разрушали в ультразвуковом дезинтеграторе MSE в течение 20 с. По 0,1 мл гомогената отбирали при определении содержания ДНК [7]. Другую часть чашек Петри заливали средой, используемой для промывки клеток, и инкубировали 2 ч при 37 °C в CO_2 -инкубаторе (2-часовой чейз). По окончании инкубации клетки снимали и разрушали, как описано выше. При снятии клеток с чашек Петри раствором трипсина, который отделяет межклеточный матрикс от клеток [15], матрикс отделяли от клеток центрифугированием (5000 об/мин, 10 мин). Клетки и межклеточный матрикс гидролизировали в 6 н. HCl (18 ч при 108 °C), высушивали под вакуумом, растворяли в 0,8 мл 0,1 н. HCl и наносили на

колонку (0,9×30 см) со смолой Апинех Q для разделения ¹⁴C-оксипролина и ¹⁴C-пролина элюцией 0,2 М Na-ацетатным буфером pH 3,25 со скоростью 1 мл/мин. В собранных фракциях, содержащих ¹⁴C-оксипролин, измеряли радиоактивность в жидкости Брея на сцинтилляционном счетчике.

Процент секреции и накопления проколлагена в межклеточном матриксе рассчитывали по формуле

$$X=100-\frac{\text{имп/мин/мкг ДНК после 2 ч чейза}\times 100}{\text{имп/мин/мкг ДНК до 2 ч чейза}}\cdot$$

Соотношение поли- и деполимеризованного тубулина определяли описанным методом [17]. Исследовали клетки, находящиеся в логарифмической фазе роста на 3-й день после субкультивирования в чашках Петри. Клетки 3 раза промывали 0,15 М NaCl, а затем буфером, полимеризующим тубулин: 50% глицерин, 5% диметилсульфоксид, 0,1 М пиперазин-N,N-бис (2-этансульфоновая кислота)-Na соль (PIPES), 0,5 мМ ЭГТА, 1 мМ фенолметилсульфонил фторид (PMSF), 1 мМ ГТФ, 0,5 мМ MgCl₂, pH 6,95. Клетки с одной чашки Петри снимали в 0,3 мл этого буфера и разрушали в гомогенизаторе тефлон — стекло. Гомогенат клеток в полимеризующем буфере помещали на 1 ч на ледяную баню, а затем центрифугировали при 4 °C в роторе SW-65 (20 000 об/мин, 30 мин). В надосадочной фракции (фракция 1) определяли количество деполимеризованного тубулина после предварительного 5-кратного разведения ее раствором деполимеризующего буфера: 0,01 М PIPES, 0,25 М сахарозы, 0,05 мМ ГТФ, 0,5 мМ MgCl₂, 1 мМ PMSF, pH 6,95. Осадок, содержащий микротрубочки, 2 раза промывали полимеризующим буфером и гомогенизировали в 200 мкл деполимеризующего буфера. Гомогенат инкубировали на ледяной бане 1 ч, центрифугировали, как описано выше, и в надосадочной фракции (фракция 2) определяли тубулин радиолигандным методом. Для этого к исследуемым фракциям 1 и 2, взятым в количестве 25 мкл, добавляли по 5 мкл 0,018 мкМ раствора ³H-колхицина с удельной радиоактивностью 5,5 Ки/мМ (ring-A-4-³H-colchicine, фирма «Amersham») и инкубировали в течение 1 ч при 37 °C. Для

отделения свободного колхицина в пробирки добавляли по 20 мкл 2% раствора бычьего сывороточного альбумина и 200 мкл 0,5% раствора активированного угля Norit (фирма «Serva») в деполимеризующем буфере. Смесь инкубировали 10 мин при комнатной температуре и центрифугировали 10 мин при 4000 об/мин. 125 мкл надосадочной жидкости, содержащей тубулин, связанный с колхицином, вносили в кювету с жидкостью Брея и определяли радиоактивность.

Результаты и обсуждение

Эмбриональные фибробласты исследовали в логарифмической фазе роста, поскольку при переходе клеток в состояние покоя наблюдаются различные изменения их метаболизма, в частности снижение синтеза макромолекул и проницаемости наружной мембраны [3]. Скорость секреции ¹⁴C-проколлагена клетками определяли по изменению содержания ¹⁴C-оксипролина в межклеточном матриксе и клетках до и после 2-часового чейза, отнесенного к количеству ДНК в микрограммах на чашку Петри. Обнаружено, что секреция ¹⁴C-проколлагена практически не различается у диплоидных и трисомных фибробластов при обработке клеток трипсином, составляя 61,5 и 63% соответственно (табл. 1). Без обработки трипсином, т. е. без отделения межклеточного матрикса, скорость секреции проколлагена снижалась для диплоидного штамма (с 61,5 до 36%) и практически не изменялась для анеуплоидного штамма. Следует учитывать, что определение ¹⁴C-оксипролина в не обработанных трипсином фибробластах дает представление о содержании проколлагена в клетках и межклеточном матрик-

Таблица 1

Относительная скорость секреции ¹⁴C-проколлагена эмбриональными фибробластами с диплоидным набором хромосом и эмбриональными фибробластами с трисомией 7-й хромосомы

Фибробласты	% секреции проколлагена	
	обработка трипсином	без обработки трипсином
Диплоидные: ЛПЧ 814 (46, XX) ЛПЧ 821 (46, XY)	63±7,7 (7) 58±1,0 (3)	36±3,89 (9) —
Среднее 61,5±5,4		
С трисомией 7-й хромосомы: ЛПЧ 162 (47, XY +7) ЛПЧ 522 (47, XY +7)	64±10,0 (5) 62±6,8 (5)	56±2,5 (3) p<0,05
Среднее 63±6,05		

Примечание. p рассчитано по сравнению с диплоидными фибробластами. Здесь и в табл. 2 в скобках — число определений.

Таблица 2

Изменение содержания ^{14}C -проколлагена в межклеточном матриксе эмбриональных фибробластов с диплоидным набором хромосом и эмбриональных фибробластов с трисомией 7-й хромосомы после 2-часового чейза

Фибробласты	Изменение (в %) содержания ^{14}C -проколлагена в межклеточном матриксе
Диплоидные: ЛЦЧ 814 (46, XX) ЛЦЧ 821 (46, XY)	+5 (7) -13 (4)
	Среднее -1,9
С трисомией 7-й хромосомы: ЛЦЧ 162 (47, XX+7) ЛЦЧ 522 (47, XY+7)	-48 (7) -50 (4)
	Среднее -49

се, обработка трипсином удаляет межклеточный матрикс и позволяет определять содержание ^{14}C -проколлагена только в клетках. Тот факт, что скорость секреции ^{14}C -проколлагена трисомными клетками оказалась практически одинаковой в обработанных трипсином фибробластах, позволил предположить, что секретируемый проколлаген накапливается в матриксе диплоидных клеток и не задерживается в матриксе трисомных клеток. Анализ изменений содержания ^{14}C -оксипролина в матриксе диплоидных клеток показал, что уровень радиоактивности в нем увеличивается после 2-часового чейза на 9%, а в матриксе трисомных клеток уменьшается на 49% (табл. 2). Эти данные свидетельствуют о том, что секретируемый ^{14}C -проколлаген не задерживается в матриксе анеуплоидных клеток. Такое различие в характере секреции проколлагена диплоидными и анеуплоидными

Таблица 3

Относительное содержание полимеризованного тубулина в эмбриональных фибробластах с диплоидным набором хромосом и в эмбриональных фибробластах с трисомией 7-й хромосомы

Фибробласты	Число экспериментов	Полимеризованный тубулин, %
Диплоидные: ЛЦЧ 814 (46 XX) ЛЦЧ 821 (46 XY)	6 3	$11,4 \pm 0,99$ $9,7 \pm 0,73$
С трисомией 7-й хромосомы: ЛЦЧ 162 (47 XX+7)	3	$7,3 \pm 0,41$ $p < 0,05$

клетками может быть связано или с нарушением структуры межклеточного матрикса или со снижением способности трисомных клеток удерживать проколлаген на своей поверхности. В связывании коллагена с поверхностью клетки играют роль фибронектин, ламинин, гликопротеиды и рецепторы коллагена, молекулярная природа которых не выяснена [5, 14, 18, 21]. Вещества, нарушающие структуру цитоскелета, нарушают и связывание коллагена с клетками [11]. При исследовании соотношения поли- и деполимеризованного тубулина было обнаружено снижение на 4,1 и 2,4% содержания полимеризованного тубулина в анеуплоидных клетках по сравнению с диплоидными (табл. 3). Кроме того, в этих же трисомных клетках было уменьшено содержание фибронектина [3]. Поскольку все элементы цитоскелета связаны между собой [9], возможно, что в трисомных клетках нарушена и система микрофиламентов, участвующих в удержании коллагена на поверхности клеток [11]. Другой причиной отсутствия задержки проколлагена в матриксе трисомных клеток может быть его качественное изменение. Однако не было обнаружено различий в степени гидроксирования остатков пролина в цепях коллагена I типа, которые могли бы быть причиной его повышенного внутриклеточного распада, снижения секреции, а также отсутствия задержки и накопления секретируемого материала в экстраклеточном матриксе [3, 10, 16].

Быстрое прохождение проколлагена через сито межклеточного матрикса трисомных клеток может вызвать нарушение внеклеточного процессирования коллагена и изменение процесса фибрилlogenеза, что в конечном счете ведет к формированию дефектного матрикса. Учитывая важную роль межклеточного матрикса в процессах морфогенеза, можно предположить, что выявленные нами различия являются одной из причин нарушения морфогенеза при хромосомных аномалиях у человека.

ЛИТЕРАТУРА

- Белкин В. М., Кухаренко В. Н., Володарская С. М. и др. // Вопр. мед. химии. — 1985. — № 1. — С. 125—129.
- Дельвиц А. А., Кухаренко В. Н., Поддуб О. В. и др. // Молек. генет., 1983. — № 12. — С. 39—43.
- Елифанова О. Н., Терских В. В., Полуновский В. А. Покоящиеся клетки. Свой-

- ства и функции в организме. — М., 1983.
4. Терапология человека. Под ред. Г. И. Лазюка. — М., 1979.
 5. Aenur Z., Geiger B. // Exp. Cell Res. — 1985. — Vol. 158. — P. 321—322.
 6. Brinkley B. R. // Meth. Cell Biol. — 1982. — Vol. 24, pt. A. — P. 1—8.
 7. Bruk C., Jones K., James T. // Analgt. Biochem. — 1979. — Vol. 92. — P. 497—500.
 8. Cellular Regulation of Secretion and Release. — New York, 1982. — P. 195—267.
 9. David-Pfenty T. // Europ. J. Cell Biol. — 1983. — Vol. 30. — P. 93—99.
 10. Diegelman R. F., Peterkofsky B. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1972. — Vol. 69. — P. 892—896.
 11. Goldberg B. D. // J. Cell Biol. — 1982. — Vol. 95. — P. 747—751.
 12. Gross J. // Gene Families Collagen and Other Proteins. — New York. — 1980. — P. 5—36.
 13. Hirata K., Joshida J., Shisamon K. et al. // Exp. Cell Biol. — 1983. — Vol. 51. — P. 121—129.
 14. Kleiman H., Cannon F., Laurie G. W. et al. // J. Cell Biol. — 1965. — Vol. 27. — P. 317—325.
 15. Koda J. E. // J. biol. Chem. — 1985. — Vol. 260. — P. 8157—8162.
 16. Kukhareno V. I., Delvig A. A., Grinberg K. N. // Hum. Genet. — 1984. — Vol. 260. — P. 269—271.
 17. Ostlund R., Lenng J. J., Hagi K. S. // Analyt. Biochem. — 1979. — Vol. 96. — P. 155—164.
 18. Plerachbacher M. D., Hayman E. G., Ruoslahti E. // J. Cell. Biochem. — 1985. — Vol. 28. — P. 115—126.
 19. Raushl B., Moss D. J. // J. Submicrosc. Cytol. — 1984. — Vol. 16. — P. 129—130.
 20. Wehland J., Hencart M., Klausner R., Sandoval J. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1983. — Vol. 80. — P. 4286—4290.
 21. Jamada K., Akaiyama S., Hasegawa T. et al. // J. Cell. Biochem. — 1985. — Vol. 28. — P. 2879—2897.

Поступила 18.07.86

SECRETION OF ¹⁴C-PROCOLLAGEN BY HUMAN EMBRYONAL FIBROBLASTS WITH DIPLOID AND TRIPLOID CHROMOSOMES

M. I. Freidin, N. V. Solov'eva, V. I. Kukhareno, A. A. Del'vig

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

Secretion of procollagen was studied in human embryonal fibroblasts with diploid chromosomes as well as in fibroblasts obtained from fetuses after spontaneous abortion from patients with trisomy by chromosome 7. The rate of procollagen secretion was approximately similar in these cells; the protein was shown to accumulate in intracellular matrix of diploid fibroblasts, while it did not occur in the matrix of aneuploid fibroblasts. Content of polymeric tubulin was decreased in fibroblasts with trisomy as compared with diploid cells. Impairment of the intracellular matrix structure in the cells with trisomy appears to be responsible for deterioration of morphogenesis in human chromosome anomalies.

УДК 617-001.17-008.6-085.38.015.2:615.246.2]-07:[616.36-008.1-07:616.153.1

Н. П. Микаелян, З. И. Ильина

ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПЕЧЕНИ ПО ФЕРМЕНТНОМУ СПЕКТРУ КРОВИ ПОСЛЕ ГЕМОСОРБЦИИ В СВЯЗИ С ОЖГОВОЙ ИНТОКСИКАЦИЕЙ

И ММИ им. Н. И. Пирогова

Значение ожоговой токсемии в патогенезе ожоговой болезни велико. Аутоинтоксикация, возникающая при тяжелых ожогах, развивается уже в первые часы после термической травмы и сопутствует всем стадиям заболевания. Особое значение при этом придают измененным белкам [9] и нарушениям функционального состояния [4, 6, 7]. Нарушение функции органов при ожогах связывают с присутствием в крови ожоговых токсинов.

Однако клинические и экспериментальные исследования, касающиеся изучения ферментного спектра крови при ожоговой интоксикации малочисленны и не дают представления о значении

этих показателей при ожоговой болезни.

Целью данного исследования было изучение ферментативного профиля сыворотки крови, характеризующего функциональное состояние печени в процессе развития ожогового синдрома и после осуществления детоксикации методом гемосорбции.

Методика

Опыты были поставлены на 25 собаках. Ожог IIIA—IIIB степени с поражением 25—30% общей поверхности тела животного вызывали наложением горящего спиртового тампона на предварительно эпилированную спинку и боковые части туловища со-

баки. В результате воздействия термического фактора в течение 1 мин возникла ожоговая поверхность, покрываемая позднее струпом, который отторгнулся без нагноения. Во избежание шокогенного эффекта ожоговую травму наносили под гексеналовым рауш-наркозом.

В I серии опытов (10 собак) изучали влияние ожоговой травмы на токсичность сыворотки крови и некоторые ферменты сыворотки крови, во II серии (10 собак) — влияние гемосорбции на те же показатели на фоне ожоговой травмы. III серия (5 собак) служила контролем. Гемосорбцию проводили на сорбенте СКТ-6а через 24 ч после ожога, когда сыворотка крови обожженных животных обладала наиболее выраженным токсическим эффектом [8].

Биохимические показатели изучали до нанесения ожоговой травмы, затем через 1—2, 3—4, 5—7 и 10 сут и более после нанесения травмы. В тех случаях, когда проводили гемосорбцию, кровь для исследования брали до ожога, т. е. до перфузии, затем после перфузии, через 1 сут, 3—4, 5—7 сут и через 2 нед после гемосорбции. Изучали следующие показатели: продолжительность жизни парамеций [1], выживаемость мышей с блокированной ретикуло-эндотелиальной системой (РЭС), лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ), активность трансаминаз — аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ), фруктозо-1-фосфатальдолазы (Ф-1-Ф-альдолазы), катепсина D и лейциламинопептидазы (ЛАП).

Результаты и обсуждение

К числу способов оценки уровня токсичности биологических сред относятся определение продолжительности жизни простейших *Paramecium caudatum* [1] и биотестирование на мышах с блоки-

рованной РЭС [5]. Применяя эти методики для изучения в стадии ожоговой токсемии токсичности сыворотки крови, мы отметили ее двухволновый характер (табл. 1). Периоды наибольшей токсемии наблюдаются на 1—2-е и 7-е сутки после термической травмы. В эти сроки степень токсичности крови более чем вдвое превышает исходный уровень. Продолжительность жизни парамеций сокращается до $122 \pm 13,8$ с на 1-е сутки, до $119 \pm 11,3$ с на 3—4-е сутки и до $137,9 \pm 17,3$ с (против $340,1 \pm \pm 9,9$ с в контроле) на 7-е сутки ($p < 0,001$).

Введение сыворотки, взятой у собак через 2 сут после термического ожога, вызвало 100% гибель белых мышей в условиях блокады РЭС, а введение сыворотки, взятой от собак через 7 сут после ожога, вызывало 75% гибель мышей (погибли 4 мыши из 5).

Небольшое ослабление токсичности мы отметили на 5-е сутки после травмы, при этом продолжительность жизни парамеций составляла $152,3 \pm 15,2$ с. Очевидно, это связано с улучшением функции почек.

О степени токсичности сыворотки крови мы судили также по ЛИИ [2]. Статистически значимые различия мы отметили на 2-е сутки термической травмы (до $1,53 \pm 0,2$ против $0,63 \pm 0,07$ ($p < 0,001$), и в остальные сроки наблюдения ЛИИ более чем в 2 раза превышал исходное значение ($p < 0,001$), что яв-

Таблица 1
Динамика токсичности крови при термической травме у собак до и после гемосорбции ($M \pm m$)

Срок исследования, сутки	Продолжительность жизни парамеций, с		ЛИИ [2]	
	до гемосорбции	после гемосорбции	до гемосорбции	после гемосорбции
До ожога	$340,1 \pm 9,9$ (25)	—	$0,65 \pm 0,07$ (25)	—
После ожога:				
1—2	$122 \pm 13,8$ (25) $p < 0,001^*$	$291 \pm 24,3$ (10) $p < 0,05^{**}$	$1,53 \pm 0,19$ (20) $p > 0,1^*$	$0,69 \pm 0,03$ (10) $p < 0,001^{**}$
3—4	$119 \pm 11,3$ (8) $p < 0,001^*$	$300,3 \pm 17,5$ (8) $p < 0,05^{**}$	$1,41 \pm 0,17$ (8) $p < 0,001^*$	—
5	$152,3 \pm 15,2$ (10) $p < 0,001^*$	$340 \pm 24,4$ (8) $p > 0,1^* < 0,001^{**}$	$1,31 \pm 0,1$ (10) $p < 0,05^*$	$0,46 \pm 0,09$ (7) $p > 0,1^*$
7	$137,9 \pm 17,3$ (9) $p < 0,001^*$	$331 \pm 25,7$ (7) $p > 0,1^* < 0,01^{**}$	$1,42 \pm 0,11$ (7) $p < 0,001^*$	$0,62 \pm 0,05$ (6) $p > 0,1^*$
10	$157,9 \pm 25,3$ (8) $p < 0,001^*$	$351 \pm 26,4$ (7) $p > 0,1^*$	$1,35 \pm 0,14$ (7) $p < 0,05^*$	—
14	$257,1 \pm 16,9$ (7) $p < 0,001^*$	$339 \pm 17,1$ (5) $p > 0,1^*, p < 0,01^{**}$	$1,27 \pm 0,13$ (6) $p < 0,01^*$	—

Примечание. В скобках — число опытов. Прочерк — исследования не были проведены. Одна звездочка — достоверность различий по отношению к исходным данным, две — по отношению к данным контрольной группы.

Таблица 2
Динамика активности трансаминаз в сыворотке
крови собак при ожоговой токсемии

Сроки исследования, сутки	АСТ, ммоль субстрата на 1 мл, в час	АЛТ, ммоль субстрата на 1 мл, в час	АСТ/АЛТ
До опыта			
После ожога:			
1—2	0,605±0,06 (25) $p < 0,001$	0,685±0,005 (25) $p < 0,01$	0,883±0,07 (25) $p > 0,5$
3—4	1,401±0,182 (9) $p > 0,1$	1,451±0,175 (9) $p < 0,001$	0,965±0,12 (9) $p > 0,2$
5	1,42±0,698 (9) $p < 0,01$	1,48±0,201 (9) $p < 0,001$	0,986±0,112 (9) $p > 0,2$
7	0,89±0,093 (7) $p < 0,01$	1,132±0,119 (7) $p < 0,001$	0,786±0,113 $p > 0,2$
10	0,83±0,98 (7) $p > 0,5$	1,140±0,152 (7) $p < 0,01$	0,728±0,109 $p > 0,2$
14	0,923±0,19 (6) $p > 0,1$	1,43±0,213 (6) $p < 0,01$	0,615±0,124 $p < 0,05$
	0,719±0,21 (6) $p > 0,5$	1,04±0,25 (6) $p > 0,1$	0,691±0,18 (6) $p > 0,2$

ляется показателем реакции лейкоцитов на интоксикацию.

При исследовании токсического действия сыворотки крови на парameции после гемосорбции оказалось, что степень токсичности сыворотки крови резко снижается и, начиная с 5-х суток после гемосорбции, практически не отличается от исходного значения ($p > 0,1$). После проведенной однократной гемосорбции ЛИИ возвращается к норме и в течение последующих 7 дней наблюдения не отличается от исходной (до ожога) величины ($p > 0,1$).

Таким образом, при экспериментальной термической травме резко повышается токсическое свойство крови. Однократно проведенная гемосорбция на сорбенте СКТ-6а приводит к стойкому снижению токсичности сыворотки крови.

При исследовании сывороточных аминотрансфераз (АЛТ и АСТ (табл. 2), характеризующих состояние гепатоцитов, установлено, что наибольший подъем активности АСТ в сыворотке крови наблюдается до 3—4-х суток после ожога ($p < 0,01$). В последующем после небольшого снижения активность АСТ сохраняется на одном уровне на протяжении всего периода наблюдения.

В динамике активности АЛТ отмечен двухволновый характер. Первый подъем наблюдается в периоде ожогового шока и полностью совпадает с динамикой АСТ. На 10-е сутки отмечается второй пик ($p < 0,001$). Хотя активность этого фермента на 7-е и 14-е сутки несколько снижается, но остается повышенной по отношению к контролю ($p < 0,05$). Пики гиперферментемии совпадают с периодами усиления токсич-

ности сыворотки крови. Повышение активности АЛТ в стадии токсемии может свидетельствовать о деструктивных процессах в печени.

В результате однократно проведенной гемосорбции уже через неделю трансаминазная активность сыворотки крови стабилизируется. Снижение активности АЛТ в сыворотке крови можно объяснить уменьшением деструктивных процессов в печени. Установлено, что в печени у собак после гемосорбции происходит восстановление структуры гепатоцита [4].

О состоянии гепатоцитов можно судить также по активности органоспецифического фермента для печени Ф-1-Ф-альдолазы. Активность этого фермента в сыворотке крови подопытных собак сразу после ожоговой травмы резко возрастала (более чем в 3 раза; $p < 0,01$) и оставалась на высоком уровне вплоть до клинического выздоровления животного. После проведенной гемосорбции активность исследованных маркерных ферментов стабилизировалась.

Обезвреживание токсичных веществ в печени связано с активностью и лизосомного аппарата. В связи с этим нами была изучена ферментативная активность катепсина D. Результаты этих исследований показали, что уже на 2-е сутки после ожога его уровень увеличивается в 3,75 раза, а на 5-е сутки достигает $19,1 \pm 4,5$ имоль тирозина на 1 мл в 1 мин при исходном уровне $3,5 \pm 0,3$ имоль тирозина на 1 мл в 1 мин. Гемосорбция способствует резкому снижению активности катепсина D, что, по-видимому, связано с устранением токсического действия метаболизмов, вызывающих активацию протеолиза.

При изучении активности ЛАП отмечено, что одновременно с повышением активности сывороточных аминотрансфераз уменьшается активность ЛАП. Наиболее выраженная степень снижения выявилась на 2-е сутки после ожога: именно в тот период, когда наблюдалось самое значительное повышение активности АЛТ и АСТ. Активность этого фермента остается сниженной в течение 10 сут исследования, что указывает на угнетение функций печени.

Таким образом, при экспериментальной термической травме резко повышается токсичность крови, о чем свидетельствуют повышение летальности парameций и белых мышей, а также увеличение

значения ЛИИ. Эти изменения приводят к токсическому поражению печени и, по-видимому, цитолизу гепатоцитов, свидетельством чего является резкое нарастание уровня органоспецифических ферментов печени (АЛТ, АСТ, Ф-1-Ф-альдолазы, катепсина D) и снижение активности ЛАП. После однократной гемосорбции наступают стойкое снижение степени токсичности сыворотки крови, нормализация ферментного спектра сыворотки крови и значения ЛИИ, что можно объяснить уменьшением деструктивных процессов в печени и восстановлением функциональной полноценности гепатоцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Генес В. С., Арнаутков А. К., Джафаров Г. А. // Действие ионизирующих излучений на животные организмы. — Киев, 1958. — С. 21.
2. Кальф-Калиф Я. Я. // Врач. дело. — 1941. — № 1. — С. 31—36.
3. Лазовская А. Я. Сорбционный способ детоксикации организма при экспериментальной острой ожоговой токсемии: Автореф. дис... канд. мед. наук. — Челябинск, 1984.
4. Подошвина Р. В. // Пат. физиол. — 1965. — № 3. — С. 82—83.
5. Подошвина Р. В. // Там же. — 1972. — № 2. — С. 43—46.
6. Окатьев В. С., Гусев Б. С., Ли А. В. //

Всесоюзная конф. по проблеме «Глубокие и обширные ожоги», 2-я: Тезисы. — М., 1979. — С. 43—45.

7. Турбин Б. Н., Амищенко Л. Г., Фисталь Э. Я. // Там же. — С. 42—43.
8. Федоров Н. А., Корякина Н. К., Савицкий А. В. и др. // Труды 2-го Моск. мед. ин-та. — 1980. — Т. 158. — С. 123—128.
9. Федоров Н. А., Мовшев Б. Е., Подошвина Р. В., Корякина И. К. Ожоговая аутоинтоксикация: Пути иммунологического преодоления. — М., 1985.

Поступила 30.09.86

ESTIMATION OF THE LIVER TISSUE FUNCTIONAL STATE USING THE BLOOD ENZYMATIC SPECTRUM AFTER HEMOSORPTION CAUSED BY BURNS INTOXICATION

N. P. Mikaelyan, Z. I. Il'ina

II Medical School, Moscow

A rate of blood serum toxicity was markedly increased beginning from the second day after thermic burns of dogs. At the same time, statistically distinct alterations were found in liver tissue specific enzymes activity demonstrating the necrotic impairments of liver tissue and cytolysis of hepatocytes. After hemosorption the rate of blood serum toxicity was steadily decreased, the enzymatic spectrum and leukocyte index of intoxication were normalized in blood serum, which appears to relate to lowering of destructive processes in liver tissue and to maintaining of hepatocytes functional activity.

УДК 612.351.11:577.152.311]-088.1+616.36-008.931:577.152.311-074

Г. Г. Ковалева, Н. М. Карманский

ПОЛУЧЕНИЕ И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ХОЛЕСТЕРОЛЭСТЕРАЗЫ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Эфиры холестерина являются одним из главных компонентов липопротеинов плазмы крови, и нарушение их метаболизма играет существенную роль в патогенезе ряда заболеваний, в частности атеросклероза [7].

При исследовании структурной и функциональной роли эфиров холестерина, а также для решения других задач (например, для выяснения степени атерогенности ферментативно-модифицированных липопротеинов) возникает необходимость их гидролиза холестеролэстеразой. Применение для этой цели иммобилизованного фермента позволило бы проводить повторные анализы и значительно облегчило бы проблему от-

деления фермента от продуктов гидролиза перед их дальнейшим исследованием. В литературе описано получение ковалентно иммобилизованных панкреатической и микробной холестеролэстераз [4, 3]. Однако эти ферменты отличаются по ряду свойств от тканевых холестеролэстераз [1], поэтому для решения вопросов, связанных с тканевым обменом эфиров холестерина, представляет интерес получение иммобилизованной тканевой холестеролэстеразы. В настоящей работе описана иммобилизация очищенной нейтральной холестеролэстеразы из печени свиньи на октил-сефарозе и приведены некоторые свойства иммобилизованного фермента.

Методика

Активность холестеролэстеразы определяли по гидролизу дисперсии холестерил-(1- 14 C)-олеата (удельная радиоактивность 27 Ки/моль, «Amersham», Англия), как описано ранее [6]. Нейтральную холестеролэстеразу из печени свиньи выделяли по методу [2]. Для иммобилизации использовали препараты, полученные после ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе и гидроксипатите. В работе использовали СН-сефарозу и октил-сефарозу («Pharmacia», Швеция). Для определения pH-оптимума иммобилизованного фермента применяли 50 мМ трис HCl (pH 8,5 и 9,0) и 20 мМ К-фосфатный буфер (pH 5,8; 6,5; 7,5 и 8,0). В остальных опытах с иммобилизованным ферментом использовали 20 мМ К-фосфатный буфер pH 7,5.

Иммобилизация холестеролэстеразы на СН-сефарозе. Для иммобилизации использовали раствор фермента, полученный после хроматографии на гидроксипатите [2] и сконцентрированный в 20 раз путем диализа против 20% полиэтиленгликоля-40 000 («Sequa», ФРГ). Иммобилизацию холестеролэстеразы на СН-сефарозе проводили по методу [5]. 1 г СН-сефарозы инкубировали с 10 мл 0,5 М NaCl в течение 2 ч при комнатной температуре, после чего набухшую суспензию промывали 300 мл 0,5 М NaCl, затем водой. К 4 мл суспензии СН-сефарозы добавляли 0,4 мл 25 мМ Na-барбиталового буфера, pH 5,5, и 1,6 мл раствора холестеролэстеразы (1 мг белка, удельная активность 0,26 имоль на 1 мг в 1 ч). После доведения pH смеси до 5,5 добавляли 40 мг 1-этил-3(3-диметиламинопропил)карбодимида («Sigma», США), растворенного в 0,5 мл воды (порциями по 25 мкл в течение 15 мин при комнатной температуре). Суспензию затем инкубировали при 4 °C в течение 16 ч, после чего отмывали 200 мл воды. В заключение гель инкубировали с 100 мл 0,1 М глицина при 15 °C, а затем отмывали 1 М NaCl, водой и 20 мМ К-фосфатным буфером pH 7,5. Активность холестеролэстеразы, иммобилизованной на СН-сефарозе, устанавливали так же, как активность фермента в растворе [6].

Иммобилизация холестеролэстеразы на октил-сефарозе. К элюату после хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе [2], содержащему 100 мг белка (удельная активность холестеролэстеразы 0,22 имоль на 1 мг в 1 ч), в 220 мл раствора добавляли 3 М NaCl для доведения концентрации NaCl до 1 М и полученный раствор наносили на колонку с октил-сефарозой (0,6×3 см), уравновешенной 1 М NaCl в 20 мМ К-фосфате pH 8,0. Нанесение проводили по замкнутому циклу со скоростью 20 мл/ч в течение 18 ч при 4 °C. После этого колонку промывали 1 М NaCl в 20 мМ К-фосфате pH 8,0, а затем 20 мМ К-фосфатом pH 7,5. Иммобилизованная холестеролэстераза не элюировалась 2 М NaCl, 3% альбумином, 0,5% дезоксихолата Na, а также 75% этиленгликолем. Для определения активности холестеролэстеразы, иммобилизованной на октил-сефарозе, использовали дисперсию холестерил- 14 C-олеата (см. выше). Эту дисперсию (30 имоль холестерилолеата) подвергали циркуляции (с помощью перистальтического насоса) через термостатированную при 37 °C колонку с октил-сефарозой, содержащей сорбированный фермент и уравновешенной 20 мМ

К-фосфатом pH 7,5. После окончания циркуляции, длившейся от 30 мин до 3 ч, колонку промывали 15 мл 20 мМ К-фосфата pH 7,5. В элюате определяли общую радиоактивность и количество освобожденного 14 C-олеата. Эти данные использовали для расчета степени гидролиза холестерил- 14 C-олеата. В качестве контроля служила колонка с октил-сефарозой, не содержащей холестеролэстеразы. Нанесение субстрата и все последующие процедуры были аналогичны описанным выше.

Результаты и обсуждение

При инкубации холестерил- 14 C-олеата с холестеролэстеразой, ковалентно иммобилизованной на СН-сефарозе, было обнаружено, что суммарная активность иммобилизованного фермента составляет 15% от суммарной активности фермента в растворе, использованного для иммобилизации. Это могло быть вызвано как малоэффективным связыванием холестеролэстеразы, так и ее инактивацией в процессе сшивки. Подобная инактивация происходила, судя по данным работы [5], при ковалентной иммобилизации липопроteinлипазы на СН-сефарозе карбодимидным методом. Эти же авторы, применив радиойодированный фермент, показали низкую эффективность карбодимидного метода иммобилизации. Дополнительным недостатком метода иммобилизации на СН-сефарозе является необходимость концентрирования белковых растворов, при котором происходит частичная инактивация фермента.

Указанных недостатков лишен метод иммобилизации холестеролэстеразы на октил-сефарозе. Гидрофобный характер этого носителя позволяет проводить иммобилизацию из разбавленных белковых растворов, а отсутствие жесткого ковалентного связывания обеспечивает, по-видимому, сохранение ферментативной активности. Так, при условиях, описанных в разделе «Методика», холестеролэстераза, находившаяся в растворе, полностью связывалась с октил-сефарозой. Ферментативная активность при этом не терялась. Повышение концентрации NaCl до 1 М в растворе, использованном при нанесении холестеролэстеразы, существенно повышало емкость сорбента.

Следует отметить, что эффективная иммобилизация холестеролэстеразы была нами достигнута также при использовании других гидрофобных носителей (фенил-сефароза, бутил - TOYOPEARL). Приводимые ниже свойства иммобили-

Влияние дезоксихолата Na и NaCl на активность растворенной и иммобилизованной холестеролэстеразы

Состав инкубационной среды	Активность холестеролэстеразы, %	
	иммобилизованной	растворенной
20 мМ К-фосфат \pm 0,5 % дезоксихолат Na	143*	72
20 мМ К-фосфат \pm 0,15 М NaCl	96**	160
20 мМ К-фосфат \pm 0,75 М NaCl	91**	64

Примечание: За 100 % активности растворенной холестеролэстеразы принята ее активность в 20 мМ К-фосфате pH 7,5, за 100 % активности иммобилизованной холестеролэстеразы — активность в 20 мМ К-фосфате pH 7,5 с 2 % альбумином. Одна звездочка — влияние дезоксихолата исследовали при pH 8,0; две — пробы содержали также 2 % альбумин.

зованной холестеролэстеразы мало зависели от вида носителя, в то время как емкость последних довольно значительно варьировала и была наибольшей у октил-сефарозы. Далее в статье приводятся результаты работы с октил-сефарозой.

Обнаружение активности иммобилизованной холестеролэстеразы было возможно лишь в присутствии 2% альбумина. Анализ элюатов, полученных при промывании иммобилизованной холестеролэстеразы раствором 2% альбумина, позволяет предположить, что альбумин препятствует сорбции как субстрата, так и продуктов его ферментативного гидролиза.

В таблице приведены некоторые свойства иммобилизованной холестеролэстеразы в сравнении со свойствами фермента в растворе. Из этих данных видно, что обнаруженное нами ранее стимулирующее влияние низких концентраций и ингибирующее действие высоких концентраций NaCl на активность растворимой холестеролэстеразы [2] не выявляется при работе с иммобилизованным ферментом. Активность иммобилизованной холестеролэстеразы не увеличивалась в присутствии 0,15 М NaCl и практически не снижалась в присутствии 0,75 М NaCl. 0,5% дезоксихолат Na, ингибирующий активность фермента в растворе, увеличивал активность иммобилизованной холестеролэстеразы.

pH-оптимум действия иммобилизованного фермента составлял 7,5, т. е. не отличался от такового растворенной холестеролэстеразы [2].

Увеличение скорости циркуляции раствора субстрата через колонку с иммобилизованной холестеролэстеразой от 10 до 40 мл/ч не влияло на скорость освобождения ^{14}C -олеата.

Иммобилизованная холестеролаза отличалась довольно высокой стабильностью. После 2 мес работы (свыше тридцати 3-часовых опытов при 37 °C) ее активность снизилась лишь на 10%. Для сравнения следует отметить, что активность растворенной холестеролэстеразы существенно уменьшалась уже после 1 нед хранения при 4 °C.

Таким образом, с помощью октил-сефарозы можно эффективно иммобилизовать печеночную холестеролэстеразу без потери ее активности. Использование этого сорбента дает возможность проводить иммобилизацию из разбавленных растворов, что является определенным преимуществом, поскольку позволяет обойтись без дополнительной стадии концентрирования фермента. Следует отметить, что у октил-сефарозы как сорбента есть недостаток — неспецифическое связывание субстрата и продуктов его гидролиза. Однако этот недостаток можно преодолеть, если добавить в буферные растворы альбумин или детергенты. Иммобилизованная холестеролэстераза может быть многократно использована. Она отличается от растворенного фермента значительно более высокой стабильностью при хранении и отсутствием чувствительности к ингибирующему действию NaCl и дезоксихолата. Получение иммобилизованной холестеролэстеразы дает возможность исследовать влияние ферментативного гидролиза эфиров холестерина в липопротеинах на их макромолекулярные свойства и взаимодействие с клетками и межклеточным веществом.

Выражаем благодарность проф. В. О. Шинктеру за помощь при обсуждении результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Брокерхоф Х., Дженсен Р. Липолитические ферменты: Пер. с англ. — М., 1978 — С. 218—241.
2. Ковалева Г. Г., Карманский Н. М. // *Вопр. мед. химии.* — 1985. — № 1. — С. 130—134.
3. Hradec J., Tuhackova Z., Dusek Z. // *Biochem. J.* — 1978. — Vol. 172. — P. 9—13.
4. Huang H. S., Kuan S. S., Guilbault G. G. // *Clin. Chem.* — 1977. — Vol. 23. — P. 671—676.
5. Matsuoka N., Shirai K., Jackson R. L. //

- Biochim. biophys. Acta. — 1980. — Vol. 620. — P. 308—316.
 6. Severson D. L., Fletcher T. // Atherosclerosis. — 1978. — Vol. 31. — P. 21—32.
 7. Tall A. R. // J. Lipid. Res. — 1986. — Vol. 27. — P. 361—367.

Поступила 01.10.86

PREPARATION AND SOME PROPERTIES OF IMMOBILIZED CHOLESTEROL ESTERASE

G. G. Kovaleva, I. M. Karmansky

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

Immobilization of cholesterol esterase enabled to study the enzymatic modification of

blood serum lipoproteins during their interaction with cells. Due to high affinity of octyl-Sepharose to cholesterol esterase large volumes of diluted enzyme preparations were immobilized without preliminary concentration. After immobilization the enzyme pH optimum was unaltered, whereas the activating effect of low NaCl concentrations and inhibitory effect of the salt high concentrations were not observed. The immobilized on octyl-Sepharose cholesterol esterase exhibited the greater stability as compared with the enzyme deluted preparation and was used repeatedly without distinct decrease in activity.

УДК 616.348-02.44-07:616.34-008.334.555.627-074

П. Д. Рабинович, Е. Н. Кашкина

ФУКОЗА И ДРУГИЕ НЕЙТРАЛЬНЫЕ ГЕКСОЗЫ В КАЛЕ У БОЛЬНЫХ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИМ ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ

Саратовский медицинский институт

Большинство исследователей связывают развитие неспецифического язвенного колита (НЯК) с иммунологическими нарушениями в организме больного [1—4, 6, 8]. Только отдельные авторы высказывали предположение об определенной роли ослабления барьерной функции толстой кишки в патогенезе НЯК [9, 12]. Ранее [11] методом ступенчатой хроматографии на колонках с ДЕАЕ-целлюлозой было установлено, что при НЯК в слизистой оболочке резецированных участков толстой кишки отсутствуют слизевые гликопротеины IV фракции. Эти вещества, по-видимому, участвуют в обеспечении защиты слизистой оболочки толстой кишки от повреждающих факторов. В связи с изложенным представлялось целесообразным определить количество углеводсодержащих соединений в фекалиях больных НЯК, поскольку по этим данным можно судить о состоянии секреции гликопротеинов защитной слизи в толстой кишке [5].

Методика

Общее количество нейтральных углеводсодержащих биополимеров оценивали по результатам определения общих нейтральных гексоз, количество фукогликопротеинов (ФГП) вместе с продуктами их деградации — по содержанию общей фукозы; о количестве гликопротеинов судили по содержанию нейтральных гексоз, связанных с белками, о количест-

ве ФГП — по содержанию фукозы, связанной с белками.

Кал, полученный за сутки, взвешивали, тщательно перемешивали, отмеряли в фарфоровую ступку 10 г, добавляли 90 мл дистиллированной воды при постоянном растирании, центрифугировали при 3000 об/мин и отделяли надосадочную жидкость, которую использовали для дальнейшего исследования.

Для определения количества общих нейтральных гексоз применили метод [10]. В пробирке с притертой пробкой 0,5 мл надосадочной жидкости в 4,5 мл 0,1 н раствора NaOH насливали на 5 мл свежеприготовленного и охлажденного на льду 0,2% раствора антрона в 78% серной кислоте. Во вторую пробирку на антроновый реактив насливали 0,5 мл дистиллированной воды, в третью — 0,5 мл 10 мг% раствора маннозы и галактозы (1 : 1). Содержимое пробирок тщательно перемешивали, пробирки закрывали и помещали на сильно кипящую водяную баню на 5 мин, затем на ледяную баню на 10 мин. После охлаждения пробирки оставляли при комнатной температуре на 40 мин и колориметрировали при длине волны 578 нм против образца с дистиллированной водой. Результаты подсчитывали по формуле:

$$Г_{сут} = \frac{ОП_{об}}{ОП_{ст}} Фг \cdot 10^{-2},$$

где $Г_{сут}$ — суточное выделение гексоз с калом (в г), $ОП_{об}$ — оптическая плотность образца из экстракта кала, $ОП_{ст}$ — оптическая плотность образца со стандартным раствором гексоз, $Фг$ — суточное выделение кала (в г).

Содержание гексоз, связанных с белками, устанавливали также в суточном количестве фекалий.

В пробирку с 20 мл 96 % этанола при постоянном помешивании приливали 1 мл над-

осадочной жидкости, оставляли на 20—30 мин, затем центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Спирт деkantировали. Осажденный белок промывали, для чего повторно суспендировали в том же объеме 96% этанола центрифугированием при 3000 об/мин в течение 30 мин. Спирт сливали, осадок тут же растворяли в 2 мл дистиллированной воды. Измерение концентрации производили в 0,5 мл раствора методом [10]. Величины, полученные по указанной выше формуле, умножали на 4. Результаты определений выражали в граммах за сутки.

Количество общей фукозы измеряли методом [7]. В две пробирки вносили по 1 мл надосадочной жидкости в 9 мл 0,1 н раствора NaOH, еще в две — по 1 мл дистиллированной воды и в одну — 1 мл 2 мг% раствора фукозы. Пробирки охлаждали в ледяной бане до 0 °С, в каждую из них добавляли по 4,5 мл охлажденного до 0 °С раствора (6 : 1 по объему) серной кислоты марки х. ч., дополнительно очищенной кипячением с пергидролем, тщательно перемешивали, помещали на сильно кипящую водяную баню на 3 мин, охлаждали в токе водопроводной воды, добавляли в одну пробирку с образцом, в пробирку со стандартным раствором и в пробирку с дистиллированной водой по 0,1 мл 3% раствора солянокислого цистеина и тщательно перемешивали. Для достижения максимальной окраски пробирки оставляли при комнатной температуре на 90 мин. Колориметрировали при 396 и 430 нм против соответствующего образца с дистиллированной водой (цистеинового и безцистеинового). Результаты рассчитывали по формуле:

$$\Phi_{\text{сут}} = \frac{(\text{ОП}_{396}^{\text{ц}} - \text{ОП}_{430}^{\text{ц}}) - (\text{ОП}_{396}^{\text{бц}} - \text{ОП}_{430}^{\text{бц}})}{(\text{ОП}_{396}^{\text{ст}} - \text{ОП}_{430}^{\text{ст}})} \times \\ \times 2 \cdot \text{СК} \cdot 10^{-3},$$

где $\Phi_{\text{сут}}$ — количество фукозы, выделенной за сутки с калом, ОП^ц — оптическая плотность пробы с цистеином, ОП^{бц} — оптическая плотность пробы без цистеина, ОП^{ст} — оптическая плотность стандарта (2 мг% раствор фукозы), 396 и 430 нм — длины волн, СК — суточное количество кала (в г).

Количество фукозы, связанной с белками кала, также устанавливали в его суточном количестве. Белки осаждали из 1 мл надосадочной жидкости 5 мл 96% этилового спирта и центрифугировали в течение 15 мин при

3000 об/мин. Осадок суспендировали в 5 мл 96% этилового спирта, снова отделяли 15-минутным центрифугированием при 3000 об/мин и растворяли в 1 мл 0,1 н раствора гидроокиси натрия. Концентрацию фукозы измеряли в 1 мл раствора методом [7]. Результаты определений выражали в граммах за сутки. Достоверность обнаруженных различий устанавливали с помощью критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Обследовали 45 больных НЯК (20 мужчин и 25 женщин) в возрасте от 16 до 70 лет с продолжительностью заболевания от нескольких месяцев до 20 лет. Пациентов наблюдали на высоте обострения заболевания и в периоде клинической ремиссии. Отклонения от нормы выявляли сопоставлением полученных данных с результатами обследования 30 практически здоровых людей (12 мужчин и 18 женщин) в возрасте от 16 до 66 лет. Для определения специфичности отклонений обследовали 24 больных хроническим панкреатитом (10 мужчин и 14 женщин) в возрасте от 22 до 70 лет с продолжительностью патологического процесса от 1 года до 23 лет. Диагноз НЯК подтверждали ирригоскопией, ректороманоскопией, колоноскопией и биопсией слизистой оболочки толстой кишки. Хроническую дизентерию исключали трехкратным бактериологическим исследованием кала, протозойную инвазию — трехкратной копроскопией.

Как видно из таблицы, при обострении НЯК суточное выведение с калом общих нейтральных гексоз было меньше, чем у здоровых людей в 1,6 раза ($p < 0,001$). В период клинической ремиссии оно практически не изменялось. При обострении хронического панкреатита этот показатель оказался в 1,4 раза

Содержание углеводных компонентов гликопротеинов (в г/сут) в кале больных и здоровых людей

Группа обследованных	Период течения заболевания	Общие нейтральные гексозы	Гексозы, связанные с белками	Общая фукоза	Фукоза, связанная с белками
Неспецифический язвенный колит (45)	Обострение	2,33±0,119	1,24±0,082	0,10±0,008	0,06±0,006
	Клиническая ремиссия	2,47±0,121	1,49±0,068	0,18±0,009	0,12±0,007
Хронический панкреатит (24)	Обострение	2,76±0,169	1,59±0,082	0,17±0,012	0,13±0,009
	Клиническая ремиссия	3,24±0,162	1,84±0,122	0,24±0,011	0,16±0,007
Здоровые люди (30)		3,76±0,135	1,85±0,072	0,26±0,009	0,16±0,001

Примечание. В скобках — число обследованных.

ниже, чем у здоровых людей ($p < 0,001$), но в 1,2 раза выше, чем при НЯК ($p < 0,05$). В период клинической ремиссии заболевания суточная экскреция с калом общих нейтральных гексоз увеличивалась в 1,2 раза по сравнению с периодом обострения ($p < 0,05$) и в 1,3 раза превышала уровень, обнаруженный во время ремиссии НЯК ($p < 0,001$).

Из таблицы следует также, что при обострении НЯК по сравнению с данными, полученными у здоровых людей, наблюдалось снижение уровня экскреции гексоз, связанных с белками кала, в 1,5 раза ($p < 0,001$). В период клинической ремиссии их содержание в кале увеличивалось в 1,2 раза ($p < 0,05$), хотя и осталось в 1,2 раза меньше нормы ($p < 0,001$). При активном хроническом панкреатите величина этого показателя уменьшалась в 1,2 раза по сравнению с нормой ($p < 0,05$). Однако она была в 1,3 раза выше, чем у больных с обострением НЯК ($p < 0,01$). В фазе клинической ремиссии хронического панкреатита экскреция гексоз, связанных с белками кала, существенно не изменялась, оставаясь в 1,2 раза выше, чем при ремиссии НЯК ($p < 0,05$).

Экскреция общей фукозы за сутки при обострении НЯК была снижена в 2,6 раза (см. таблицу; $p < 0,001$). Улучшение состояния больных сопровождалось увеличением этого показателя в 1,8 раза ($p < 0,001$), но он оставался в 1,4 раза меньше, чем в норме ($p < 0,001$). У пациентов, страдавших хроническим панкреатитом, в фазе обострения экскреция общей фукозы уменьшалась не так резко (в 1,5 раза; $p < 0,001$). Она оказалась в 1,7 раза выше, чем при обострении НЯК ($p < 0,001$). При наступлении ремиссии происходило увеличение экскреции общей фукозы в 1,4 раза ($p < 0,001$). По сравнению с аналогичной фазой НЯК величина этого показателя найдена большей в 1,3 раза ($p < 0,001$).

Обострение НЯК сопровождалось уменьшением суточной экскреции фукозы, связанной с белками кала, в 2,7 раза ($p < 0,001$; см. таблицу). Во время клинической ремиссии она увеличивалась в 2 раза ($p < 0,001$), однако оставалась ниже, чем у здоровых людей в 1,3 раза ($p < 0,01$). У больных активным и неактивным панкреатитом содержание фукозы, связанной с бел-

ками кала, было практически нормальным.

Из приведенных данных следует, что при НЯК в кале уменьшается общее количество углеводсодержащих биополимеров (гликопротеинов, гликопептидов), о чем свидетельствует значительное снижение выделения с ним общих нейтральных гексоз. Аналогичным образом изменяется фекальная экскреция этих сахаров при симптоматическом энтероколите у больных хроническим панкреатитом, но уменьшение выведения общих нейтральных гексоз при НЯК было несколько более выраженным, чем при хроническом панкреатите. Вероятно, при язвенном колите происходит большее угнетение секреции гетеросахаридов слизи. Для НЯК, по-видимому, особенно характерным является уменьшение количества ФГП в кале, так как содержание в нем общей фукозы при этом заболевании снижается значительно резче, чем содержание гексоз и чем это наблюдается при хроническом панкреатите. Если в норме на 100 молей общих гексоз приходится 8 молей общей фукозы, то при НЯК независимо от периода течения — 5 молей ($p < 0,05$). При обострении хронического панкреатита на 100 молей общих гексоз приходится 7 молей общей фукозы, а при ремиссии этого заболевания соотношение приведенных показателей не отличается от такового у здоровых людей. Это наблюдение указывает на более существенное нарушение состава слизи толстой кишки у больных НЯК. О правильности такого предположения свидетельствуют также результаты измерения нейтральных гексоз и фукозы, связанных с белками. При НЯК количество таких нейтральных гексоз в периоде обострения снижено значительно больше, чем при хроническом панкреатите. Особенно заметно это различие по данным измерения экскреции с фекалиями фукозы, связанной с белками. При НЯК она уменьшена в 2,7 раза, а при хроническом панкреатите — незначительно и статистически не существенно. Если в норме на 100 молей гексоз, связанных с белками, приходится 10 молей фукозы, связанной с белками, то при обострении НЯК оно уменьшается до 6 молей ($p < 0,05$), а при ремиссии возвращается к норме. При хроническом панкреатите независимо от фазы течения подобного изменения состава слизевых гликопротеинов не происхо-

дит. При нем на 100 молей гексоз, связанных с белками, в обе фазы течения заболевания приходится 10 молей фукозы, связанной с белками.

Таким образом, при НЯК наблюдается довольно специфичное угнетение выведения ФГП в кал слизистой оболочкой толстой кишки. Эти результаты совпадают с данными работы [11], в соответствии с которыми при НЯК отсутствуют IV фракции гликопротеинов в слизистой оболочке резецированных участков толстой кишки. Увеличение содержания ФГП (общей фукозы и фукозы, связанной с белками) в фекалиях больных НЯК в период клинической ремиссии свидетельствует о связи выявленных отклонений с заболеванием. Однако и в этом периоде содержание гликопротеинов в просвете толстой кишки остается ниже нормы, о чем свидетельствует уменьшение количества в кале общих и связанных с белками нейтральных гексоз и фукозы. Сохранение дефицита защитных компонентов слизи при исчезновении клинических и морфологических признаков активности НЯК может быть одним из факторов, обуславливающих склонность этого заболевания к рецидивирующему, циклическому течению.

ЛИТЕРАТУРА

1. Блюгер А. Ф., Векслер Х. М., Тимошенко Ж. П. и др. // Тер. арх. — 1974. — № 4. — С. 125—130.
2. Герасимов В. К. // Там же. — 1972. — № 2. — С. 71—74.
3. Левитан М. Х., Федоров В. Д., Капуллер Л. Л. Неспецифические колиты. — М., 1980. — С. 16—18.

4. Левитан М. Х. // Сов. мед. — 1981. — № 9. — С. 71—75.
5. Рабинович П. Д., Скворцов В. С. // Вопр. мед. химии. — 1983. — № 5. — С. 14—17.
6. Федоров В. Д., Левитан М. Х. Воспалительные заболевания толстой кишки. — Ташкент, 1982. — С. 6—12.
7. Dische Z., Shettles L. B. // J. biol. Chem. — 1948. — Vol. 175, № 2. — P. 595—603.
8. Fodor O., Dejica D. // Med. interne. — 1977. — Vol. 15, № 2. — P. 105—110.
9. Fraser G. M., Clamp J. R. // Gut. — 1975. — Vol. 16, № 10. — P. 832—833.
10. Holt C. V. // Klin. Wschr. — 1954. — Bd 32, № 27/28. — S. 661—663.
11. Podolsky D. K., Isselbacher K. J. // J. clin. Invest. — 1983. — Vol. 72, № 1. — P. 142—153.
12. Teague R. H., Fraser D., Clamp J. R. // Brit. med. J. — 1973. — Vol. 2, № 16. — P. 645—646.

Поступила 09.10.86

FUCOSE AND OTHER NEUTRAL HEXOSES IN FECES OF PATIENTS WITH UNSPECIFIC ULCEROUS COLITIS

P. D. Rabinovich, E. I. Kashkina

Medical School, Saratov

Secretion of glycoproteins with protective mucus of large intestine was studied by means of estimation of the carbohydrate components in feces of patients with unspecific ulcerous colitis. A decrease in daily excretion with feces of glycoproteins and glycopeptides was detected in these patients as well as in the patients with chronic pancreatitis. Under conditions of unspecific ulcerous colitis distinct from chronic pancreatitis content of fucoglycoproteins, main chemical protectors of gastrointestinal tract, was primarily decreased. The defect of large intestine mucus might be responsible for impairment of barrier function of the intestinal mucosa and to contribute to ulcer development.

УДК 616.127-008.922.1-008.64-02:616.127-005.4-092.9-07:[616.127-008.931:577.152.6+616.127-008.93:577.113]

А. П. Кацаускас, А.-А. Ё. Тамулявичюс, Л. Ю. Лукошявичюс,
Л. Л. Иванов, А. К. Прашкявичюс

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ тРНК И АМИНОАЦИЛ-тРНК-СИНТЕТАЗ МИОКАРДА СВИНЬИ ПРИ АНОКСИИ И ПОСЛЕДУЮЩЕЙ РЕОКСИГЕНАЦИИ

Кафедра биологической и органической химии Каунасского медицинского института

Интенсивность обмена веществ в миокарде в большей мере зависит от снабжения клеток O_2 . Резкое снижение обеспечения миокарда O_2 при аноксии приводит к глубоким нарушениям ряда метаболических процессов [8—12]. Репарация некоторых из них возможна при

восстановлении снабжения O_2 клеток сердечной мышцы [11].

Среди всех метаболических процессов в миокарде особая роль принадлежит биосинтезу белка, так как в основном за счет этого процесса поддерживается на определенном уровне сократитель-

ная функция сердца. Тем не менее влияние аноксии миокарда на биосинтез белка изучено мало. При аноксии уменьшается включение радиоактивных аминокислот в белки сердечной мышцы [8, 9, 11], что объясняют снижением синтеза белка на рибосомах [8]. Однако синтез белка — многостадийный процесс, в нем участвует большое число факторов. Известно, что в регуляции биосинтеза белка принимают участие молекулы тРНК и аминоацил-РНК-синтетазы (АРСаз, КФ 6.1.1), которые во многом определяют скорость и точность доставки аминокислот к рибосомам. В связи с этим целью данной работы явилось изучение влияния снабжения миокарда O_2 на биологическую активность тРНК и АРСаз.

Методика

Исследования проводили на свиньях массой 30—40 кг. Для снижения свертываемости крови за 5 мин до начала эксперимента животным через вену вводили гепарин (300 ЕД/кг). Свиней усыпляли внутривенным введением тиопентал-натрия (16 мг/кг), сердца быстро извлекали, помещали в охлажденный ($2^\circ C$) физиологический раствор и перфузировали по модифицированной методике Лангендорфа [10]. Для этого сердца предварительно промывали 5 мин бикарбонатным буфером Krebsa — Хензеляйта (118 мМ NaCl, 4,7 мМ KCl, 2,5 мМ $CaCl_2$, 1,2 мМ $MgCl_2$, 1,2 мМ KH_2PO_4 , 3,25 мМ $NaHCO_3$, 20 мМ глюкозы), насыщенным смесью 95% O_2 + 5% CO_2 . Сердца перфузировали аппаратом искусственного кровообращения АИК-5 под давлением 60—80 мм рт. ст. Объем перфузируемого буфера 5 л, температура $37,0 \pm \pm 0,5^\circ C$. Постоянное значение pH буфера ($7,40 \pm 0,05$) поддерживали добавлением определенных количеств 5 % $NaHCO_3$. Аноксию миокарда воспроизводили путем перфузии сердец бескислородным буфером.

Условия выделения препаратов суммарных тРНК и АРСаз из миокарда свиньи и постановка реакции аминоацилирования тРНК описаны в работах [1, 3].

Результаты обрабатывали статистически, применяя *t*-критерий Стьюдента [2].

Результаты и обсуждение

От эффективности функционирования тРНК во многом зависит интенсивность и точность биосинтеза белка. Ранее мы показали, что тотальная ишемия миокарда свиньи приводит к нарушению аминоацилирования тРНК [11]. Вследствие этого была поставлена задача сравнить акцепторную активность этих макромолекул, выделенных из миокарда свиньи, в норме и при изменении снабжения O_2 . Результаты исследований

Таблица 1

Акцепторная активность тРНК (в пмоль аминоацил-тРНК на 1 мг тРНК) миокарда при аноксии и последующей реоксигенации перфузируемого сердца свиньи ($M \pm m$; $n = 6$)

^{14}C -аминокислота	Контроль	Аноксия	Реоксигенация
Аланин	$2,3 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,1$
Глутаминовая	$3,7 \pm 0,3$	$1,9 \pm 0,3$	$3,1 \pm 0,4^*$
Лейцин	$5,3 \pm 0,1$	$4,3 \pm 0,2$	$5,1 \pm 0,3^*$
Серин	$1,6 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$

Примечание. Здесь и в табл. 2 звездочка — величины, статистически достоверно не отличающиеся от контроля.

представлены в табл. 1. Полученные данные свидетельствуют о существенном снижении аминоацилирования всех изученных тРНК при 20-минутной аноксии миокарда. Реоксигенация в течение 20 мин аноксического миокарда приводит к восстановлению до контрольного уровня акцепторной активности тРНК, специфичных к глутаминовой кислоте и лейцину. При этом отмечена также тенденция к увеличению акцепторной активности тРНК, специфичных к аланину и серину, однако уровень их аминоацилирования не достигает контрольного.

Причиной снижения акцепторной активности тРНК при аноксии миокарда может явиться изменение пространственной структуры молекул, приводящее к появлению функционально неактивных конформеров тРНК. Наличие таких форм тРНК в миокарде свиньи отмечено нами ранее при ишемии [11]. Переход части молекул тРНК в неактивное состояние может быть одной из причин нарушения биосинтеза белка в миокарде при аноксии.

Интенсивность биосинтеза белка во многом определяется функциональной активностью АРСаз, катализирующих строго специфическое аминоацилирование тРНК. В связи с этим в экспериментах и следующей серии исследований влияли на снабжения миокарда O_2 на активность этих ферментов. Результаты определения активности ряда АРСаз миокарда свиньи при аноксии и последующей реоксигенации представлены в табл. 2. Полученные данные свидетельствуют об увеличении аланил-глутамил-, лейцил- и серил-тРНК-синтетазной активности в препаратах, выделенных из

Таблица 2

Аминоацил-тРНК-синтетазная активность (в пмоль аминоацил-тРНК на 100 мкг белка в 1 мин) препаратов суммарных АРСаз миокарда при аноксии и последующей реоксигенации перфузируемого сердца свиньи ($M \pm m$; $n = 6$)

¹⁴ C-аминокислота	Контроль	Аноксия	Реоксигенация
Аланин	93,6 ± 6,7	130,4 ± 13,5	85,1 ± 14,8*
Глутаминовая	101,2 ± 8,9	163,8 ± 9,6	117,0 ± 15,2*
Лейцин	31,0 ± 3,5	51,1 ± 4,4	30,0 ± 2,4*
Серин	30,2 ± 1,9	43,9 ± 5,8	24,8 ± 2,4*

миокарда свиней после 20-минутной аноксии. При восстановлении снабжения миокарда кислородом отмечается снижение активности АРСаз до контрольного уровня. Увеличение АРСаз при аноксии может быть связано либо с повышением каталитической активности АРСаз под воздействием ряда внутриклеточных факторов [3—7], либо со стимуляцией их синтеза и увеличением содержания в ткани.

Таким образом, при аноксии миокарда свиньи обнаружено изменение активности тРНК и АРСаз. Следует отметить, что аноксия перфузируемого сердца как модель позволяет исследовать один из аспектов ишемии, а именно: зависимость состояния миокарда от снабжения его O₂. Причем при сопоставлении результатов изучения активности тРНК и АРСаз при аноксии (см. табл. 1 и 2) и кратковременной тотальной ишемии [1, 3] было обнаружено сходство этих изменений. В связи с этим можно предположить, что одной из основных причин, определяющих изменение биологической активности компонентов аппарата трансляции при ишемии, является нарушение обеспечения миокарда кислородом. В пользу этого предположения свидетельствуют данные о нормализации активности тРНК и АРСаз при восстановлении снабжения миокарда O₂. Необходимо отметить, что восстановление активности тРНК и АРСаз возможно только после кратковременной ишемии и аноксии (15—20 мин), так как структурно-функциональные изменения этих макромолекул в данный период не носят такой глубокий характер, как в более длительные сроки ишемии [1, 3].

Таким образом, на основании полученных результатов можно заключить,

что одной из причин нарушения биосинтеза белка в миокарде при недостаточном снабжении его O₂ является изменение биологической активности тРНК и АРСаз.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коваленко М. П., Родовичус Г. А., Тамулявичус А. Н. и др. // Молекул. биол. — Киев, 1984. — Вып. 37. — С. 18—21.
2. Лакин Г. Ф. Биометрия. — М., 1980.
3. Тамулявичус А. Н., Иванов Л. Л., Лукошавичус Л. Ю., Прашкявичус А. К. // Вопр. мед. химии. — 1985. — № 5. — С. 104—107.
4. Chua B., Elson C., Shrago E. // Biochim. biophys. Acta. — 1977. — Vol. 478, N 4. — P. 747—785.
5. Colas B., Boulanger Y. // FEBS Lett. — 1983. — Vol. 163, N 3. — P. 175—180.
6. Damuni Z., Caudwell B. F., Cohen P. // Europ. J. Biochem. — 1982. — Vol. 129, N 1. — P. 57—65.
7. Dignam J. D., Deutscher M. P. // Biochemistry (Wash.). — 1979. — Vol. 18, N 14. — P. 3165—3170.
8. Jefferson L. S., Wolpert E. B., Giger K. E., Morgan H. E. // J. biol. Chem. — 1971. — Vol. 246, N 8. — P. 2171—2178.
9. Kao R., Rannels D. E., Morgan H. E. // Acta med. scand. — 1976. — Suppl. 587. — P. 117—123.
10. Morgan H. E., Henderson M. J., Regen D. M., Park C. E. // J. biol. Chem. — 1961. — Vol. 236, N 1. — P. 253—261.
11. Schreiber S. S., Oratz M., Rothschild M. A. // J. Physiol. (Paris). — 1980. — Vol. 76, N 7. — P. 777—784.
12. Williamson J. R., Davis K. N., Medina-Ramirez G. // J. molec. cell. Cardiol. — 1982. — Vol. 14, N 9. — P. 29—35.

Поступила 10.10.86

BIOLOGICAL ACTIVITY OF tRNA AND AMINOACYL-tRNA SYNTHETASES IN ANOXIA AND IN SUBSEQUENT REOXYGENATION OF PIG MYOCARDIUM

A. P. Kashauskas, A. J. Tamulyavicus, L. Yu. Lukoshavichus, L. L. Ivanov, A. K. Prashkyavichus

Chair of Biological and Organic Chemistry, Medical School, Kaunas

Distinct decrease in the rate of aminoacylation of tRNAs, specific to alanine, glutamic acid, leucine and serine, was found after 20 min anoxia of perfused pig heart. In the anoxia activity of aminoacyl-tRNA synthetases of the same amino acid specificity was increased. Reduction of these macromolecules activity was observed in reoxygenation of the anoxic myocardium. Biological activity of tRNA and aminoacyl-tRNA synthetases in pig myocardium appears to depend on the supply of heart with oxygen.

Х. М. Марков, А. Г. Кучеренко

ВЛИЯНИЕ ДИЕТ С РАЗЛИЧНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ЛИНОЛЕВОЙ КИСЛОТЫ НА ПРОСТАГЛАНДИНОВУЮ СИСТЕМУ ПОЧЕК КРЫС

НИИ педиатрии АМН СССР, Москва

Функционирование почек связано с обменом в них жирных кислот. Полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) являются, в частности, субстратом для синтеза простагландинов (ПГ), обладающих широким спектром биологического действия. В связи с этим представляет интерес влияние диет с различным содержанием ПНЖК на простагландиновую систему почек. Имеющиеся по этому вопросу данные весьма противоречивы [1, 4, 15].

Целью настоящей работы было исследование влияния различного содержания линолевой кислоты (ЛК), в диете на образование тканью почек ПГ и их выведение с мочой.

Методика

Работа выполнена на 45 нормотензивных крысах-самцах Вистар-Киото (НКВК). В зависимости от количества поступающей с пищей ЛК животные были разделены на 3 группы. К 1-й группе были отнесены крысы, получавшие диету, дефицитную по ЛК (менее 0,1 кал.%), ко 2-й и 3-й — животные, содержащие ЛК в диете которых составляло соответственно 9 и 16 кал.%. Все указанные диеты были изокалорийными, с нормальным уровнем белка и углеводов, но различным качественным составом жиров. Рацион состоял (в весовых процентах) из казенна (20), крахмала (52,9), сахарозы (5,0), жиров (11,0), смеси солей (4,0) и витаминов (2,0), целлюлозы (5,0) и холинхлорида (0,1). Жировой компонент 1-го рациона был представлен гидрогенизированным жиром (саломасом) — 11%, 2-й рацион содержал 4% подсолнечного масла, 5% лярда и 2% гидролизованного жира, 3-й — 10% подсолнечного масла и 1% лярда. Диеты назначали в течение 1 нед (последней) пренатального периода и 18 нед после рождения. В 18-недельном возрасте после предварительного сбора суточной мочи в обменных клетках животных декаантировали и в ткани почек (кора и мозговой слой) исследовали биосинтез простагландинов ПГЕ и ПГФ_{2α}, 6-кето-ПГФ_{1α} и тромбоксана В₂ (ТХВ₂) из эндогенного субстрата по методу [16]. По количеству образующихся стойких метаболитов — 6-кето-ПГФ_{1α} и ТХВ₂ — судили о скорости биосинтеза их нестойких, но высокобиологически активных предшественников — простагглина (ПГ₁) и тромбоксана А₂ (ТХА₂) соответственно. Количественное определение указанных соединений в образцах ткани и суточной мочи производили радиоиммунным методом с помощью наборов реактивов фирмы «Clinical assay» (США) и произ-

водимых в ВНР. Осуществляли предварительную экстракцию проб этилацетатом и разделение экстрактов на фракции методом адсорбированной колоночной хроматографии в системе бензол — этилацетат — метанол [6]. Радиоактивность проб исследовали на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Magk-III» фирмы «Tracor Eufora» (США).

Количество экскретируемых с мочой электролитов (натрия, калия) определяли методом пламенной фотометрии на приборе FLM-2 «Radiometer» (Дания). Содержание ренина в ткани почек устанавливали радиоиммунным методом набором реактивов фирмы «Sea-Ice-Solign» (Франция), а радиоактивность проб — на счетчике 1175 фирмы «Tracor Eufora» (США). Результаты обрабатывали методом вариационной статистики.

Результаты и обсуждение

Как показывают результаты исследования, ткань почек (кора и мозговой слой) крыс обладает высокой способностью синтезировать все основные виды простаноидов (ПГЕ, ПГФ_{2α}, 6-кето-ПГФ_{1α} и ТХВ₂). При этом образование их в мозговом слое почек значительно выше, чем в коре почек. Определение процентного содержания отдельных соединений от их общей суммы, принятой за 100%, подтвердило полученные нами ранее данные [2] о видовой специфичности спектра синтезируемых простаноидов у крыс, основным продуктом метаболизма арахидоновой кислоты (АК) в коре и мозговом слое почки которых является ПГЕ (ПГЕ > ПГФ_{2α} > 6-кето-ПГФ_{1α} > ТХВ₂).

Сопоставление уровней медуллярного биосинтеза простаноидов (рис. 1) выявило наиболее низкое образование ПГЕ, ПГФ_{2α} и 6-кето-ПГФ_{1α} в условиях дефицита ЛК (1-я группа), что согласуется с данными литературы о снижении содержания тканевой АК, а следовательно, и ПГ диеновой серии в почке при ограничении поступления линолеата с пищей [7, 9]. Биосинтез ТХВ₂ был крайне низок и оставался неизменным у животных всех исследованных групп, что подтверждает имеющиеся сведения о незначительной роли ТХА₂ в функционировании здоровых почек и возрастании таковой при их патологии [13].

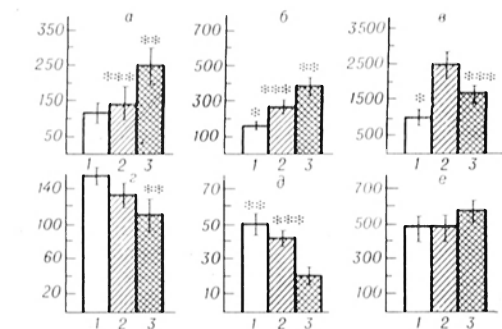


Рис. 1. Биосинтез простаноидов в мозговом слое почки и их экскреция с мочой у крыс на диете с различным содержанием ЛК.

а — биосинтез $\text{PGF}_{2\alpha}$ (10^2 нг на 1 мг белка); б — биосинтез ПГЕ (10^2 нг на 1 мг белка); в — биосинтез 6-кето- $\text{PGF}_{1\alpha}$ (н г на 1 мг белка); г — экскреция с мочой $\text{PGF}_{2\alpha}$ (10^2 нг за 24 ч); д — экскреция с мочой ПГЕ (10^2 нг за 24 ч); е — биосинтез TXB_2 (н г на 1 мг белка); Здесь, и на рис. 2: 1—3 — животные 1—3-й группы соответственно; одна звездочка — $p_{1-2} < 0,05$, две — $p_{1-3} < 0,05$, три — $p_{2-3} < 0,05$.

Что касается экскреции ПГ с мочой, то в отличие от биосинтеза последних выделение ПГЕ и $\text{PGF}_{2\alpha}$ у крыс 1-й группы (дефицит по ЛК) оказалось наибольшим. Результаты наших исследований и данные работ [11, 20] свидетельствуют, таким образом, о том, что изменения уровня ПГ в моче не всегда соответствуют изменениям их внутрипочечного образования. Наличие как биосинтеза, так и метаболизма ПГ в мозговом слое и коре почек [10, 13, 19] позволяет предположить, что количество ПГ, поступающих в мочу, является скорее всего результирующей величиной их образования и разрушения в различных отделах почки в целом. Исходя из этого, высокая экскреция ПГЕ и $\text{PGF}_{2\alpha}$ с мочой на фоне сниженного биосинтеза этих ПГ в мозговом слое почек (изменений коркового биосинтеза ПГ у животных всех трех групп не обнаружено) может быть следствием их замедленного катаболизма в почках. Последнее согласуется с данными, указывающими на уменьшение экскреции с мочой метаболитов ПГ у людей [8] и животных [14] при дефиците ПНЖК.

Не исключено, что такое взаимоотношение между процессами биосинтеза и катаболизма ПГ обусловлено необходимостью поддержания их эндогенной концентрации на определенном уровне, обеспечивающем в той или иной степени функционирование почек в данных экстремальных условиях. Действительно, у крыс 1-й группы не обнаружено

задержки натрия и воды. Напротив, экскреция натрия и воды оказалась значительно выше, чем у животных других групп (рис. 2). Однако объяснение этого факта только влиянием ПГ было бы весьма упрощенным и маловероятным. Известно, что изменения поступления ПНЖК с пищей приводят к изменению жирно-кислотного состава клеточных мембран вообще и почек в частности, а следовательно, структуры и функции этих мембран, их физико-химических свойств, осуществления ими транспортных процессов, следствием чего может быть усиленное выведение электролитов и воды почками. Именно в группе животных с дефицитом ЛК имело место наиболее значительное выведение с мочой калия (см. рис. 2).

Оценивая влияние диеты, дефицитной по ЛК, следует иметь в виду, что усиленный диурез у этих крыс может быть также проявлением повышенного обмена веществ, столь характерного для развития синдрома дефицита ПНЖК [12]. Наименьшая масса тела данных животных (у животных 1-й группы $274,28 \pm 5,47$ г, 2-й — $320,7 \pm 6,7$ г, 3-й — $307,7 \pm 4,47$ г; $p < 0,05$) при наибольшем количестве потребляемого корма ($57,5 \pm 0,11$, $51 \pm 0,3$ и $48,5 \pm 0,37$ г соответственно; $p < 0,05$) согласуется с таким предположением.

По мере обогащения рациона крыс ЛК до 9, а затем 16 кал. % имело место постепенное увеличение продукции $\text{PGF}_{2\alpha}$ и ПГЕ мозговым слоем почки (см. рис. 1), что согласуется с данными работы [14]. Характер изменений биосинтеза 6-кето- $\text{PGF}_{1\alpha}$ был несколько иным. Так, если у животных 2-й группы

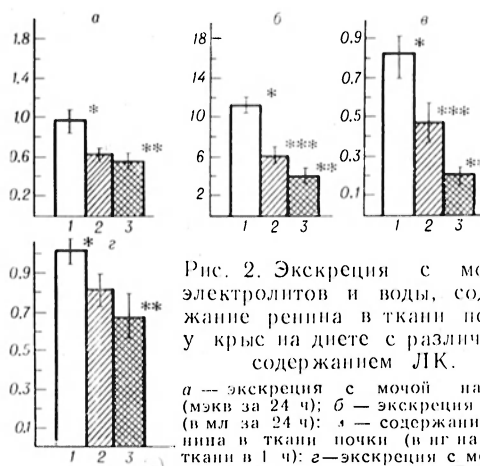


Рис. 2. Экскреция с мочой электролитов и воды, содержание ренина в ткани почки у крыс на диете с различным содержанием ЛК.

а — экскреция с мочой натрия (мэкв за 24 ч); б — экскреция воды (мл за 24 ч); в — содержание ренина в ткани почки (н г на 1 мг ткани в 1 ч); г — экскреция с мочой калия (в мэкв за 24 ч). Другие обозначения — см. рис. 1.

(9 кал.%) образование его оказалось наиболее высоким, то дальнейшее увеличение содержания ЛК в диете (до 16 кал.% — 3-я группа) приводило к достоверному снижению биосинтеза 6-кето-ПГF_{1α}, не достигавшему в то же время, уровня, характерного для крыс 1-й группы (дефицит по ЛК). Если допустить увеличение содержания АК в почках в условиях рациона, обогащенного ЛК, как это имело место в работе [18], выявленное снижение биосинтеза 6-кето-ПГF_{1α} у крыс 3-й группы может быть следствием перераспределения спектра синтезируемых в мозговом слое почек ПГ (в сторону образования ПГЕ) в зависимости от концентрации тканевой АК [1, 13]. Экскреция же ПГ с мочой с увеличением ЛК в диете, наоборот, снижалась и у животных 3-й группы оказалась наименьшей (см. рис. 1). Установленное несоответствие между уровнем образования и выведения ПГ связано, по-видимому, с повышенным их почечным метаболизмом.

Возрастание более чем в 2 раза экскреции метаболитов ПГ с мочой у молодых здоровых женщин по мере насыщения диеты ЛК от 0,4 до 20 кал.% [17] подтверждает высказанное предположение. Ускорение катаболизма почечных ПГ приводило в итоге к снижению их конечной тканевой концентрации, способствуя тем самым обнаруженному нами уменьшению экскреции почками натрия и воды (см. рис. 2) при увеличении ЛК в рационе этих животных.

Тесная взаимосвязь ПГ с другими гормональными системами в регуляции водно-электролитного баланса, в частности с гипофизарным антидиуретическим гормоном (АДГ), позволяет думать о том, что в результате антагонистического действия АДГ и ПГЕ снижение экскреции последнего вызывало подавление ингибирующего действия ПГЕ на чувствительность клеток собирательных трубок к вазопрессину и, следовательно, приводило к уменьшению диуреза. При этом обращает на себя внимание тот факт, что уменьшение объема выделяемой мочи у животных 3-й группы (максимальный избыток ЛК — 16 кал.%) не сопровождалось дальнейшим снижением экскреции натрия, уровень которой оставался таким же, как в предыдущей группе (9 кал.% ЛК). По мнению Ю. В. Наточина [3], в почке млекопитающих АДГ может из-

менять проницаемость для воды, не влияя на экскрецию почками натрия.

Концентрация ренина в почечной ткани (так же как и экскреция ПГЕ с мочой) оказалась наиболее высокой у крыс с дефицитом ЛК (1-я группа). Вполне возможно, что увеличение секреции ренина у этих животных явилось результатом выраженной стимуляции юктагломерулярных клеток значительной потерей натрия, т. е. носило компенсаторный характер и было направлено на предотвращение дальнейшего избыточного выведения натрия из организма. Длительное содержание крыс на диете с избыточным содержанием ЛК приводило к прогрессирующему снижению секреции ренина тканью почек. Однонаправленная динамика содержания ренина в почках и выделения ПГЕ с мочой, отражающего его внутрипочечную концентрацию, подтверждает существующую точку зрения о регулирующем синтез ренина влиянии ПГЕ [13].

Не исключено, что отсутствие задержки натрия в организме крыс 3-й группы (16 кал.%) по сравнению с таковой у животных, находившихся на диете с меньшим избытком ЛК (9 кал.% — 2-я группа), опосредовано выраженным уменьшением секреции ренина и, следовательно, снижением продукции надпочечниками одного из основных регуляторов электролитного обмена — альдостерона.

Таким образом, суммируя полученные нами данные, можно заключить, что потребление крысами диет с различным содержанием ЛК (избыток и дефицит) сопровождалось значительными изменениями почечных ПГ, которые в свою очередь прямо или, возможно, взаимодействуя с другими гормональными системами (ренин-ангиотензиновой, антидиуретическим гормоном гипофиза), вызывали существенные сдвиги в водно-электролитном балансе организма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дан М. Дж. // Современная нефрология: Пер. с англ. — М., 1984. — С. 80—121.
2. Кучеренко А. Г., Комаревцева И. А., Марков Х. М. // Физиол. журн. СССР. — 1986. — № 6. — С. 839—842.
3. Наточин Ю. В. Основы физиологии почки. — Л., 1982.
4. Brenner R. P. // Progr. Lipid. Res. — 1981. — Vol. 20. — P. 41—47.
5. Codde J. P., Beilin L. J., Croft K. D., Vandongen R. // Prostaglandins. — 1985. — Vol. 29, № 6. — P. 895—910.

6. Dunn M., Liard I., Dray F. // *Kidney int.* — 1978. — Vol. 13, № 2. — P. 136—143.
7. Dunham E., Balasingam M. // *Lipids.* — 1978. — Vol. 13, № 12. — P. 892—897.
8. Friedman L., Oates Y. // *Prostaglandins and Cardiovascular Disease.* — New York, 1981. — P. 69—80.
9. Hassan M., Dunham E. // *Prostagland. Leukotr. Med.* — 1985. — Vol. 18, № 2. — P. 183—192.
10. Hassid A., Kniecowski M., Dunn M. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.* — 1979. — Vol. 76, № 12. — P. 1155—1159.
11. Haylor J., Lole C., Thewles A. // *J. Physiol. (Lond.)* 1984. — Vol. 346. — P. 105.
12. Holman R. T. // *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids.* — London, 1968. — Vol. 9, Pt. 2. — P. 279—295.
13. Larsson C., Weber P. // *Acta biol. med. germ.* — 1978. — Bd 37. — S. 857—862.
14. Nugteren D. H., van Evert W., Soeting W., Sruy J. // *Advanc Prostagland. Thrombos. Res.* — 1980. — Vol. 8. — P. 1793—1796.
15. Olaf A., Wolfram L. // *Amer. J. clin. Nutr.* — 1984. — Vol. 4, № 4. — P. 763—770.
16. Oliw E. // *Prostaglandins.* — 1980. — Vol. 19, № 2. — P. 272—284.
17. Oliw E., Granstrom E., Anguad E. // *Prostaglandins and Related Substances.* — New York, 1983. — P. 1—44.
18. Singer W., Moritz V., Förster D., Gerike H. // *Dtsch. Gesundh. — Wes.*, 1984. — Bd 39, № 6. — S. 238—240.
19. Speziale E., Speziale N., Lugo S. // *Biochem. biophys. Res. Commun.* — 1984. — Vol. 124, № 1. — P. 69—74.
20. Vallotton M., Favre L. // *Prostaglandins and Membrane Ion Transport.* — New York, 1985. — P. 263—269.

Поступила 28.10.86

EFFECT OF DIETS CONTAINING VARIOUS AMOUNT OF LINOLEIC ACID ON THE PROSTAGLANDIN SYSTEM OF RAT KIDNEY

Ch. M. Markov, A. G. Kucherenko
Institute of Pediatrics, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Effect of diets containing various amount of linoleic acid on formation of prostaglandins in kidney as well as excretion of the substances with urine were studied in 45 normotensive rats of Wistar-Kyoto strain. Distinct alterations were observed in the kidney prostaglandin system, which directly or via other hormonal systems (renin-angiotensin, antidiuretic hormone of hypophysis) caused the corresponding shifts in the water-electrolyte balance.

УДК 612.433.62.018-088.1:615.357.814.32:577.175.3221.012.6.07

Г. П. Елизарова, Ю. М. Кеда, А. Г. Киселева, Т. А. Осипова,
А. А. Булатов, Ю. А. Панков

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СОМАТОТРОПИНА ЧЕЛОВЕКА, ПОЛУЧЕННОГО ГЕННОИНЖЕНЕРНЫМ МЕТОДОМ И ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ГИПОФИЗОВ

Институт экспериментальной эндокринологии и химии гормонов АМН СССР, Москва

Настоящая работа посвящена сравнительному исследованию гормона роста, или соматотропного гормона (СТГ) человека, полученного генноинженерным методом с использованием штаммов-продуцентов *E. coli* (биосинтетический СТГ—СТГ_{био}), и его высокоочищенного природного аналога, выделенного из гипофизов людей (СТГ_{гип}).

СТГ — одноцепочечный простой белок с молекулярной массой около 22 кД (22К-СТГ). Он является гормоном широкого спектра действия, основной специфический биологический эффект которого заключается в стимуляции процессов, связанных с ростом организма. СТГ также играет важную роль в регуляции различных сторон обмена веществ. Сравнительное исследование

СТГ_{био} и СТГ_{гип}, помимо чисто практического значения, представляет значительный теоретический интерес, связанный с изучением свойств гормона и механизма его действия. Микрогетерогенность высокоочищенных препаратов гипофизарного СТГ, противоречивость результатов, получаемых в разных лабораториях при работе с препаратами СТГ, выделяемыми из гипофизов различными методами и подвергнутыми различной очистке, а также трудность воспроизведения ряда эффектов гормона в условиях *in vitro* делают спорным наличие у молекулы СТГ ряда приписываемых ему эффектов [16]. Изучение спектра действия СТГ_{био}, лишенного в силу своего происхождения примесей других гипофизарных веществ, позво-

ляет уточнить, какие биологические эффекты СТГ являются внутренним свойством его молекулы.

Методика

В работе использовали препарат СТГ_{био}, получаемый в СССР в рамках программы «Гормон роста человека» (АН СССР, Министерство медицинской и микробиологической промышленности СССР и Минздрав СССР) на основе штамма *E. coli*, продуцирующего СТГ человека.

СТГ_{гид} выделяли из высушенных ацетонном гипофизов по методу Сайрама и соавт. [2] с использованием в качестве заключительной стадии очистки гель-фильтрации через сефадексе G=100. Для работы брали мономерную фракцию СТГ, выходящую одним пиком при повторной гель-фильтрации. При определении методом дансильирования СТГ_{гид} имел единственную N-концевую аминокислоту — фенилаланин.

Электрофорез в полнакриламидном геле (ПААГ) в стеклянных трубках проводили в трис-глициновом буфере pH 8,3 [3] при концентрации акриламида в геле 7,5% и силе тока 6—8 мА на трубку. Белок окрашивали амидо черным 10В. Электрофорез в пластинках ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (ДДС Na) проводили по методу Леммли [4] в трис-HCl-буфере pH 8,3 при концентрации акриламида 12% и силе тока 30 мА. Белок окрашивали кумасси.

Обращеннофазную высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) проводили на приборе фирмы «Altex» на колонке Ultrasphe ODS (250×4,6 мм). Для элюции материала с колонки использовали следующую программу: 20% ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте (ТФУ), 3 мин; градиент концентраций ацетонитрила в 0,1% ТФУ от 20 до 80%, 43 мин; градиент концентраций ацетонитрила в 0,1% ТФУ от 80 до 100%, 10 мин. Скорость элюции 1 мл/мин, детектирование при 280 нм.

Аминокислотный состав определяли в автоматическом аминокислотном анализаторе «BioTronic LC 7000» после гидролиза образцов 5,7 н. HCl в запаянных ампулах при 110 °C в течение 24 и 48 ч.

N-концевые аминокислоты идентифицировали по реакции с дансил-хлоридом [5] с последующей идентификацией дансильрованных аминокислот хроматографией на полиамидных пластинках [6].

N-концевую аминокислотную последовательность СТГ определяли методом Эдмана в модификации [7].

Ростстимулирующую активность испытывали в «тибия-тесте» на гипофизэктомированных крысах Вистар по увеличению ширины энфизарной пластинки большеберцовой кости [8]¹. Препараты вводили внутривенно в течение 4 дней, начиная с 15-го дня после гипофизэктомии.

¹ Тестирование проводилось Л. В. Алешин в лаборатории биологических исследований гормональных соединений Института экспериментальной эндокринологии и химии гормонов АМН СССР.

Инсулиноподобную активность оценивали по стимуляции поглощения $[U-^{14}C]$ -глюкозы эпидидимальной жировой тканью крыс [9]. Измельченную ткань (32—42 мг) для снятия рефрактерности к инсулиноподобным эффектам СТГ предварительно инкубировали 4 ч в бикарбонатном буфере Кребса — Рингера, содержащем 1 % бычьего сывороточного альбумина и 1 мг/мл глюкозы, в атмосфере карбогена. Затем ткань переносили в свежую среду того же состава, содержащую 0,08 мкКи $[U-^{14}C]$ -глюкозы и тестируемые препараты гормона. Инкубацию проводили 1 ч, поглощение глюкозы тканью оценивали по разности содержания $[U-^{14}C]$ -глюкозы в инкубационной среде до и после инкубации.

Липотропную активность испытывали на беспородных кроликах массой 2,5—3,5 кг *in vivo* и *in vitro*, как описано ранее [10]. Концентрацию неэстерифицированных жирных кислот (НЖК) в плазме крови кроликов и в инкубационной среде определяли методом Фолхолта и соавт. [11]. Время инкубации ткани с гормоном *in vitro* составляло 3 ч.

Митогенную активность СТГ изучали в культуре фибробластов кожи человека по включению $[^3H]$ -тимидина в ДНК, как описано ранее [12] с небольшими модификациями. Фибробласты были получены из клеточного банка Института медицинской генетики АМН СССР и представляли собой диплоидные штаммы ИМГ-855, ИМГ-822, ИМГ-881 постнатальных фибробластов (15—20 пассажей), выведенных из кожных биоптатов доноров. Штаммы находились во второй фазе роста. Клетки культивировали в среде Игла, содержащей 5% сыворотку крови крупного рогатого скота и 10% пуловинную сыворотку крови человека. Взесь клеток (10^4 — $2 \cdot 10^4$ клеток на 1 см²) высевали на 24-луночные пластиковые панели («Nunc», Дания). Через 16 ч питательную среду меняли на бессывороточную, через 64 ч — на свежую бессывороточную, содержащую испытуемые препараты различной концентрации (опыт) или без них (отрицательный контроль), либо на среду, содержащую 10% сыворотку крови крупного рогатого скота (положительный контроль). Через 20 ч субкультивирования в культуру вносили $[^3H]$ -тимидин (1 мкКи/мл) и через 8 ч метку отмывали раствором Хенкса. Для оценки интенсивности биосинтеза ДНК по включению $[^3H]$ -тимидина кислоторастворимые компоненты клеток отмывали 5% ТХУ, смесью этанол — эфир (2:1) и лизировали 1 н. NaOH. Радиоактивность лизата определяли на β-счетчике («Interleck-nique», Франция).

Иммунологическую активность препаратов СТГ исследовали с помощью стандартных наборов для радиоиммунологического определения СТГ человека (фирма «Sea-Ire-Sorin», Франция).

Результаты

При электрофорезе в ПААГ СТГ_{гид}, гомогенный по N-концевой аминокислоте, выявляется в виде одного доминирующего и минорных компонентов (рис. 1), что характерно для высоко-

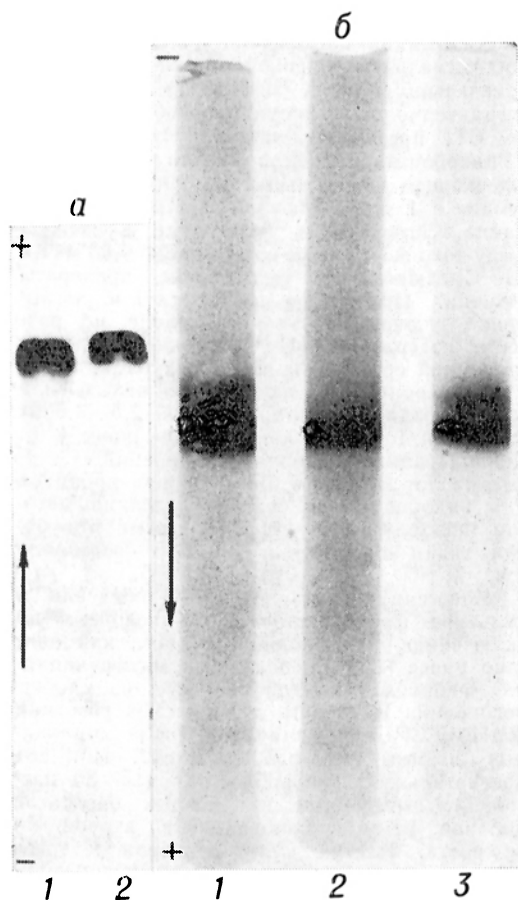


Рис. 1. Электрофорез препаратов СТГ_{био} и СТГ_{гип} человека в ПААГ в присутствии ДДС Na (а) и без него (б).

1 — СТГ_{гип}; 2 — СТГ_{био}; 3 — СТГ_{гип} + СТГ_{био}.

очищенных препаратов этого гормона [13]. В отличие от него СТГ_{био} дает единственную полосу, подвижность которой при электрофорезе в отсутствие ДДС Na совпадает с подвижностью основного компонента СТГ_{гип}. Об этом свидетельствует и отсутствие дополнительных полос при совместном внесении обоих препаратов в один столбик геля (см. рис. 1, з). При электрофорезе в присутствии ДДС Na полоса СТГ_{био} мигрирует несколько быстрее основного компонента СТГ_{гип}. Кроме того, при этом обнаруживается слабая вторая полоса, соответствующая по подвижности димерной форме СТГ.

Монокомпонентность СТГ_{био} подтверждается данными обращеннофазной ВЭЖХ (рис. 2). При хроматографии на колонке Ultrasphere ODS в градиенте концентраций ацетонитрила в 0,1% ТФУ он элюировался в виде одного пика при концентрации ацетонитрила

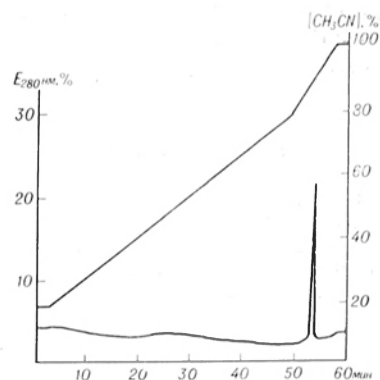


Рис. 2. Обращеннофазная ВЭЖХ СТГ_{био} человека.

Колонка ODS (4,6 × 25 см), градиент концентрации ацетонитрила (20—100%) в 0,1% ТФУ. Скорость элюирования 1 мл/мин.

86%. При этой же концентрации ацетонитрила элюировался с колонки основной пик СТГ_{гип}.

Аминокислотный состав СТГ_{био} близок к теоретическому составу СТГ человека [14]. Единственное существенное различие между ними заключается в заниженном содержании остатков аргинина (табл. 1). Однако при параллельном исследовании гидролизата СТГ_{гип} наблюдалось аналогичное явление.

Дансильным методом у СТГ_{био} выявляется единственная N-концевая аминокислота — пролин, что подтверждает его гомогенность. У СТГ_{гип} пролин является вторым аминокислотным остатком, а в качестве N-концевой аминокислоты

Таблица 1
Аминокислотный состав СТГ_{био} (в остатках на 1 моль)

Аминокислота	Время гидролиза, ч			Состав, согласно структуре [11]
	24	24	48	
Asp	19,9	19,4	20,3	20
Thr	9,2	9,9	10,1	10
Ser	15,6	16,3	16,3	18
Glu	28,4	25,9	27,5	27
Pro	8,2	14,8	12,0	8
Gly	8,9	9,6	13,3	8
Ala	7,2	7,3	7,8	7
1/2 Cys	2,7	1,3	1,1	4
Val	7,0	6,7	7,5	7
Met	2,4	3,4	3,4	3
Ile	6,7	6,7	8,2	8
Leu	27,4	22,8	26,2	26
Tyr	5,8	6,1	4,9	8
Phe	12,9	12,1	12,1	13
Trp	—	—	—	1
Lys	11,6	8,3	8,5	9
His	3,3	3,2	3,1	3
Arg	4,3	7,7	7,9	11

Таблица 2

Ростстимулирующая активность препаратов СТГ_{био} и СТГ_{гип} «в тibia-тесте» на гипофизэктомированных крысах ($M \pm m$)

Препарат	Общая доза на крысу, мкг	Ширина эпифизарной пластинки тibia, мкм	Активность, ед.
Контроль		183 \pm 5,8	
Стандарт СТГ человека			
	20	232 \pm 4,1*	
	60	247 \pm 6,9*	
СТГ _{био}	20	242 \pm 14,0**	2,0
	60	259 \pm 5,7*	
Контроль		199 \pm 3,5	
Стандарт СТГ человека			
	20	223 \pm 4,4	
	60	242 \pm 4,0	
СТГ _{гип}	20	239 \pm 6,5*	2,6
	60	282 \pm 5,9*	

Примечание. В каждой группе было по 8—10 животных. Здесь и в табл. 3—5 величина p рассчитана по сравнению с контролем: одна звездочка — $p < 0,001$, две — $p < 0,01$.

кислоты он имеет фенилаланин. Последовательность следующих за пролином двух аминокислотных остатков у обоих гормонов была идентичной:

СТГ_{гип} Phe-Pro-Thr-Ile...

СТГ_{био} Pro-Thr-Ile...

Ген гормона роста человека, экспрессируемый *E. coli*, был лишен кодона, соответствующего первому аминокислотному остатку природного гормона — фенилаланину. Поэтому естественно, что N-концевой аминокислотный остаток в СТГ_{био} представлен не фенилаланином, а пролином.

СТГ_{био} при испытании в «tibia-тесте» на гипофизэктомированных крысах проявлял высокую ростстимулирующую активность, близкую к таковой высокоочищенного СТГ_{гип} (табл. 2).

СТГ_{био} обладал присущей СТГ_{гип}

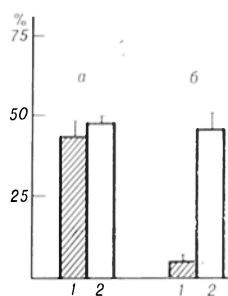


Рис.3

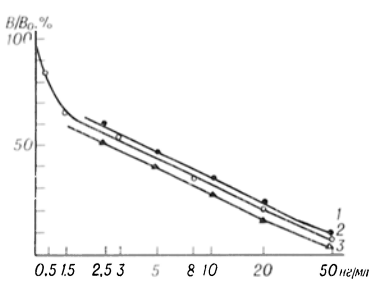


Рис.4

Таблица 3

Влияние препаратов СТГ_{био} и СТГ_{гип} (1 мкг/мл) на поглощение [¹⁴C]-глюкозы жировой тканью крыс

Препарат	Поглощение [¹⁴ C]-глюкозы, нмн на 1 г ткани в 1 мин ($M \pm m$)	p
Контроль	17 750 \pm 3210	
Инсулин, 50 мкЕ/мл	37 700 \pm 4090	$< 0,001$
СТГ _{био}	29 120 \pm 4080	$< 0,05$
СТГ _{гип}	26 780 \pm 2970*	$< 0,05$

Примечание. p дано по сравнению с контролем. Звездочкой отмечено, что разница между эффектом СТГ_{био} и СТГ_{гип} статистически недостоверна.

инсулинодобной активностью (табл. 3). Оба препарата в равной степени стимулировали поглощение глюкозы жировой тканью нормальных крыс после 4-часовой преинкубации этой ткани в целях снятия рефрактерности к действию СТГ (разница в стимуляции поглощения [¹⁴C]-глюкозы обоими гормонами статистически недостоверна).

Аналогично оба гормона вызывали одинаковое увеличение уровня неэтерифицированных жирных кислот (НЖК) в плазме крови кроликов через 120 мин после введения. В то же время эффект СТГ_{гип} был более длительным и полностью сохранялся через 240 мин, а эффект СТГ_{био} к этому моменту исчезал (рис. 3).

В опытах *in vitro* на изолированной жировой ткани кроликов наблюдалось существенное различие в действии гормонов (табл. 4). СТГ_{био} лишь слабо стимулировал освобождение НЖК из жировой ткани в дозах 25 и 50 мкг/мл, но не в дозе 10 мкг/мл, и его эффект не увеличивался с повышением дозы гормона. Как показано ранее [15], минимальная эффективная доза СТГ_{гип} со-

Рис. 3. Влияние СТГ_{био} и СТГ_{гип} на липолиз у кроликов *in vivo*. По оси ординат — увеличение концентрации НЖК в плазме крови (в %) а и б — соответственно через 120 и 240 мин. после введения СТГ в дозе 100 мкг/кг. 1 — СТГ_{био}; 2 — СТГ_{гип}.

Рис. 4. Иммунологическая активность СТГ_{био} человека в радиоиммунологической системе фирмы «Sea-Ire-Sorin» для СТГ человека.

1 — СТГ_{гип}; 2 — стандарт СТГ из набора фирмы; 3 — СТГ_{био}.

Таблица 4

Липотропная активность препаратов СТГ_{био} и СТГ_{гип} человека на изолированной жировой ткани кролика *in vitro* ($n = 5$)

Препарат	Доза, мкг/мл	Концентрация ИЖК в инкубационной среде, мкг/г ткани, $M \pm m$	p
Контроль		$12,70 \pm 0,84$	
СТГ _{гип}	25	$51,37 \pm 7,35$	$< 0,001$
СТГ _{био}	25	$19,07 \pm 2,04$	$< 0,01$
Контроль		$8,91 \pm 0,76$	
СТГ _{био}	100	$9,70 \pm 0,89$	$> 0,05$
	50	$11,28 \pm 0,56$	$< 0,05$
	25	$11,47 \pm 0,73$	$< 0,05$
	10	$10,40 \pm 0,73$	$> 0,05$

ставляет 10 мкг/мл и его эффект зависит от дозы.

Таблица 5

Влияние препаратов СТГ_{био} и СТГ_{гип} на включение [³H]-тимидина в ДНК фибробластов кожи человека в бессывороточной среде (число лунок 4)

Условия опыта	Концентрация СТГ, М	Включение [³ H]-тимидина, нмн на лунку в 1 мин
<i>Штамм 855</i>		
Контроль		$279,9 \pm 16,7$
10% сыворотка		$7143,8 \pm 140,8^*$
СТГ _{гип}	10^{-6}	$293,8 \pm 20,5$
	10^{-7}	$223,0 \pm 18,9$
	10^{-8}	$183,8 \pm 12,3$
СТГ _{био}	10^{-6}	$227,0 \pm 22,6$
	10^{-7}	$241,9 \pm 9,4$
	10^{-8}	$160,4 \pm 28,7$
<i>Штамм 881</i>		
Контроль		$184,5 \pm 10,8$
10% сыворотка		$6918,8 \pm 28,0^*$
СТГ _{гип}	10^{-6}	$175,0 \pm 15,8$
	10^{-7}	$191,3 \pm 33,2$
СТГ _{био}	10^{-6}	$167,5 \pm 20,5$
	10^{-7}	$166,1 \pm 10,9$
<i>Штамм 822</i>		
Контроль		$199,3 \pm 11,3$
10% сыворотка		$6071,6 \pm 56,7^*$
СТГ _{гип}	10^{-6}	$186,0 \pm 15,2$
	10^{-7}	$239,0 \pm 18,7$
СТГ _{био}	10^{-6}	$180,8 \pm 18,9$
	10^{-7}	$187,5 \pm 20,5$

Примечание. Звездочкой отмечены величины, достоверно отличающиеся от контроля ($P < 0,001$); в остальных случаях разница между контролем и опытом не достоверна.

Как видно из табл. 5, в отсутствие сыворотки оба препарата не стимулировали включение [³H]-тимидина в ДНК фибробластов человека в клеточной культуре.

При испытании в радиоиммунологической системе для гипоталамического СТГ человека кривые разбавления для СТГ_{био}, СТГ_{гип} и стандарта СТГ из набора фирмы «Sea-Ire-Sorin» (иммунологическая активность 2 ед/мг) были параллельны (рис. 4). Рассчитанная на основании полученных данных иммунологическая активность СТГ_{био} составляет 2,6 ед/мг.

Обсуждение

Результаты исследований свидетельствуют о близком сходстве физико-химических свойств СТГ_{био} и СТГ_{гип}. При электрофорезе, ВЭЖХ, определении N-концевой аминокислоты и N-концевой аминокислотной последовательности СТГ_{био} ведет себя, как однокомпонентный белок, отличающийся от 22К-СТГ тем, что в его состав не входит N-концевой фенилаланин и, следовательно, на N-конце появляется пролин — вторая с N-конца аминокислота в молекуле СТГ. Примесей других компонентов пептидной природы указанными методами в препарате СТГ_{био} не выявлено.

Электрофореграмма взятого для сравнения СТГ_{гип} характерна для гипоталамических препаратов этого гормона. Согласно многочисленным данным, минорные компоненты СТГ_{гип} представляют собой дезамидированные и расщепленные формы гормона [1, 13]. В высокоочищенных препаратах также обычно присутствует природный молекулярный вариант СТГ — так называемый 20К-СТГ, отличающийся от обычного 22К-СТГ делецией участка 32—46 [1, 13]. В свежевыделенном СТГ_{био}, судя по его монокомпонентности при электрофорезе и ВЭЖХ, эти формы СТГ отсутствуют. Слабое различие в электрофоретической подвижности СТГ_{био} и основного компонента СТГ_{гип} при электрофорезе в присутствии ДДС На может объясняться некоторым занижением размера молекулы СТГ_{био} ввиду отсутствия на его N-конце остатка фенилаланина.

Близкое сходство СТГ_{био} и СТГ_{гип} подтверждается результатами изучения их биологических свойств. Оба пре-

парата обладают сравнимой ростстимулирующей, инсулиноподобной, жиромобилизующей (*in vivo*) и иммунологической активностью. Высокая ростстимулирующая активность СТГ_{био} подтверждает несущественность N-концевого остатка фенилаланина для проявления основного специфического действия гормона, которое, как полагают, связано с центральной частью молекулы [16]. Подтверждается и неучастие этого остатка в проявлении двух других характерных для СТГ эффектов — инсулиноподобного и жиромобилизующего, которые ассоциированы с участком 31—44 [9—10].

Причиной некоторого наблюдающегося в экспериментах различия в иммунологической и ростстимулирующей активности СТГ_{био} и СТГ_{гип} может быть гетерогенность природного СТГ. Молекулярные формы СТГ, присутствующие в самой железе и выделяемых из нее препаратах, могут иметь отличную от доминирующей формы 22К-СТГ активность как в «тибия-тесте», так и в радиоиммунологической системе, специфичной для этой доминирующей формы. Так, природные расщепленные формы гормона, составляющие 3—5% его общего количества, могут обладать большей ростстимулирующей активностью, чем нерасщепленный 22К-СТГ, а 20К-СТГ, содержание которого может достигать 10—15% при равной с 22К-СТГ ростстимулирующей активности, сохраняет только 30% его иммунологической активности [11]. Наличие этих форм может приводить к повышению ростстимулирующей и занижению иммунологической активности СТГ_{гип} по сравнению с таковыми СТГ_{био}. С другой стороны, нельзя полностью исключить возможность присутствия в СТГ_{био} не выявляющихся физико-химическими методами микропримесей бактериальных белков, которые могут влиять на физиологическую и иммунологическую активность гормона.

В связи с большой сложностью отделения доминирующей формы 22К-СТГ_{гип} от сопутствующих природных изоформ гормона, появление СТГ_{био} представляет возможность разрешения ряда спорных вопросов, касающихся разносторонних биологических эффектов СТГ. Хотя участие СТГ в регуляции жирового обмена считается общепризнанным, имеются сообщения о высокоочищенных препаратах СТГ, лишенных липотроп-

ной активности при тестировании в той или иной системе [17]. В связи с этими данными и наличием липотропной активности у ряда гипофизарных пептидных гормонов высказывается предположение, что эта активность не свойственна самой молекуле СТГ и является результатом действия трудноотделимых примесей других гипофизарных пептидов. Аналогичные споры ведутся и по поводу наличия у СТГ гипергликемической и диабетогенной активности [11]. Исследования биосинтетических препаратов СТГ человека и быка, лишенных примесей других гипофизарных пептидов, показали, что при введении *in vivo* гомологичным видам они увеличивают концентрацию НЖК в крови в такой же степени, как и гипофизарные препараты СТГ [18, 19]. В наших экспериментах СТГ_{био} и СТГ_{гип} были также эквипотенциальны в отношении стимуляции липолиза у кроликов *in vivo*, но эффект СТГ_{био} был более кратковременным.

Менее однозначными оказались данные о липотропной активности СТГ_{био} *in vitro*. Согласно сообщению Гудман и Грихтиг [20], СТГ_{гип} и СТГ_{био} вызывают одинаковое увеличение липолиза в изолированной жировой ткани крысы, однако эти результаты не нашли подтверждения в работе Харт и соавт. [19]. Как показано в нашей работе, СТГ_{био} в условиях *in vitro* обладает низкой и не зависящей от дозы препарата липотропной активностью при испытании на изолированной жировой ткани кролика. Это согласуется с данными Фриджери и соавт. [21] о слабой и не зависящей от дозы активности биосинтетического СТГ человека в изолированной жировой ткани крысы.

Несмотря на противоречивость данных *in vitro*, наличие у различных биосинтетических препаратов СТГ человека и животных липотропной активности при введении *in vivo*, равной таковой у гипофизарных препаратов СТГ, позволяет утверждать, что эта активность является внутренним свойством молекулы СТГ. Однако механизм этого эффекта гормона остается неясным.

В последнее время появляются сообщения о возможности стимуляции роста клеток при их прямом контакте с СТГ [12, 22]. В связи с этим СТГ_{био} был испытан в культуре клеток кожных фибробластов человека — модели, используемой для тестирования митоген-

ной активности ростовых факторов. В этой системе в отсутствие сыворотки СТГ_{био} не стимулировал включение [³H]-тимидина в ДНК клеток. СТГ_{гип} в этих условиях также не усиливает синтез ДНК. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии митогенных бактериальных примесей в биосинтетическом препарате.

Суммируя полученные данные, можно заключить, что генноинженерными методами получен препарат СТГ, соответствующий доминирующему компоненту гипофизарного гормона.

18. Pankov Yu. A., Keda Yu. M., Sazina E. T. // Horm. Metab. Res. — 1986. — Vol. 18. — P. 374—377.
19. Sairam M. R., Chretien M., Li C. H. // J. clin. Endocr. — 1978. — Vol. 47. — P. 1002—1008.
20. Takano K., Hizuka N., Shizume K. et al. // Endocr. jap. — 1983. — Vol. 30. — P. 79—84.
21. Woods K. R., Wang K. T. // Biochim. biophys. Acta. — 1967. — Vol. 33. — P. 369—370.
22. Yudaev N. A., Pankov Yu. A., Keda Yu. M. et al. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1983. — Vol. 110. — P. 866—872.

Поступила 11.11.86

ЛИТЕРАТУРА

1. Булатов А. А., Осипова Т. А., Терехов С. М. и др. // Бюл. экпер. биол. — 1984. — № 12. — С. 720—723.
2. Булатов А. А., Осипова Т. А., Терехов С. М. и др. // Биохимия. — 1983. — Т. 48, № 8. — С. 1305—1310.
3. Маурер Г. Диск-электрофорез: Пер. с нем. — М., 1971.
4. Панков Ю. А., Кедя Ю. М., Киселева А. Г. // Биохимия. — 1982. — Т. 47. — С. 1314—1321.
5. Bangham D. R., Gaines Das R. E., Schuster D. // Molec. cell. Endocr. — 1985. — Vol. 42. — P. 269—282.
6. Bowden C. R., White K. D., Lewis U. J. et al. // Metabolism. — 1985. — Vol. 34. — P. 237—243.
7. Falholt K., Lund B., Falholt W. // Clin. chim. Acta. — 1973. — Vol. 46. — P. 105—111.
8. Frigeri L. G., Robel G., Stebbing N. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1982. — Vol. 104. — P. 1041—1047.
9. Goodman H. M., Grichlig G. // Endocrinology. — 1983. — Vol. 113. — P. 1697—1702.
10. Gray W. R. // Meth. Enzymol. — 1967. — Vol. 11. — P. 139—151.
11. Gray W. R. // Ibid. — P. 469—475.
12. Greenspan F. S., Li C. H., Simpson M. E. et al. // Endocrinology. — 1959. — Vol. 45. — P. 455—463.
13. Harl I. C., Chadwick P. M. E., Bone T. C. et al. // Biochem. J. — 1984. — Vol. 224. — P. 93—100.
14. Isaksson O. G. P., Eden S., Jansson J. O. // Ann. Rev. Physiol. — 1985. — Vol. 47. — P. 483—499.
15. Laemmli U. K. // Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 680—685.
16. Lewis U. J., Singh R. N. P., Tutwiler G. F. et al. // Recent Progr. Hormone Res. — 1980. — Vol. 36. — P. 477—508.
17. Li C. H., Dixon J. S. // Arch. Biochem. — 1971. — Vol. 146. — P. 233—236.

PHYSICO-CHEMICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF HUMAN HYPOPHYSEAL SOMATOTROPIN AS COMPARED WITH THE HORMONE PRODUCED BY MEANS OF GENE ENGINEERING

G. P. Elizarova, Yu. M. Keda, A. G. Kiseleva, T. A. Osipova, A. A. Bulatov, Yu. A. Pankov

Institute of Experimental Endocrinology and Hormone Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Human somatotropin hormone (STH), produced by means of gene engineering in the complex program «Human growth hormone», managed by the Academy of Sciences of the USSR, Ministry of Medical and Biological Industry of the USSR and Ministry of Public Health of the USSR, was shown to be similar in its physico-chemical properties to the main isoform of highly purified STH, isolated from human hypophysis. As distinct from the hypophyseal STH (STH_{hyp}) containing minor isoforms of the hormone, the preparation of bio-synthetic STH (des-Phe¹-STH; STH_{bio}) proved to be homogenous. Studies of biological properties showed that STH_{bio} exhibited high, similar to STH_{hyp}, immunological, growth-stimulating and insulin-like activities as well as it possessed the lipotropic effect in vivo. The lipotropic effect of STH_{bio} in vivo was less prolonged as compared with that of STH_{hyp}, while in vitro it was only slightly expressed in isolated rabbit fat tissue. The effect did not depend on the hormone dose, apparently due to either absence of the hormone modified forms in the STH_{bio} preparation or other hypophyseal contaminating substances responsible for the lipotropic activity. STH_{bio}, similarly to STH_{hyp}, did not stimulate DNA synthesis in blood serum-free culture of human fibroblasts. Studies of STH_{bio} biological properties suggest that multifunctionality of native STH_{hyp} appear to depend on intrinsic specificity of its molecule.

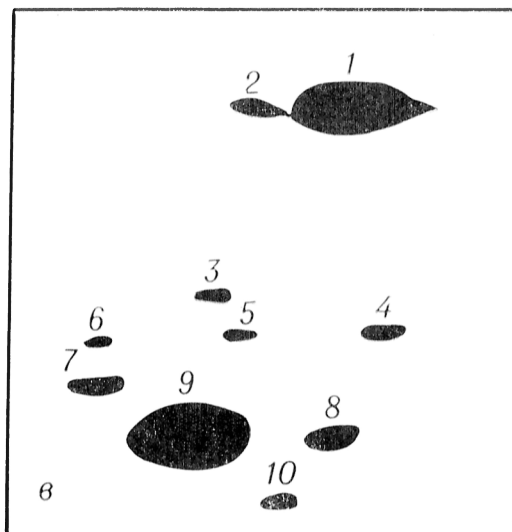
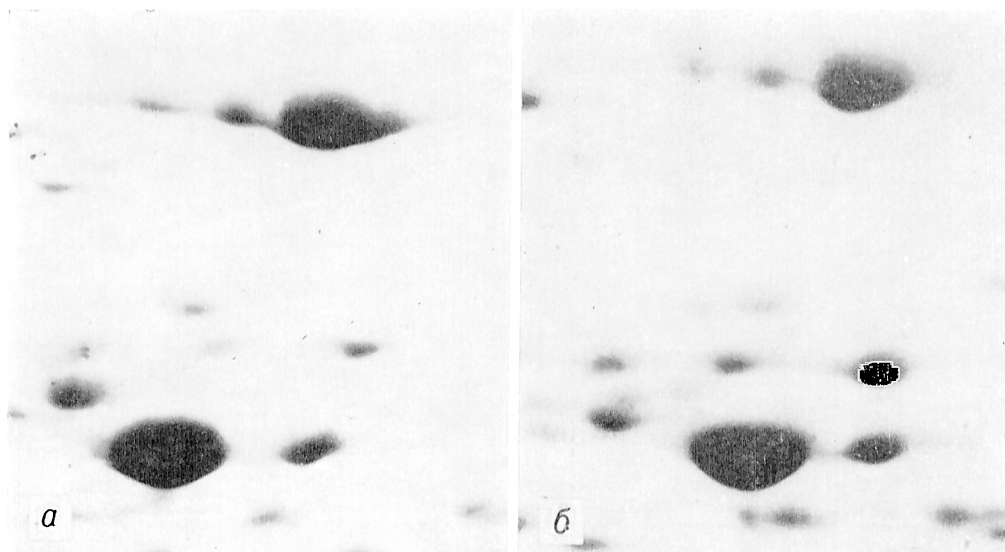


Рис. 1. Фрагменты двумерных электрофореграмм белков миокарда мыши.
а — в норме; *б* — с нагрузкой пируваткиназой; *в* — схема сравниваемой зоны (объяснения приведены в тексте).

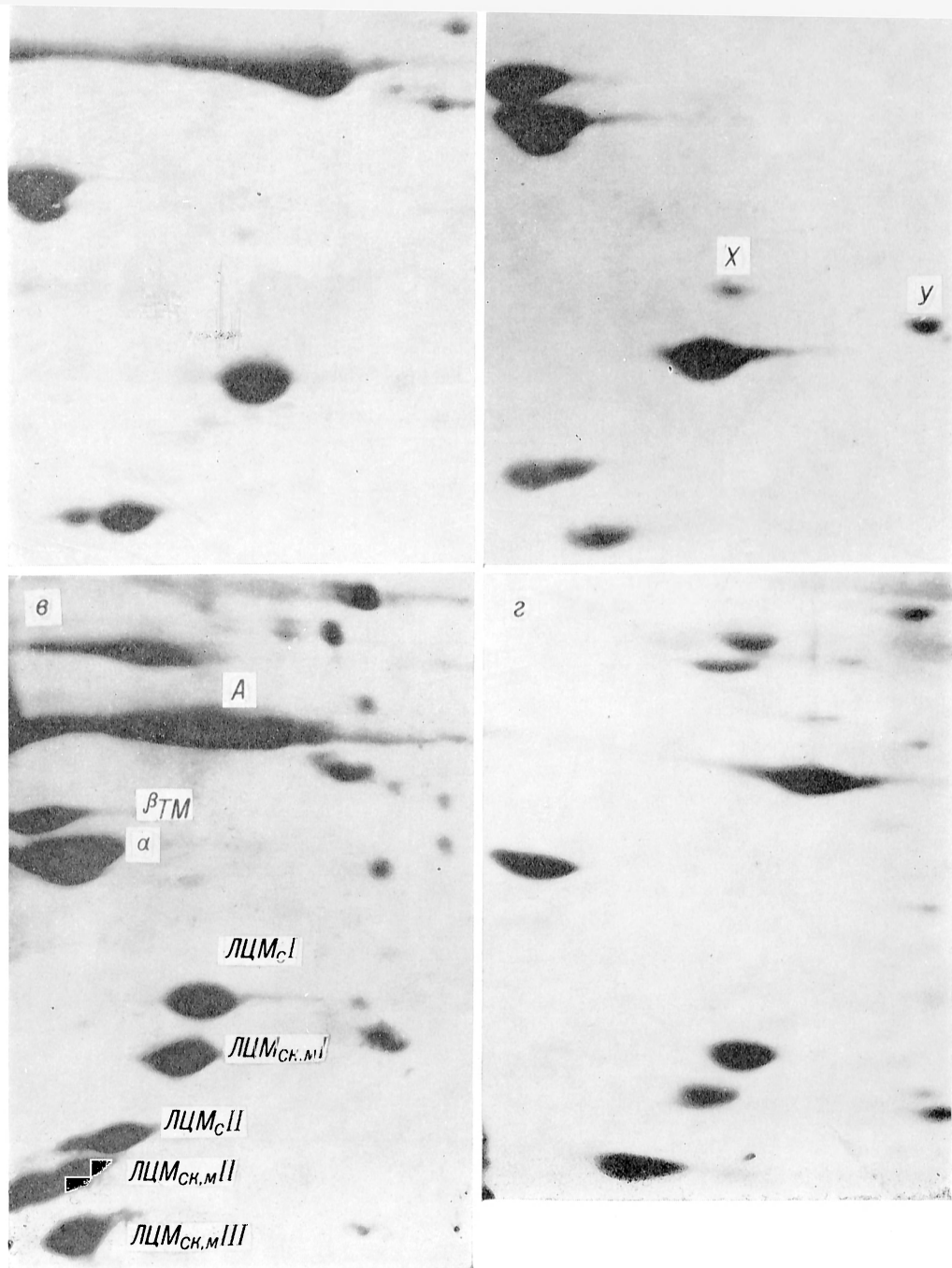


Рис. 3. Двумерные электрофореграммы белков мышечной ткани зоны легких цепей миозина.

а — сердечная мышца; *б* — скелетная мышца; *в* — коэлектрофорез лизатов скелетной и сердечной мышц; *г* — эмбриональная мышца сердца. *A* — актин, *TM* — тропомиозин, *ЛЦM* — легкая цепь миозина.

А. В. Васильев, Л. С. Коновалова, К. Д. Плещитый,
Л. Г. Пономарева, В. А. Тутельян

АКТИВНОСТЬ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ГИДРОЛАЗ В ПЕЧЕНИ, СЕЛЕЗЕНКЕ И ТИМУСЕ КРЫС ПРИ АНТИГЕННОЙ СТИМУЛЯЦИИ И ДЕФИЦИТЕ ВИТАМИНА В₆

Институт питания АМН СССР, Москва

Лизосомальный аппарат клетки играет существенную роль в развитии реакций неспецифического и специфического иммунитета, обеспечивая гетерофагоцитоз и модификацию антигенного материала, формирование антител из предшественников и др. [2, 8, 9, 11, 13].

В реализации этих процессов основная функция принадлежит ферментным системам лизосом и в первую очередь лизосомальным протеиназам, особенности участия которых в иммуногенезе определяются субстратной, клеточной и органной специфичностью, однако до настоящего времени остаются неясными. Целью данной работы явилось исследование функционального состояния протеолитической системы лизосом в различных органах на фоне иммунодепрессивного состояния, вызванного дефицитом витамина В₆.

Методика

Эксперименты проводили на крысах-самцах Вистар массой 230—280 г. Животных опытных групп в течение 30 дней содержали на рационе, лишенном витамина В₆. Контрольные животные в течение этого периода времени получали полноценный полусинтетический рацион. Через 30 дней половину животных из контрольных и подопытных групп иммунизировали однократно внутрибрюшинным введением 2 мл 20% суспензии отмытых эритроцитов барана. Через 4 дня после иммунизации в селезенке определяли содержание антителообразующих клеток (АОК) прямым методом Ерие [10] и уровень сывороточных антител к эритроцитам барана с помощью реакции пассивной гематглютинации. Общую комплементарную активность сыворотки (СН₅₀) определяли по 50% гемолизу [3].

В гомогенатах печени, селезенки и тимуса, приготовленных по стандартной методике [5] с использованием в качестве суспендирующей среды 0,25 М сахарозы pH 7,4, содержащей 1 мМ ЭДТА, определяли общий белок [12] и активность 6 лизосомальных гидролаз: катепсинов А, В, С, D спектрофлуориметрическими методами [1] и арилсульфатаз А и В по методу [6] с использованием в качестве субстратов соответственно N-карбобензоксен-L-глутамин-L-тирозина, N-бензоил-D, L-аргинин-β-нафтиламида, глицин-L-фенилаланин-β-нафтиламида, гемоглобина и п-нитрокатохолеульфата «Sigma», США). Определение периода полужизни

суммарных белков (T_{1/2}) в печени, селезенке и тимусе проводили путем введения животным соответствующих экспериментальных и контрольных групп за 1, 4 и 6 дней до забоя 1-(¹⁴C)-D, L-лейцина в дозе 20 мкКи на 100 г массы тела. Образец исследуемого гомогената осаждали 5% ТХУ, переносили на мембранный фильтр «Синпор» № 2 (ЧССР), дважды промывали 5 мл 5% ТХУ, высушивали и помещали в толуольный сцинтилятор (8 г РРО и 100 мг РОРОР в 1 л толуола). Радиоактивность считали на сцинтиляционном счетчике «Rackbeta-1215». Величину T_{1/2} определяли на основании расчета константы деградации, которую находили из зависимости ln удельной радиоактивности образца от времени, прошедшего с момента введения 1-(¹⁴C)-D, L-лейцина [17].

Результаты и обсуждение

Как видно из результатов иммунологических исследований, представленных в табл. 1, дефицит витамина В₆ приводил к резкому ослаблению иммунного ответа, о чем судили по уменьшению титра антител на 38% и продукции АОК более чем в 8 раз, а также по снижению комплементарной активности сыворотки на 53%. Полученные данные полностью согласуются со сведениями о развитии иммунодепрессивных состояний при В₆-авитаминозе [7, 15].

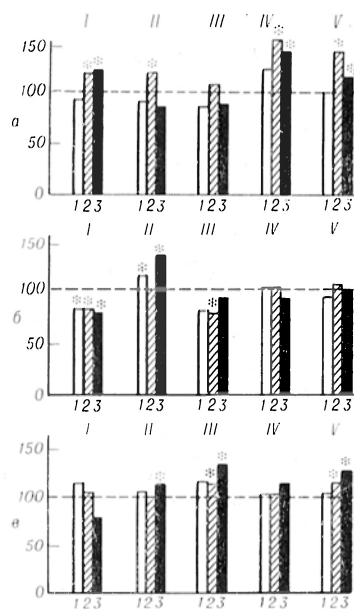
Результаты энзимологического анализа (см. рисунок) свидетельствуют о том, что АС intactных животных вызвала незначительные изменения активности лизосомальных протеиназ в се-

Таблица 1

Показатели иммунного ответа у крыс на эритроциты барана на фоне дефицита витамина В₆

Иммунологические показатели	Антигенная стимуляция	Антигенная стимуляция на фоне дефицита витамина В ₆
Активность комплемента (СН ₅₀)	83,4±4,8	39,3±3,5*
Число АОК на 10 ⁶ эритроцитов	73,0±2,2	8,28±3,6*
Титр антител, log	3,70±0,21	2,30±0,11*

Примечание. Представлены средние (M±m) данные из 8—10 опытов; звездочка — p<0,001.



Активность лизосомальных гидролаз в печени (а), селезенке (б) и тимусе (в) крыс при АС на фоне дефицита витамина В₆ (в % от контроля).

I—IV катепсины А, В, С и D соответственно; V — арилсульфатазы А и В. I — АС; 2 — дефицит витамина В₆; 3 — АС + дефицит витамина В₆. Представлены средние ($M \pm m$) данные 6—8 опытов; звездочкой отмечено $p < 0,05—0,01$.

лезенке, характеризующиеся снижением на 15% активности катепсина А и увеличением на 18% активности катепсина В. При В₆-авитаминозе в печени обнаружена активация всех исследованных (за исключением катепсина С) лизосомальных гидролаз на 21—43%, тогда как в селезенке, напротив, обнаружено снижение активности катепсинов А и С (на 15 и 23% соответственно). В тимусе животных этой группы отмечено некоторое увеличение активности катепсина С и арилсульфатаз А и В. АС на фоне дефицита витамина В₆ в значительной степени изменяла ха-

рактер реакции лизосомальных гидролаз в ответ на введение антигена. Так, в печени сохранялся выявленный при В₆-авитаминозе повышенный уровень активности катепсинов А и Д, тогда как активность тиролевых протеиназ и арилсульфатаз А и В снижалась относительно таковой у неиммунизированных животных с В₆-авитаминозом на 15—27% ($p < 0,05$). В селезенке АС на фоне дефицита В₆ вызвала лишь достоверное увеличение на 35% активности катепсина В. Следует отметить, что наиболее отчетливые изменения активности лизосомальных гидролаз при данных экспериментальных условиях были обнаружены в тимусе, где иммунизация животных Т-зависимым антигеном — эритроцитами барана — вызвала увеличение активности тиролевых протеиназ и арилсульфатаз А и В на 15—35% ($p < 0,01$).

Как видно из результатов определения $T^{1/2}$ суммарных белков, представленных в табл. 2, иммунизация животных, получавших контрольный рацион, вызвала незначительное увеличение $T^{1/2}$ суммарного белка в печени и селезенке и более интенсивное обновление белков тимуса. Вместе с тем, если $T^{1/2}$ белков в исследованных органах крыс с В₆-авитаминозом практически не отличался от контрольных значений, то АС животных этой группы приводила к увеличению $T^{1/2}$ белка в печени на 39% ($p < 0,01$) и сокращению $T^{1/2}$ белка в тимусе на 36% ($p < 0,01$).

Весь комплекс результатов иммунологических и энзиматических исследований позволяет сделать вывод о преимущественном участии тиролевых протеиназ лизосом в формировании иммунного ответа. Так, если выявленная при дефиците витамина В₆ активация катепсинов А, В и D в печени может являться

Таблица 2

Период полужизни белка в печени, селезенке и тимусе крыс при антигенной стимуляции на фоне дефицита витамина В₆

Условия эксперимента	Период полужизни белка, дни		
	печень	селезенка	тимус
Контроль	5,33±0,10	3,30±0,09	4,48±0,08
Антигенная стимуляция	6,20±0,27**	3,80±0,06***	3,67±0,09***
Дефицит витамина В ₆	4,52±0,01***	2,77±0,09***	4,27±0,07
Антигенная стимуляция на фоне дефицита витамина В ₆	6,30±0,01***	3,27±0,09*	2,75±0,03***

Примечание. Представлены средние ($M \pm m$) данные 6—8 опытов. Одна звездочка — $p < 0,05$; две — $p < 0,01$; три — $p < 0,001$.

причиной интенсивной деградации ряда низкомолекулярных компонентов компонента, в следствии чего имеет место снижение общей комплементарной активности сыворотки, то АС на этом фоне приводит к уменьшению активности катепсинов В и С в печени и их активации в тимусе, что находится в прямой зависимости от изменения интенсивности обновления белков в этих органах, о чем можно судить по величине $T_{1/2}$. Есть основания считать, что подавление иммуногенеза и реакция лизосомальных протеиназ находятся в тесной связи с возникающими при дефиците B_6 нарушениями в сфере синтеза нуклеиновых кислот и белка [14, 16]. Данное обстоятельство позволяет предполагать, что тимоловые протеиназы лизосом играют существенную роль в иммуногенезе, поскольку именно с этим типом ферментов связывают регуляцию однонаправленных биологических процессов, кругооборота белков, посттрансляционного процессинга [4].

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильев А. В., Капелевич Т. А., Тютельян В. А. // *Вопр. мед. химии*. — 1983. — № 3. — С. 127—130.
2. Гуткин В. С., Горбатов В. А., Феоктистова Т. А. Лизосомы в антибактериальном иммунитете животных. — М., 1984. — С. 304.
3. Кэбот К., Мейер М. Экспериментальная иммунохимия: Пер. с англ. — М., 1968.
4. Локишина Л. А., Дилакян Э. А. // *Молекул. биол.* — 1986. — Т. 20, № 20, № 5. — С. 1157—1175.
5. Покровский А. А., Тютельян В. А. Лизосомы. — М., 1976.
6. Покровский А. А., Тютельян В. А., Кравченко А. В. // *Биохимия*. — 1975. — Т. 40, № 8. — С. 75—79.
7. Axelrod A. E. // *Diet and Resistance to Disease*. — New York, 1981. — P. 93—106.
8. Green R. C. // *Exp. Cell. Res.* — 1977. — Vol. 110. — P. 215—223.
9. Hirschhorn K., Hirschhorn R. // *Lancet*. — 1965. — Vol. 1. — P. 1046.
10. Jerne R. K., Nordin A. A. // *Science*. — 1963. — Vol. 140. — P. 405.
11. Lesser M., Chang J. C., Orłowski M. // *Molec. cell. Biochem.* — 1985. — Vol. 69. — P. 67—73.
12. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // *J. biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
13. Munoz M., Marcos A., Unzaga M. T. // *J. Nutr.* — 1981. — Vol. 111. — P. 2133—2141.
14. Pandit V. I., Chakrabarti C. H. // *Indian J. Biochem. Biophys.* — 1971. — Vol. 8. — P. 54—55.
15. Pruzansky J., Axelrod A. E. // *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*. 1955. — Vol. 88. — P. 179—181.
16. Trakateellis A. C., Axelrod A. E. // *Biochem. J.* — 1965. — Vol. 95. — P. 344—349.
17. Zak R., Martin A., Blough R. // *Physiol. Rev.* — 1979. — Vol. 59. — P. 407—446.

Поступила 17.06.87

ACTIVITY OF LYSOSOMAL HYDROLASES IN RAT LIVER, SPLEEN AND THYMUS TISSUES UNDER CONDITIONS OF ANTIGEN STIMULATION AND VITAMIN B_6 DEFICIENCY

A. V. Vasil'ev, L. S. Kononova, K. D. Plecity, L. G. Ponomareva, V. A. Tutel'yan

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

Activity of cathepsins A, B, C and D and protein half-life $T_{1/2}$ in rat liver, spleen and thymus tissues, content of antibody-producing cells in spleen, titer of antibodies and the complement activity were studied after antigen stimulation accompanied by vitamin B_6 deficiency. Deficiency of vitamin B_6 caused a distinct decrease in immune response and in activation of thiol-dependent proteinases in thymus, while the enzymatic activity was lowered in liver tissue. At the same time, the protein $T_{1/2}$ was increased by 39% in liver tissue and decreased by 36% in thymus. These data suggest the importance of lysosomal thiol-dependent proteinases in immunogenesis.

УДК 616.126.421-07:[616.127-008.934.556.23]-616.127-008.934.723

Н. П. Ким, Н. В. Овчинников, Д. С. Гулямов, Ю. П. Андреев

ОСОБЕННОСТИ ОКИСЛЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ И ЛАКТАТА В МИОКАРДЕ ПРИ РАЗНЫХ СТАДИЯХ МИТРАЛЬНОГО СТЕНОЗА

Ташкентский филиал Всесоюзного научного центра хирургии АМН СССР

Прогрессирование стеноза митрального отверстия, в частности переход из III стадии порока в IV (по классификации А. Н. Бакулева и Е. А. Дамир),

связано с развитием новых адаптационных механизмов, направленных на обеспечение адекватного энергетического обмена миокарда. Ранее [2, 3]

нами было показано, что в IV стадии порока по сравнению с III изменяется характер утилизации субстратов: происходит «переключение» миокарда с преимущественного потребления неэтерифицированных жирных кислот (НЭЖК) на усиленную утилизацию низкомолекулярных субстратов, таких, как глюкоза, лактат и кетоновые тела.

В настоящей работе предпринята попытка охарактеризовать некоторые механизмы интенсификации углеводного метаболизма при прогрессировании митрального стеноза. С этой целью изучали содержание углеводных субстратов в биоптатах миокарда и окислительную способность гомогенатов миокарда в отношении меченных ^{14}C -углеводных субстратов и некоторых промежуточных продуктов метаболизма глюкозы.

Методика

Материалом для исследования служили удаленные во время комиссуротомии части левого предсердия 120 больных, из них у 71 больного была III, у 49 — IV стадия порока по классификации А. Н. Бакулева и Е. А. Дампр.

При определении содержания углеводов и цАМФ ткань немедленно замораживали в жидком азоте и хранили в нем до исследования. Жировую и соединительную ткань удаляли, мышечную растирали в жидком азоте до порошкообразного состояния и обрабатывали 0,6 н. раствором HClO_4 для определения лактата и пирувата. Дальнейшую экстракцию проводили в стеклянной части гомогенизатора с притертым тefлоновым пестиком. Осадок отделяли центрифугированием при 10 000 g в течение 20 мин при 0 °C. В полученном экстракте энзиматически определяли содержание лактата, используя набор реактивов фирмы «Boehringer» (ФРГ). В нейтрализованных с помощью 2 M раствора K_2CO_3 и отцентрифугированных экстрактах энзиматически определяли содержание пирувата, используя набор реактивов фирмы «Берингер» (ФРГ). Для экстракции глюкозы применяли 5% раствор трихлоруксусной кислоты. Содержание глюкозы определяли по цветной реакции с ортотолуидином, при этом использовали набор реактивов фирмы «Lachema» (ЧССР). Экстракцию цАМФ проводили абсолютным этанолом с последующим кипячением и центрифугированием. Определение содержания цАМФ осуществляли, применяя набор реактивов фирмы «Amersham» (Англия).

При изучении окислительной способности биоптаты немедленно погружали в ледяной 0,9% раствор хлорида натрия. Жировую и соединительную ткань удаляли, из мышечной ткани готовили 10% гомогенат, как описано ранее [4]. Инкубацию проводили в колбах Эрленмейера при плавном встряхивании в течение 2 ч при 25—26 °C. После преникубации (15 мин) в пробы вносили меченные субстраты окисления ($1,6\text{-}^{14}\text{C}$ -

глюкоза, $1\text{-}^{14}\text{C}$ -глюкозо-1-фосфат, $1\text{-}^{14}\text{C}$ -глюкозо-6-фосфат, $1\text{-}^{14}\text{C}$ -лактат или $1,4\text{-}^{14}\text{C}$ -сукцинат) в конечных концентрациях по 5 мМ и с конечной радиоактивностью примерно 5 МБк. Для улавливания $^{14}\text{CO}_2$ использовали свежеприготовленный 10% раствор КОН. Для коррекции неэнзиматических превращений меченые субстраты параллельно вносили в контрольные пробы, не содержащие гомогенат. Подсчет числа импульсов производили в жидкостно-сцинтилляционном счетчике ЛС-230 фирмы «Beckman» (Австрия). Результаты с учетом радиоактивности и концентрации внесенного меченого субстрата выражали в пикомолях субстрата на 1 мл гомогената.

Полученные результаты обрабатывали статистически, применяя критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

По нашим данным (табл. 1), содержание углеводных субстратов в IV стадии митрального стеноза было ниже, чем в III. Так, уровень глюкозы составлял 83% от величины соответствующего показателя при III стадии порока. Содержание пирувата и лактата уменьшалось соответственно на 26 и 24% по сравнению с III стадией заболевания. Отношение лактат/пируват, численно характеризующее величину цитоплазматического редокс-потенциала ($\text{НАДН}/\text{НАД}^+$), недостоверно увеличивалось на 16%.

Ранее [2, 3, 7] нами было показано, что в IV стадии заболевания у больных отмечается увеличение содержания лактата и пирувата в крови по сравнению с III стадией. При гистохимическом исследовании установлено исчезновение запасов гликогена в миокарде больных этой группы. Наиболее вероятной причиной снижения тканевого содержания углеводных метаболитов в IV стадии является активация их окисления в миокарде.

Для подтверждения этого предположения нами было измерено образование

Таблица 1
Содержание углеводных субстратов в биоптатах левого предсердия у больных митральным стенозом в III и IV стадиях заболевания

Показатель, ммоль на 1 г влажного веса	Стадия митрального стеноза		P
	III	IV	
Глюкоза	$3,6 \pm 0,21$	$3,0 \pm 0,200$	$<0,05$
Пируват	$0,19 \pm 0,017$	$0,14 \pm 0,011$	$<0,02$
Лактат/пируват	$5,75 \pm 0,39$	$4,37 \pm 0,33$	$0,05$
	$30,4 \pm 1,7$	$35,4 \pm 3,4$	$>0,1$

Таблица 2

Образование $^{14}\text{CO}_2$ при окислении (в ималь субстрата на 1 мл гомогената за 2 ч при 25—26 °C) меченых субстратов в гомогенате миокарда левого предсердия у больных с митральным стенозом в III и IV стадиях заболевания

Субстрат (5 мм)	Стадия заболевания		p
	III	IV	
1,6-[^{14}C]-глюкоза	40±3,9	56±3,0	<0,01
1-[^{14}C]-глюкозо-1-фосфат	149±36	105±12	>0,1
1-[^{14}C]-глюкозо-6-фосфат	172±18	107±9	<0,01
1,4-[^{14}C]-сукцинат	132±20	227±26	<0,02
1-[^{14}C]-лактат	167±11	213±14	<0,05

$^{14}\text{CO}_2$ при инкубации гомогенатов миокарда с мечеными субстратами окисления (табл. 2). Интенсивность окисления меченой глюкозы у больных с IV стадией порока была выше на 40%, чем у больных с III стадией. Для проверки возможного вклада пентозофосфатного пути (ПФП) обмена углеводов в образование меченого углекислого газа из глюкозы было изучено окисление 1-[^{14}C]-глюкозо-1-фосфата и 1-[^{14}C]-глюкозо-6-фосфата, так как CO_2 , появляющийся в окислительных реакциях ПФП, происходит из первого углеродного атома. Окисление этих фосфорных эфиров глюкозы в IV стадии митрального стеноза было ниже, чем в III стадии. Это означает, что увеличенная продукция меченого углекислого газа из глюкозы связана с усилением аэробного окисления глюкозы. В пользу сохранности окислительной способности цикла Кребса в миокарде больных этой группы свидетельствуют данные об интенсивном окислении меченого лактата (см. табл. 2), а также обнаруженное нами ранее [2] увеличенное миокардиальное потребление лактата и кетоновых тел.

В обеих группах больных окисление фосфорилированных продуктов глюкозы было выше, чем окисление глюкозы. По-видимому, при митральном стенозе интенсивность окисления различных субстратов зависит от числа метаболических превращений этих субстратов. Возможно поэтому окисление фосфорных эфиров глюкозы было выше, чем окисление глюкозы, а наиболее интенсивным среди изученных субстратов было окисление сукцината и лактата, метаболизм которых характеризу-

ется быстрым поступлением в митохондрии и включением в реакции цикла Кребса.

В IV стадии порока резко возрастает окисление одного из интермедиатов цикла Кребса — янтарной кислоты. Тенденция к ускорению окисления экзогенного сукцината с прогрессированием митрального стеноза была отмечена при полярографических исследованиях митохондрий сердечной мышцы больных [5, 6], что, по-видимому, связано с гипоксией миокарда вследствие ухудшения гемодинамических условий. Известно, что гипоксические сдвиги в метаболизме миокарда могут привести к активации реакций дикарбоновой части цикла Кребса и тем самым к усиленному образованию и окислению янтарной кислоты [1, 9]. Данные о наличии такого «обращения» реакций цикла Кребса в миокарде больных в IV стадии митрального стеноза были получены при изучении изоферментного спектра малатдегидрогеназы [8]. Вероятно, с наличием такой гипоксической активации гликолиза связано некоторое возрастание цитоплазматического редокс-потенциала (см. табл. 1) и увеличение интенсивности окисления меченого сукцината (см. табл. 2).

Другой возможной причиной ускорения окисления сукцината могло быть нарушение адренергической регуляции метаболизма миокарда в данной стадии заболевания. Так, ускорение окисления сукцината в митохондриях коррелирует с истощением содержания норадреналина в миокарде [6]. Нами обнаружено, что содержание цАМФ в миокарде больных в IV стадии порока было ниже (325±39 нмоль на 1 г влажного веса), чем в III стадии (473±34 нмоль на 1 г влажного веса; $p < 0,05$).

Сопоставляя результаты, полученные в настоящем исследовании, с данными наших предыдущих работ, касающихся утилизации НЭЖК [2, 3], можно предположить, что в отличие от III стадии порока, когда сохранены условия для метаболизма этих субстратов, в IV стадии митрального стеноза снижение их миокардиального потребления связано не с уменьшением эффективности цикла Кребса, а с нарушением предшествующих стадий, таких, как бета-окисление и транспорт из цитоплазмы в митохондрии. Действительно, удалось обнаружить дефицит карнитина в миокарде больных с митральными порока-

ми [10]. Возможно, с этим механизмом связано усиление утилизации углеводов, окисление которых не требует наличия карнитина, характеризуется меньшим числом метаболических превращений и меньшим потреблением кислорода.

Таким образом, переход митрального стеноза из III в клинически более тяжелую IV стадию заболевания обуславливает описанные выше компенсаторные реакции, направленные на адаптацию энергетического метаболизма к новым гемодинамическим условиям.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кондрашова М. П., Маевский Е. И., Бабаян Г. В. и др. // Митохондрии: Биохимия и ультраструктура. — М., 1973. — С. 112—128.
2. Овчинников И. В., Гулямов Д. С., Андрес Ю. П. и др. // Вестн. хир. — 1981. — № 7. — С. 8—11.
3. Овчинников И. В., Гулямов Д. С., Ким Н. П., Андрес Ю. П. // Мед. журн. Узбекистана. — 1984. — № 10. — С. 47—49.
4. Овчинников И. В., Ким Н. П. // Укр. биохим. журн. — 1985. — № 4. — С. 72—75.
5. Медвинская Н. А., Цызаний А. А., Кнышов Г. В. и др. // Физиол. журн. — 1981. — Т. 27. — № 2. — С. 264—267.
6. Степанян Е. П., Ярлыкова Е. И., Кузнецова Б. А. Энергетика оперированного сердца. — М., 1978.
7. Ходжаев М. М., Хан Н. И., Овчинников И. В. и др. // Мед. журн. Узбекистана. — 1982. — № 8. — С. 20—23.
8. Шотт А. В., Кухта В. К., Романенко В. В. Механизмы компенсации при митральном стенозе. — Минск, 1978.

9. Freminet A. // Comp. Biochem. Physiol. — 1981. — Vol. 70, № 3. — P. 427—433.
10. Masamura H., Suzuki Y., Kobayashi A. et al. // J. molec. Cell Cardiol. — 1983. — Vol. 45, Suppl. 5. — P. 13.

Поступила 27.01.87

SPECIFIC TYPE OF GLUCOSE AND LACTATE OXIDATION IN MYOCARDIUM UNDER CONDITIONS OF MITRAL VALVE STENOSIS OF VARIOUS DEGREE

N. P. Kim, I. V. Ovchinnikov, D. S. Guljamov, U. P. Andres

Branch of the All-Union Research Centre of Surgery, Academy of Medical Sciences of the USSR, Tashkent

Content of glucose, lactate, pyruvate and cAMP was estimated in biopsy from left atrium of 120 patients with the III and IV degree of mitral valve stenosis. Content of $^{14}\text{CO}_2$, developed after incubation of myocardium homogenates with labelled substrates — glucose, glucose-1-phosphate, glucose-6-phosphate, succinate, lactate, was also measured. In patients with the IV degree of mitral valve stenosis concentration of carbohydrates and cAMP was decreased in myocardium as compared with those of patients with the III degree of the disease, whereas consumption of labelled glucose, lactate and succinate was increased. Estimation of the oxidation rate of glucose phosphorylated derivatives enabled to suggest that main part of glucose carbon was involved in reactions of the Krebs cycle. At the same time, a decrease in the content of carbohydrate substrates in myocardium of patients with the IV degree of the stenosis occurred due to elevated rate of these substrates oxidation. The data obtained suggest that adaptation reactions to hemodynamic impairments were responsible for dissimilar character of glucose and lactate metabolism in myocardium of patients with various degree of mitral valve stenosis.

УДК 612.112.3.015.6:577.161.5+612.015.1:577.152.531-088.1

А. М. Герасимов, А. С. Захаров

ВОССТАНОВЛЕНИЕ НИТРОСИНЕГО ТЕТРАЗОЛИЯ ТИОЛАМИ В ПРИСУТСТВИИ ВИТАМИНА К

ЦНИИ травматологии и ортопедии им. Н. Н. Приорова, Москва

Реакция превращения нитросинего тетразолия (НСТ) в диформазап широко используется в цитохимических исследованиях для выявления и определения активности оксидоредуктаз [6]. В биохимии этот реагент нашел распространение при электрофоретическом разделении изоформ оксидоредуктаз [8, 14], при определении их активности, в частности супероксиддисмутазы (СОД) [1, 8], а также для оценки функциональной активности

фагоцитов [4, 11]. Недавно обнаружено что в процессе генерации фагоцитами супероксидного анион-радикала (O_2^-) могут участвовать как содержащиеся в клетках, так и экзогенные хиноны [2, 10]. Однако роль последних в восстановлении НСТ не обсуждалась. В данной работе показана возможность ферментативного восстановления НСТ в присутствии как белковых, так и низкомолекулярных тиолов и витамина K_3 (менадион, 2-метил-1,4-нафтохинон).

Методика

В качестве SH-содержащего белка и низкомолекулярного тиола в большей части опытов использовали альбумин сыворотки крови человека (ЧСА) («Serva», ФРГ) и восстановленный глутатион (GSH) («Sigma», США). Скорость восстановления НСТ («Calbiochem», США) исследовали спектрофотометрически при 560 нм в системе, содержащей 50 мМ фосфатный буфер pH 7,8 [11], 0,1 мМ ЭДТА, 0,1 мМ НСТ, различные концентрации менадиона и анализируемых веществ в объеме 3,0 мл при 37 °С. Количество образующегося диформаза рассчитывали, используя коэффициент молярной экстинкции — $3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [12]. Для определения скорости O_2^- -зависимого восстановления НСТ в реакционную среду добавляли очищенный препарат СОД («Sigma», США) в концентрации 20 ед·мл⁻¹. Активность СОД оценивали в ксантиноксидазной системе с цитохромом с в качестве акцептора [13]. Содержание SH-групп в белках определяли по реакции с 5,5'-дитиобиснитробензойной кислотой (ДТНБ) [3]. Алкилирование SH-групп ЧСА проводили с помощью N-этилмалеимида [5]. Концентрацию белка определяли биуретовым методом.

Результаты и обсуждение

В отсутствие менадиона ЧСА и GSH при pH 7,8 не восстанавливали НСТ. Добавление менадиона в реакционную среду, содержащую ЧСА или GSH и НСТ, вызывало восстановление последнего. Величина максимального ингибирования СОД данного процесса для ЧСА и GSH достигала 40 и 52% соответственно (рис. 1). Это свидетельствует о наличии O_2^- -зависимого и O_2^- -независимого пути восстановления НСТ в исследуемой системе, в которой, веро-

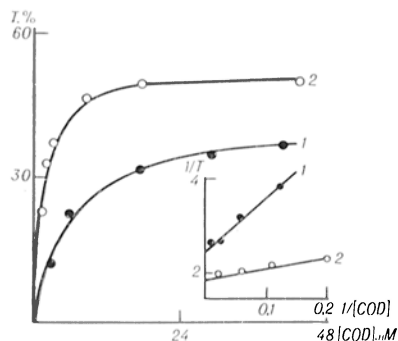


Рис. 1. Торможение СОД опосредованного менадионом восстановления НСТ сывороточным альбумином (1) или GSH (2).

Начальная скорость восстановления НСТ: 0,010—0,012 мин⁻¹. Здесь и на рис. 2 концентрация менадиона 300 мкМ. По оси абсцисс — концентрация СОД (в мМ); по оси ординат — торможение (в %), определяемое как отношение разности начальных скоростей реакции без СОД и в присутствии СОД к начальной скорости реакции без СОД.

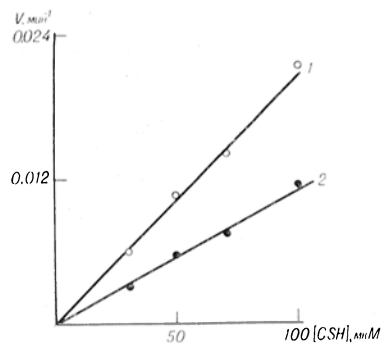


Рис. 2. Зависимость скорости опосредованного менадионом восстановления НСТ от концентрации GSH в отсутствие (1) и в присутствии (2) СОД (20 ед·мл⁻¹).

По оси абсцисс — концентрация GSH (в мМ); по оси ординат — скорость восстановления НСТ (в мин⁻¹).

ятно, образующийся семихинон менадиона восстанавливает кислород и НСТ. Возможность участия семихинонов в переносе электрона на каждый из этих акцепторов показана в ряде работ [7, 12]. Восстановление НСТ в данной системе соответствовало реакции 1 порядка по отношению к ЧСА или GSH (рис. 2), при этом соотношение O_2^- -зависимого и O_2^- -независимого путей образования диформаза оставалось постоянным (см. рис. 2). Сдвиг pH среды с 7,8 до 9,0 сопровождался увеличением скорости менадион-опосредованного восстановления НСТ ЧСА и GSH соответственно в 1,9 и 2,0 раза, а также появлением незначительного восстановления НСТ данными веществами в отсутствие менадиона (табл. 1, 2). Использование различных белковых препаратов в данной системе приводило к восстановлению НСТ только при наличии у них SH-групп (см. табл. 1). Однако увеличение скорости образования диформаза с ростом SH-групп в белках не имело линейной зависимости, что, по-видимому, связано с различной доступностью белковых тиолов для ДТНБ, менадиона и НСТ. Необходимость именно SH-групп при восстановлении НСТ в исследуемой системе подтвердилась фактом полного ингибирования процесса после обработки ЧСА тиолалкилирующим агентом N-этилмалеимидом и отсутствием образования диформаза при замене восстановленного глутатиона окисленным. Использование вместо GSH эквимольных концентраций NADPH и NADH не приводило к восстановлению НСТ как в присутствии, так и в отсутствии

Таблица 1
Опосредованное менадионом восстановление НСТ
белковыми препаратами

Препарат	Скорость восстано- вления НСТ, $\text{нмоль} \cdot \text{мин}^{-1}$ на 1 мг белка	Доля $\text{O}_2^{\cdot-}$ -зависимого восстановления НСТ, %	Содержание SH- групп, нмоль на 1 мг белка
ЧСА:			
pH 7,8	0,16	37,0	1,8
pH 9,0	0,31*	35,0	
Сухая плазма 0 (1) группы крови	0,51	58,5	2,4
Сыворотка крови 10 до- норов	0,96	57,5	7,8
Гексокиназа из дрож- жей	0,90	33,0	18,8
Иммуноглобулин анти- стафилококковый	0	0	0

* С учетом скорости восстановления НСТ ($0,02 \text{ нмоль}$ диформазана $\cdot \text{мин}^{-1}$ на 1 мг белка) в отсутствие менадиона. Здесь и в табл. 2 дан-
ные представляют собой среднее арифметическое
результатов 3 параллельных измерений. Условия
проведения реакции, как на рис. 2.

менадиона, что указывает на неспособность этих соединений выступать доно-
рами электронов для НСТ при исследуе-
мых условиях. Скорость опосредован-
ного менадионом образования диформа-
зана в присутствии низкомолекулярных
SH-соединений возрастала по мере сни-
жения величины их редокс-потенциа-
лов, при этом цистеинхлорид и дитио-

Таблица 2
Восстановление НСТ низкомолекулярными SH-
соединениями

Соединение (50 мкМ)	Скорость вос- становления НСТ, нмоль диформазана $\cdot \text{мин}^{-1}$		Доля $\text{O}_2^{\cdot-}$ -за- висимого вос- становления НСТ, %		Редокс-потенци- ал, В*
	— ме- нади- он	+ ме- нади- он	— ме- нади- он	+ ме- нади- он	
Глутатион восстанов- ленный:					
pH 7,8	0	1,0	0	48,0	—0,13
pH 9,0	0,1	2,1	50,0	39,0	
Цистеамин	0	9,3	0	49,5	
Цистеинхло- рид	0,8	33,0	37,5	48,5	—0,21
Дитиотреи- тол	2,5	106,0	52,5	43,4	—0,33

Данные из [9].

тrentол восстанавливали НСТ и в от-
сутствии менадиона (см. табл. 2).

Таким образом, тиолы при наличии
менадиона и кислорода способны вос-
станавливать НСТ как $\text{O}_2^{\cdot-}$ -зависимым,
так и $\text{O}_2^{\cdot-}$ -независимым путем. Учиты-
вая высокое содержание в клетках
тиолов и хинонов, неферментативное
взаимодействие между ними может ока-
зывать существенное влияние на выра-
женность оксидоредуктазных реакций,
выявляемых с помощью НСТ. Аналогич-
ная проблема может возникать в ис-
следованиях токсикологического и фар-
макологического направления при ис-
пользовании препаратов хиноидной
структуры.

ЛИТЕРАТУРА

- Вартанян Л. С., Гуревич С. М. // Вопр.
мед. химии. — 1982. — № 5. — С. 23—
26.
- Герасимов А. М., Гудошникова Л. В.,
Махсон Н. Е., Уразильдиев З. Н. // Там
же. — 1986. — № 5. — С. 103—106.
- Герасимов А. М., Уваров В. Ю. // Докл.
АН СССР. — 1978. — Т. 240, № 2. —
С. 467—470.
- Маянский А. И., Маянский Д. И. Очерки
о нейтрофиле и макрофаге. — Новоси-
бирск, 1983.
- Торчинский Ю. М. Сера в белках. — М.,
1977.
- Хейхоу Ф. Г., Кваглино Д. Гематологи-
ческая цитохимия: Пер. с англ. — М.,
1983.
- Auclair Ch. // Oxy Radicals and Their
Scavenger Systems / Eds. G. Cohen, R. Gre-
enwald. — New York, 1983. — Vol. 2. —
P. 312—316.
- Beauchamp Ch., Fridovich I. // Analyt.
Biochem. — 1971. — Vol. 44. — P. 276—
287.
- Clark W. M. Oxidation — Reduction Po-
tentials of Organic Systems. — Baltimore,
1960.
- Crawford D. K., Schneider D. L. // Bio-
chem. biophys. Res. Commun. — 1981. —
Vol. 99. — P. 1277—1286.
- Hierholzer S., Hierholzer G. // Unfallheil-
kunde. — 1980. — Bd 83. — S. 241—244.
- Lee-Ruff S. // Chem. Soc. Rev. — 1977. —
Vol. 6. — P. 195—214.
- McCord J. M., Fridovich I. // J. biol.
Chem. — 1969. — Vol. 244. — P. 6045—
6055.
- Nishikimi N. // Biochem. biophys. Res.
Commun. — 1972. — Vol. 46. — P. 849—
853.

Поступила 04.08.87

REDUCTION OF NITROBLUE TETRAZOLIUM BY MEANS OF THIOLS IN PRESENCE OF VITAMIN K

A. M. Gerasimov, A. S. Zakharov

Central Institute of Traumatology and Orthopedics, Moscow

Thiol-containing proteins and low molecular sulfhydryl-containing compounds redu-

ced nitroblue tetrazolium (NBT) in presence of vitamin K₃(2-methyl-1,4-naphthoquinone). Cysteine and dithiotritol (but not glutathione) reduced NBT also in absence of the quinone. Reduction of NBT was accelerated in the weakly alkaline medium and occurred both via O₂⁻-dependent and O₂⁻-independent mechanism. In presence of quinones the thiols appear to affect the manifestation of oxidoreductase reactions estimated by means of NBT-test.

УДК 616.36-008.931-02:615.277.41-092.9

Н. Н. Литвинов, Л. Ф. Астахова, Л. Х. Мухамбетова

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ НИТРОЗОДИМЕТИЛАМИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ВОЗДЕЙСТВИЯ

НИИ общей и коммунальной гигиены им. А. Н. Сысина АМН СССР, Москва

В хронических экспериментах на животных по изучению развития гепатоканцерогенеза под влиянием таких химических канцерогенов, как нитрозодиэтиламин, 2-ацетиламинофлуорен, нитрозодиметиламин (НДМА), показана фазовость изменения активности ферментов: АТФазы митохондрий, моноаминоксидазы, аденилатциклазы и ферментов гликолиза [2, 6, 12]. Авторы этих работ объясняли циклические изменения активности изучаемых ферментов определенными стадиями развития химического канцерогенеза, так как исследуемые канцерогенные вещества брали в концентрациях, приводивших к увеличению частоты образования опухолей печени животных.

Однако другие авторы [1, 16] считают, что циклические изменения метаболических реакций организма под влиянием вводимых канцерогенных веществ обусловлены не только специфическим действием канцерогенов на клетки тканей, но и отражением «фазовых изменений реактивности ткани», т. е. ответными реакциями клеток тканей на повреждающее воздействие химических веществ.

В настоящей работе проведено сравнительное исследование функционального состояния ферментных систем митохондрий печени крыс в зависимости от длительности воздействия НДМА в концентрации (10 мг/л), вызывающей увеличение частоты образования опухолей, и в концентрациях (0,1, 1,0 мг/л),

не вызывающих увеличения частоты опухолеобразования у крыс [10].

Методика

Эксперимент проведен на неинбредных крысах-самцах с начальной массой тела 150—170 г, которые получали постоянно с питьевой водой НДМА в концентрациях 0,1, 1,0 и 10,0 мг/л в течение 2, 5 и 10 мес. Опыты выполнены на 12 группах животных, из них 3 контрольные (в каждой по 6—10 животных). Крыс забивали декапитацией, через 2, 5 и 10 мес воздействия. В свежеприготовленных гомогенатах печени, полученных в условиях мягкого режима, обеспечивающего целостность внутриклеточных структур (гомогенизатор: тефлон — стекло), определяли активность сукцинатдегидрогеназы (КФ 1.3.99.1; СДГ), малатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.37; МДГ), глутаматдегидрогеназы (КФ 1.4.1.3; ГДГ) [13]. Гомогенаты печени готовили на 0,25 М растворе сахарозы (рН 7,4) в соотношении 1:10 (масса:объем). Для определения общей (суммарной) активности вышеуказанных ферментов использовали ионный детергент — тритон X-100 (конечная концентрация 0,1 %). Выделение фракции митохондрий из печени крыс проводили методом дифференциального центрифугирования [14]. Определение активности H⁺-АТФазы (КФ 3.6.1.3) во фракции митохондрий проводили по методу [8, 15]. Белок определяли по методу [24]. В неразведенной сыворотке крови крыс определяли активность МДГ, ГДГ [13]. Статистическую обработку полученных данных проводили, как описано ранее [3, 9].

Результаты и обсуждение

Активность ферментов в гомогенатах печени, обработанных тритоном X-100,

Активность МДГ и ГДГ (в мкмоль/мин на 1 г ткани) в гомогенатах печени крыс при постоянном воздействии различных концентраций НДМА

Длительность воздействия, мес	Концентрация НДМА, мг/л	МДГ		ГДГ	
		общая активность	свободная активность	общая активность	свободная активность
2	Контроль	63,21±4,69	23,04±1,39	4,68±0,58	2,09±0,24
	0,1	75,45±4,08	28,79±2,13*	5,25±0,61	1,77±0,22
	1,0	73,22±5,10	40,21±5,82**	6,23±0,24*	2,65±0,29
	10,0	97,27±3,20**	45,78±4,49**	5,58±0,32	3,04±0,31*
5	Контроль	34,23±4,24	18,01±1,70	3,70±0,31	1,77±0,12
	0,1	24,44±1,36*	16,19±2,27	2,54±0,31*	1,59±0,22
	1,0	18,01±2,72**	17,38±1,01	2,34±0,64*	1,29±0,12*
	10,0	24,70±0,68*	15,44±1,36	1,57±0,07*	0,74±0,07*
10	Контроль	42,70±3,10	22,60±4,50	6,08±0,49	2,57±0,19
	0,1	72,20±4,90**	40,60±2,00**	3,81±0,09*	1,48±0,15*
	1,0	50,20±4,80	39,60±2,40*	4,36±0,34*	1,68±0,15*
	10,0	30,70±2,30	19,90±1,50	4,00±0,26*	1,19±0,08*

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 обозначены достоверные различия: одна звездочка — $p < 0,05$, две — $p < 0,01$ по сравнению с контрольными значениями.

обозначена как общая активность, а активность ферментов в гомогенатах печени, не обработанных тритоном X-100, — как свободная активность [13].

Анализ результатов по влиянию НДМА в концентрации 0,1 мг/л на исследуемые ферментные системы митохондрий печени крыс в зависимости от длительности воздействия выявил циклические изменения общей и свободной активности МДГ и СДГ. Так, свободная активность МДГ и СДГ повышалась на 25 и 53% ($p < 0,05$) соответственно через 2 мес воздействия канцерогена, а к 5 мес исследования свободная активность данных ферментов находилась на уровне контрольных величин, затем повышалась на 80 и 58% ($p < 0,05$) к 10 мес воздействия (табл. 1, 2). Общая активность МДГ изменялась сле-

дующим образом: на уровне контрольных величин — 2 мес воздействия, снижение на 29% — 5 мес, повышение на 69% — 10 мес. Общая активность СДГ повышалась на 50% ($p < 0,05$) через 5 мес воздействия НДМА (0,1 мг/л), а на 2- и 10-месячных сроках исследования общая активность СДГ соответствовала уровню активности фермента контрольных животных. Аналогичная направленность цикличности изменений свободной активности МДГ и СДГ сохранялась при воздействии НДМА в концентрации 1,0 мг/л (2, 5, 10 мес), при этом свободная активность СДГ колебалась подобным образом и при воздействии канцерогена в концентрации 10 мг/л (см. табл. 1, 2). Как видно из табл. 1, 2, циклически изменялись свободная активность МДГ (НДМА

Таблица 2

Активность СДГ (в мкмоль/мин на 1 г ткани) в гомогенатах и H^+ -АТФазы (в мкмоль Ph /ч на 1 мг белка) в митохондриях печени крыс при постоянном воздействии различных концентраций НДМА

Длительность воздействия, мес	Концентрация НДМА, мг/л	СДГ		H^+ -АТФаза
		общая активность	свободная активность	
2	Контроль	8,19±0,92	3,04±0,30	2,58±0,42
	0,1	8,51±0,71	4,65±0,45*	2,32±0,33
	1,0	11,84±0,67**	4,52±0,59*	4,00±0,67*
	10,0	11,14±0,99*	4,45±0,25*	4,27±0,64*
3	Контроль	7,43±1,09	3,26±0,60	1,44±0,18
	0,1	11,15±0,54**	4,28±0,39	1,90±0,13
	1,0	7,89±1,47	3,88±0,49	4,09±1,06*
	10,0	8,27±0,09	2,86±0,46	4,77±0,36**
10	Контроль	10,91±0,96	2,85±0,36	1,28±0,17
	0,1	9,31±0,46	4,44±0,30**	1,65±0,18
	1,0	9,16±0,48	3,96±0,34*	2,90±0,19*
	10,0	11,78±0,68	4,00±0,32*	0,67±0,12*

10 мг/л), общая активность МДГ, СДГ (НДМА 1,0 и 10 мг/л) в зависимости от длительности введения вещества, по свособразию их изменений характерно для каждой исследуемой концентрации НДМА.

Однако фазовость изменений активности ферментных систем митохондрий в зависимости от длительности воздействия различных концентраций НДМА прослеживалась не для всех исследуемых ферментных систем. Например, общая и свободная активность ГДГ стойко снижалась при всех изучаемых концентрациях НДМА на 5 и 10 мес исследования; активность H^+ -АТФазы митохондрий печени повышалась при действии канцерогена в концентрации 1,0 мг/л на всех сроках, а также в концентрации 10 мг/л на 2 и 5 мес воздействия НДМА и резко снижалась на 10-месячном сроке исследования последней концентрации (см. табл. 1, 2).

Мы полагаем, что волнообразный характер изменения активности некоторых ферментных систем митохондрий, как и совокупность всех наблюдаемых изменений функционального состояния ферментных систем митохондрий печени крыс в нашем эксперименте, обусловлен не какими-то определенными фазами развивающегося канцерогенного процесса под влиянием НДМА, а количеством образующихся активных метаболитов канцерогена в клетках, их качественными характеристиками, а также компенсаторными (или адаптивными) фондами клеток печени, которые пытаются приспособить клетки к измененным условиям, так как циклические изменения активности изучаемых ферментов наблюдались при воздействии НДМА как в концентрации, вызывающей увеличение частоты образования опухолей (10 мг/л), так и в концентрациях, не обладающих этим свойством (0,1, 1,0 мг/л).

Известно, что повреждающим действием на клетки обладает не сам НДМА, а его метаболиты [22], образование которых происходит в основном в микросомальной фракции клеток печени под действием монооксигеназных систем (образование алкилирующих соединений — гидроксисламиннов) [9]. Метаболизм НДМА может, вероятно, частично протекать в растворимой (нитроредуктазы — образование гидразиннов) и митохондриальной (N-оксиредуктазы)

фракциях клеток печени животных [5, 11].

Следовательно, оценивая функциональное состояние ферментных систем митохондрий и энергообеспечение клеток по наблюдаемым изменениям активности изучаемых митохондриальных ферментов, как и следовало ожидать, наименьшие изменения функционального состояния ферментных систем митохондрий и процесса окислительного фосфорилирования выявлены при воздействии НДМА в концентрации 0,1 мг/л. Увеличение свободной активности МДГ и СДГ через 2 мес воздействия НДМА (0,1 мг/л) может быть вызвано либо активацией пермеаз, переносящих субстраты для данных ферментов, либо небольшим увеличением проницаемости митохондриальных мембран. Изменения общей активности МДГ, ГДГ, СДГ, не сопровождающиеся изменением их свободной активности через 5 мес воздействия НДМА (0,1 мг/л), обусловлены, вероятно, какими-то конформационными изменениями структур данных ферментов, затрагивающими регуляторные центры. Дальнейшее увеличение срока воздействия до 10 мес (НДМА 0,1 мг/л) приводило к увеличению проницаемости митохондриальных мембран, о чем свидетельствовало повышение активности МДГ и ГДГ в сыворотке крови (табл. 3) [4, 7]. При этом увеличение активности МДГ в сыворотке крови обусловлено, по-видимому, не только повышенной проницаемостью митохондриальных и цитоплазматических мембран печени, но и увеличением количества фермента, что косвенно отражает увеличение общей и свободной активности МДГ в печени подопытных крыс. Количественное увеличение фермента МДГ может быть вызвано потребностью клетки в восстановительных эквивалентах НАДН, необходимых для метаболизма НДМА в различных системах окисления. НАДН может перебрасываться из митохондрий в цитоплазму через малатаспартатную ферментную систему [11]. Низкая скорость гидролиза АТФ (на уровне контрольных величин) митохондриями печени крыс при данном режиме воздействия НДМА свидетельствует о сопряженности процессов дыхания и фосфорилирования: высокий $\Delta\mu$ поддерживается за счет переноса электронов по дыхательной цепи [21].

Активность МДГ и ГДГ (в мкмоль/мин в 1 мл сыворотки) в сыворотке крови крыс при постоянном воздействии различных концентраций НДМА

Фермент	Длительность воздействия, мес	Контроль	Концентрация НДМА, мг/л		
			0,1	1,0	10,0
МДГ	2	2,21±0,14	2,21±0,21	3,40±0,30*	4,17±0,51**
	5	1,53±0,28	1,97±0,17	1,16±0,09	1,51±0,25
	10	0,85±0,12	2,14±0,32**	0,37±0,10*	1,00±0,10
ГДГ	2	0,13±0,02	0,11±0,01	0,13±0,03	0,18±0,02
	5	0,09±0,009	0,09±0,01	0,10±0,02	0,13±0,01*
	10	0,07±0,007	0,10±0,02*	0,12±0,01*	0,12±0,01*

Повышение интенсивности воздействия НДМА в 10 раз (1,0 мг/л) уже к 2 мес исследования приводило к несколько большим повреждениям функционального состояния ферментов и мембранных структур митохондрий, чем воздействие канцерогена 0,1 мг/л через 10 мес. Увеличение свободной активности МДГ на 74% ($p < 0,05$) и H^+ -АТФазы на 55% ($p < 0,05$) в печени подопытных крыс (0,1 мг/л — 2 мес), а также повышение активности МДГ в сыворотке крови свидетельствуют об увеличении степени проницаемости мембран митохондрий печени (см. табл. 1—3). Степень проницаемости мембран митохондрий постепенно повышается при удлинении срока воздействия НДМА (1, 0 мг/л), что отражает повышение активности H^+ -АТФазы (184% — 5 мес, 126% — 10 мес) в печени и снижение активности МДГ (56% — 10 мес), увеличение активности ГДГ (71% — 10 мес) в сыворотке крови (см. табл. 1—3).

Увеличение общей и свободной активности СДГ (1,0 мг/л — 2 мес) может характеризовать как повышение количества фермента, так и усиление его активности в ответ на увеличенную функциональную нагрузку на данный фермент. При любых повреждениях митохондрий в первую очередь поражается НАДН-трансдегидрогеназный путь поступления электронов и протонов в дыхательную цепь [17]. Возможно, в данной ситуации главным источником поступления электронов и протонов в дыхательную цепь является сукцинат-дегидрогеназный участок. Усиление потока электронов через СДГ, а также частичное генерирование энергии через электрохимический потенциал $\Delta\mu_{H^+}$ путем гидролиза АТФ [19] позволяет митохондриям обеспечивать клетки печени подопытных крыс необходимым уровнем энергии.

В ответ на усиление повреждающего воздействия НДМА (1,0 мг/л — 5, 10 мес) митохондрии печени подопытных крыс поддерживают мембранный потенциал в основном посредством активации H^+ -АТФазы [18, 19] сохранения таким образом, необходимый для жизнедеятельности клеток уровень энергии.

НДМА в концентрации 10 мг/л через 2 мес вызывал аналогичные качественные изменения в митохондриях подопытных крыс, как и НДМА в концентрации 1,0 мг/л (2 мес). Концентрационные различия в воздействиях канцерогена отражались в количественных изменениях, которые были более выражены при действии 10 мг/л НДМА. К 5 мес исследования (10 мг/л) отмечено сочетание увеличенной степени проницаемости мембран митохондрий с ингибированием активности некоторых ферментов (см. табл. 1, 2), на что митохондрии реагируют напряжением компенсаторных механизмов (наибольшее повышение активности H^+ -АТФазы 231%; $p < 0,05$; см. табл. 2). Самые неблагоприятные изменения для митохондрий печени крыс выявлены при воздействии НДМА в концентрации 10 мг/л через 10 мес. Вся совокупность изменений: снижение активности H^+ -АТФазы на 48% ($p < 0,05$; см. табл. 2), общей и свободной активности ГДГ на 50%, общей активности МДГ на 28% ($p < 0,05$) в печени (см. табл. 1), а также повышение активности ГДГ на 71% в сыворотке крови (см. табл. 3) — расценивалась как начальный этап срыва компенсаторных механизмов митохондрий и начальный этап разрушения структурной целостности митохондриальных мембран, так как инактивация H^+ -АТФазы сопровождается снижением мембранного потенциала, электрохимического градиента, что вызывает снижение продукции энергии митохондриями.

Таким образом, отмечено количественное нарастание неблагоприятных изменений функционального состояния ферментных систем митохондрий печени крыс в зависимости от интенсивности и длительности воздействия НДМА. При этом наименьшие количественные изменения наблюдались при действии канцерогена в концентрации 0,1 мг/л, наибольшие — под влиянием НДМА в концентрации 10,0 мг/л, особенно через 10 мес исследования.

Нарастание совокупности количественных неблагоприятных изменений в клетках печени крыс в зависимости от интенсивности воздействия НДМА при определенной интенсивности и длительности воздействия канцерогена может привести к качественным изменениям в клетках печени у некоторых животных. В нашем эксперименте таким свойством, вероятно, обладает НДМА в концентрации 10 мг/л, так как в этой группе животных через 19 мес воздействия отмечено увеличение частоты образования опухолей печени на 57% [10].

ЛИТЕРАТУРА

1. Алякринский Б. С., Степанова С. И. По закону ритма. — М., 1985.
2. Бердинских Н. К., Санина О. Л., Мельникова Н. Н. // *Вопр. онкол.* — 1978. — № 10. — С. 42—45.
3. Бирюкова Р. И. // *Гиг. и сан.* — 1972. — № 7. — С. 43—46.
4. Вилкинсон Д. Принципы и методы диагностической энзимологии: Пер. с англ. — М., 1981.
5. Головенко Н. Я., Карасева Т. Л. Сравнительная биохимия чужеродных соединений. — Киев, 1983.
6. Гуркало В. К., Третьяков А. В. // *Вопр. мед. химии.* — 1978. — № 4. — С. 495—499.
7. Норданова Ю., Димов Д., Стоянов С. и др. // *Клин. мед.* — 1977. — № 10. — С. 61—64.
8. Кондришова М. Н., Лесозорова М. Н. // *Биохимия.* — 1965. — Т. 30. — С. 58—65.
9. Лакин К. М., Крылов Ю. Ф. Биотрансформация лекарственных веществ. — М., 1981.
10. Литвинов Н. Н., Казачков В. Н., Воронин В. М., Журков В. С. // *Гиг. и сан.* — 1983. — № 3. — С. 19—22.
11. Лукьянова Л. Д., Балмуханов Б. С., Уголев А. Т. Кислородзависимые процессы в клетке и ее функциональное состояние. — М., 1982.

12. Осипова Л. А., Плисс М. Б., Захаренко Л. Н., Горбань Г. П. // *Вопр. онкол.* — 1984. — № 11. — С. 71—76.
13. Покровский А. А., Арчаков А. Н., Мухамбетова Л. Х. // *Цитология.* — 1969. — Т. 11, № 1. — С. 121—125.
14. Поляков В. М., Ланкин В. З., Архангельская А. В., Благородов С. Г. // *Биохимия.* — 1977. — Т. 42, № 3. — С. 499—504.
15. Романова И. Н., Астахова Л. Ф. // *Митохондрии: Биохимические функции в системе клеточных органов.* — М., 1969. — С. 227—232.
16. Саломон Л. С. Рак и дисфункция клетки. — Л., 1974.
17. Скулачев В. П. Аккумуляция энергии в клетке. — М., 1969.
18. Скулачев В. П. // *Успехи совр. биол.* — 1974. — Т. 77, № 2. — С. 125—154.
19. Страйер Л. Биохимия: Пер. с англ. — М., 1985. — Т. 2.
20. Черняк Б. В., Ходжисев Е. Ю., Гладышева Т. Б. // *Конф. Федерация европейских биохимических о-в, 16-я: Тезисы докладов.* — М., 1984. — С. 288.
21. de Gómez-Puyou M. T., Gavilanes M., Gomez-Puyou A., Ernster L. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1980. — Vol. 592. — P. 396—405.
22. Lowry O. H., Rosebrough N. I., Farr A. L., Randall R. J. // *J. biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.

Получила 13.02.87

EFFECT OF NITROSE DIMETHYLAMINE AT VARIOUS CONCENTRATIONS ON THE FUNCTIONAL STATE OF RAT LIVER MITOCHONDRIAL ENZYMATIC SYSTEMS DEPENDING ON DURATION OF THE CARCINOGEN ACTION

N. N. Litvinov, L. F. Astakhova, L. Kh. Mukhambetova

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

Activities of glutamate-, succinate-, malate dehydrogenases and H^+ -ATPase were studied in liver tissue and these of malate- and glutamate dehydrogenases — in blood serum of rats which received nitrose dimethylamine (0.1, 1.0 and 10 mg per 1 l of water) within 2.5 and 10 months. Cyclic alterations in activities of malate- and succinate dehydrogenases were found in liver tissue of these rats, while the activities of glutamate dehydrogenase and H^+ -ATPase were changed depending on contraction and duration of the carcinogen effect. Unfavourable alterations in the functional state of mitochondrial enzymatic systems were increased according to intensity and duration of nitrose dimethylamine effect.

Г. В. Андреевко, Л. В. Подорожская, А. М. Федоров

О ЗНАЧЕНИИ ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ПНЕВМОНИЯХ, ОСЛОЖНЕННЫХ ЭКССУДАТИВНЫМИ ПЛЕВРИТАМИ У ДЕТЕЙ

МГУ им. М. В. Ломоносова

По существующим представлениям процесс воспаления осуществляется в результате взаимодействия между иммунной системой и системами ограниченного протеолиза (калликреин-кининовой, свертывающей, фибринолитической и компонентов комплемента). Одним из первых этапов образования воспалительного очага является появление отложенной фибрина, отграничивающих область воспаления. Этому процессу противостоит освобождение из лейкоцитов (гранулоцитов, моноцитов) протеолитических ферментов, направляющихся в место повреждения. Секретируемые протеиназы не только препятствуют отложению фибрина, но и вызывают гидролиз важных макромолекулярных структур ткани. Однако при наличии достаточного уровня ингибиторов протеолиза (α_1 -протеазный ингибитор, α_2 -макроглобулин, α_2 -антиплазмин, местносинтезируемые кислотостабильные ингибиторы) повреждающее действие протеиназ нейтрализуется [5, 6].

Легочная ткань наиболее богата фибринолитическими и тромбопластическими агентами, что, несомненно, сказывается на особенностях протекания легочных заболеваний, в частности пневмонии. При присоединении к пневмонии плеврита ход и развитие воспаления определяются процессами, происходящими в легком и плевральной полости, а также реактивностью организма.

Целью данной работы явилось изучение фибринолитической системы в крови и плевральной полости при различных типах плевритов у детей и оценка значения процесса фибринолиза в развитии деструктивных процессов в легких, а также роли фибринолитической системы при особой клинической форме плеврита — метаневмоническом.

Методика

Показатели фибринолиза гемостаза в крови и плевральном экссудате изучали у 71 ребенка с синипневмоническим плевритом

(СПП) и у 18 детей с метаневмоническим плевритом (МПП). СПП развивались одновременно с пневмонией, МПП возникали на фоне обратной динамики пневмонии и сопровождались новым подъемом температуры до фебрильных цифр, снижением лейкоцитаза и повышением СОЭ. В группу сравнения вошли 25 детей с острой респираторной вирусной инфекцией (ОРВИ) в стадии выздоровления и 26 детей с острой пневмонией (ОП).

Исследовали следующие биохимические показатели: содержание фибриногена по методу Бидвелл в модификации Г. В. Андреевко, фибринолитическую активность (ФА) на стандартных фибриновых пластинах по методу Аструпа, содержание антитромбина III (АТ III) по методу Абильтгарда, ФА эуглобулиновой фракции по методу Ниверевского, концентрацию растворимых комплексов фибрин — мономера (РКФМ) по методу Стахурской и соавт., уровень продуктов деградации фибрина, фибриногена (ПДФ) по методу Наннинга и Гест в модификации Г. В. Андреевко и Л. В. Подорожской [3], уровень антиплазминов по методу Ниверевского в модификации В. Е. Пасторовой [7], содержание плазминогена по А. И. Грицкову [2], неферментативный фибринолиз (НФ) по методу Б. А. Кудряшова и Л. А. Ляпиной [1].

Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены показатели системы фибринолиза и гемостаза у детей при различных формах плеврита, пневмонии и ОРВИ. В отдельную группу выделены дети с пневмонией и плевритом, течение заболевания которых осложнилось деструкцией легких.

Как видно, начало всех клинических форм воспалений у детей сопровождалось увеличением содержания фибриногена до 7,53 г/л и подавлением ФА до 0 мм². Это торможение ФА обусловлено не только появлением в кровотоке избыточного количества ингибиторов фибринолиза — антиплазминов (до 131—160%), но и уменьшением уровня активатора плазминогена и его субстрата плазминогена. Изменения, зарегистрированные в кровотоке в начале заболевания, свидетельствуют о «благоприятном» соотношении процесса фибринолиза и его подавления, что способ-

Показатели системы фибринолиза в гемстазе у детей с инфекционными поражениями

Исследуемая группа	Продолжительность болезни, нед	Содержание фибриногена, г/л	РКФМ, г/л	ФА	Время лизиса эуглобулинов, мин	ПДФ, г/л	Уровень антиплазмина, %	Соержание плазминогена, %	АТ III, %	НФ
Норма ОРВИ ОП	—	2,0—4,0 2,92±0,05 6,0±0,69*	0,01—0,05 0,02±0,01 0,06±0,01	5—25 25±11,9 12,5±8,1*	120—180 182±18,5 267±18*	0—0,02 0,02±0,004 0,03±0,003*	10 12,9±1,8 35,8±11,4	5—90 39,0±11,6 47,5±12,0*	0—100 86,2±6,6 91,7±3,5*	6—30 30±9,3 30,6±7,5*
СПП	3—5	3,83±0,50* 7,50±1,70* 3,70±0,30*	0,09±0,03* 0,12±0,02* 0,10±0,03*	18,6±16,6 19,6±1,5* 13,3±5,0	145±28 233±11* 219±19*	0,02±0,005 0,03±0,007* 0,03±0,007*	14,3±15,7* 34,0±4,0 37,8±7,4	96,5±8,5* 88,7±5,0* 93,1±10,4*	93,1±7,5* 96,5±8,5* 91,5±10,4*	21—48 21,2±4,8 21,1±4,8
Деструкция	3—5	3,24±0,74* 3,80±0,40* 4,22±0,30*	0,17±0,12* 0,24±0,05* 0,25±0,11*	32,0±15,0 23,6±10,7 46,5±10,7	161±23* 172±30 140±17	0,02±0,004* 0,03±0,007* 0,03±0,005*	31,0±7,6 33,5±5,1* 59,3±9,2	32,9±13,6 43,0±9,1 63,0±16,5	86,9±11,2 94,4±5,2 92,7±7,6	112—150 120±33 120±33
МПП	3—5	3,85±0,73* 6,90±0,83* 3,10±0,40*	0,14±0,05* 0,23±0,01* 0,10±0,03*	63,0±6,4 1,1±0,1 7,9±3,4	148±16 10,4* 210±16	0,045±0,005* 0,05±0,010* 0,02±0,005*	51,0±14,6* 39,4±19,2 04,0±5,7*	82,0±6,2 43,0±9,1 82,0±16,5	67,2±9,7* 74,3±3,4* 83,0±3,1*	60—90 60±20 60±20

ствует созданию четко отграниченного воспалительного очага. Уже ко 2-й неделе заболевания исследуемые показатели приближались к нормальным величинам в группах детей с ОП и ОРВИ, но продолжали прогрессировать в группах с деструкцией легких и МПП.

У больных с деструкцией легких усиливалась активация фибринолиза — в кровотоке выделялось избыточное количество активатора плазминогена, возрасстал уровень плазминогена. Усиленный протеолиз фибрина реализовывался в виде появления в крови избытка ПДФ. Таким образом, в этой группе детей расширение границ и интенсивности воспалительного процесса (вылоть до распада тканевых структур легкого) сопровождается чрезмерным развитием фибринолитической активности в кровотоке. Фибринолиз здесь выступает как фактор агрессии, который не может нейтрализовать значительное (до 160%) повышение уровня ингибиторов фибринолиза.

Каков механизм гиперфибринолиза при деструктивных изменениях? Вероятно, возможны два объяснения чрезмерному развитию ФА при деструкции. С одной стороны, это пассивное вымывание фибринолитических агентов из богатой ими ткани легкого, что регистрируется как гиперплазминемия, в то время как область деструкции еще не различима рентгенологически. С другой — это освобождение фибринолитических и протеолитических ферментов из лейкоцитов и тромбоцитов, накапливающихся в большом количестве в зоне воспаления.

В табл. 2 представлены данные, свидетельствующие в пользу лейкоцитарного происхождения ФА в экссудатах. Как видно, экссудат содержит те же компоненты, что и плазма крови, однако они находятся в других количественных соотношениях. Отсутствие корреляции между содержанием белков в плазме крови и экссудате говорит о существенном вкладе в состав экссудата местных локальных факторов серозных оболочек плевральной полости. Уровень ФА незначителен, что соответствует литературным данным [4]. Однако ФА существенно выше у больных с деструкцией легких (до 26,3 мм²). Более высокие цифры ПДФ, РКФМ, неферментативного фибринолиза в этой группе детей свидетельствуют о значительной активации в экссудате процессов как

Таблица 2

Показатели свертывающей, фибринолитической систем и цитоза в экссудате при различных клинических формах плевритов у детей

Форма плеврита	Содержание фибриногена, г/д	РКФМ, г/д	ФА, мм ²	ПДФ, г/л	АТ III, %	Содержание плазминогена, %	НФ, мм ²	Уровень антиплазмина, %	Цитоз, клетки/мкл
СПП серознофибринозный (n = 16)	0,66±0,35	0,16±0,03	4	0,05±0,02	48,9±14,3	30,5±9,3	73,3±22,9	117,4±9,5	4 354±127
СПП гнойный (n = 9)	0,80±0,4	0,14±0,04	7	0,07±0,02	41±39,5	35,7±13,7	12,0±4,7	125,2±11,5	6 660±2 500
Деструкция легких (n = 19)	0,3±0,12	0,35±0,05	26,3	0,15±0,07	40,5±7,1	34,6±5,0	84,1±9,2	129,4±7,7	14 483±10 064
МПП (n = 8)	0,46±0,14	0,06±0,01	0	0,03±0,006	25,3±11,8	13,2±9,8	14,5±7,8	106,1±9,0	624±24

Примечание. n — число больных.

фибринолиза, так и коагуляции. Источником фибринолитических ферментов в экссудате могут быть накапливающиеся в нем лейкоциты. Это подтверждают следующие факты: более часто встречающееся развитие деструкции легких при гнойном СПП, хорошая корреляция между активностью фибринолиза в экссудате (по времени лизиса эуглобулинового сгустка) и количеством лейкоцитов в нем ($r = -0,504$); наиболее высокий уровень цитоза при деструктивных изменениях в легочной ткани.

Таким образом, приведенные данные показывают, что если чрезмерная активность фибринолиза не компенсирована достаточным количеством ингибиторов, то она может выступать как фактор риска развития деструктивных изменений в легочной ткани. Больные при таких условиях нуждаются в мероприятиях, корригирующих эти изменения, включая введение антипротенназных препаратов.

Для МПП, наоборот, характерно значительное торможение фибринолитической активности крови не только на I-й неделе заболевания, но и в последующее время с длительным периодом восстановления (см. табл. I). Продолжительное подавление ФА совпадает с долговременным существованием нерастворившихся фибриновых шварт в плевральной полости, с которыми дети иногда выписываются из клиники. Отсутствие ФА свойственно и плевральному экссудату при МПП, который всегда имеет серозно-фибринозный характер с низким цитозом и более сниженными другими показателями. Плевральная полость выстлана массивными отложениями фибрина. По-видимому, при МПП торможение фибринолиза является фактором длительного сохранения воспалительного очага в плевральной полости. Имеющиеся в нашем распоряжении биохимические данные не позволяют объяснить глубокую депрессию фибринолитической и протенназной активности крови и экссудата при МПП. Небольшое количество лейкоцитов в экссудате и возможна адсорбция агентов фибринолиза и коагуляции на отложения фибрина едва ли могут быть основными факторами, объясняющими стойкое исчезновение активатора плазминогена из кровеносного русла. В последнее время появились сведения, позволяющие рассматривать МПП как особую нозологическую форму бронхо-

легочного воспаления, в основе которой лежат гиперфункция иммунной системы и резкое возрастание комплексов антиген — антитело в циркуляции [8]. Не исключено, что антигенами могут быть и фибринолитические агенты, содержащиеся в большом количестве в легочной ткани.

Приведенные данные свидетельствуют об активном участии процесса фибринолиза в возникновении и протекании пневмонии с экссудативными плевритами у детей: при формировании деструктивных осложнений он является фактором, способствующим деструкции; при появлении метапневмонического плеврита торможение фибринолиза способствует более длительному течению заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А. // Лаб. дело. — 1981. — № 6. — С. 326.
2. Лабораторные методы исследования системы гемостаза / Балуда В. П., Баркаган З. С., Гольдберг Е. Д. и др. — Томск, 1980.
3. Методы исследования фибринолитической системы крови / Под ред. Г. В. Андреевко. — М., 1981.
4. Никитин Ю. П., Леденева О. А. // Арх. пат. — 1973. — № 11. — С. 49—54.

5. Оглоблина О. Г. // Биохимия. — 1982. — Т. 47, № 10. — С. 1587—1600.
6. Оглоблина О. Г. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 1. — С. 3—13.
7. Пасторова В. Е., Ковалев С. В. // Там же. — 1976. — № 2. — С. 240—244.
8. Панасюк Н. Л. Особенности течения синпневмонических и метапневмонических плевритов у детей: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 1986.

Поступила 11.11.85

IMPORTANCE OF THE FIBRINOLYTIC SYSTEM IN PNEUMONIA COMPLICATED BY EXUDATIVE PLEURISY

G. V. Andreenko, L. V. Podorol'sky, A. M. Fedorova

M. V. Lomonosov State University, Moscow

Phasic alterations in fibrinolytic activity were found in blood plasma of children with pneumonia complicated by exudative pleurisy. Hypercoagulation and inhibition of fibrinolytic activity were observed at the beginning of the disease. Hypercoagulation and an increase in the fibrinolytic activity occurred during restoration. In the children with lung destruction the fibrinolytic activity was increased in blood and in exudates before the appearance of roentgenologic indications of the destructive alterations. The fibrinolytic activity was inhibited in children with metapneumonic pleurisy formed during pneumonia and characterized by long-term and severe course. Role of fibrinolysis as possible pathogenetic factor responsible for development of complications is discussed.

УДК 615.256.54.015.42:618.14-018.61-008.924.1

М. Д. Курский, О. П. Шинлова, В. П. Фомин, С. А. Костерин

ВЛИЯНИЕ СТИМУЛЯТОРОВ СОКРАЩЕНИЯ МАТКИ НА АКТИВНЫЙ И ПАССИВНЫЙ ТРАНСПОРТ Ca^{2+} ВО ФРАКЦИИ САРКОЛЕММЫ МИОМЕТРИЯ

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

Катионам Ca^{2+} принадлежит существенная роль в обеспечении взаимодействия актина и миозина в гладких мышцах и, в частности, в миометрии [2, 12]. Повышение концентрации Ca^{2+} в диапазоне 10^{-8} — 10^{-5} М активирует сокращение, а понижение — стимулирует релаксацию гладкой мышцы матки [8, 9]. Внутриклеточный гомеостаз Ca^{2+} в миометрии обеспечивается системами пассивного и активного транспорта катиона, локализованными в плазматической мембране и субклеточных структурах [3, 4]. Доказано, что ряд физиологически активных веществ, стимулирующих сократительный эффект миометрия (окситоцин, простагландин и др.), обладают способностью ингибировать активность кальциевого насоса сарколеммы или (и) активировать пассивное поступление катиона в миоплазму [7, 11].

В настоящее время для усиления сократительной активности матки и преодоления ее инертности в родах в медицинской практике широко используются такие фармакологические препараты, как хинин, сибутин, пахикарпин и изоверин [1, 6]. Роль этих веществ в регуляции кальциевого обмена в миометрии не исследована. Цель данной работы заключалась в изучении влияния указанных фармакологических агентов на активный и пассивный транспорт

др.), обладают способностью ингибировать активность кальциевого насоса сарколеммы или (и) активировать пассивное поступление катиона в миоплазму [7, 11].

Ca^{2+} во фракции везикул сарколеммы миометрия.

Методика

Фракцию везикул сарколеммы миометрия коров выделяли, как описано ранее [5]. Содержание белка находили по Лоури [10]. Чистоту фракции оценивали электронно-микроскопически и по активности ферментов-маркеров. Результаты определения активности ферментов-маркеров Na^+ , K^+ -АТФазы и Mg^{2+} -АТФазы до и после обработки мембранного препарата дигитонином указывают на то, что фрагменты сарколеммы на 50% (по белку) состояли из везикулярных структур, замкнутых цитоплазматической стороной наружу. Остальные фрагменты были представлены невезикулярными структурами.

Активное накопление Ca^{2+} изучали в среде, содержащей 10 мМ HEPES (pH 7,0 при 37 °C), 160 мМ KCl, 5 мМ АТФ, 10^{-5} М $^{40}\text{CaCl}_2$ - $^{45}\text{CaCl}_2$ (0,1 мкКи/мл), 30 мМ Na-фосфатного буфера pH 7,0 при 37 °C, 50 мкг белка мембранного препарата. Объем инкубационной среды 0,5 мл, время инкубации 15 мин, температура 37 °C. Реакцию начинали внесением в среду инкубации препарата белка, а останавливали добавлением к ней 3 мл охлажденного раствора, содержащего 10 мМ трис-малеат / NaOH (pH 7,0 при 4 °C), 340 мМ сахарозы, с последующим фильтрованием через мембранные фильтры и промывкой фильтров 3 мл среды того же состава. Контрольные пробы не содержали АТФ.

Пассивный транспорт Ca^{2+} изучали, предварительно нагружая везикулы $^{45}\text{CaCl}_2$ в среде, содержащей 160 мМ KCl, 10 мМ HEPES (pH 7,0 при 37 °C), 1 мМ ЭГТА, $5 \cdot 10^{-8}$ М валиномицина. Время инкубации 5 мин, объем инкубационной среды 0,5 мл, температура 37 °C. Выход Ca^{2+} останавливали добавлением 3 мл раствора, содержащего 340 мМ сахарозы, 1 мМ LaCl_3 , 10 мМ трис-малеат / NaOH (pH 7,0 при 4 °C), с последующим фильтрованием через мембранные фильтры, которые дважды промывали 3 мл этого же раствора.

Во всех экспериментах фармакологические препараты вносили непосредственно в среду инкубации.

При исследовании влияния различных концентраций кальция внутри везикул на скорость его освобождения без хинина и в его присутствии мембранный препарат нагружали изотопом, как описано выше, однако среда загрузки содержала 0,1—2,0 мМ $^{40}\text{CaCl}_2$ - $^{45}\text{CaCl}_2$ (1—20 мкКи/мл). Выход катиона из везикул инициировали способом, описанным выше, время инкубации составляло 1 мин. Хининзависимую компоненту пассивного выхода определяли по разнице между кривыми, полученными в отсутствие и в присутствии 10 мМ хинина.

Изучение влияния сигетина при различных концентрациях ионизированного Ca на процесс его аккумуляции проводили в среде

инкубации, содержащей 50 мМ трис-HCl pH 7,5 при 30 °C, 1 мМ АТФ, 3 мМ MgCl_2 , 10^{-4} М ЭГТА и $^{40}\text{CaCl}_2$ - $^{45}\text{CaCl}_2$ в диапазоне 10^{-6} — 10^{-3} М (0,01—10 мкКи/мл). Реакцию начинали внесением белка мембранного препарата (100 мкг). Время инкубации 3 мин, объем инкубационной среды 1 мл, температура 30 °C. Реакцию останавливали посредством быстрого фильтрования. Фильтры промывали 5 мл раствора, содержащего 50 мМ трис-HCl-буфера (pH 7,5 при 22 °C), 160 мМ HCl. Значения концентрации ионизированного Ca рассчитывали, как описано ранее [3].

Влияние хинина и сигетина на стабильность K^+ -диффузионного потенциала изучали с помощью потенциалочувствительного флуоресцентного зонда diS-C₃(5) в Институте биофизики АН СССР на специальной флуориметрической установке. K^+ -диффузионный потенциал (≈ 58 мВ) формировали, помещая аликвотную порцию везикул, уравновешенных со 160 мМ KCl, 10 мМ HEPES (pH 7,0), в изотоничную среду, содержащую 16 мМ KCl, 144 мМ хлорида и $5 \cdot 10^{-8}$ М валиномицина. В исследуемых концентрациях хинина и сигетина не влияли на флуоресценцию diS-C₃(5). Длины волн возбуждения и флуоресценции составляли 578 и 660 нм соответственно.

В опытах использовали фильтры «Suprag» диаметром 0,3 мк фирмы «Сметарол» (ЧССР). Радиоактивность фильтров измеряли на жидкостном сцинтиляционном спектрометре фирмы «Beckman» (США).

В работе использованы следующие реактивы: АТФ, трис(гидроксиэтиламин)метан) фирмы «Reanal» (Венгрия), ЭГТА — «Fluka» (Швейцария), HEPES — «Sigma» (США); остальные реактивы были отечественного производства квалификаций ч. д. а. и х. ч.

Результаты и обсуждение

Показано, что пахикарпин и изоверин не оказывали существенного влияния на Mg, АТФ-зависимый транспорт Ca^{2+} в везикулах сарколеммы миометрия (данные не приведены). Сигетин в диапазоне концентраций 10^{-6} — 10^{-4} М не подавлял накопления Ca^{2+} , но при концентрациях выше 10^{-3} М снижал уровень Mg, АТФ-зависимой аккумуляции катиона на 65% (рис. 1). Хинин (10^{-6} — 10^{-3} М) не влиял на активный транспорт Ca^{2+} и только при концентрации 10^{-2} М на 32% подавлял накопление катиона. Чем же обусловлено снижение аккумуляции катиона: ингибированием активности кальциевого насоса или увеличением пассивной проницаемости мембранных везикул для ионов Ca? Для решения этого вопроса было изучено влияние исследуемых веществ на пассивный транспорт Ca^{2+} во фракции везикул сарколеммы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что пахикарпин, изоверин и сигетин в концентрациях 10^{-6} — 10^{-2} М не влия-

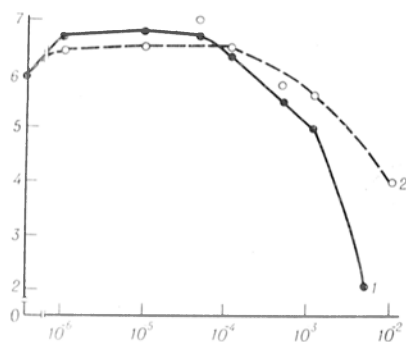


Рис. 1. Влияние сигетина (1) и хинина (2) на Mg, АТФ-зависимое накопление $^{45}\text{Ca}^{2+}$ везикулами сарколеммы миомертия.

По оси ординат — накопление Ca^{2+} (в нмоль на 1 мг белка за 15 мин). Здесь и на рис. 2 и 5 по оси абсцисс — концентрация препаратов (в М).

ли на пассивный выход Ca^{2+} из везикул плазматических мембран миомертия. Только хинин при концентрации более 10^{-3} М резко усиливал этот процесс, тогда как в присутствии 10^{-3} М сигетина скорость выхода катиона не отличалась от контрольных значений (рис. 2).

Хинин в концентрации 10 мМ вызывал также освобождение Ca^{2+} из везикул, в которых катион был накоплен посредством Mg, АТФ-зависимого процесса (рис. 3). Изменение скорости хининзависимого выхода Ca^{2+} из везикул сарколеммы от концентрации в них катиона подчиняется кинетическим закономерностям простой диффузии — процесс не характеризуется насыщением по субстрату переноса (рис. 4).

Это свидетельствует о том, что хининзависимый выход Ca^{2+} из везикул осуществляется не по канальным структурам, а за счет увеличения неспецифической проницаемости мембран к Ca^{2+} . Этим же, по-видимому, объясняется и

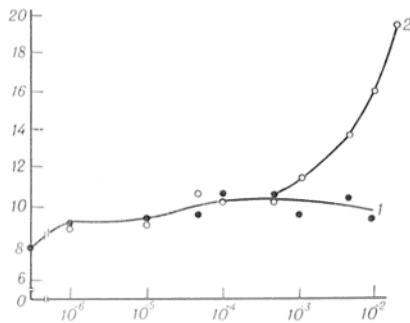


Рис. 2. Влияние сигетина (1) и хинина (2) на пассивный выход $^{45}\text{Ca}^{2+}$ из везикул сарколеммы миомертия.

По оси ординат — выход Ca^{2+} (в нмоль на 1 мг белка за 5 мин).

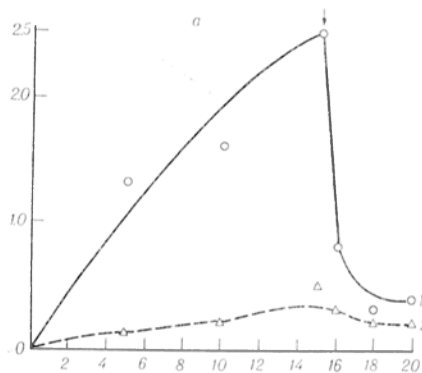


Рис. 3. Влияние хинина на освобождение предварительно аккумуляированного $^{45}\text{Ca}^{2+}$ из везикул сарколеммы миомертия.

По оси абсцисс — время инкубации (в мин), по оси ординат — выход Ca^{2+} (в нмоль на 1 мг белка). 1 — контроль; 2 — хинин. Стрелкой указан момент введения хинина.

ингибирующее влияние хинина (более 10^{-4} М) на уровень энергозависимого накопления Ca^{2+} везикулами сарколеммы, определяемый двумя противоположно направленными процессами: Mg, АТФ-зависимым накоплением и пассивным выходом Ca^{2+} из везикул по градиенту концентрации. Вероятно, снижение в присутствии хинина (10^{-2} М) уровня аккумуляированного в везикулах сарколеммы Ca^{2+} является следствием увеличения неспецифической проницаемости плазматической мембраны для этого катиона.

Сигетин не влиял на пассивный выход Ca^{2+} из везикул, но подавлял активное накопление в них катиона. По-видимому, сигетин непосредственно воздействует на систему активного транспорта Ca^{2+} . Характер зависимости начальной скорости Mg, АТФ-зависимого накопления Ca^{2+} от концентрации субстрата переноса свидетельствует о том, что сигетин в 2 раза уменьшает значение V_{max} и практически не влияет на величину K_m (0,3—0,5 мкМ), т. е. является неконкурентным ингибитором кальциевого насоса сарколеммы миомертия (рис. 5).

В связи с предположением о том, что хинин увеличивает неспецифическую проницаемость плазматической мембраны клеток миомертия для Ca^{2+} , а сигетин не влияет на нее, представляло интерес выяснить, могут ли хинин и сигетин нарушать целостность мембранных везикул. С этой целью исследовали действие этих веществ на диссипацию K^+ -валяномицинового мембранного потен-

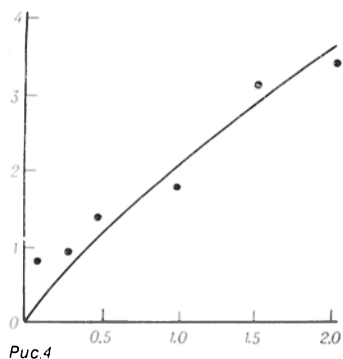


Рис. 4

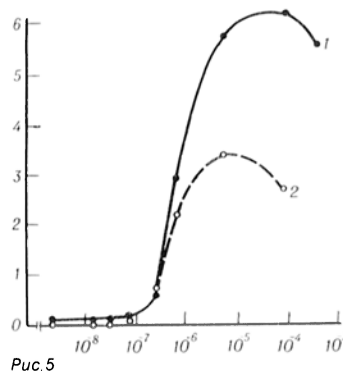


Рис. 5

Рис. 4. Хининзависимый пассивный выход $^{45}\text{Ca}^{2+}$ из везикул сарколеммы миометрии.

По оси ординат — выход Ca^{2+} (в нмоль на 1 мг за 1 мин).

Рис. 5. Влияние сигетина на Mg , АТФ-зависимое накопление различных концентраций $^{45}\text{Ca}^{2+}$ везикулами сарколеммы миометрии.

По оси ординат — накопление Ca^{2+} (в нмоль на 1 мг белка за 3 мин). 1 — контроль; 2 — с сгетин.

циала в везикулах плазматической мембраны. Хинин (10^{-4} М) стимулировал диссипацию потенциала, возникающего как следствие формируемого градиента ионов K^{+} и регистрируемого по флюоресценции потенциалоочувствительного флюоресцентного зонда $\text{diS-C}_3(5)$. Аналогичная концентрация сигетина не вызывала диссипации потенциала. Отсюда следует, что сброс мембранного потенциала обусловлен резким повышением неспецифической проницаемости сарколеммы под воздействием хинина, но не сгетина.

Вывод о действии хинина на неспецифическую проницаемость сарколеммы миометрии, не индуцируемую каким-либо рецепторным взаимодействием, подтверждается и опытами по изучению влияния этого вещества на K^{+} -валиномициновый диффузионный потенциал, создаваемый на мембране лецитиновых липосом. После добавления к препарату липосом хинина (10^{-4} М) потенциал мгновенно диссипировал, следствием чего является увеличение флюоресценции зонда.

Итак, из четырех исследованных веществ два (пахикарпин и изоверин) не оказывали влияния на системы активного и пассивного транспорта Ca^{2+} во фракции везикул сарколеммы миометрии. Этот результат вполне объясним, так как эти препараты оказывают контрактильное действие на мускулатуру матки на уровне вегетативной нервной системы [1, 6].

Хинин в диапазоне концентраций 10^{-3} — 10^{-2} М резко увеличивал скорость пассивного выхода Ca^{2+} из везикул сарколеммы, тогда как сгетин в том же диапазоне концентраций не влиял на этот процесс. Тот факт, что хинин усиливает скорость выхода ионов Ca^{2+} , накопленных путем пассивного уравни-

вания либо в АТФ-зависимом процессе, свидетельствует об увеличении кальциевой проницаемости мембранных везикул. Хинин повышает неспецифическую проницаемость сарколеммы, что подтверждается опытами по изучению диссипации K^{+} -диффузионного потенциала в присутствии этого вещества (данные не приведены). Таким образом, хинин увеличивает проницаемость сарколеммы не только для Ca^{2+} , но и для одновалентных катионов, тогда как сгетин не оказывает подобного влияния.

Сгетин в отличие от хинина неконкурентно ингибирует АТФ-зависимый транспорт Ca^{2+} . Как показали предварительные эксперименты, этот препарат (2 мМ) на 40—50% снижал активность $(\text{Mg}^{2+}, \text{Ca}^{2+})$ -АТФазы, выделенной из сарколеммы миометрии (эксперименты на препарате очищенной $(\text{Mg}^{2+}, \text{Ca}^{2+})$ -АТФазы проведены Н. Н. Слинченко, отдел биохимии мышц Института биохимии АН УССР). Можно полагать, что действие сгетина как стимулятора сокращения гладкой мышцы матки опосредуется подавлением активности системы Mg , АТФ-зависимого выброса Ca^{2+} из клеток миометрии в межклеточное пространство.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бакшеев Н. С., Орлов Р. С. Сократительная функция матки. — Киев, 1976.
2. Данилова В. М. // Механизмы контроля мышечной деятельности. — Л., 1985. — С. 128—147.
3. Костерин С. А., Браткова Н. Ф., Курский М. Д. // Биохимия. — 1985. — Т. 50, № 8. — С. 1350—1361.
4. Костерин С. А., Курский М. Д. // Укр. биохим. журн. — 1985. — Т. 57, № 5. — С. 100—116.
5. Курский М. Д., Костерин С. А., Браткова Н. Ф. и др. // Биохимия. — 1981. — Т. 46, № 8. — С. 1435—1444.

6. Михайленко Е. Т. Слабость родовой деятельности. — Киев. — 1978.
7. Batra S. // *Europ. J. Pharmacol.* — 1986. — Vol. 120. — P. 57—61.
8. Godfraind T., Miller R. C. // *Calcium and Contractility* / Ed. A. K. Grover, E. E. Daniel. — Clifton, 1985. — P. 93—117.
9. Loutzenhizer R., Leyten P., Saidu K., van Breemen C. // *Ibid.* — P. 61—92.
10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // *J. biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
11. Popescu L. M., Nutu O., Panoiu C. // *Biosci. Rep.* — 1985. — Vol. 5. — P. 21—28.
12. Silver P. J., Stull J. T. // *Calcium Blockers: Mechanisms of Action and Clinical Applications* / Ed. S. F. Flaim, R. Zelis. — Baltimore, 1982. — P. 37—51.

EFFECT OF DRUGS STIMULATING UTERINE CONTRACTION ON ACTIVE AND PASSIVE Ca^{2+} TRANSPORT IN MYOMETRIUM SARCOLEMMMA

M. D. Kursky, O. P. Shinlova, V. P. Fomin,
S. A. Kosterin

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

Effect of drugs (quinine, sigetine, isoverine and pachycarpine) stimulating uterine contraction on active and passive Ca^{2+} transport was studied in cow myometrium sarcolemma. Isoverine and pachycarpine at concentrations 10^{-6} – 10^{-2} M did not affect the systems of Ca^{2+} transport. Quinine at concentrations above 10^{-3} M decreased the rate of Mg^{2+} ATP-dependent accumulation of Ca^{2+} and stimulated passive elimination of the cation from vesicles due to an increase in unspecific permeability of myometrial sarcolemma. Sigetine (10^{-6} – 10^{-2} M) did not affect the Ca^{2+} passive transport but inhibited uncompetitively the Mg^{2+} ATP-dependent accumulation of Ca^{2+} in sarcolemmal vesicles. Effect of sigetine as a stimulator of the uterine contractile activity is apparently based on inhibition of the calcium pump in plasmatic membrane of myometrial cells.

Поступила 27.04.87

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 616-008.939.631-055.5/.7-06:[616.71-007.17+616.899]-079.4

Т. В. Лебедева, О. Н. Одинокова, К. Д. Краснопольская,
М. И. Фрейдин

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЛЮОРОМЕТРИЧЕСКОГО ТИТРОВАНИЯ В МЕТОДЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ КООПЕРАЦИИ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ МУКОПОЛИСАХАРИДОВ

Институт медицинской генетики АМН СССР, Москва

Мукополисахаридозы (МПС) относятся к разряду сублетальных наследственных болезней обмена, для которых характерно внутриклеточное накопление гликозаминогликанов (ГАГ) и не существует эффективных методов терапии [7, 9]. Дифференциальная клиническая диагностика МПС невозможна вследствие перекрытия клинико-биохимических фенотипов внутри этой группы, включающей в себя мутации не менее 10 различных локусов. Идентификация первичного биохимического дефекта в группе МПС является важнейшей задачей медико-генетического кон-

сультирования отягощенных семей и пренатальной диагностики. Биохимическая программа локусной дифференциации МПС [3] включает в себя методы энзимодиагностики [2], а при отсутствии искусственных субстратов для определения активности мутантного фермента — метод метаболической кооперации [5]. Использование этого метода основано на коррекции дефекта деградации ГАГ при сокультивировании клеток больных, имеющих мутации в различных локусах, результатом чего является снижение уровня накопления ГАГ в сокультивируемых клетках [8].

Стандартный метод метаболической кооперации предусматривает определение количества накопленных в клетках ГАГ по включению радиоактивного изотопа ^{35}S [5]. При идентификации первичного биохимического дефекта в группе МПС III (А, В, С, D) разрешающая способность стандартного метода часто оказывается недостаточной, так как для этой группы МПС характерно умеренное накопление внутриклеточных ГАГ, незначительно отличающееся от нормы. Таким образом, повышение точности и разрешающей способности метода метаболической кооперации для дифференциации различных типов МПС и пренатальной диагностики этих заболеваний является актуальной задачей. Предлагаемый флюорометрический метод основан на изменении флюоресценции 4,6-диамидино-2-фенилиндол.2HCl (ДАФИ) при его электростатическом взаимодействии с ГАГ [11].

Методика

Работа проводилась на культурах кожных фибробластов (ККФ) обследуемых больных МПС и здоровых доноров, а также на эталонных штаммах кожных фибробластов больных с установленными типами МПС, полученными из международной организации Human Genetic Mutant Cell Repository. ККФ больных и здоровых доноров получали по методу, описанному ранее [4], штаммы хранили в клеточном банке в Институте медицинской генетики АМН СССР. Далее клетки выращивали, как описано в работе [5]. Для определения внутриклеточного накопления ГАГ методом флюорометрического титрования клетки высевали на пластиковые чашки Петри диаметром 30 мм («Flow», Англия) в количестве 400 000 клеток на чашку в 2 мл ростовой среды с добавлением NEPEs («Flow») в конечной концентрации 20 мМ (рН 7,2). Через 6 сут культивирования в атмосфере, содержащей 5% CO_2 , клетки снимали и обрабатывали для получения осадков ГАГ, как описано ранее [6]. Флюорометрическое титрование проводили, как описано в работе [11]. Коэффициент накопления ($K_{\text{нак}}$) определяли как отношение количества ГАГ в тестируемых клетках к количеству их в клетках здорового донора. При проведении метаболической кооперации клетки сокультивируемых штаммов высевали по 200 000 клеток каждого из двух штаммов на чашку Петри. Исправление дефекта деградации ГАГ ($K_{\text{исп}}$) оценивали по отношению количества внутриклеточных ГАГ в клетках больного к количеству их в сокультивированных клетках.

Результаты и обсуждение

Сравнение возможностей стандартного радиоизотопного метода и метода

флюорометрического титрования для определения накопления ГАГ показало, что $K_{\text{нак}}$ в ККФ больных МПС в опытах с использованием флюорозонда существенно выше, чем при использовании стандартного метода. $K_{\text{нак}}$ для МПС II ($n = 20$) и МПС III ($n = 8$) при радиоизотопном методе определения ГАГ составляли $3,22 \pm 0,31$ и $1,71 \pm 0,11$ соответственно. При использовании метода флюорометрического титрования эти коэффициенты были значительно выше — $8,35 \pm 0,29$ и $2,24 \pm 0,05$ соответственно. Это можно объяснить тем, что второй метод позволяет измерять абсолютное количество ГАГ, накопленное во внутриклеточной фракции ККФ как за 6 сут культивирования в опыте, так и за все время предшествовавшей жизни клеток; радиоизотопный метод маркирует только определенную часть ГАГ (поскольку у клеток есть альтернативный источник немеченых сульфатных групп вследствие присутствия в обычной среде MgSO_4), вновь синтезированных за 3 сут эксперимента. Таким образом, метод флюорометрического титрования позволяет более точно дифференцировать группу МПС I и II от группы МПС III, а эту последнюю от нормы, что важно для пренатальной диагностики этих заболеваний.

Метод флюорометрического титрования был применен параллельно со стандартным радиоизотопным методом для локусной дифференциации МПС у больных с подозрением на МПС I, II, III. Результаты, полученные при использовании этих методов, показывают преимущества метода флюорометрического титрования (см. таблицу). Метаболическая кооперация клеток от больных с различными типами МПС III при использовании радиоизотопного метода дает значения $K_{\text{исп}}$ в пределах 1,4—1,6, что совпадает с литературными данными [10]. При минимальных значениях $K_{\text{исп}}$ достоверно установить диагноз не представляется возможным. Применение метода флюорометрического титрования в этих случаях позволяло точно идентифицировать тип МПС III при значениях $K_{\text{исп}}$ в пределах 1,7—1,9.

Применение флюорометрического титрования может иметь важное значение для разработки методов пренатальной диагностики МПС, когда необходимы высокая точность и разрешающая способность метода. При использовании

Сравнительная характеристика результатов, полученных при использовании радиоизотопного и флюорометрического методов метаболической кооперации

Штамм	K _{исп.} полученные при культивировании исследуемых штаммов с другими штаммами				
	МПС I	МПС II	МПС IIIA	МПС IIIB	МПС IIIC
МПС I (n = 5)	—	$\frac{2,15 \pm 0,16}{4,74 \pm 0,05}$			
МПС II (n = 8)	$\frac{2,02 \pm 0,12}{3,57 \pm 0,03}$	—			
МПС IIIA (n = 4)			—	$\frac{1,58 \pm 0,04}{1,92 \pm 0,02}$	$\frac{1,43 \pm 0,04}{1,76 \pm 0,03}$
МПС IIIB (n = 3)			$\frac{1,51 \pm 0,06}{1,81 \pm 0,02}$		$\frac{1,48 \pm 0,05}{1,94 \pm 0,03}$
МПС IIIC (n = 1)			$\frac{1,56}{1,82}$	$\frac{1,63}{1,95}$	—

Примечание. В скобках указано число больных. В числителе — радиоизотопный метод, в знаменателе — метод флюорометрического титрования.

культивируемых клеток амниотической жидкости, отличающихся чувствительностью к различным средовым факторам, существенным преимуществом этого метода является то, что он не дает каких-либо токсических эффектов. Флюорометрическое титрование позволяет повысить разрешающую способность метода метаболической кооперации, что особенно важно для дифференциации группы МПС III.

Полученные данные позволяют считать, что применение флюорометрического титрования в методе метаболической кооперации может широко использоваться как для целей практического медико-генетического консультирования, так и для изучения метаболизма ГАГ в норме и при различных патологиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Горняк Л. Л., Краснопольская К. Д., Одиноква О. П. и др. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 5. — С. 48.
2. Краснопольская К. Д., Аронович Е. Л., Терехов С. М. // Там же. — 1982. — № 3. — С. 50—55.
3. Краснопольская К. Д., Лебедева Т. В., Одиноква О. П. и др. // Педиатрия. — 1985. — № 5. — М. 28—32.
4. Кухаренко В. И., Кулиев А. М., Гринберг К. П. и др. // Цитология. — 1974. — № 10. — С. 1228—1232.
5. Лебедева Т. В., Краснопольская К. Д., Фрейдин М. И. // Молек. генет. — 1984. — № 7. — С. 32—36.

6. Одиноква О. П., Бялик М. А., Краснопольская К. Д. и др. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 1. — С. 87—92.
7. Adinolfi M., Broun S. // Develop. Med. Child Neurol. — 1984. — Vol. 26. — P. 404—408.
8. Fratantoni J. C., Hall C. W., Neufeld E. F. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1968. — Vol. 60. — P. 699—706.
9. Gibbs D. A., Spellacy E., Tompkins R. et al. // J. Inher. Metab. Dis. — 1983. — Vol. 6. — P. 62—81.
10. Kresse H., Von Figura K., Klein U. // Europ. J. Biochem. — 1978. — Vol. 92. — P. 333—339.

Поступила 05.06.86

DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF MUCOPOLYSACCHARIDOSES USING FLUORIMETRIC TITRATION IN A PROCEDURE OF METABOLIC COOPERATION

T. V. Lebedeva, O. N. Odinkova, K. D. Krasnopol'skaya, M. I. Freidin

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

Content of intracellular glycosaminoglycans (GAG) was studied in a procedure of metabolic cooperation by means of the polysaccharides fluorimetric titration in order to differentiate between various types of mucopolysaccharidoses and to establish prenatal diagnosis of these diseases. The procedure involved electrostatic interaction of fluorochrome 4,6-diamidino-2-phenylindol. HCl with GAG's. As compared with the standard radiometric method of metabolic cooperation the procedure developed exhibited higher sensitivity, which is especially important for differentiation of the mucopolysaccharidoses III (A, B, C, D) and for prenatal diagnosis of these diseases.

А. В. Куликов, И. П. Воронова, Е. Ю. Жанаева

ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ ФЛЮОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ТРИПТОФАНГИДРОКСИЛАЗЫ В СТРУКТУРАХ МОЗГА

Институт цитологии и генетики СО АН СССР, Новосибирск

Триптофангидроксилаза (ТПГ) — фермент, катализирующий превращение L-триптофана в 5-окситриптофан, — является ключевым ферментом синтеза серотонина [6]. У млекопитающих этот фермент обнаружен в головном мозге, эпифизе и злокачественных опухолях тучных клеток [10].

Описанные в литературе чувствительные методы определения активности ТПГ довольно сложны и доступны только для специально оборудованных лабораторий [8, 9, 11], простые же методы не обладают достаточной чувствительностью [3, 5, 7]. Ранее [3] нами был разработан метод определения активности этого фермента, основой которого является флюориметрическое измерение количества продукта, образованного в результате действия двух ферментов — ТПГ, которая превращает L-триптофан в 5-окситриптофан, и декарбоксилазы ароматических L-аминокислот, которая превращает 5-окситриптофан в серотонин. Последний отделяют от L-триптофана, экстрагируя смесью бензола с бутанолом, и конденсируют с о-фталевым альдегидом в кислой среде для получения флюоресцирующего продукта.

Описанный метод имеет такие недостатки, как трудоемкость и недостаточная чувствительность. Поэтому он непригоден для определения активности фермента в малых объемах ткани и не может быть использован при анализе большого количества проб.

Нами разработана модификация этого метода, обладающая большей чувствительностью и значительно упрощающая процедуру определения активности ТПГ.

Методика

В работе использовали следующие реактивы: 0,05 М трис-ацетатный буфер pH 7,5, содержащий 10^{-3} М дитиотреитол; 0,5 М боратный буфер pH 10,0; $1,08 \cdot 10^{-3}$ М свежеприготовленный раствор кофактора ТПГ 2-амино-4-окси-6,7-диметил-5,6,7,8-тетрагидрибиоптерина — DMPN₄ («Calbiochem», Швейца-

рия), содержащий 10 мг каталазы («Calbiochem», Швейцария) в 1 мл трис-ацетатного буфера; 0,1% свежеприготовленный раствор L-цистеина в 0,1 н. HCl; $1,65 \cdot 10^{-3}$ М раствор пиридоксаль-5-фосфата — П-5-Ф («Reanal», ВНР) в 0,05 М трис-ацетатном буфере; декарбоксилазу ароматических L-аминокислот, приготовленную из почек свиньи [4] и хранящуюся в течение года при -40°C . Непосредственно перед опытом в раствор П-5-Ф добавляли декарбоксилазу из расчета 1 объемная часть препарата фермента на 4 объемные части раствора П-5-Ф; $4 \cdot 10^{-3}$ М раствор L-триптофана («Sigma», США) в 0,05 М трис-ацетатном буфере, свежеприготовленный; 4×10^{-3} % раствор о-фталевого альдегида в 10 н. HCl, свежеприготовленный; $1 \cdot 10^{-3}$ М раствор 5-окситриптофана, разбавленный в 100 раз в день опыта, а также бутанол и гептан квалификации х. ч. Для приготовления растворов использовали бидистиллированную воду.

Процедура определения. Животных декапитировали, на холоде быстро извлекали мозг и выделяли необходимые отделы, которые хранили в жидком азоте до определения. Навеску мозга гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в отношении 1:3 (масса / объем) с использованием холодного 0,05 М трис-ацетатного буфера в качестве суспендирующей среды (200 — 500 мкл), центрифугировали 15 мин при 20 000 g и в надосадочной фракции определяли активность фермента.

В пробирки с притертыми пробками вместимостью 15—20 мл заливали инкубационную среду, содержащую 100 мкл раствора кофактора и 100 мкл исследуемой фракции. Реакцию инициировали, добавляя 50 мкл раствора триптофана. Контрольные пробы вместо надосадков содержали 100 мкл буферного раствора, стандартные пробы — 50 мкл буферного раствора и 50 мкл раствора 5-окситриптофана. Предварительные опыты показали, что контрольные и стандартные пробы с надосадками, инактивированными кипячением, не отличаются от таковых с буферным раствором. Конечный объем инкубационной смеси 250 мкл.

Инкубацию проводили при 37°C и постоянном встряхивании. Реакцию останавливали, помещая пробы в кипящую воду на 3 мин. При этом ТПГ из ткани мозга полностью инактивировалась [7].

На следующем этапе 5-окситриптофан, получившийся в результате действия ТПГ на субстрат (триптофан), превращали в серотонин с помощью декарбоксилазы. Для этого в охлажденные пробы добавляли по 50 мкл раствора П-5-Ф, содержащего препарат декарбоксилазы (активность 5 нмоль серотонина / 1 мин). Пробы перемешивали и инкубировали 15 мин при 37°C . Реакцию

Модификация	Исследуемый параметр	Исходный метод	Модифицированный метод
Исключение стадии депротенинизации и связанных с ней последующих стадий	Активность ТПГ в стволе мозга мышей линии DD, нмоль/мин на 1 мг белка	$40,8 \pm 1,69$ (6)	$42,3 \pm 1,02$ (5)
Сокращение времени декарбоксилирования с 60 до 15 мин	Количество серотонина, нмоль	$0,5 - 0,7$	$0,6 - 0,7$
Замена 2-меркаптоэтанола на дитиотреитол	Активность ТПГ в полунаряях мозга мышей линии СЗН/Не, нмоль/мин на 1 мг белка	$19,8 \pm 0,67$ (10)	$18,5 \pm 0,46$ (10)
Замена смеси бензола с бутанолом (1:1) смесью гептана с бутанолом (2:1)	Выход серотонина из щелочной среды, %	100	$107 \pm 2,7$ (7)

Примечание. В скобках указано число определений.

останавливали, приливая 1 мл боратного буфера. Серотонин отделяли от L-триптофана экстрагированием смесью гептана с бутанолом (2:1): к каждой пробе приливали 6 мл смеси, встряхивали 10 мин и центрифугировали 5 мин при 2000 g. При этом серотонин переходил в органическую фазу. 5,5 мл органической фазы переносили в пробирки с 300 мкл L-цисттина, встряхивали 10 мин, центрифугировали 5 мин при 2000 g. При этом серотонин переходил в водную фазу. Органическую фазу осторожно удаляли с помощью водоструйного насоса. 200 мкл водной фазы переносили в пробирки вместимостью 5 мл, добавляли 750 мкл о-фталевого альдегида, тщательно перемешивали и помещали на 10 мин в кипящую водяную баню. После охлаждения до комнатной температуры (20—24 °C) флуоресценцию серотонина измеряли на флюориметре «Флофакол» при длине волны 470 нм. Длина волны возбуждающего света 365 нм.

Концентрацию белка в пробе определяли по Лоури [12] на спектрофотометре СФ-26.

Активность ТПГ выражали в пикомолях 5-окситриптофана, образующегося за 1 мин в пересчете на 1 мг белка, определяя ее по формуле:

$$\bar{V} = \frac{(X_i - X_0) \cdot C}{(X_{st} - X_0) \cdot t \cdot m},$$

где \bar{V} — активность ТПГ (в нмоль/мин на 1 мг белка); X_0 , X_{st} , X_i — флуоресценция контроля, стандарта и пробы соответственно; t — время инкубации (в мин); m — количество белка, добавленного в пробу (в мг); C — количество 5-окситриптофана в стандартной пробе (в нмоль).

Результаты и обсуждение

Чувствительность предлагаемого метода превышает чувствительность модифицируемого и позволяет определять активность фермента в таких структурах мозга мышей, как гипоталамус и полосатое тело, масса которых всего 10 мг, в то время как раньше для анализа требовались навески не менее 50 мг.

Увеличение чувствительности стало возможным благодаря сокращению объемов на ключевых стадиях анализа.

Предлагаемый метод по сравнению с описанным ранее [3] обладает также тем преимуществом, что время, затрачиваемое на процедуру проведения 50 проб, в среднем на 2,5—3 ч меньше. Сокращение продолжительности анализа достигается за счет исключения депротенинизации с помощью трихлоруксусной кислоты и связанных с этим последующих стадий: нейтрализации кислоты углекислым калием, осаждения коагулировавшего белка с помощью центрифугирования и перенесения полученного надосадка в чистые пробирки. В нашей модификации ферментативную реакцию останавливают добавлением боратного буфера pH 10,0, поскольку такая резко щелочная среда далека от оптимума pH для данной реакции (8,3), а имеющийся в растворе белок не влияет на экстракцию серотонина (см. таблицу). Кроме того, было обнаружено, что для проведения реакции декарбоксилирования достаточно 15 мин, а не 60, как прежде (см. таблицу).

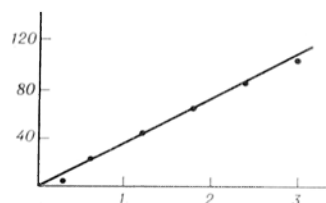


Рис. 1. Зависимость скорости образования серотонина от количества белка в пробе. По оси абсцисс — количество белка (в мг); по оси ординат — скорость образования серотонина (в нмоль/мин).

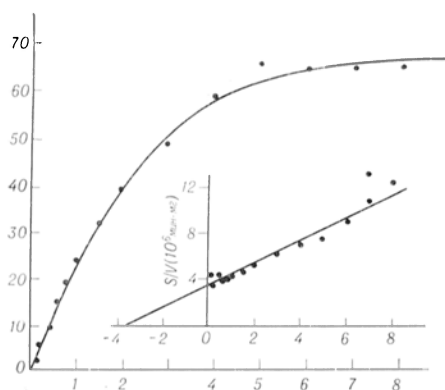


Рис. 2. Зависимость скорости реакции гидроксилирования от концентрации триптофана в пробе.

Максимальная скорость реакции ($V_{\max} = 65.1 \pm 4.63$ нмоль/мин на 1 мг белка) и кажущаяся константа Михаэлиса ($K_m = 3.8 \pm 0.39 \cdot 10^{-4}$ М) рассчитаны по методу Погансена — Ламри [11]. По оси абсцисс — концентрация триптофана (10^{-4} М); по оси ординат на основном графике — активность ТПГ (в нмоль/мин на 1 мг белка).

Еще одним преимуществом данного метода является использование вместо 2-меркаптоэтанола менее токсичного дитиотрептола и гептана вместо бензола (см. таблицу).

Доказательством адекватности предлагаемого метода является то, что скорость реакции гидроксилирования пропорциональна концентрации белка (рис. 1) и зависимость скорости от концентрации субстрата подчиняется уравнению Михаэлиса — Ментен (рис. 2). Интенсивность флюоресценции пропорциональна концентрации 5-оксиптриптофана (рис. 3).

Полученные данным методом значе-

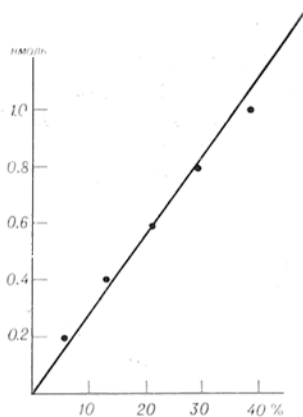


Рис. 3. Интенсивность флюоресценции в зависимости от количества 5-оксиптриптофана, добавленного в пробу.

Каждая точка — среднее 4 измерений. По оси абсцисс — флюоресценция (в % шкалы); по оси ординат — количество 5-оксиптриптофана в стандартном образце (в нмоль).

ния и их соотношения соответствуют величинам, полученным радиоферментативным методом [13] и с помощью других методик. Активность ТПГ в стволе головного мозга млекопитающих при насыщающей концентрации триптофана составила (в нмоль/мин на 1 мг белка) у свиней 13 по данным [14], у крыс 40—50 [5], у мышей 25—50 [2] и 22—60 (по нашим данным). Активность ТПГ, измеренная нашим методом у мышей линии DD, составила (в нмоль/мин за 1 мг белка) в гипоталамусе $27,4 \pm 0,90$, в полосатом теле $18,5 \pm 1,49$, в среднем мозге $61,5 \pm 3,27$.

Таким образом, предлагаемая методика определения активности ТПГ обладает более высокой чувствительностью, простотой исполнения и безопасностью. Ее можно рекомендовать для использования в клинических лабораториях при проведении серийных анализов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Корниш-Бовден Э. Основы ферментативной кинетики. Пер. с англ. — М.: 1979.
2. Куликов А. В. // Всесоюзное о-во генетиков и селекционеров им. Н. И. Вавилова: Съезд., 4-й: Тезисы докладов. Казань, 1981. — Ч. 1. — С. 135.
3. Куликов А. В. // Вопр. мед. химии. — 1982. — № 1. — С. 135—139.
4. Christenson J. G., Dairman W., Udenfriend S. // Arch. Biochem. — 1970. — Vol. 141. — P. 356—367.
5. Gal E. M., Patterson K. // Analyt. Biochem. — 1973. — Vol. 52. — P. 625—629.
6. Gal E. M. // Advanc. Biochem. Psychopharmacol. — 1974. — Vol. 11. — P. 1—11.
7. Friedman P. A., Kappelman A. H., Kaufman S. // J. biol. Chem. — 1972. — Vol. 247, № 13. — P. 4165—4173.
8. Ichiyama A., Nakamura S., Nishizuka Y., Hayaishi O. // Ibid. — 1970. — Vol. 245, № 7. — P. 1699—1709.
9. Kizer G. L., Zivin G. A., Saavedra J. M., Brownstein M. G. // J. Neurochem. — 1975. — Vol. 24, N 4. — P. 779—785.
10. Kuhn D. M., Rosenberg R. C., Lovenberg W. // Ibid. — 1979. — Vol. 33, N 1. — P. 15—22.
11. Lovenberg W., Bensinger R. E., Guckson R. L., Daly G. W. // Analyt. Biochem. — 1971. — Vol. 43. — P. 269—274.
12. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
13. Saavedra J. M. // Fed. Proc. — 1977. — Vol. 36, N 8. — P. 2134—2141.
14. Youdim M. B. H., Hamon M., Bourgois S. // Advanc. Biochem. Psychopharmacol. — 1974. — Vol. 11. — P. 13—17.

Поступила 10.02.87

THE SENSITIVE FLUOROMETRIC ASSAY OF TRYPTOPHANE HYDROXYLASE ACTIVITY IN BRAIN STRUCTURES

A. V. Kulikov, I. P. Voronova, E. Y. Janaeva

Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk

An assay of tryptophane hydroxylase activity in brain was based on fluorometric measu-

rement of serotonin after condensation with o-phthalic aldehyde in 10 N HCl. The method proved to be more sensitive and simple as compared with the previously reported technique and enabled to measure the enzyme activity in brain samples as little as 10 mg. The method is recommended for laboratory routine use.

УДК 615.382.014.4:[612.115.3:577.112.853].07

П. А. Гамзатова, Т. Ю. Коринунова, Г. П. Клемянов,
Н. Н. Овчарук, Н. А. Федоров

ИММУНОФЕРМЕНТНОЕ, ТУРБИДИМЕТРИЧЕСКОЕ И АФФИННО-ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ИЗМЕРЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ФИБРОНЕКТИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА (СОПОСТАВИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ И ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ И ВРЕМЕНИ ХРАНЕНИЯ КРОВИ)

Центральный НИИ гематологии и переливания крови Минздрава СССР, Москва

Концентрация и функциональные свойства такого гликопротеина, как фибронектин (ФН), имеют прямое отношение к регуляции функций лейкоцитов, тромбоцитов, ретикулоэндотелиальной системы, пролиферации и дифференцировки фибробластов и эпидермальных клеток [3]. Уровень плазменного ФН важно знать как для оценки нативности и полноценности донорской крови, так и для проведения эффективной терапии таких состояний, как сепсис, различные виды шока, внутрисосудистое диссеминированное свертывание крови и др. [2]. Возникла необходимость не только в сравнении значений концентраций ФН в плазме крови, полученных различными методами, но и в установлении влияния на полученные результаты таких условий, как тип консерванта крови, температура и длительность хранения, материал сосуда для взятия крови.

Методика

Кровь групп О, А, В и АВ получали со станции переливания крови Центрального НИИ гематологии и переливания крови (ЦНИИГПТК) в стеклянных флаконах или в полимерных контейнерах «Гемакон-500». В качестве антикоагулянтов использовали гепарин (1000 МЕ раствора на 100 мл крови), этилендиаминтетраацетат натрия (2 мл 0,5 М раствора на 100 мл крови) или глюцин — отечественный вариант цитратного консервирующего раствора. Хранение происходило в течение 48 ч при 4 и 20 °С. Измерение концентрации ФН в I серии опытов проводили иммуноферментным методом при

помощи набора реактивов, созданного в лаборатории иммунохимии Всесоюзного кардиологического научного центра АМН СССР совместно с производственным отделом Московского НИИ вакцины и сывороток им. И. И. Мечникова [1]. Кратко метод сводится к следующему: высокоспецифические антитела (АТ) к ФН (концентрация по белку 2 мкг/мл) сорбировали в микротитровальных планшетах, затем лунки планшетов заполняли образцами разбавленной 1:1000 плазмы.

После инкубации в течение 1 ч при 37 °С планшеты отмывали от несвязавшегося белка и вновь заполняли АТ к ФН, ковалентно связанными с пероксидазой. Инкубацию и отмывку повторяли. Субстратной смесью для пероксидазы является раствор орто-фенилендиамина с перекисью водорода, который вносили в лунки и инкубировали при комнатной температуре. Количественную оценку реакции проводили на микроспектрофотометре «Titertek Multiskan» (Flow) при длине волны 492 нм.

В I серии опытов на образцах, полученных от 10 доноров, проведено параллельное измерение концентрации ФН иммуноферментным, аффинно-хроматографическим [5] и турбидиметрическим методами [4]. Турбидиметрическое измерение ФН осуществляли при помощи набора реактивов фирмы «Boehringer» (Австрия). Суть этого метода заключается в измерении нарастания мутности образцов разбавленной в 50 раз плазмы до и через 30 мин после добавления к ним избытка АТ к ФН. Спектрофотометрировали против воздуха в микрокуветках при длине волны 365 нм. Устанавливали прирост оптической плотности и с помощью предварительно построенного по приложенным стандартным растворам ФН калибровочного графика определяли концентрацию ФН в изучаемых образцах. Этот метод по своей чувствительности и воспроизводимости не уступает иммуноферментному, но он значительно проще и легче в исполнении.

Концентрация фибронектина (мкг/мл) в плазме крови 10 доноров, измеренная спектрофотометрически в элюатах с аффинных сорбентов желатин-сефарозы, желатин-силикагеля турбидиметрическим и иммуноферментными методами

Метод	Доноры									
	А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	З	И	К
Аффинная хроматография на желатин-сефарозе	350	344	375	200	363	320	277	450	357	475
Аффинная хроматография на желатин-силикагеле	380	344	386	277	383	330	300	500	405	490
Турбидиметрический	380	310	360	210	350	515	280	445	340	480
Иммуноферментный	350	310	370	160	310	340	290	460	300	500

Аффинно-хроматографический анализ проводили на иммобилизованном желатине. Колонку с сорбентом уравнивали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) pH 7,1. Через колонку пропускали 2 мл свежей цитратной плазмы донорской крови. Оптимальными условиями для сорбции ФН была скорость фильтрации 0,25—0,30 мл/мин. Затем колонку отмывали от плазмы ФСБ, контролируя оптическую плотность элюата при 280 нм, и проводили элюцию белка 3 М раствором мочевины в ФСБ pH 7,0, собирая фракции по 2 мл до нулевой экстинкции элюата. Все фракции с $E_{280} > 0,1$ объединяли и спектрофотометрировали при 260 и 280 нм. Концентрацию белка определяли по номограмме.

Нами был получен новый аффинный сорбент для ФН желатин-силикагель, поэтому мы сопоставили результаты, полученные на данном сорбенте, с таковыми, полученными при использовании коммерческого аффинного сорбента желатин-сефарозы 4 В (фирма «Pharmacia», Швеция) и данными иммуноферментного и турбидиметрического определений.

Результаты и обсуждение

Мы провели сравнение 4 методов определения концентрации ФН в плазме крови 10 доноров (см. таблицу). Данные, представленные в таблице, сви-

детельствуют о хорошей сопоставимости результатов, получаемых этими методами. Иммуноферментный анализ является сложным и малодоступным, а аффинная хроматография требует больших затрат времени. Поскольку турбидиметрическое определение является более простым, требует значительно меньше времени и дает возможность измерять концентрацию ФН в малых объемах плазмы (20 мкл), все последующие исследования проводили данным методом.

Снижение концентрации ФН через 48 ч хранения крови в стеклянных флаконах происходило на 45—50%, и мало зависело от температуры (рис. 1).

Как известно, ФН является гликопротеином с резко выраженными адгезирующими свойствами. В связи с этим при исследованиях его в различных биологических жидкостях принято их образцы хранить в сосудах из полимерных материалов, а не из стекла. Поскольку отечественная служба крови переходит к широкому использованию контейнеров из полимерных материалов, нами была проведена аналогичная работа по измерению снижения концентрации ФН в плазме крови доноров, консервированной глюглициром в полимерных мешках «Гемакон-500». По-

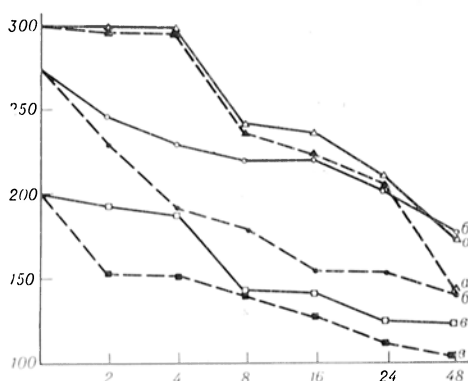


Рис. 1. Концентрация ФН в плазме донорской крови, полученной с применением разных консервантов и сохранившейся при 4 или 20 °C.

По оси абсцисс — время (в ч); по оси ординат — концентрация ФН (в мкг/мл): а — глюглицир, б — ЭДТА, в — гепарин. Здесь и на рис. 2: сплошные линии — хранение при 4 °C, пунктирные — при 20 °C.

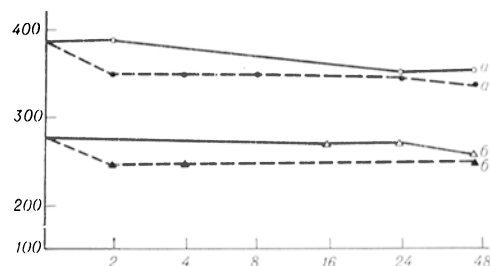


Рис. 2. Концентрация ФН в консервированной крови доноров групп А и АВ, взятой в полимерные контейнеры «Гемакон-500» с глюглициром и сохранившейся 48 ч при 4 и 20 °C. а — кровь группы А, б — кровь группы АВ.

лученные данные представлены на рис. 2, из которого видно, что значимых изменений в концентрациях ФН через 48 ч хранения как при 4 °С, так и при 20 °С в образцах крови групп А и АВ, хранимых в полимерных контейнерах с глюгидрином, не происходит.

Практическое значение проведенных сравнительных исследований очевидно. Прежде всего они показали, что наиболее перспективным по простоте, быстрой и точности измерения концентрации ФН в плазме крови является турбидиметрический метод. К тому же применение полимерных контейнеров для обеспечения сохранности концентрации ФН в плазме крови доноров на исходном уровне является обязательным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ермолин Г. А., Ефремов Е. Е., Филимонова Е. В. и др. // *Вопр. мед. химии.* — 1986. — № 6. — С. 123—125.
2. *Fibronectin* / Ed. D. F. Mosher. — New York, 1986.
3. *Plasma Fibronectin* / Ed. Y. McDonagh. — New York, 1985.

4. Saba T. M., Alben W. H., Blumenstock F. A. et al. // *J. lab. clin. Med.* — 1981. — Vol. 98. — P. 482—491.
5. Zardi L. // *J. immunol. Meth.* — 1980. — Vol. 3. — P. 155—156.

Поступила 05.04.87

ESTIMATION OF FIBRONECTIN CONCENTRATION IN HUMAN BLOOD PLASMA USING IMMUNOENZYMATIC, TURBIDIMETRIC AND AFFINITY CHROMATOGRAPHY METHODS

P. A. Gamzatova, T. Yu. Korshunova,
G. P. Klemeshov, I. N. Ovcharuk, N. A. Fedorov

Central Institute of Hematology and Blood Transfusion, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

Immunoenzymatic, turbidimetric and affinity chromatography methods used for estimation of fibronectin concentration exhibited the similar results but the turbidimetric procedure was more simple and less time-consuming. Concentration of fibronectin was not decreased in blood maintained in polymer container «Gemacon 500» within 48 hrs both at 4° and 20°, while about 40—50% of fibronectin was lost after storage of blood in glass flasks under similar conditions.

УДК 612.351.014.467:612.62.1.31

Л. Л. Игнатенко, Г. Д. Матарадзе, А. Ф. Бунятян

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СВОБОДНЫХ И СВЯЗАННЫХ ФОРМ РЕЦЕПТОРОВ ЭСТРОГЕНОВ В ЦИТОЗОЛЕ ПЕЧЕНИ КРЫС МЕТОДОМ ЛИГАНДНОГО ОБМЕНА ПРИ НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ

И ММИ им. И. М. Сеченова, МГУ им. М. В. Ломоносова

Имеются данные, убедительно свидетельствующие о влиянии эстрогенов на функции печени [3]. В печени обнаружены внутриклеточные белки — рецепторы эстрогенов (РЭ), локализованные в цитоплазме, способные в комплексе с гормоном транслоцироваться в клеточное ядро и оказывать влияние на процессы транскрипции и синтеза специфических белков.

Наличие адекватных методов определения содержания РЭ в цитозоле и ядрах клеток имеет важное значение для оценки гормоночувствительности органа, изучения закономерностей динамики и внутриклеточного распределения рецепторов при введении гормона.

По классическим представлениям о механизме действия стероидных гормонов, основная часть РЭ в цитоплазме

находится в свободной от связи с гормоном форме. Широко используемый в настоящее время метод определения РЭ в цитозоле печени крыс [2] позволяет определять только свободные, не связанные с эндогенным гормоном рецепторы. Однако нельзя исключить возможность присутствия в цитоплазме, особенно при введении больших доз эстрогенов, определенного количества эстрогенрецепторных комплексов (ЭРК), которые еще не транслоцировались в клеточное ядро. Идентифицировать ЭРК можно только путем замены эндогенного лиганда на меченный радиоактивным изотопом гормон в условиях повышенной диссоциации гормонрецепторных комплексов (ГРК). Обычно для этих целей используют метод лигандного обмена при повышенной темпе-

ратуре [5]. Однако при изучении цитозольных рецепторов печени повышение температуры крайне нежелательно, так как эти рецепторы отличаются высокой термолабильностью и прогревание приводит к частичной утрате ими гормон-связывающих свойств. С другой стороны, скорость диссоциации ЭРК при низкой температуре невелика и не позволяет провести лигандный обмен. В связи с этим целью нашего исследования была разработка метода лигандного обмена, совмещающего два условия, необходимых для определения свободных и связанных форм РЭ в цитозоле печени, — низкую температуру и повышенную скорость диссоциации ГРК.

Методика

Работу проводили на половозрелых интактных и овариэктомированных самках крыс смешанной популяции. Овариэктомированным самкам однократно вводили подкожно в дозе 500 мкг эстрадиол (E_2), растворенный в пропиленгликоле. Животных забивали через указанные ниже промежутки времени после инъекции гормона. Цитозоль печени получали, как описано ранее [2]. Содержание белка в цитозоле, которое определяли методом [6], составляло 10—25 мг/мл. В работе использовали 0,01М трис-НСI pH 7,5—0,0015М ЭДТА — 0,005М дитиотреитол (ТЭД-буфер). Для тестирования рецепторов применяли 2,4,6,7- 3H -эстрадиол — 17 β (3HE_2) («Amersham», Англия) с удельной активностью 101 Ки/ммоль. Радиоактивность измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Rackbeta 1217» (LKB), с использованием сцинтилляционной жидкости на основе диоксана [7]. Для оптимизации условий лигандного обмена использовали тиоцианат натрия (NaSCN), который ранее применяли для аналогичных целей при изучении цитозольных рецепторов матки [11]. Особенности количественного определения РЭ в печени изложены ниже.

Результаты и обсуждение

Повышение скорости диссоциации ЭРК при низкой температуре достигали путем добавления в среду инкубации хаотропного агента тиоцианата натрия, обладающего свойством ускорять диссоциацию комплексов белков с лигандами [9]. Как показали результаты исследований, добавление 0,5 М NaSCN сокращает время полураспада ЭРК с 10 до 1,3 ч (рис. 1) и полный обмен лигандов происходит за 9 ч. В предварительных экспериментах было установлено, что увеличение длительности инкубации цитозоля с гормонами от 9 до

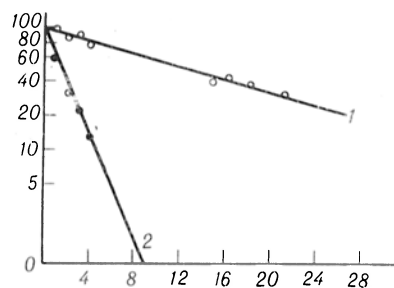


Рис. 1. Кинетика диссоциации ЭРК цитозоля печени крыс в ТЭД-буфере (1) и в присутствии 0,5М NaSCN (2).

Аликвотные порции цитозоля инкубировали с насыщающей добавкой 3HE_2 в течение 3 ч при 0—4 °С. Началом диссоциации комплексов 3HE_2 с РЭ считали момент добавления в пробы избытка меченого E_2 . Специфическое связывание 3HE_2 (B_c) определяли через указанные промежутки времени после инкубации при 0—4 °С. По оси абсцисс — время от начала диссоциации (в ч); по оси ординат — $\lg \frac{B_{c,t}}{B_{c0}}$; где $B_{c,t}$ представляет собой B_c в данной временной точке, B_{c0} — исходное связывание до добавления избытка E_2 .

48 ч не влияет на величину специфического связывания меченого эстрадиола с РЭ. В дальнейшем для удобства постановки опытов инкубацию проб с NaSCN проводили в течение 24 ч.

Повышение скорости диссоциации гормона приводит к закономерному снижению равновесной константы ассоциации почти на порядок (рис. 2, а) и для

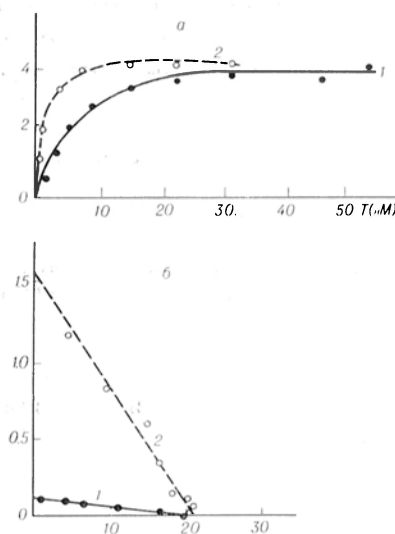


Рис. 2. Специфическое связывание 3HE_2 ($B_c \cdot 10^{-14}$ М на 1 мг белка) в цитозоле печени овариэктомированных крыс.

а — кривые насыщения B_c в присутствии 0,5М (1) и в ТЭД-буфере (2). По оси абсцисс — добавка 3HE_2 (в нМ); б — те же данные в координатах [10]. По оси абсцисс — B_c (в пкг на пробу); 1 — $K_d = 2,6 \cdot 10^{-11}$; 2 — $K_d = 2,7 \cdot 10^{-10}$ М $^{-1}$; по оси ординат — B_c/U (B_c — концентрация связанного лиганда, U — концентрация свободного лиганда).

Состав инкубационной смеси для определения содержания РЭ в цитозоле печени крыс

РЭ цитозоля печени	№ пробирок	Инкубация при 0—4 °С в течение 24 ч						
		$^3\text{HE}_2$		E_2		ТЭД-буфер, мкл	2,5М NaSCN, мкл	цитозоль, мкл
		нМ	мкл	нМ	мкл			
Свободные	1, 2, 3	15	10	—	—	30	—	60
	4, 5, 6	15	10	1500	10	20	—	60
Суммарные	7, 8, 9	50	10	—	—	10	20	60
	10, 11, 12	50	10	5000	10	—	20	60

полного насыщения рецепторов меченым эстрадиолом требуется увеличение добавки гормона с 10—15 до 40—50 нМ (рис. 2, б).

Предварительные эксперименты позволили выработать следующую схему метода лигандного обмена при низкой температуре для определения РЭ в цитозоле печени крыс (табл. 1).

Аликвотные порции цитозоля печени инкубировали 24 ч при 0—4 °С с насыщающей добавкой $^3\text{HE}_2$ (50 нМ) в присутствии 0,5 М NaSCN. Для определения уровня неспецифического связывания $^3\text{HE}_2$ использовали 100-кратный избыток немеченого E_2 . Разделение свободного и связанного с белками гормона производили методом адсорбции на активированном угле, покрытом декстраном. Для этого к пробам добавляли равный объем 2 % угля. Пробы инкубировали в течение 5 мин при 0—4 °С, после чего уголь осаждали центрифугированием при 800 g (при 0—4 °С) в течение 10 мин. Количество специфически связанного $^3\text{HE}_2$ (B_c) и содержание РЭ в клетке рассчитывали, как описано ранее [2, 4]. Для определения только свободных РЭ аликвотные порции цитозоля инкубировали с меньшей насыщающей добавкой

$^3\text{HE}_2$ (15 нМ); вместо NaSCN к пробам добавляли ТЭД-буфер.

Вышеописанным методом определяли содержание РЭ в цитозоле печени интактных и овариэктомированных самок крыс, а также у овариэктомированных самок через 1, 3 и 24 ч после введения 500 мкг E_2 (табл. 2). Как видно из табл. 2, общее содержание РЭ в цитозоле печени примерно одинаково у интактных и овариэктомированных самок. Однако у интактных животных примерно 30 % от общего числа рецепторов определялось в виде комплексов, тогда как у овариэктомированных (в отсутствие эндогенных эстрогенов) все РЭ находилось в свободной форме.

Ранее считалось, что овариэктомия приводит к некоторому повышению содержания РЭ в цитозоле печени крыс [1]. Высказывалось предположение о «сдерживающем», ингибирующем влиянии эстрогенов на содержание собственных рецепторов в цитозоле печени. Однако эти данные были получены с использованием метода, позволяющего определять только свободные от связи с гормоном РЭ. Поэтому несколько сниженное содержание РЭ в цитозоле печени интактных самок крыс по сравнению с овариэктомированными является ка-

Таблица 2

Содержание РЭ в цитозоле печени интактных (N) с овариэктомированных (О/Э) самок крыс, а также у овариэктомированных самок через 1, 3 и 24 ч после введения 500 мкг E_2

РЭ цитозоля печени	Без введения E_2		О/Э + 500 мкг E_2		
	N	О/Э	время после введения гормона, ч		
			1	3	24
Свободные связи на клетку	6802±442 (6)	9263±967 (12)	2921±942 (4)	1673±124 (4)	3863±460 (4)
Суммарные связи на клетку	9723±754 (6) $p < 0,001$	9263±967 (12)	3406±582 (4) $p > 0,1$	2754±544 (4) $p < 0,1$	7876±571 (4) $p < 0,001$

Примечание. В скобках — число параллельных определений; p — достоверность различий между показателями свободных и суммарных РЭ цитозоля печени.

жущимся и объясняется невозможностью определения ЭРК в цитозоле intactных самок без использования метода лигандного обмена. Применение разработанного нами метода, как уже объяснялось выше, позволило показать отсутствие различий в содержании суммарных РЭ в цитозоле печени intactных и овариэктомированных самок крыс.

В качестве наглядного примера преимуществ использования предлагаемого метода определения свободных и связанных РЭ в цитозоле печени с использованием тиоцианата натрия по сравнению с обычным способом определения только свободных рецепторов мы представляем данные о содержании РЭ в цитозоле печени овариэктомированных самок крыс через 1, 3 и 24 ч после введения *in vivo* большой дозы эстрадиола (500 мкг) (см. табл. 2). Через 1 и 3 ч после введения гормона в цитозоле печени наблюдалось резкое снижение общего содержания РЭ, что связано с транслокацией ГРК в клеточное ядро [8]. Но если через 1 ч после введения 500 мкг E_2 достоверных различий в определении рецепторов обычным методом и методом лигандного обмена не было, то через 3 ч различия были уже достоверными и существенными. Через 24 ч после введения гормона общий уровень РЭ в цитозоле приближался к контрольному (см. табл. 2). При этом свободные рецепторы составляли лишь половину от общего содержания РЭ в цитозоле печени. Вероятно, при введении больших доз эстрадиола *in vivo* в цитозоле клеток печени со временем происходило накопление ЭРК, еще не перешедших в клеточное ядро.

Таким образом, применение тиоцианата натрия позволяет провести лигандный обмен при низкой температуре, сохраняющей неизменными связывающие свойства рецепторов. В конечном итоге это дает возможность наиболее полно и адекватно оценить содержание и внутриклеточное распределение РЭ в печени, что имеет важное значение

для оценки общей гормоночувствительности органа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гонтарь Е. В., Матарадзе Г. Д., Розен В. Б. // Бюл. экспер. биол. — 1985. — № 3. — С. 137—140.
2. Матарадзе Г. Д., Рукайя М.-Х., Смирнов А. Н., Розен В. Б. // Биохимия. — 1979. — Т. 44, вып. 8. — С. 1484—1485.
3. Розен В. Б. // Вестн. АМН СССР. — 1983. — № 2. — С. 80—86.
4. Смирнова О. В., Смирнов А. Н., Розен В. Б. // Биохимия. — 1974. — № 3. — С. 646—655.
5. Anderson J., Clark J. H., Peck E. J. // Biochem. J. — 1972. — Vol. 126. — P. 563—567.
6. Bradford M. M. // Analyt. Biochem. — 1976. — Vol. 72. — P. 248—254.
7. Bray G. // Ibid. — 1960. — Vol. 1. — P. 279—285.
8. Jensen E. V., Mohla S., Gorell T. et al. // J. Steroid. Biochem. — 1972. — Vol. 3. — P. 445—457.
9. Sawyer W. H., Puckridge J. // J. biol. Chem. — 1973. — Vol. 248. — P. 8429—8433.
10. Scatchard G. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1949. — Vol. 51. — P. 660—672.
11. Sica V., Puca G. A., Molinari A. M. et al. // Biochemistry. — 1980. — Vol. 19. — P. 83—88.

Поступила 12.12.86

ESTIMATION OF FREE AND BOUND FORMS OF ESTROGEN RECEPTORS IN RAT LIVER CYTOSOL BY MEANS OF THE PROCEDURE OF LIGAND TURNOVER AT LOW TEMPERATURE

L. L. Ignatenko, G. D. Mataradze, A. F. Bunyatyán

1 Medical School, M. V. Lomonosov State University, Moscow

A procedure is described for estimation of free and bound estrogen receptors in rat liver cytosol at low temperature using ligand turnover in presence of sodium thiocyanate. Total content of estrogen receptors was similar in cytosol of intact and ovariectomized rat females but about 30% of estrogen receptors were estimated in cytosol of intact animals as estrogen-receptor complexes. Within 24 hrs after single administration of 500 mg estradiol E_2 into ovariectomized rat females approximately 50% of estrogen receptors were shown to be bound with hormone in cytosol.

ОРТОДИАНИЗИДИНОВЫЙ МИКРОМЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ L-ФЕНИЛАЛАНИН- α -ОКСИДАЗЫ

Кафедра биохимии Университета дружбы народов им. Патриса Лумумбы, Москва

Наметившиеся в последнее время успехи в ферментативной терапии онкологических заболеваний человека при применении L-аспарагиназы и L-глутамин (аспарагин)азы [8, 9] побудили исследователей к поиску других ферментов, обладающих антиопухолевой активностью. Особое место среди испытанных препаратов занимают ферменты, активно вмешивающиеся в аминокислотный обмен, вызывающие необратимую деструкцию незаменимых аминокислот [1, 11]. Подобные ферментные препараты микробного происхождения вызывают торможение роста клеток ряда опухолей в культуре ткани. Так, обладающая фенилаланинаммиаклиазной активностью культура *Rodoturula glutinis* ингибирует рост лейкозных клеток человека и лимфобластов мышей линии L 5178 I [6, 7].

На кафедре биохимии Университета дружбы народов им. П. Лумумбы из отечественной культуры *Trichoderma* sp. выделена L-лизин- α -оксидаза, оказывающая выраженное тормозящее влияние на синтез ДНК, РНК и белка из меченых предшественников в культивируемых клетках тест-модельных систем карциномы яичника человека (CaOv) и лимфомы Беркитта (P3HRj) в опытах *in vitro* [2, 5]. Имеются сведения о биосинтезе культурой *Proteus vulgaris* фенилаланин- α -оксидазы [13]. Оказалось, однако, что фермент обладает незначительной активностью и недостаточной субстратной специфичностью, проявляя оксидазную активность в отношении ряда других L-аминокислот.

В культуральной жидкости *Trichoderma* sp. в нашей лаборатории, помимо лизин- α -оксидазной активности, была обнаружена достаточно высокая активность фенилаланин- α -оксидазы. Этот фермент катализирует окислительное дезаминирование L-фенилаланина с образованием фенилпировиноградной кислоты, аммиака и H_2O_2 .

Ранее [4] в лаборатории был разработан простой, достаточно чувствительный и специфичный метод определения

активности L-лизин- α -оксидазы, основанный на количественном определении образующейся перекиси водорода. Однако замена L-лизина на L-фенилаланин в указанном методе оказалась недостаточной для использования его для определения L-фенилаланин- α -оксидазной активности.

Эти обстоятельства, а также необходимость изучения механизма биосинтеза еще одного фермента, который мог бы найти применение в клинической онкологии, побудили к разработке нового метода определения L-фенилаланин- α -оксидазы в культуральной жидкости *Trichoderma* sp.

М е т о д и к а

В опытах использовали штамм *Trichoderma* sp., выращенный по описанному ранее [11] методу. Активность L-фенилаланин- α -оксидазы в культуральной жидкости рассчитывали по приросту H_2O_2 , количество которой определяли спектрофотометрически ортоданизидиновым микрометодом [4]. Инкубационная смесь содержала 20 мкг пероксидазы, 250 мкг о-данизидингидрохлорида и 0,1—0,5 мг белка в 1 мл конечного объема. Субстраты и буфер в каждой серии опытов добавляли в определенных концентрациях. После 20 мин инкубации в термостате при 37 °C пробы охлаждали до 4 °C и добавляли 1 мл концентрированной HCl, предварительно охлажденной до 0—4 °C. Оптическую плотность окрашенных растворов опытной и контрольной (без субстрата) проб измеряли на спектрофотометре СФ-16 при 540 нм против второй контрольной пробы (без пероксидазы).

Для построения калибровочной кривой молярность свежеприготовленного раствора H_2O_2 определяли перманганатометрией [10]. Субстратом служил L-фенилаланин (фирма «Serva», ФРГ).

Применяли 0,05 М фосфатный, 0,1 М цитратный, 0,2 М ацетатный буферы. В качестве катализатора пероксидазной реакции использовали пероксидазу фирмы «Reanal» (Венгрия), в качестве донатора протонов — о-данизидингидрохлорид (фирма «Merck», ФРГ). За единицу активности принимали количество фермента, катализирующего образование 1 мкмоль H_2O_2 за 1 мин при 37 °C.

Удельную активность фермента выражали числом единиц активности на 1 мг белка или на 1 мл водного экстракта культуры. Белок определяли по методу Лоури и соавт. [12]. В качестве стандарта использовали 0,05 % раствор кристаллического бычьего альбумина (фирма «Reanal», Венгрия).

водимость результатов количественного определения активности L-фенилаланин- α -оксидазы в культуральной жидкости *Trichoderma* sp.

Статистический показатель	<i>Trichoderma</i> sp.	
	штамм № 1	штамм № 2
$\bar{x} \pm S$, нмоль в 1 мин на 1 мг белка	$0,40 \pm 0,01$	$0,61 \pm 0,01$
Абсолютная воспроизводимость:		
отклонение от среднего ($x_i - \bar{x}$)	0,03	0,03
размах варьирования ($W = x_{\max} - x_{\min}$)	0,09	0,09
Относительная воспроизводимость, стандартное отклонение, %	0,02	0,02

Примечание. Расчеты проведены на материале 10 параллельных определений проб культуральной жидкости 2 различных штаммов (№ 1 и 2).

Результаты опытов обрабатывали статистически методом Монтевичиос-Эрингенса с использованием фактора Мондengaуэра [3].

Результаты и обсуждение

При исследовании зависимости между концентрацией L-фенилаланина и скоростью L-фенилаланин- α -оксидазной реакции в культуральной жидкости гриба *Trichoderma* установлено, что ферментативная активность подавляется высокими концентрациями субстрата (рис. 1), а при концентрации L-фенилаланина 20 мМ наблюдается постоянная скорость ферментативной реакции. При низких концентрациях субстрата имеет место прямая зависимость между концентрацией субстрата и скоростью реакции. Величина K_m для L-фенилаланина, вычисленная по методу Лайнуивера — Бэрка (рис. 2),

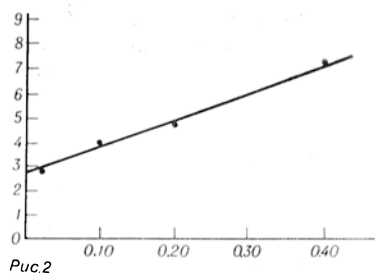
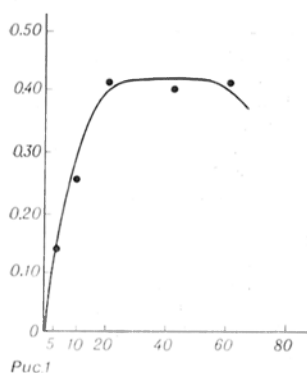


Рис. 1. Зависимость между скоростью реакции и концентрацией субстрата.

По оси абсцисс — концентрация L-фенилаланина в пробе (в мМ); по оси ординат — активность фермента (в ед. активности). Здесь и на рис. 2 и 3 пробы, кроме перечисленных в разделе «Методика» компонентов, содержали 35 мкмоль фосфатного буфера pH 5,9. В качестве источника использовали культуральную жидкость *Trichoderma* sp.

Рис. 2. Расчет величины K_m графическим способом Лайнуивера — Бэрка.

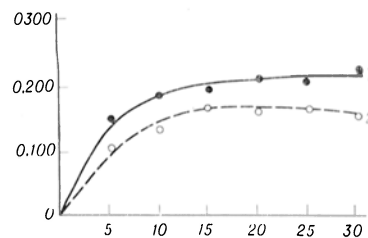


Рис. 3. Зависимость активности L-фенилаланин- α -оксидазы от времени инкубации. По оси абсцисс — время инкубации (в мин); по оси ординат — разность оптической плотности (ΔA) опытной и контрольной проб. Культуральная жидкость разведена в соотношении 1 : 4 (1) и 1 : 5 (2).

составила $2,5 \cdot 10^{-3}$ М, а V_{\max} — 0,42 Е/мг. Данные о зависимости активности L-фенилаланин- α -оксидазы от времени инкубации (рис. 3) свидетельствуют о том, что реакция начинается мгновенно, почти в нулевой точке и образование H_2O_2 происходит линейно в течение первых 5 мин при использовании 4 мкмоль L-фенилаланина и разведенной в 5 раз исходной культуральной жидкости *Trichoderma* sp.

При изучении зависимости L-фенилаланин- α -оксидазной активности от pH среды установлено, что фермент наиболее активен в кислой зоне и имеет оптимум pH, равный 5,0. При смещении pH среды до значений 3,6 или 8,0 наблюдается резкое снижение активности фермента вплоть до нуля, в то время как в слабощелочной среде энзиматическая активность снижается незначительно (рис. 4). Из испытанных буферных систем (цитратная, ацетатная, фосфатная) наилучшим при определении L-фенилаланин- α -оксидазной активности оказался цитратный буфер.

Представленные в таблице данные о воспроизводимости результатов определения активности L-фенилаланин- α -оксидазы свидетельствуют, что предложенный метод отличается не только

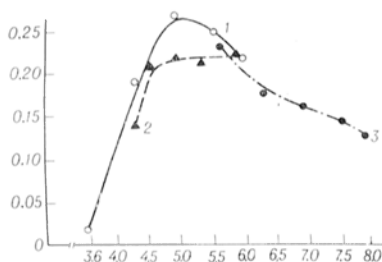


Рис. 4. pH-зависимость активности L-фенилаланин- α -оксидазы.

По оси абсцисс — pH; по оси ординат — разность оптической плотности (AA) опытной и контрольной проб. В пробу добавляли 70 мкмоль цитратного (1), 140 мкмоль ацетатного (2) или 35 мкмоль фосфатного буфера (3). Пробы инкубировали 5 мин.

высокой чувствительностью, но и хорошей воспроизводимостью.

Метод может быть применен как для определения активности L-фенилаланин- α -оксидазы у разных видов микроорганизмов, так и для количественного определения концентрации L-фенилаланина в органах и тканях животных и человека, а также кормах и продуктах питания человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Березов Т. Т. // Вестн. АМН СССР. — 1984. — № 8. — С. 11—24.
2. Жукова О. С., Хадусов С. Х., Добрынин Я. В. и др. // Экспер. онкол. — 1985. — Т. 7, № 6. — С. 42—44.
3. Монцевичюте-Эрингсене Е. В. // Пат. физиол. — 1964. — № 4. — С. 71—78.
4. Смирнова Н. П., Сяткин С. П., Березов Т. Т. // Вопр. мед. химии. — 1984. — Т. 30, вып. 1. — С. 133—136.
5. Хадусов С. Х., Лукашева Е. В., Смирнова Н. П., Березов Т. Т. // Там же. — 1985. — Т. 31, № 5. — С. 130—134.

6. Abell C. W., Stith W. J., Hodgins D. S. // Cancer Res. — 1972. — Vol. 32. — P. 285—290.
7. Abell C. W., Hodgins D. S., Stith W. J. // Ibid. — 1973. — Vol. 33. — P. 2529—2532.
8. Holcenberg J. S., Lu P., Tang E. // Proc. Amer. Ass. Cancer Res. — 1976. — Vol. 17. — P. 168.
9. Holcenberg J. S. // Ann. Rev. Biochem. — 1982. — Vol. 61. — P. 778—804.
10. Kolthoff A. M., Sandell B. B. // Textbook of Quantitative Inorganic Analysis. — New York, 1952. — P. 574.
11. Kusakabe H., Kodama K., Kuninaka A. et al. // Agricult. biol. Chem. — 1979. — Vol. 43. — P. 2531—2535.
12. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
13. Stumpf P. K., Green D. E. // Ibid. — 1944. — Vol. 153. — P. 387—399.

Поступила 11.10.86

ORTHO-DIANIZIDINE MICROMETHOD FOR ESTIMATION OF L-PHENYLALANINE- α -OXIDASE ACTIVITY

I. P. Smirnova, T. T. Beresov

P. Lumumba State University of People Friendship, Moscow

A micromethod is developed for estimation of L-phenylalanine- α -oxidase activity from *Trichoderma* sp. The method is based on interaction of H_2O_2 formed in the reaction with o-dianisidine-HCl. Optimal conditions were adopted for estimation of the new enzyme activity from *Trichoderma* sp. The enzyme had $K_m=2.5 \cdot 10^{-3}$ M and $V_{max}=0.42$ U/mg at 20 mM concentration of phenylalanine in the incubation mixture; the highest enzymatic activity was estimated in citrate buffer, pH 5.0. The method is simple, precise and reproducible.

УДК 612.398.1-088.1+616.153.96-074:543.545

С. С. Шишкин, Р. В. Ильинский, Л. И. Ковалев, В. И. Борисенко,
П. С. Громов, Л. С. Чесалин

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ДВУМЕРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОГО ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ БЕЛКОВ НА КОМПЛЕКСЕ ЦИФРОВОЙ ОБРАБОТКИ ВИДЕОИНФОРМАЦИИ (СВИТ)

Институт медицинской генетики АМН СССР: Институт космических исследований
АН СССР, Москва

Метод двумерного электрофореза белков [17] нашел широкое применение в биохимических исследованиях [5, 10, 18]. При его использовании положение каждой белковой фракции определяется на пластине геля в системе координат, из которых первую образуют ве-

личины, производные от значений изоэлектрических точек, а вторую — молекулярные массы. Следовательно, оценки электрофоретических подвижностей фракций по этим координатам позволяют охарактеризовать анализируемые белки по указанным важней-

шим физико-химическим свойствам, благодаря чему открывается путь к систематической каталогизации белков [7, 8]. При современных методах детекции белков на пластинах геля двумерная электрофореграмма с несколькими сотнями белковых пятен может быть подвергнута дальнейшему анализу с использованием вычислительной техники [11, 13, 16], в результате которого оказывается возможным измерение количества белка в получаемых фракциях [11, 16]. Электрофореграмма в этом случае рассматривается как изображение, подвергаемое численному анализу, при котором оцениваются и координаты, и плотности отдельных пятен на пластине геля, и на основе реперных известных точек одно изображение делается сопоставимым с другим.

Создание общих методов и аппаратных средств обработки изображений осуществляется современной иконикой, включающей в себя теоретические исследования процессов реставрации и анализа изображений, эвристическое программирование, разработку математического обеспечения и т. д. [2]. В Институте космических исследований АН СССР разрабатывается ряд комплексов обработки видеoinформации на базе управляющих мини-ЭВМ. Результаты применения одного из них — комплекса СВИТ (самостоятельный видеoinформационный интерактивный терминал размером кадра 256×256 пиксел) для решения некоторых задач анализа двумерных электрофореграмм приведены в данном сообщении.

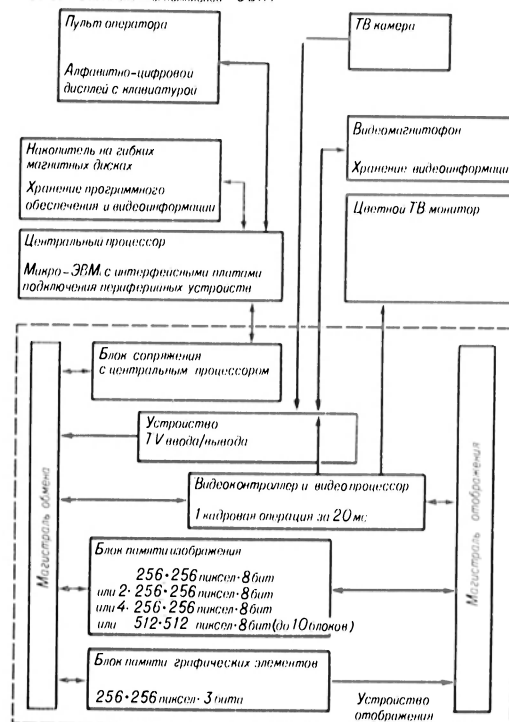
Методика

В качестве анализируемых препаратов были выбраны экстракты белков сердечной и скелетной мышц мышей (инбредная линия С57В1) — взрослых животных (2 мес) и эмбрионов разных стадий развития. В качестве белков-маркеров применяли препараты пируваткиназы («Sigma», США), сывороточного альбумина, креатинфосфокиназы и миоглобина («Serva», ФРГ).

Двумерный электрофорез проводили в модификации, описанной ранее [1]. После окрашивания кумасси R-250 или методом серебрения электрофореграммы 15 мин дегидратировали в 50% растворе этанола, содержащем 5% глицерина. Затем гели плотно фиксировали между двумя листами диализного целлофана и высушивали при комнатной температуре. Высушенные гели и фотографии электрофореграмм использовали для анализа на комплексе СВИТ [3].

Обработку электрофореграмм проводили с помощью пакетов программ телевизионного ввода, коррекции искажений, подсчета

Основные компоненты комплекса СВИТ



статистических характеристик по локальным участкам, геометрических преобразований и визуализации в графических проекциях [4].

Различные системы, используемые для анализа результатов двумерного электрофореза, имеют ряд сходных черт. Комплекс СВИТ как универсальная система обработки изображений содержит устройство телеввода изображений (телекамера ПТУ-42 и плоская люминесцентная лампа подсветки), управляющую ЭВМ («Электроника-60»), накопители на гибких дисках и магнитной ленте (ГМД-7012 и ИЗОТ 5003), цветной телевизионный монитор и специализированное устройство отображения (памяти изображения и видеопроцессор). Общая конфигурация комплекса представлена на схеме.

Результаты и обсуждение

Первой задачей в анализе белковых фракций, которую мы попытались решить, используя СВИТ, было построение зависимости между интегральной оптической плотностью пятен на гелевых пластинах и количеством нанесенного белка. Для этой цели растворы, содержащие разные концентрации трех белковых препаратов (альбумин, креатинкиназа, миоглобин), фракционировали двумерным электрофорезом. При окраске электрофореграмм кумасси R-250 для миоглобина и альбумина наблюдали почти одинаковую зависимость изменений плотности пятен от кон-

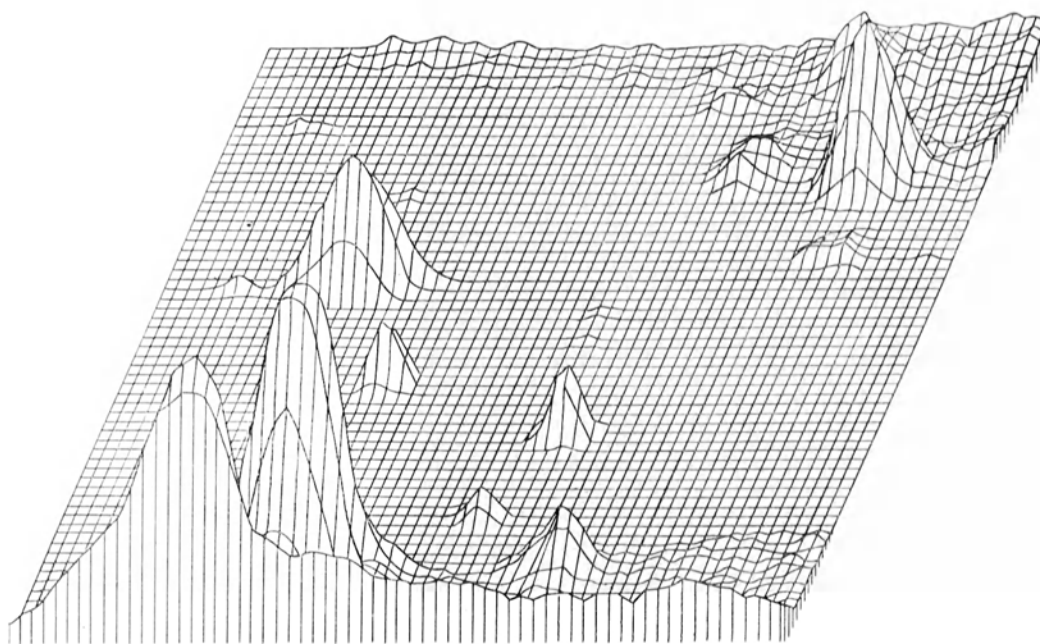


Рис. 2. Участок двумерной электрофореграммы белков миокарда мыши, преобразованный по программе построения графических проекций яркостного рельефа изображений комплексом СВИТ.

центрации белков — от 2 до 20 мкг белка на пятно — прямо пропорциональный участок кривой, которая после 20 мкг переходила в область плато. Для креатинкиназы область плато не достигалась даже при 40 мкг нанесенного белка. Однако препарат креатинкиназы при фракционировании обнаруживал 3 близкорасположенных компонента с одинаковыми величинами молекулярных масс, но разными электрофоретическими подвижностями в первом направлении. Если для сравнения суммарную величину плотности трех почти слившихся пятен креатинкиназы условно разделить на 3, то данные, полученные для креатинфосфокиназы, согласуются с результатами по двум другим белкам. Таким образом, можно сделать заключение, что в диапазоне концентраций от 2 до 20 мкг белка на пятно устройство телевода и хранения изображений в цифровом виде дает возможность количественно оценивать относительные характеристики пятен.

Другая, непосредственно связанная с первой задача заключалась в сравнении количественных характеристик нескольких одноименных пятен на двух электрофореграммах. Решение этой задачи было необходимо в экспериментах по идентификации пятен с помощью коэлектрорефа. На рис. 1, см. вклей-

ку приведены фрагменты двух электрофореграмм белков сердечной мышцы, из которых одна получена при фракционировании экстракта с нагрузкой коммерческим препаратом пируваткиназы (см. рис. 1, б). Уже при визуальной оценке обращает на себя внимание усиление пятна 4. Сравнение количественных характеристик 10 одноименных пятен (см. рис. 1, в), проведенное с помощью комплекса СВИТ, позволило, выявить усиление не только пятна 4, но и пятна 6, по-видимому, соответствующего другой субъединице пируваткиназы.

Для качественной оценки распределения оптической плотности внутри пятен, а также для решения задачи о перекрывающихся пятнах и ряда других вопросов используют преобразование плоского изображения пятен на двумерной электрофореграмме в трехмерную систему холмов, отражающую изменение оптической плотности внутри каждого пятна. Участок двумерной электрофореграммы мышечных белков, преобразованный таким образом с помощью комплекса СВИТ по программе построения графических проекций яркостного рельефа изображения, представлен на рис. 2.

Известно, что в разных сериях опытов трудно получать полностью идентич-

ные по размерам и характеру распределения белков двумерные электрофореграммы. Причины вариабельности, связанные с различными техническими и технологическими трудностями, детально рассматриваются в специальных обзорах [8, 10]. Таким образом, проведение сравнения нескольких электрофореграмм путем их наложения одна на другую, как это рекомендуют некоторые авторы [7], оказывается затруднительным или даже невозможным. Однако если на электрофореграммах имеется несколько (не менее 3) идентичных пятен, то при использовании их в качестве реперных точек можно с помощью соответствующих программ геометрических преобразований унифицировать изображения, введенные в память ЭВМ. Затем, при выведении унифицированного изображения на дисплей, можно применить в отношении их метод наложения.

В данной работе подобная задача решалась на примере анализа одноименных участков нескольких электрофореграмм мышечных белков. Для сравнения были выбраны участки, захватывающие прямоугольник М и части соседних прямоугольников [1], на которых расположены некоторые главные миофибрилярные белки — актин, тропомиозин и легкие цепи миозина. Работами ряда авторов было показано, что сердечная и скелетные мышцы разных млекопитающих различаются набором легких цепей миозина, а также тем, что скелетные мышцы содержат примерно равные количества α - и β -цепей тропомиозина, тогда как в сердечной мышце представлена почти исключительно α -цепь [6, 15, 19]. Подобные результаты были получены и нами при двумерном электрофорезе экстрактов сердечной и скелетной мышц мышей (рис. 3, а и б, см. вклейку). Вместе с тем на выбранном участке электрофореграмм присутствовало несколько минорных фракций. В этом числе на электрофореграмме скелетной мышцы имелись пятна, которые по положению подходили к легкой цепи I миозина сердца и идентифицированное пятно N 22. Они обозначены на рис. 3, б как пятно X и Y соответственно. Для проверки данного предположения проведен коэлектрофорез экстрактов сердечной и скелетной мышц, взятых в одинаковых количествах (рис. 3, в). Затем, взяв эту электрофореграмму за

образец и выбрав в качестве реперных точек пятна, образованные тремя легкими цепями скелетной мышцы, актина и α -цепи тропомиозина, провели с помощью СВИТ геометрическое преобразование трех электрофореграмм экстракта скелетной мышцы. На унифицированных изображениях белковых фракций скелетной мышцы пятна X и Y совпали по положению с пятном легкой цепи I миозина сердца и с пятном N 22. Таким образом, по всей вероятности, у мыши в скелетных мышцах в небольших количествах присутствует легкая цепь I миозина сердца и некоторые другие сердечные белки.

В отдельной серии экспериментов при анализе изменений белкового состава сердечной мышцы в ходе эмбриогенеза было обнаружено, что у эмбрионов между легкими цепями миозина располагается почти столь же значительное дополнительное пятно (рис. 3, з). По положению оно оказалось весьма похожим на легкую цепь I миозина скелетной мышцы. Используя в качестве образца коэлектрофореграмму (см. рис. 3, в), с помощью СВИТ проведено геометрическое преобразование трех электрофореграмм эмбриональных экстрактов. Реперными точками послужили обе легкие цепи миозина сердца, актин и тропомиозин. На унифицированных изображениях дополнительная эмбриональная фракция располагалась несколько левее и выше, чем пятно легкой цепи I миозина скелетной мышцы. В то же время эмбриональная фракция полностью совпала по положению с минорным пятном M5, обычно обнаруживающимся в экстрактах сердца взрослых животных (см. рис. 3, а). Вопрос о том, являются ли данные белки (эмбриональный белок и легкая цепь I миозина скелетной мышцы) продуктами экспрессии разных генов или различия в их положении на двумерных электрофореграммах связаны с посттрансляционными модификациями, требует дополнительных исследований.

Рассмотренные задачи, естественно, не исчерпывают чрезвычайно сложную проблему анализа результатов двумерного электрофореза белков. Разработки этой проблемы, ведущиеся в различных лабораториях мира, связаны с повышением точности сканирующих устройств, расширением программного обеспечения, созданием комплексов для ведения быстрого анализа в авто-

матическом режиме и т. д. [10, 14].

Подчеркнем, что СВИТ является универсальной системой широкого назначения и, следовательно, ее возможности не будут полностью использоваться в анализе электрофореграмм. В настоящее время в Институте космических исследований АН СССР подготовлена ориентированная на прикладные задачи модульная система микроСВИТ, позволяющая, в частности, подобрать режим, наиболее эффективный для оценки электрофореграмм. Система микроСВИТ управляется одним или несколькими микропроцессорами с системой команд «Электроника-60» или 1810ВМ86, одним из которых может быть выделен для функционирования в качестве видеопроцессора, включает несколько (от 4 до 16) памяти изображения, блок управления, обеспечивающий ввод и вывод телевизионного изображения, обычную периферийную вычислительную аппаратуру и специализированные блоки для выполнения обработки в интересах конкретных приложений. Система СВИТ может стать базой для развития подобных исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ковалев Л. И., Шишкин С. С., Иволгина Г. Л. и др. // Биохимия. — 1986. — Т. 51, № 6. — С. 896—908.
2. Лебедев Д. С., Попова Н. Р. // Иконика: Теория и методы обработки изображений. — М., 1983. — С. 5—20.
3. Чесалин Л. С., Лубман С. В., Борисенко В. И. и др. // Препринт. ИКИ АН СССР. / 1982. — № 721. — С. 1—12.
4. Чесалин Л. С., Борисенко В. И., Балаховская Т. И. и др. // Там же. — 1986. — № 1112. — С. 1—60.
5. Шишкин С. С. // Вести. АМН СССР. — 1985. — № 1. — С. 78—84.
6. Amphlett C. W., Syska H., Perry S. V. // FEBS Lett. — 1976. — Vol. 63. — P. 22—26.
7. Anderson N. G., Anderson L. // Behring Inst. Mitt. — 1979. — № 6. — S. 169—210.
8. Anderson N. G., Anderson N. L. // Clin. Chem. — 1982. — Vol. 28. — P. 739—749.

9. Anderson N. G., Anderson N. L. // Ibid—1984. — Vol. 30. — P. 1898—1905.
10. Celis J. E., Bravo R. // Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins: Methods and Applications. — New York, 1984. — P. 39—92.
11. Cossinger J., Miller M. J., Kiem Phong Vo et al. // J. Biol. Chem. — 1979. — Vol. 254. — P. 7986—7998.
12. Garrels J. J. // Ibid. — P. 7961—7977.
13. Garrels J. J. // Meth. Enzymol. — 1983. — Vol. 100. — P. 411—423.
14. Lemkin P. F., Lipkin L. E., Leister E. P. // Clin. Chem. — 1982. — Vol. 28. — P. 840—849.
15. Libera L. D., Margreth A., Mussini N. // Muscle Nerve. — 1978. — Vol. 1. — P. 280—291.
16. Merril C. R., Goldmann G. // Clin. Chem. — 1982. — Vol. 28. — P. 1015—1020.
17. O'Farrell P. H. // J. Biol. Chem. — 1975. — Vol. 250. — P. 4007—4021.
18. Pahlic M., Tyson J. J. // Exp. Cell. Res. — 1985. — Vol. 161. — P. 533—540.
19. Spooner B., Davis G., Sulling M. // J. Cell. Biol. — 1985. — Vol. 101. — P. 403.

Поступила 10.10.86

ANALYSIS OF TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORETIC FRACTIONATION OF PROTEINS USING THE COMPLEX SET FOR FIGURES PROCESSING OF VIDEOINFORMATION — SVIT

S. S. Shishkin, R. V. Il'insky, L. I. Korolev, V. I. Borisenko, P. S. Gromov, L. S. Chesalin

Institute of Medical Genetics, Academy of Medical Sciences of the USSR, Institute of Space Investigations, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Possible solution of four main problem in analysis of two-dimensional electrophoregrams using the complex set for processing of video-information SVIT is considered: 1. a. potentiality for evaluation of correlation between integral optic density of spots on gel plates and amount of protein fractionated, 2. qualitative comparison of similar spots from various electrophoregrams, 3. the problem of overlapping spots, where the plane pictures of spots were transformed into threedimensional system of peaks, 4. use of bench-marks for geometric transformations and production of unified pictures. The complex set or its modifications were able to settle these problems.

РЕЦЕНЗИИ

УДК 617-001+617.31-07:616-008.9-074(049.32)

А. М. Герасимов, Л. Н. Фурцева. Биохимическая диагностика в травматологии и ортопедии. — М.: Медицина, 1986. — 234 с.

Современный этап развития медицины характеризуется бурным ростом информации о патохимических механизмах развития заболеваний, на основе чего возникают новые

представления об их патогенезе, принципах диагностики и лечения. Травматология и ортопедия в этом отношении не являются исключением: благодаря развитию биохимического подхода эта отрасль хирургии все более дополняется методологией терапевтических отраслей, использованием фармакологических средств с учетом метаболических основ патологии.

Рецензируемая монография является крупным шагом в направлении превращения травматологии и ортопедии в отрасль медицины, объединяющих достижения различных медико-биологических и клинических наук с целью профилактики, диагностики и лечения повреждений и заболеваний опорно-двигательного аппарата. Актуальность книги обусловлена главным образом тем, что отечественная травматология и ортопедия, несмотря на приоритет в разработке аппаратов и методик хирургического вмешательства на скелете, существенно отстает от уровня дифференциальной диагностики и фармакологического лечения заболеваний ортопедо-травматологического профиля, достигнутого за рубежом. Одной из причин такого отставания является недооценка возможностей клинической биохимии в распознавании сущности костно-суставной патологии. Вследствие этого лабораторная служба ортопедо-травматологических стационаров развита сравнительно слабо, отсутствуют некоторые фармакологические препараты, с успехом применяющиеся за рубежом для лечения ортопедических больных. Приходится констатировать, что значение медицинской биохимии в различных отраслях медицины не одинаково. Если в клинике внутренних болезней постановка правильного диагноза без солидного биохимического обследования больного в наше время едва ли возможна, что в хирургических отраслях медицины диагностика большинства заболеваний базируется на клинических или в лучшем случае на клинико-лабораторных симптомокомплексах. Вместе с тем рассмотрение организма как единой метаболической системы является единственно правильной методологической основой для понимания сущности заболевания, оценки тяжести болезни и эффективности лечения.

Рецензируемая монография на примере травматологии и ортопедии ярко иллюстрирует условность существующего отраслевого принципа медицины, ставит под сомнение целесообразность сложившейся исторически и все усиливающейся специализации медицины, особенно медицинской науки. В связи с этим книга представляет интерес не только для биохимиков, ортопедов и травматологов, но и для организаторов здравоохранения, генетиков, педиатров, терапевтов, эндокринологов, фармакологов, патофизиологов, врачей-лаборантов и других специалистов.

Клиническая биохимия ориентирована главным образом на анализ сыворотки крови и мочи. Многочисленными примерами авторы показывают, что исследование нетрадиционных объектов — биоплатов культуры фибробластов, клеток крови, слюны открывают новые перспективы для выяснения патогенеза и лабораторной диагностики заболеваний. В приложении к монографии приведены нормы для биохимических парамет-

ров сыворотки крови, синовиальной жидкости и мочи.

Структура монографии оригинальна и не имеет аналогов в отечественной и зарубежной литературе. Можно было ожидать, что первые главы монографии будут посвящены общим проблемам патологии соединительной ткани, что было бы вполне оправдано и придало бы легкость восприятия читателем последующего фактического материала. Однако авторы ограничились изложением лишь одной из проблем патологии, введя новое понятие — свободно-радикальная патология. Отсутствие других аспектов в какой-то мере компенсируется ссылками на монографии, изданные ранее. Но все же остаются опасения, что для не подготовленного читателя не все разделы книги будут понятны. Что касается изложенной авторами главы о свободно-радикальной патологии, что этот раздел можно оценить как действительно новый аспект учения о соединительной ткани, составляющий одно из принципиальных достоинств монографии.

Принципиальную новизну имеет также глава «Травматические болезни». В сущности взгляд биохимика на больного с травмой существенно отличается от взгляда врача-травматолога. Анализ метаболического состояния организма после травмы позволил авторам развить появившиеся в последнее время представления о травматической болезни. Особую ценность для травматологии и ортопедии представляют понятия о таких вариантах травматической болезни, как ятрогенная и посттравматическая. Впервые вводится понятие о токсико-травматических болезнях и предлагается их классификация. Эта часть работы, вероятно, станет предметом научных дискуссий, поскольку экспериментальная медицина еще не располагает соответствующими моделями. Вместе с тем сама постановка вопроса о необходимости рассмотрения травматологии как науки о новом метаболическом состоянии организма, возникшем после травмы и, соответственно, о необходимости фармакологической биохимической реабилитации больного с травмой заслуживает одобрения как единственно возможная реализация главного принципа отечественной клинической медицины: лечить не болезнь, а больного с учетом заболевания, предшествовавшего травме.

Основная ценность монографии состоит в изложении современных представлений о метаболических проявлениях ортопедических заболеваний. Авторы скрупулезно отобрали ту информацию, которая может быть получена при обследовании больного человека. Экспериментальная костно-суставная патология нашла лишь частичное отражение, что вытекает из названия и цели книги. Если исходить из нужд практической медицины, то монография, лежащая на столе у клинициста и напоминающая ему о возможности, например почечной и печеночной патологии скелета, безусловно, послужит стимулом к углубленному обследованию больного с неясным диагнозом. Преимущества биохимической диагностики перед традиционным клинкорентгенологическим подходом наиболее ярко видны из раздела, посвященного наследственным рахитам. Здесь клинически сходный витамин-D-резистентный рахит «распался» на основе биохимических параметров или