

ТОМ XXXIV

ВЫПУСК 3

МАЙ — ИЮНЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1988

# ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

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

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БАЕВ А. А. (Москва),	ТРОИЦКИЙ Г. В. (Симферополь)
БЕЛИЦЕР В. А. (Киев)	ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)
БЫЧКОВ С. М. (Москва)	ТЫХЕПЫЛЬД Л. Я. (Тарту)
КОНСТАНТИНОВ А. А. (Хабаровск)	УТЕВСКИЙ А. М. (Харьков)
КУДРЯШОВ Б. А. (Москва)	ШАПОТ В. С. (Москва)
ЛЯХОВИЧ В. В. (Новосибирск)	ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)
ПАСХИНА Т. С. (Москва)	ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)

Адрес редакции журнала:

Москва, 109801, Солянка, 14

АМН СССР

Тел. 297-16-44

Зав. редакцией Л. А. Фирсова

1283

А. А. Бугланов

**МЕТАБОЛИЗМ ЖЕЛЕЗА И МЕТАЛЛОПРОТЕИДЫ (обзор)**

НИИ гематологии и переливания крови Минздрава Узбекской ССР, Ташкент

Метаболизм важнейшего олигоэлемента — железа в организме человека можно представить в виде процессов абсорбции, транспорта в ткани-депо, хранения в ткани, мобилизации и транспорта в ткани-мишени, использования в синтезе металлопротеидов, функционирования в составе металлопротеидов, катаболизма металлопротеидов, повторного использования, выделения. Вся система таких процессов, направленных на поддержание гомеостаза железа в организме, осуществляется через посредство различных металлопротеидов.

Ежесуточно около 1 мг железа всасывается в верхних отделах кишечника и вовлекается в обменные процессы в организме. Примерно такое же количество железа ежесуточно теряется организмом. Недостаточность железа в организме вследствие, например, малабсорбции или значительной кровопотери приводит к развитию анемии. Избыточное поступление железа в организм при массивных трансфузиях крови может вызвать перегрузку и интоксикацию организма. Это предполагает наличие системы регуляции метаболизма железа в организме. Составной частью такой системы являются металлопротеиды, непосредственно участвующие в обмене железа: трансферрин, ферритин, лактоферрин, гаптоглобин, гемопексин и церулоплазмин. Из общего количества железа в организме взрослого человека, составляющего около 4,5 г [39], подавляющая часть связана с белками — гемоглобином, миоглобином, цитохромными компонентами дыхательной цепи митохондрий, каталазой и др. Существенная часть железа (1,5 г) находится в составе негемовых белков (таких, как ферритин и трансферрин) и гемосидерина, представляющего собой продукт

частичной протеолитической деградации ферритина. Несмотря на то, что абсорбция железа у человека оценивается приблизительно в 1 мг, ежесуточно в организме обменивается примерно 38 мг железа, основная часть которого (30 мг) поступает в костный мозг, где используется при биосинтезе гемоглобина, 4,5 мг обменивается в тканях печени, мышц и ретикулоэндотелиальных клетках и около 3 мг обменивается с пулом трансферрина в экстравазкулярной жидкости. Из 30 мг железа, поступающего ежесуточно в костный мозг, большая часть (около 21 мг) включается в созревающие эритроциты и покидает костный мозг. Современная биологическая модель феррокинетики предусматривает, что часть поступившего в костный мозг железа, составляющего около 9 мг, аккумулируется в ретикулоэндотелиальных клетках костного мозга, при деструкции в них дефектных красных кровяных клеток [36]. Основная масса эритроцитов после циркуляции в кровотоке в течение 100—110 дней подвергается деструкции в ретикулоэндотелиальной системе (селезенке и купферовских клетках печени), при этом более половины осебжающегося здесь железа достаточно быстро возвращается в кровоток, связывается трансферрином и вновь поступает в клетки эритрона, где используется при биосинтезе гемоглобина или в клетки печени и других органов, где депонируется в ферритине [36]. В свою очередь, известно, что при железодефицитных состояниях абсорбция железа в двенадцатиперстной кишке усиливается и, наоборот, при синдромах перегрузки железом (например, при идиопатическом гемохроматозе) снижается [7, 21]. Механизм, лежащий в основе регуляции абсорбции железа в клетках слизистой оболочки тонкой



кишки, до конца еще не ясен. В экспериментальных данных, объясняющих механизм, большая роль в регуляции абсорбции железа отводится железосвязывающим белкам, локализованным в клетках слизистой оболочки — трансферрину и ферритину [21, 22]. Отмечают, что железо, связываясь с соответствующими рецепторами на поверхности клеток слизистой оболочки кишечника, затем поступает энергозависимым путем внутрь клеток [34]. Предполагают, что в состав специфических рецепторов входит трансферрин, встроенный в клеточную мембрану [25, 32]. Этот же самый белок рассматривают и в качестве основного переносчика железа от клеток слизистой оболочки кишечника в плазму крови. Такая точка зрения нашла экспериментальное подтверждение. Недостаток железа в организме компенсаторно вызывает усиленный биосинтез трансферрина в печени и возрастание его концентрации в плазме крови. Аналогичная ситуация имеет место и в кишечном эпителии, где наблюдаются усиление биосинтеза и соответственно увеличение содержания трансферрина в клетках слизистой оболочки при дефиците экзогенного железа [21, 22]. Трансферрин слизистой был выделен из гомогената слизистой оболочки кишечника многих экспериментальных животных [22, 30].

Отмечено, что по своим основным физико-химическим свойствам трансферрин слизистой оболочки и трансферрин плазмы крови достаточно близки, хотя и различаются по аминокислотному и изoeлектрическому составу [30]. Трансферрин слизистой оболочки обладает перекрестной иммунореактивностью с антителами против плазменного трансферрина, что позволило [41] количественно оценить содержание этого белка в различных сегментах кишечника. Содержание трансферрина, рассчитанное в микрограммах белка на 1 см кишечного сегмента, составляет в среднем 28, 20 и 13 мкг/см соответственно в двенадцатиперстной, тонкой и толстой кишках у экспериментальных железодефицитных животных и 15, 14 и 12 мкг/см в тех же отделах кишечника у контрольных животных. Таким образом, содержание трансферрина в клетках слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки, где в основном происходит абсорбция железа, у железодефицитных животных почти в 2 раза

выше, чем у контрольных. Полученные результаты указывают на существенную роль трансферрина в регуляции абсорбции железа в клетках слизистой оболочки.

Роль ферритина в регуляции абсорбции железа сводится к предохранению клеток кишечного эпителия от токсического действия избыточных доз железа, поступающего в клетки слизистой оболочки из желудочно-кишечного тракта. Впервые Granick [27] была предложена теория так называемого «слизистого блока», согласно которой абсорбция железа из кишечника клетками слизистой оболочки регулировалась содержанием в них ферритина, который депонировал избыток поступающего в клетки железа, предотвращая его дальнейшую абсорбцию, а захваченное железо терялось при слущивании погибших клеток эпителия кишки. В дальнейшем было показано, что повышенное образование ферритина в эпителиальных клетках кишечника является следствием, а не причиной процесса абсорбции железа. Железо, абсорбированное клетками слизистой оболочки, является индуктором усиленного синтеза на полисомных комплексах белковых субъединиц ферритина, которые после агрегации в патиновую молекулу апоферритина немедленно депонируют избыточное железо, не поступившее в кровоток, предохраняя таким образом клетки от интоксикации. Интересной особенностью ферритина слизистой оболочки в отличие от ферритина иного происхождения является низкое содержание в нем железа [36]. Физиологическое значение этого понятно — низкое содержание железа и, следовательно, большая железосвязывающая емкость ферритина слизистой оболочки позволяет ему депонировать значительные количества железа, поступающего в клетки слизистой оболочки.

В последние годы появились сведения о возможной роли лактоферрина в регуляции абсорбции железа. Железосвязывающий белок лактоферрин встречается практически во всех биологических жидкостях и, как отмечают [2, 8, 9], выполняет в организме ряд важных функций, являясь антимикробным фактором бактерицидной системы фагоцитов [4] и участвуя в регуляции миелопоэза [9]. Рядом исследователей [12, 42] показана возможность участия лак-

тоферрина в регуляции абсорбции железа в желудочно-кишечном тракте новорожденных в качестве ограничительного фактора абсорбции. Известно, что гомеостаз железа у новорожденных в значительно большей степени, чем у взрослых, поддерживается за счет абсорбируемого железа [19]. В то же время в организме новорожденного уже существуют достаточные запасы депонированного железа и неконтролируемая абсорбция экзогенного железа могла бы привести к интоксикации организма. На ранних стадиях жизни организма лактоферрин, обладая высоким сродством к железу, может играть существенную роль в ограничении абсорбции алиментарного железа в желудочно-кишечном тракте новорожденного. В пользу этого свидетельствуют высокая концентрация лактоферрина в материнском молоке в начальной стадии кормления и особенно в молозиве, где его концентрация может составлять до 15 мг/мл [35], а также низкая протеолитическая активность в желудочно-кишечном тракте у новорожденных [42] за счет высокого содержания в молоке ингибиторов протеолитических ферментов, в частности антитрипсина. При этом высокая концентрация антитрипсина в молоке поддерживается достаточно долго, особенно в первое время кормления. Кроме того, рядом исследователей отмечено, что связывание железа апотрансферрином и, в частности, аполактоферрином [1, 11] повышает резистентность молекулы этого белка к действию протеолитических ферментов.

Имеются сведения, предполагающие участие гормонов, в частности эритропоэтина, в регуляции абсорбции железа [36], хотя строгих доказательств этому нет. Как предполагают, сывороточный трансферрин играет большую роль в поддержании гомеостаза железа в организме, что обусловлено функциональной неэквивалентностью двух железосвязывающих центров этого белка, впервые обнаруженной Fletcher и Huehns [26] и подтвержденной позднее другими исследователями [10, 38, 40]. В соответствии с этими взглядами трансферрин является не просто пассивным переносчиком железа, но и регулятором его абсорбции и распределения в организме, за счет того, что оба железосвязывающих центра высвобождают железо избирательно, в зависимости от ак-

центирующей ткани. Так, если один центр поставляет железо преимущественно в ретикулоциты и плаценту, то другой центр ориентирован в своей функции на гепатоциты или клетки слизистой оболочки. В то же время имеются работы, в которых приводятся результаты противоположного характера. Согласно этим сообщениям, оба центра связывания железа в молекуле трансферрина функционально эквивалентны [20, 23]. Huebers и соавт. [31], проведя соответствующие экспериментальные исследования, отметили, что гипотеза Fletcher — Huehns основывалась на конкурентном преимуществе диферритрансферрина (2 Fe-ТФ) над моноферритрансферрином (Fe-ТФ) при связывании с рецепторами, а при сравнении моноферриформ этого белка каких-либо различий в способности передавать железо в ретикулоциты не обнаружено. Тем не менее остается фактом, что железо связывается с трансферрином преимущественно в кислотолabileм В-центре, локализованном в N-концевом домене этого белка, тогда как при некоторых патологиях обмена железа (например, при гемолитических анемиях) наблюдается преимущественное связывание этого биометалла в кислотостабильном А-центре, локализованном в С-концевом домене трансферрина [6].

Пул трансферрина, циркулирующий в кровотоке, таким образом представлен различными молекулярными формами — диферри-, моноферри-, и апотрансферрином [24]. В норме в кровотоке преобладают апотрансферрин и моноферритрансферрин с локализацией железа в В-центре [8]. Если относительно функциональной гетерогенности двух железосвязывающих центров трансферрина единого мнения нет, то функциональная гетерогенность трансферринового пула, циркулирующего в кровотоке, показана экспериментально. Установлено, что диферритрансферрин поставляет свое железо в ретикулоциты эффективнее, чем моноферритрансферрин [32]. Это обусловлено более успешной конкуренцией его с моноферритрансферрином за рецепторы на поверхности ретикулоцитов. Очевидно эффективность снабжения клеток железом зависит также и от количества в них специфических рецепторов для трансферрина. Такие рецепторы имеются во многих клетках, по их количе-

ство варьирует. В гепатоцитах это количество оценивается в 36 700 на 1 клетку [46], в ретикулоцитах эта величина гораздо выше и по различным данным определяется от 105 000 [33] до 300 000 на 1 клетку [37]. По расчетам [37], в течение 1 мин ретикулоцит может утилизировать через систему этих рецепторов  $1 \cdot 10^6$  атомов железа из трансферрина. Взаимодействие трансферрина с ретикулоцитами осуществляется путем опосредованного рецептором эндоцитоза [29], а освободившееся железо становится доступным для включения в процессы синтеза гема в митохондриях [44]. После освобождения железа молекулы апотрансферрина транспортируются из клеток, поступают в кровоток и вновь способны выполнять свою функцию по транспорту железа в эритрои. После деструкции отживших эритроцитов железо временно запасается в ретикуло-эндотелиальных клетках. Высвобождение железа из макрофагов ретикулоэндотелиальной системы опосредуется специфическими рецепторами для апотрансферрина, которые могут связывать более 100 000 молекул апотрансферрина на 1 клетку и отличаются от таковых для насыщенного железом трансферрина. Предполагают, что усиление абсорбции железа клетками слизистой оболочки и передача его в кровоток может быть вызвана увеличением содержания специфических рецепторов для апотрансферрина плазмы в этих клетках.

Трансферрин является основным, хотя и не единственным медиатором железа в плазме крови человека. При некоторых заболеваниях (например, при гемолитической анемии) происходит массивный внутрисосудистый гемолиз (в норме этот процесс затрагивает примерно 10 % ежедневно разрушающихся эритроцитов [36]), при котором в плазму крови освобождается как свободный гемоглобин, так и свободный гем. Как гемоглобин, так и гем в плазме крови образуют комплексы с гаптоглобином и гемопексином соответственно. Комплексы гемоглобин — гаптоглобин и гем-гемопексин транспортируются в гепатоциты, в мембранах которых для них имеются специальные рецепторы, причем эффективное связывание рецепторов наблюдается не с самими белками гаптоглобином и гемопексином, а именно с образованными

комплексами [43]. При деструкции гемоглобина и гема в гепатоцитах освобождающееся железо поступает в плазму крови, где вновь связывается трансферрином и поступает в эритроидный ряд.

Запасы железа в организме сосредоточены в депонирующих органах, где оно накапливается в виде железосодержащего белка ферритина, а также в составе гемосидерина. Ферритин представляет собой универсальный депонирующий железо белок, присутствующий практически во всех клетках и тканях организма. Ферритин — мультисубъединичный белок с мол. массой 450 000—470 000 Д [3, 28], имеющий внутреннюю полость, где находится железосодержащий кристалл [5]. Молекула холоферритина напоминает форму сферических вирионов. Этот белок имеет большую железосвязывающую емкость, позволяющую аккумулировать до 4500 атомов железа [16, 17]. Такая железосвязывающая емкость ферритина, как правило, не зависит от видовой и органной специфичности (за исключением, пожалуй, ферритина слизистой оболочки). Содержание железа в последнем, как отмечалось выше, значительно меньше. Характерной особенностью ферритина является его гетерогенность в органах и тканях организма, обусловленная различным соотношением входящих в состав белка двух типов субъединиц — H и L, различающихся между собой по молекулярной массе, общему поверхностному заряду и иммунологическим свойствам [17, 18]. Основная биологическая функция тканевых ферритинов заключается в депонировании феррионов железа ( $\text{Fe}^{3+}$ ), которые в свободном состоянии весьма токсичны для организма (даже в низких концентрациях) и способны при необходимости обеспечивать синтез различных железосодержащих белков. Эта функция осуществляется в процессе депонирования и мобилизации железа ферритином. В составе железосодержащего ядра внутри молекулы ферритина железо находится в форме феррионов и при мобилизации из ферритина восстанавливается в ферроионы при участии флавинов и их производных [17]. Однако для того чтобы включиться в молекулы апотрансферрина, обладающие способностью избирательно связываться лишь с феррионами, но не с ферроио-

нами, последние снова должны окислиться в феррионы. Отмечают, что на данной стадии окисления важную роль играет медьсодержащий гликопротеид — церулоплазмин, имеющий еще иное название — феррооксидаза I [18].

С появлением в экспериментальной практике высокочувствительных радиоиммунологических методов было установлено наличие в сыворотке крови в очень низких концентрациях так называемого сывороточного ферритина. Дальнейшие исследования показали, что источником этого сывороточного ферритина являются клетки ретикулоэндотелиальной системы. Сывороточный ферритин обладает рядом особенностей в отличие от тканевых ферритинов. Так, молекулы сывороточного ферритина гликозилированы [15], т. е. подвергаются посттрансляционной модификации. Такие модификации (гликозилирование, фосфорилирование, ацетилирование и т. д.) характерны для синтеза так называемых экспортных белков, предназначенных для секреции в кровотока и транслируемых на полисомах, ассоциированных с мембранами эндоплазматической сети. Возможно, что и молекулы сывороточного ферритина синтезируются на мембраносвязанных полисомах и активно секретуются в кровотока [28] в отличие от таковых ферритинов, синтезируемых на свободных полисомах и предназначенных для использования внутри клеток. Другой особенностью сывороточного ферритина является низкое содержание в нем железа. Практически весь сывороточный ферритин поглощается гепатоцитами, в которых имеются специальные рецепторы для этого белка [28]. Биологическая функция сывороточного ферритина в настоящее время представляется пока неясной. Если таковой рассматривать транспорт железа из ретикулоэндотелиальной системы в печень, то, по-видимому, вклад сывороточного ферритина в феррокинетику невелик. Показано, что этот белок обеспечивает не более 1—1,5 мг железа ежедневно [36]. Хотя и содержание ферритина в сыворотке крови незначительно, оно хорошо коррелирует с насыщенностью депо и отдельных тканей железом, что с успехом применяется в диагностических целях [13, 14], в частности при диагностике latentного дефицита железа.

Таким образом, весь метаболический

цикл железа представляет собой сложную систему разнонаправленных процессов, обеспечивающих поддержание его гомеостаза в организме и осуществляющихся с помощью различных металлопротеинов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бугланов А. А., Салихов Т. А. // Химия природ. соедин. — 1983. — № 6. — С. 768—772.
2. Бугланов А. А., Салихов Т. А. // Там же. — 1984. — № 2. — С. 139—151.
3. Казакбаева Х. М., Бугланов А. А., Бахрамов С. М. // Там же. — 1986. — № 1. — С. 96—99.
4. Кудрявицкий А. И. // Лаб. дело. — 1985. — № 1. — С. 45—47.
5. Митерев Ю. Г., Назаретян М. К., Андреева А. П. и др. // Гематол. и трансфузиол. — 1983. — № 6. — С. 38—44.
6. Aisen P. // Biol. Chem. Iron Look Metab., 1982. — P. 63—83.
7. Boley R. G., Gallagher N. D. // Gastroenterology. — 1977. — Vol. 73. — P. 267—272.
8. Bezukorovainy A. // Diet and Resistance to Disease. — New York, 1981. — P. 139—154.
9. Birgens H. S. // Scand. J. Haemat. — 1984. — Vol. 33. — P. 225—230.
10. Boulard M. // Probleme der Erythrozytopoese, Granulozytopoese und des malignen Melanoms. — Berlin, 1978. — P. 11—16.
11. Brock J. H. // Arch. Dis. Child. — 1980. — Vol. 55. — P. 417.
12. Brock J. H., Arzabe F., Lempereur F. et al. // Biochim. biophys. Acta. — 1976. — Vol. 445. — P. 214.
13. Colama R. L. // Laboratorio. — 1984. — Vol. 78. — P. 567—576.
14. Cook J. D., Skikne B. S. // Amer. J. clin. Nutr. — 1982. — Vol. 35. — P. 1180—1185.
15. Cragg S. J., Wagstaff M., Worwood M. // Biochem. J. — 1981. — Vol. 199. — P. 565—571.
16. Crichton R. R. // Med. Welt. — 1981. — Bd 42. — S. 1401—1404.
17. Crichton R. R. // Biol. Chem. Iron, 1982. — P. 45—61.
18. Crichton R. R., Mareschal J. C. // Inorganic Biochemistry. — London, 1982. — Vol. 3. — P. 78—125.
19. Dallman P. R., Siimes M. A., Stekel A. // Amer. J. clin. Nutr. — 1980. — Vol. 33. — P. 86—118.
20. Delany T. A., Morgan W. H., Morgan E. H. // Biochim. biophys. Acta. — 1982. — Vol. 701. — P. 295—304.
21. Edwards J. A., Hoke J. E. // J. Med. — 1978. — Vol. 9. — P. 353—364.
22. El-Shobake F. A., Rummel W. // Res. exp. Med. — 1978. — Vol. 173. — P. 119—129.
23. Esparza I., Brock J. H. // Biochim. biophys. Acta. — 1980. — Vol. 624. — P. 479—489.
24. Finch C. A. // Blood. — 1982. — Vol. 60. — P. 1241—1246.
25. Finch C. A., Huebner H. // New Engl. J. Med. — 1982. — Vol. 306. — P. 1520.
26. Fletcher J., Huebner H. // Nature. — 1968. — Vol. 218. — P. 1211—1214.
27. Granick S. // Science. — 1946. — Vol. 103. — P. 107.

28. Halliday J. W., Powell L. M. // Semin. Liver Dis. — 1984. — Vol. 4. — P. 207—216.
29. Hopkins C. R. // Nature. — 1983. — Vol. 304. — P. 684—685.
30. Huebers H., Huebers E., Rummel W. et al. // Europ. J. Biochem. — 1976. — Vol. 66. — P. 447—455.
31. Huebers H., Josephson B., Huebers E. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1981. — Vol. 78. — P. 2572—2576.
32. Huebers H., Csiba E., Huebers E. et al. // Ibid. — 1983. — Vol. 80. — P. 300—304.
33. Iacopetta B. J., Morgan E. H., Yeoh G. C. T. // Biochim. biophys. Acta. — 1982. — Vol. 687. — P. 204—210.
34. Linder M. C., Munro H. N. // Fed. Proc. — 1977. — Vol. 36. — P. 2017—2023.
35. McClelland D. B. L., McGrath J., Samson R. R. // Acta paediat. scand. — 1978. — Suppl. — 271. — P. 1.
36. Munro H. N., Linder M. C. // Physiol. Rev. — 1978. — Vol. 58. — P. 318—387.
37. Newman R., Schneider C., Sutherland R. et al. // Trends Biochem. Sci. — 1982. — Vol. 7. — P. 397—400.
38. Nunez M. T., Glass J. // J. biol. Chem. — 1983. — Vol. 258. — P. 9676—9680.
39. Nimeh N., Bishop R. // Med. Clin. N. Amer. — 1980. — Vol. 64. — P. 631—645.
40. Okada S., Jarvis B., Brown E. B. // J. clin. Lab. Med. — 1979. — Vol. 93. — P. 189—198.
41. Osterloh K., Forth W. // Blut. — 1981. — Bd 43. — S. 227—235.
42. Reiter B. // Int. J. Tissue React. — 1983. — Vol. 5. — P. 87—96.
43. Smith A., Morgan W. T. // Biochem. J. — 1979. — Vol. 182. — P. 47—54.
44. Smith G. D., Morgan E. H., Peters T. J. // Biochem. Soc. Trans. — 1985. — Vol. 13. — P. 1138—1139.
45. Van Oost B. A., Van den Beld B., Cloin L. G. L. et al. // Clin. Biochem. — 1984. — Vol. 17. — P. 263—269.
46. Young S. P., Aisen P. // Biochim. biophys. Acta. — 1980. — Vol. 633. — P. 145—153.

Поступила 09.03.87

## METABOLISM OF IRON AND METALLO-PROTEINS

A. A. Buglanov

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

Problems of ferrokinetics, participation of metalloproteins transferrin, ferritin and lactoferrin in metabolism of iron at the step of the metal absorption, transport of iron by means of transferrin, haptoglobin and hemopexin, interaction of transferrin with reticulocytes, deposition of iron in ferritin, mobilization of iron from ferritin via ceruloplasmin are considered. Importance of blood serum ferritin is discussed.

УДК 616.379-008.64-092:612.118.223-064

Я. А. Александровский

## РОЛЬ ИНГИБИТОРОВ АКТИВАЦИИ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА В ПАТОГЕНЕЗЕ И ТЕРАПИИ ИНСУЛИНЗАВИСИМОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА (обзор)

Институт химической физики АН СССР, Москва

Основные деструктивные процессы в патогенезе инсулинзависимого сахарного диабета (ИЗСД) направлены в первую очередь против инсулярного аппарата поджелудочной железы. Поэтому классификация аутоиммунных заболеваний [28] позволяет рассматривать ИЗСД как органоспецифическое заболевание. Указанные патологические процессы включают в себя блокирование физиологических секреторных механизмов  $\beta$ -клеток и их разрушение, прогрессирующее во времени [1, 23, 48, 49, 67, 69]. Названными специфическими цитотоксическими свойствами обладают факторы клеточного и гуморального иммунитета [71]. Однако выявляемый дисбаланс в соотношении субпопуляций Т-лимфоцитов без изменения их общего количества, увеличение числа К-клеток, осуществляющих антителозависимый клеточный ли-

зис, и ряд других изменений [44, 67, 71, 76] — скоротечны и проявляются только в начале болезни в течение нескольких первых месяцев, изменяясь в сторону нормализации. Тем не менее значимость сдвигов в клеточном иммунитете в период манифестации, сопровождающихся морфологическими и метаболическими изменениями как в опытах с экспериментальными животными [66], так и у больных ИЗСД, подтверждается не только цитотоксическим действием Т-лимфоцитов из крови больных с недавно диагностированным ИЗСД в экспериментах с  $\beta$ -клетками *in vitro* [41], но и способностью антилимфоцитарной сыворотки или моноклональных антител против бласттрансформированных Т-лимфоцитов предотвращать развитие болезни у ВВ/В крыс со спонтанным ИЗСД [60, 61].

С другой стороны, цитотоксические аутоантитела, специфичные к поверхностным рецепторам  $\beta$ -клеток (ICSA — islet cell surface antibodies), обнаруживаются у больных ИЗСД в течение всего периода болезни. Концентрация ICSA коррелирует с длительностью заболевания и фактически отражает степень поражения инсулярного аппарата поджелудочной железы при диабете. На основании этих данных ICSA рассматривают как один из наиболее важных диабетогенных факторов [1, 67, 71].

В то же время в ряде случаев ИЗСД может осложняться другими функциональными расстройствами и метаболическими нарушениями, чаще всего в виде сосудистых поражений [30]. Поэтому, определяя стратегию и тактику лечения ИЗСД, необходимо не только выявлять основные механизмы развития болезни на данном этапе, но и дифференцировать результаты терапевтических воздействий на основании адекватного отражения происходящих при лечении изменений.

С этих позиций методы иммунотерапии ИЗСД в «стационарном» периоде, основанные на комбинации иммуносупрессии комплементзависимой цитотоксичности и стимуляции регенерационных процессов  $\beta$ -клеток, представляются наиболее перспективными [1], а изменение уровня эндогенного инсулина — наиболее важным критерием эффективности проводимого лечения. Состояние больного, при котором в результате терапии повышение секреции инсулина будет адекватно содержанию глюкозы в крови, следует рассматривать как ремиссию [2]. В то же время, по-видимому, даже самое эффективное гипотетическое лечение ИЗСД, обеспечивающее отказ от инсулина, не устраняет факторов риска, определенных не только генетическим кодом [23], но и состоявшейся сенсibilизацией организма антигенами островковых клеток, что делает возможным рецидив болезни.

Указанные перспективные методы терапии могут быть осуществлены применением лекарственных препаратов, способных предотвращать активацию комплемента в начальной стадии, контролируемой первым субкомпонентом C1q [18]. В этом случае ICSA, рассматриваемые на данном этапе течения болезни как один из основных диабетогенных факторов, будут лишены

способности лизировать  $\beta$ -клетки и блокировать их физиологические секреторные механизмы высвобождения инсулина в ответ на стимуляцию глюкозой. С другой стороны, создавая условия, при которых невозможна активация комплемента по классическому пути, эти аутоантитела могут способствовать пролиферации сохранившихся  $\beta$ -клеток и усилению их функциональной активности [1]. (По данным работы [54]  $\beta$ -клетки были обнаружены более чем у 50 % больных с 10-летней давностью болезни и у 18 % с более длительным сроком заболевания.)

Названными свойствами ингибировать активацию комплемента обладают такие природные соединения, как C1-ингибитор эстераз (C1-ИНГ), гепарин, ряд синтетических пептидов и лекарственных препаратов. Возможность применения этих соединений в терапии ИЗСД и роль C1-ИНГ в патогенезе данного заболевания составляют предмет обсуждения в настоящей работе.

Активация системы комплемента по классическому пути инициируется фиксацией C1q в области константного домена  $C_H$  IgG [63, 74, 81]. Расшифровка первичной структуры данного  $F_c$ -фрагмента позволила синтезировать разнообразные пептиды, имитирующие аминокислотную последовательность предполагаемых центров связывания первого субкомпонента комплемента [13а, 33, 40, 43, 63, 74, 81]. По своему биологическому влиянию эти соединения в зависимости от структуры и концентрации, взаимодействуя с C1q, способны активировать либо ингибировать комплемент [40]. Рассматривая синтетические пептиды как потенциальные средства иммуносупрессорной терапии, мы привели в таблице структуры некоторых из них, характеризуя их способность ингибировать комплемент.

Как видно из таблицы, синтетический пептид 274—281 (№ 8) обладает наибольшим сродством к C1q и вследствие этого характеризуется наименьшим значением  $I_{50}$ . Ингибирующие свойства пептида 277—281 (№ 11) проявляются в меньшей степени. В то же время значительное упрощение методики получения делает его более доступным в плане дальнейшего использования. Указанные пептиды, как и некоторые другие, приведенные в таблице, в области высоких концентраций способны активировать комплемент [40]. Ис-



№ пеп- тида	Формула	Концентрация пептида, необходимая для связывания 50 % C1, I <sub>50</sub>	Источник
1	Glu-Trp-Tyr-Glu-Arg-Glu	2 мг/мл (2,2 мМ), 100 % ингибиро- вание	[33]
2	Z-Asn-Trp-Tyr-Val	2 мг/мл	[33]
3	Phe-Asn-Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Gln-Val- 275 290 His-Asn-Ala-Lys-Thr-Lys	20 мкМ	[74]
4	Gly-Val-Gln-Val-His-Asn-Ala-Lys-Thr-Lys 281 290 282	180 мкМ	[74]
5	Val-Gln-Val-His-Asn-Ala-Lys-Thr-Lys-Pro- 292 Arg-OH	175 мкМ	[63]
6	Лейпептин (Acetyl-Leu-Arginal)	30 мкМ, 100% ингибирование, неспе- цифическое связывание C1s	[33]
7	Глутатион (Gly-Cys-Gly) 277 281	10—40 мМ, 100% ингибирование	[33]
8	Lys-Ala-Asp-Trp-Tyr-Val-Asp-Gly	70 нг/мл (0,07 мкМ)	[40]
9	Lys-Phe-Asp-Trp-Ala-Val-Asp-Gly	2,31 мкг/мл	[40]
10	Lys-Phe-Glu-Trp-Tyr-Val-Glu-Gly-Val-Glu- Val-His-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys-Pro-Gly-Arg	2,8 мкг/мл	[40]
11	Trp-Tyr-Val-Asp-Gly	2,67 мкг/мл (4,2 мкМ)	[40]
12	Lys-Phe-Asp-Ala-Tyr-Val-Asp-Gly Агрегированный $\gamma$ -глобулин человека	33 мкг/мл 50 нг/мл (0,025 мкМ)	[40]

П р и м е ч а н и е. Последовательность аминокислотных остатков участка C<sub>H</sub> 2 домена IgG: 273 283 Val-Lys-Phe-Asp-Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu. В скобках приведены концентрации, пересчитанные с использованием данных других работ.

следования с этими соединениями представляются далеко не полными, и работы в этом направлении, в частности испытание их действия в патофизиологических экспериментах, должны быть продолжены [18].

Специфичность, избирательность действия и высокая ингибирующая способность — вот несомненные достоинства рассмотренных синтетических пептидов как иммуносупрессивных препаратов ближайшего будущего.

К сожалению, многие антикомплемментарные агенты других классов соединений, также способные ингибировать комплемент в начальной стадии активации, в значительной мере лишены этих достоинств названных синтетических пептидов. Однако те из лекарственных средств, которые широко используются в других целях и могут обладать необходимыми антикомплемментарными свойствами, заслуживают детального рассмотрения, в первую очередь благодаря их доступности уже в настоящее время. К таким соединениям относится гепарин, традиционно применяемый в медицине как антикоагулянт [4, 21].

Свойство гепарина ингибировать комплемент проявляется в его способности неспецифического взаимодействия непосредственно с активированным первым субкомпонентом комплемента C1 [46]. По-видимому, это взаимодействие обусловлено в первую очередь кулоновскими силами, благодаря высокому отрицательному заряду, который характеризует молекулу гепарина [4]. Действительно, такие полианионы, как декстран сульфат [58], поливинил сульфат, полиэтианол сульфат, хондроитин сульфат, сумарин и многие другие, характеризуются иммунодепрессивными свойствами [22, 23]. Концентрация гепарина, необходимая для ингибирования 50 % C1-активности сыворотки человека, сравнительно велика и по данным разных работ находится в пределах 0,1—1 мМ [43, 46]. Для создания указанной концентрации экзогенного гепарина в организме человека требовалось бы введение 10<sup>6</sup>—10<sup>7</sup> ЕД гепарина. Это превышает предельно допустимые дозы как минимум в 25 раз. Тем не менее многочисленные исследования применения гепарина в терапии ИЗСД и ряда других аутоиммун-

ных заболеваний, например гломерулонефрита [7, 19], в суточных дозах от 6000 до 20 000 ЕД продемонстрировали высокую его эффективность [3, 8, 12, 14, 20]. Среди разнообразных интерпретаций полученных результатов указывали в том числе и на способность гепарина ингибировать комплемент. Последнее предположение, по-видимому, является одним из наиболее верных, но в рамках другой, обсуждаемой ниже схемы.

Доминирующим механизмом способности гепарина ингибировать классический путь активации комплемента является его свойство усиливать функцию природного С1-ИНГ.

С1-ИНГ — гликопротеин с мол. массой 105 кДа, содержится в крови человека в большой концентрации —  $110 \pm 10$  мкг/мл [18, 55, 77]. Этот белок играет важную регуляторную роль не только в системе комплемента, предотвращая его активацию на первой стадии, но и в системах свертывания крови, фибринолиза и кишечного [42, 55, 56].

Показано, что использование гепарина в концентрациях, исключаящих проявление им собственных антикомплементарных свойств, усиливает эффективность инактивирующего действия С1-ИНГ примерно в 10 раз. Так, если в условиях проведения реакции связывания комплемента с сенсибилизированными эритроцитами барана при добавлении определенной концентрации С1-ИНГ степень гемолиза уменьшалась лишь на 9 %, то в присутствии гепарина (380 нг/мл) при той же концентрации ингибитора падение гемолитической активности составило 82 % [46].

Механизм усиления ингибирующих свойств С1-ИНГ под действием гепарина до конца не уточнен. Согласно [79], процесс ингибирования комплемента С1-ИНГ протекает по двухстадийному механизму. На первой стадии образуется быстродиссоциирующий комплекс в соотношении 1 : 1 между С1-ИНГ и активированными субкомпонентами  $C1\bar{s}$  или  $C1\bar{r}$ , проявляющих активность сериновых протеиназ, необходимую для активации следующего С4-компонента комплемента [18]. На второй стадии происходит медленная трансформация слабого комплекса в сильный с образованием в нем ковалентных связей между ферментом и ингибитором [34,

87]. Образующийся комплекс диссоциирует в раствор с одновременным вытеснением  $C1q$ , фиксированным иммунным комплексом, что и определяет инактивацию комплемента по классическому пути [18, 55]. На основании этих данных было высказано предположение, что гепарин благодаря своей специфичности к С1-ИНГ и С1 стабилизирует первоначально образованный комплекс между ними, одновременно соединяясь с двумя взаимодействующими молекулами, и тем самым способствует более быстрой перестройке его [46]. Согласно результатам работы [72], специфичность гепарина изменчива и в реакции между тромбином и антитромбином III (см. ниже) регулируется S-белком, модифицирующим гепарин.

Дальнейшими исследованиями удалось показать, что гепарин также ускоряет процесс распада ковалентного комплекса С1-ИНГ —  $C1\bar{s}$  ( $C1\bar{r}$ ) с образованием модифицированного С1-ИНГ (95 кДа) и небольшого пептида (2—5 кДа) [87]. Представляется заманчивым провести параллель между рассмотренным и изученными механизмами процесса инактивации других сериновых протеиназ соответствующими плазменными ингибиторами — антиплазмином, антитромбином III и  $\alpha_1$ -ингибитором [31, 45, 55, 59, 82]. Так, антитромбин III взаимодействует с активированными факторами системы свертывания крови ( $X_a$ ,  $XI_a$ ,  $XII_a$ ) с образованием комплексов, процесс распада которых является лимитирующей стадией. В присутствии гепарина скорость этой реакции существенно увеличивается [83]: например, скорость реакции распада комплекса  $XI_a$  — антитромбин III возрастает в 40 раз [37], а в результате реакции образуются неактивный модифицированный антитромбин III и пептид [51].

Таким образом, важным выводом из изучения механизма действия гепарина как антикомплементарного агента является его способность в малых концентрациях путем усиления действия С1-ИНГ эффективно ингибировать комплемент, в частности на первой стадии активации. (Особо отметим действие гепарина в усилении ингибирующих свойств другого природного ингибитора — фактора Н в процессе активации комплемента альтернативным путем



[39].) Приведенное объяснение механизма действия позволяет глубже понять причины положительного эффекта гепарина при ИЗСД. Эффективность гепаринотерапии ИЗСД, по-видимому, дополнительно обусловлена еще двумя обстоятельствами. Во-первых, концентрация эндогенного гепарина у больных ИЗСД снижена более чем в 2 раза по сравнению с нормой [14]. Во-вторых, гепарин эффективно взаимодействует с выделенным из крови больных ИЗСД и животных с экспериментальным ИЗСД так называемым диабетогенным фактором [12, 16, 17] с образованием прочного нековалентного комплекса [15]. По своей природе (глобулярный белок, мол. масса 60 кДа) и биологическому действию (вызывает гипергликемию у беспородных крыс, достоверно проявляющуюся и усиливающуюся в выбранные контрольные сроки измерения — 7-й и 14-й день после введения соответственно) диабетогенный фактор напоминает выделенный из островковых клеток поджелудочной железы человека белок (мол. масса 64 кДа), проявляющий антигенные свойства и взаимодействующий с аутоантителами, выявляемыми у больных ИЗСД [35, 36]. Если высказанное нами предположение об идентичности двух белков верно, то многочисленные свидетельства [15, 16] указывают на свойства гепарина экранировать антигенные детерминанты белка в комплексе, что способствует снижению иммунореактивности организма.

Тем не менее, несмотря на все рассмотренные и другие возможные механизмы действия гепарина в лечении ИЗСД, по данным клинических наблюдений проведенный курс терапии обеспечивал только улучшение состояния больных при полном отсутствии случаев ремиссии. В рамках рассматриваемой схемы такие результаты, по-видимому, могут быть объяснены тем, что концентрация С1-ИНГ в крови больных ИЗСД *если не снижена, то недостаточна* для полного ингибирования аутоиммунных деструктивных процессов. Действительно, при аутоиммунных заболеваниях у больных выявлено усиление биосинтеза первого субкомпонента комплемента С1q и в то же время снижение его концентрации в крови [18]. Этот результат вполне понятен, если исходить из природы

аутоиммунных заболеваний: синтезируемый С1q интенсивно вовлекается в процессы деструкции клеток. Следовательно, можно предположить, что эффективность ингибирования комплемента по классическому пути под действием С1-ИНГ в рассматриваемом случае определяется не недостатком гепарина и С1, а низкой концентрацией комплекса С1-ИНГ — С1s (С1г), обусловленной дефицитом С1-ИНГ.

Высказанное предположение поддается несложной экспериментальной проверке [52]. С другой стороны, в литературе уже имеются некоторые подтверждающие его данные. Показано, что эффективность действия С1-ИНГ в процессе инактивации С1-гемолитической активности в значительной мере зависит от того, находится ли С1 в жидкой фазе или связан с эритроцитами [46]. Когда активация С1 произошла не в растворе, а в результате фиксации на поверхности клетки, для достижения одинакового процента ингибирования гемолитической активности требуется увеличение концентрации С1-ИНГ в 10 000 раз. Это хорошо согласуется с современным пониманием физической роли С1-ИНГ, действие которого направлено в том числе на ингибирование процессов «незапланированной» активации комплемента в организме, происходящей по разным причинам [88].

Концентрация С1-ИНГ (74 мкг/мл), при которой достигается только 90 % ингибирования гемолитической активности (в случае С1q, связанного с клеткой), мало отличается от нормальной физиологической концентрации. Другими словами, для достижения предполагаемого терапевтического эффекта при лечении ИЗСД необходимо задействовать практически весь без исключения С1-ИНГ организма, что невозможно по ряду причин [80]. Во-первых, особенность ИЗСД как аутоиммунного заболевания заключается в том, что организм больного, по-видимому, не только не «распознает» течение патологического процесса, а даже «подстраивается» под него. Во-вторых, немаловажным оказывается то обстоятельство, что, как уже отмечалось, С1-ИНГ играет одну из главных регуляторных ролей в системах свертывания крови, фибринолиза и кининогенеза [42, 56], явля-

ясь, например, значительно более мощным ингибитором для калликреина, чем антитромбин III [83]. В то же время, ни один из известных ингибиторов неспособен заменить С1-ИНГ в процессе инактивации им комплекса [55].

Таким образом, интерпретация представленных результатов подтверждает правильность высказанного нами предположения. Следовательно, одним из важных направлений в комплексной терапии ИЗСД является стимуляция биосинтеза С1-ИНГ в организме больного.

Свойством избирательно стимулировать биосинтез белков обладают тестостерон и его производные со сниженными андрогенными свойствами, так называемые анаболические стероиды [5, 13, 21]. Применение некоторых из названных лекарственных средств в терапии ИЗСД приводит к улучшению общего самочувствия больных, повышению фибринолитической активности, уменьшению ацидоза, снижению уровня глюкозы в крови и в ряде случаев к значительному уменьшению (до 40 %) потребности в инсулине [5, 9—11, 57]. Показано, что гипогликемическое действие анаболических стероидов у этих больных обусловлено стимуляцией функциональной активности сохранившихся  $\beta$ -клеток и их пролиферацией [5, 70].

Однако результаты аналогичных исследований по применению андрогенов и анаболических стероидов в терапии подопытных животных с различными формами экспериментального сахарного диабета противоречивы [27, 29, 47, 78, 85]. Хотя клиническая картина течения заболевания в эксперименте и у людей во многом схожа, указанное несовпадение результатов в разных случаях может быть обусловлено неадекватностью моделей патологии человека [66, 73], разными дозировками препаратов и продолжительностью терапии, возрастной реактивностью животных и рядом других причин [29]. Так, терапия больных ИЗСД с использованием тестостерон-пропионата в дозе 50 мг/сут не приводила к достоверно регистрируемым изменениям в патологических процессах, в то время как повышение дозы препарата до 150 мг/сут способствовало ингибированию процессов катаболизма белка (о чем свидетель-

ствовало понижение секреции азота в 2—3 раза), существенному снижению уровня глюкозы в крови и моче, уменьшению концентрации кетоновых тел в крови и моче на 75 и 100 % соответственно [57]. Другим примером может служить влияние пола на частоту возникновения аутоиммунных заболеваний у людей и экспериментальных животных. У женщин системная красная волчанка и синдром Сьегрена встречаются чаще в 9 раз, ревматоидный артрит — в 2—4 раза, ИЗСД — в 5 раз, миастения — в 2 раза, некоторые виды хронического лимфоцитарного тиреоидита — в 25—50 раз чаще, чем у мужчин [32]. В то же время хотя у животных с экспериментальными формами некоторых из названных патологий в целом наблюдается аналогичная картина, однако в ряде случаев эти различия выражены менее ярко или нивелированы [29, 32, 66, 85]. Так, если у мышей линии NOD возникающий спонтанно уже на 5-й неделе после рождения ИЗСД проявляется преимущественно у самок, частота заболеваний среди которых достигает 80 % к 30-й неделе жизни [66], то развитие спонтанного ИЗСД у ВВ крыс не зависит от пола [85].

Поскольку эффективность терапии была прямо пропорциональна анаболическому действию препаратов [5, 32], можно предположить, что стимуляция и пролиферация инсулярных клеток обусловлены специфическим действием аутоантител благодаря лишению их названных цитотоксических свойств возросшей концентрацией С1-ИНГ. Прямые доказательства усиления биосинтеза С1-ИНГ под действием анаболических стероидов были получены при лечении наследственного (приобретенного) ангионевротического отека — заболевания, связанного с недостатком С1-ИНГ [42, 64]. При использовании даназола (станазола) в высоких дозах (до 600 мг/сут) наблюдалось увеличение в крови больных концентрации С1-ИНГ в 4—5 раз, что приводило к эффективному купированию приступов этого заболевания без каких-либо существенных побочных эффектов [53, 75].

Таким образом, в рамках рассматриваемого материала становится понятным один из специфических механизмов действия анаболических стероидов при ИЗСД, что и определяет

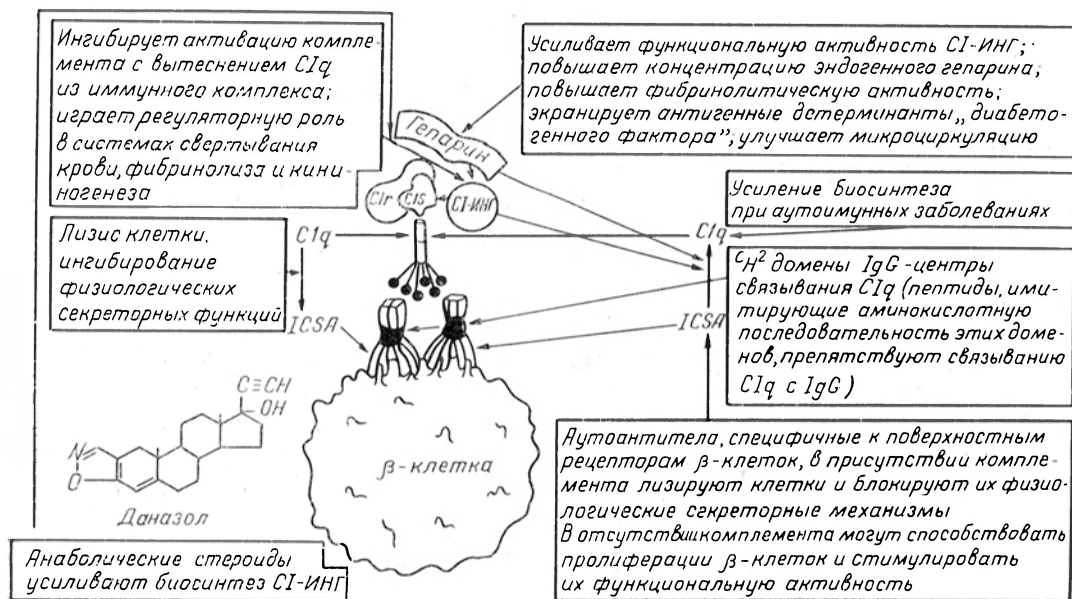


Схема некоторых путей функциональной активности цитотоксических аутоантител, специфичных к поверхностным рецепторам β-клеток (ICSA), первых субкомпонентов комплемента, C1-ИНГ, гепарина и анаболических стероидов в патогенезе и терапии ИЗСД.

дальнейшие пути коррекции данной терапии, направленные на применение стероидов с наиболее выраженными свойствами избирательно стимулировать биосинтез C1-ИНГ, оптимизацию лекарственных доз и сроков лечения, усиление функциональной активности синтезируемого в организме C1-ИНГ введением экзогенного гепарина. По-видимому, именно из-за отсутствия комплекса указанных мероприятий применение анаболических стероидов в терапии ИЗСД и ряда других аутоиммунных заболеваний (системная красная волчанка, синдром Сьегрена, ревматоидный артрит [84]) обеспечивало лишь незначительное улучшение и предотвращение развития болезни, но не ее прекращение (рисунк).

По этой причине анаболические стероиды используются преимущественно при осложнении ИЗСД — диабетической микроангиопатии [5, 6, 11, 23, 24], развитие которой является еще одним косвенным подтверждением дефицита C1-ИНГ у больных ИЗСД. Выявляемые сосудистые поражения глаз, почек, конечностей и других органов обусловлены в значительной степени нарушениями в кининогенной системе, активность которой также регулируется преимущественно

C1-ИНГ [42]. Показано, что при сахарном диабете повышен уровень калликреинов [25, 26, 50], что, по-видимому, и служит одной из причин сосудистых поражений [56]. У больных с ангионевротическим отеком — дефицитом C1-ИНГ, как и у больных ИЗСД, диагностируются тромбоэмболические осложнения [6, 86].

Таким образом, рассмотрение механизма действия C1-ИНГ, влияние гепарина на этот процесс, анализ методов лечения ИЗСД с помощью гепарина и анаболических стероидов, наличие сосудистых поражений позволяют сделать вывод о том, что C1-ИНГ как мощный плазменный регулятор систем комплемента, свертывания крови, фибринолиза и кининогенеза может и должен играть одну из ключевых ролей в терапии болезни. Несомненно и то, что хотя законченные схемы именно в силу своей кажущейся завершенности не могут охватить всего многообразия процессов при ИЗСД, одновременное пролонгированное применение гепарина и C1-ИНГ (например, вливанием донорской плазмы [38, 62]) или препаратов, способных специфически стимулировать его биосинтез, должно оказывать качественно новое терапевтическое действие в «стационарном» периоде течения болезни.

По-видимому, в момент развития ИЗСД рассмотренные методы терапии должны быть дополнены применением ингибиторов клеточной цитотоксичности, что подтверждается предотвращением развития некоторых форм экспериментального ИЗСД у животных в результате превентивной терапии никотинамидом [65, 68, 89].

В заключение важно подчеркнуть, что, поскольку андрогены и их производные с анаболическими свойствами, как правило, являются эффективными протекторами многих других аутоиммунных заболеваний [32], рассмотренные в настоящей работе аспекты функциональной активности плазменных ингибиторов могут так же, как и для ИЗСД, стать основополагающими в разработке новых методов иммунотерапии тех патологий, в патогенезе которых ведущую роль играет комплементзависимая цитотоксичность.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Александровский Я. А. // Клин. мед. — 1987. — № 7. — С. 31—37.
2. Баранов В. Г., Богатырева Ш. И., Оркодашвили Л. Ш. и др. // Тер. арх. — 1972. — № 10. — С. 3—9.
3. Бозаджиева Е. К., Марковски С. Г. // Пробл. эндокринологии. — 1978. — № 6. — С. 23—30.
4. Бычков С. М. // Вопр. мед. химии. — 1981. — № 6. — С. 726—735.
5. Васюкова Е. А., Зефинова Г. С., Брискин А. И. // Тер. арх. — 1969. — № 4. — С. 9—15.
6. Великов В. К., Бокарев И. А., Галкина С. К. и др. // Клин. мед. — 1985. — № 4. — С. 96—99.
7. Верженская Э. М., Тобина Т. С., Смурева В. П. // Педиатрия. — 1986. — № 6. — С. 66.
8. Геллер Л. И., Козлова З. П. // Пробл. эндокринологии. — 1969. — № 5. — С. 22—24.
9. Дубинина И. И. // Сов. мед. — 1981. — № 7. — С. 99—101.
10. Ефимов А. С., Карабун П. М. // Тер. арх. — 1972. — № 10. — С. 90—94.
11. Ефимов А. С., Лиманская Г. В., Литвиненко А. Ф. и др. // Там же. — 1970. — № 6. — С. 81—85.
12. Жуковский М. А., Кудряшов Б. А., Ульянов А. М. и др. // Педиатрия. — 1985. — № 2. — С. 7—9.
13. Зарубина Н. А. // Сов. мед. — 1982. — № 5. — С. 83—88.
- 13а. Козлов Л. В., Сизой М. П., Зинченко А. А., Левковский А. В. // Биохимия. — 1986. — Т. 51, № 5. — С. 707—718.
14. Кудряшов Б. А., Жуковский М. А., Щербачева Л. П. и др. // Педиатрия. — 1985. — № 8. — С. 46—47.
15. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 2. — С. 64—65.
16. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А., Ульянов А. М. // Пробл. эндокринологии. — 1985. — № 6. — С. 51—53.
17. Кудряшов Б. А., Ульянов А. М., Ляпина Л. А. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 5. — С. 57—59.
18. Кульберг А. Я. Регуляция иммунного ответа. — М., 1986. —
19. Кутырина И. М., Никишова Т. А., Лифшиц Н. Л., Александровская Т. Н. // Тер. арх. — 1982. — № 7. — С. 42—46.
20. Лесниций А. В. // Там же. — 1968. — № 6. — С. 108—111.
21. Машковский М. Д. Лекарственные средства. — М., 1986. — Т. 1; 2.
22. Преображенская М. Е., Данилова Н. А. // Вопр. мед. химии. — 1977. — № 3. — С. 385—391.
23. Полтораки В. В., Бриндак О. И., Ладозубец Е. В. // Пробл. эндокринологии. — 1986. — № 3. — С. 81—87.
24. Салтыков Б. Б., Великов В. К., Шубина О. И., Зеленчук Н. М. // Арх. пат. — 1986. — № 2. — С. 47—51.
25. Суrowикина М. С., Семенова Л. В. // Вопр. эндокринологии. — М., 1983. — Вып. 8. — С. 54—59.
26. Спесивцева В. Г., Меньшиков В. В., Мамаева Г. Г., Степанова Н. И. // Пробл. эндокринологии. — 1978. — № 6. — С. 19—22.
27. Ташмухамедова М. А., Алматов К. Т., Сыров В. Н. и др. // Науч. докл. высш. школы: Биол. науки. — 1985. — № 9. — С. 37—39.
28. Шляхов Э. Н., Андриеш Л. П. Иммунология. — Кишинев, 1985.
29. Экспериментальный сахарный диабет: Роль в клинической диабетологии / Под ред. В. Г. Баранова. — Л., 1983. — С. 143—160.
30. Эндокринология и метаболизм / Под ред. Ф. Фелига и др.: Пер. с англ. — М., 1985. — Т. 2. — С. 115—144.
31. Agostini A., Schapira M., Wachtfogel Y. T., Colman R. W. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1985. — Vol. 82. — P. 5190—5193.
32. Ansar Ahmed S., Penhale W. J., Talat N. // Amer. J. Path. — 1985. — Vol. 121. — P. 531—551.
33. Asghar S. S. // Pharmacol. Rev. — 1984. — Vol. 36. — P. 233—244.
34. Arlaud G. J., Reblut A., Sim R. B., Colomb M. G. // Biochim. biophys. Acta. — 1979. — Vol. 576. — P. 151—162.
35. Baekkeskov S., Bruining J., Sricanta S. et al. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1986. — Vol. 475. — P. 415—417.
36. Baekkeskov S., Nielsen J. H., Marner B. et al. // Nature. — 1982. — Vol. 298. — P. 167—169.
37. Beeler D. L., Marcum J. A., Schiffman S., Rosenberg R. D. // Blood. — 1986. — Vol. 67. — P. 1488—1492.
38. Bergmaschini L., Cicardi M., Tucci A. et al. // Allergy. — 1983. — Vol. 38. — P. 81—84.
39. Boackle R. J., Caughman G. B., Vesely J. et al. // Molec. Immunol. — 1983. — Vol. 20. — P. 1157—1164.
40. Boackle R. J., Johnson B. J., Caughman G. B. // Nature. — 1979. — Vol. 282. — P. 742—743.
41. Boilard C., Debray-Sachs M., Pouplard A. et al. // Diabetologia. — 1981. — Vol. 21. — P. 41—46.
42. Bork K., Witzke G., Artman K. et al. // Arch. dermat. Res. — 1984. — Vol. 276. — P. 375—380.

43. *Burton D. R., Boyd J., Brampton A. D.* et al. // *Nature*. — 1980. — Vol. 288. — P. 338—344.
44. *Buschard K., Röpke C., Madsbad S.* et al. // *Diabetologia*. — 1983. — Vol. 25. — P. 247—251.
45. *Currell R. W., Jeppsson J.-O., Laurell C. B.* et al. // *Nature*. — 1982. — Vol. 298. — P. 329—334.
46. *Caughman G. B., Boackle R. J., Vesely J.* // *Molec. Immunol.* — 1982. — Vol. 19. — P. 287—295.
47. *Chiappino G.* // *Arch. Stud. Fisiopat. Ricambio*. — 1960. — Vol. 24. — P. 321—325.
48. *Durinovic-Bello I., Hadzija M., Radica A.* et al. // *Transplant. Proc.* — 1986. — Vol. 18. — P. 1517—1519.
49. *Eisenbarth G. S.* // *New Engl. J. Med.* — 1986. — Vol. 314. — P. 1360—1368.
50. *Federspil G., Vettor R., Palo E. D.* et al. // *Metabolism*. — 1983. — Vol. 32. — P. 540—542.
51. *Fiah W. W., Orre K., Björk I.* // *FEBS Lett.* — 1979. — Vol. 98. — P. 103—106.
52. *Fong J. S., Good R. A., Gewurz H.* // *J. Lab. clin. Med.* — 1970. — Vol. 76. — P. 836—844.
53. *Fretwell M. D., Altman L. C.* // *J. Allergy*. — 1982. — Vol. 69. — P. 306—310.
54. *Gepts W.* // *Behring Inst. Mitt.* — 1984. — N 75. — S. 39—41.
55. *Harrison R. A.* // *Biochemistry (Wash.)*. — 1983. — Vol. 22. — P. 5001—5007.
56. *Kaplan A. P.* // *Amer. J. Med.* — 1981. — Vol. 70. — P. 755—758.
57. *Kinsell L. W., Margen S., Michaels G. D.* et al. // *J. clin. Invest.* — 1951. — Vol. 30. — P. 1486—1490.
58. *Klerx J. P. A. M., Van Dijk H., Van der Maaden W. J., Willers J. M. N.* // *Int. Arch. Allergy*. — 1985. — Vol. 78. — P. 182—189.
59. *Lewin N. P., Kaplan A. P., Harpel P. C.* // *J. biol. Chem.* — 1983. — Vol. 258. — P. 6415—6421.
60. *Like A. A., Rossini A. A., Guberski D. L.* et al. // *Science*. — 1979. — Vol. 206. — P. 1421—1423.
61. *Like A. A., Biron C. A., Weringer E. J.* et al. // *J. exp. Med.* — 1986. — Vol. 164. — P. 1145—1159.
62. *Logan R. A., Greaves M. W.* // *J. roy. Soc. Med.* — 1984. — Vol. 77. — P. 1046—1048.
63. *Lukas T. J., Munoz H., Erickson B. W.* // *J. Immunol.* — 1981. — Vol. 127. — P. 2555—2560.
64. *Melamed J., Alper C. A., Cicardi M., Rosen P. S.* // *J. Allergy*. — 1986. — Vol. 77. — P. 322—326.
65. *Michels J. E., Bauer F. E., Johnson D., Dixit P. K.* // *Exp. molec. Path.* — 1986. — Vol. 44. — P. 247—258.
66. *Miyazaki A., Hanafusa T., Yamada K.* et al. // *Clin. exp. Immunol.* — 1985. — Vol. 60. — P. 622—630.
67. *Naji A., Silvers W. K., Barker C. F.* // *Transplantation*. — 1983. — Vol. 36. — P. 355—361.
68. *Nakajima H., Yamada K., Hanafusa T.* et al. // *Immunol. Lett.* — 1986. — Vol. 12. — P. 91—94.
69. *Nerup J., Mandrup-Poulsen T.* // *Transplant. Proc.* — 1986. — Vol. 18. — P. 1507—1508.
70. *Novak R., Williams J., Johnson W.* // *Arch. Path. Lab. Med.* — 1979. — Vol. 103. — P. 483—485.
71. *Papadopoulos G., Lernmark A.* // *Behring Inst. Mitt.* — 1984. — N 75. — S. 50—57.
72. *Preissner K. T., Müller-Berghaus G.* // *Europ. J. Biochem.* — 1986. — Vol. 156. — P. 645—650.
73. *Prud'homme G. J., Colle E., Fuks A.* et al. // *Immunol. Today*. — 1985. — Vol. 6. — P. 160—162.
74. *Prystowsky M. B., Kehoe J. M., Brickson B. W.* // *Biochemistry. (Wash.)*. — 1981. — Vol. 20. — P. 6349—6356.
75. *Rothbach C., Green R. L., Levine M. I., Fireman P.* // *Amer. J. Med.* — 1979. — Vol. 66. — P. 681—683.
76. *Pozzilli P., Gorsuch A., Senisi M., Bottazzo G. P.* // *Lancet*. — 1979. — Vol. 2. — P. 173—175.
77. *Schapiro M., de Agostini A., Schifferli J. A., Colman R. W.* // *Complement*. — 1985. — Vol. 2. — P. 111—126.
78. *Schuurs A. H. W. M., Verheul H. A. M., Schot L. P. C.* // *Acta endocr. (Kbh.)*. — 1985. — Suppl. 271. — P. 97—108.
79. *Sim R. B., Arlaud G. J., Colomb M. G.* // *Biochim. biophys. Acta*. — 1980. — Vol. 612. — P. 433—449.
80. *Spath P. J., Wüthrich B., Büttler R.* // *Complement*. — 1984. — Vol. 1. — P. 147—159.
81. *Takada A.* // *Immunopharmacology*. — 1985. — Vol. 9. — P. 87—95.
82. *Travis J., Salvesen G. S.* // *Annu. Rev. Biochem.* — 1983. — Vol. 52. — P. 655—709.
83. *Venneröd A. M., Laake K., Solberg A. K., Strömblad S.* // *Thrombos. Res.* — 1976. — Vol. 9. — P. 457—466.
84. *Verheul H. A. M., Schot L. P. C., Deckers G. H. J., Schuurs A. H. W. M.* // *Clin. Immunol. Immunopath.* — 1986. — Vol. 38. — P. 198—208.
85. *Verheul H. A. M., Schot L. P. C., Schuurs A. H. W. M.* // *Clin. exp. Immunol.* — 1986. — Vol. 63. — P. 656—662.
86. *Wautier J. L., Ollier-Hartmann M. P., Kadava H.* et al. // *Thrombos. Haemost.* — 1981. — Vol. 45. — P. 247—251.
87. *Weiss V., Engel J.* // *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* — 1983. — Bd 364. — S. 295—301.
88. *Ziccardi R. J.* // *J. Immunol.* — 1982. — Vol. 128. — P. 2505—2508.
89. *Yamada K., Nakada K., Hanafusa T.* et al. // *Diabetes*. — 1982. — Vol. 31. — P. 749—753.

## ГИПОИНСУЛИНЕМИЯ И БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В КОРЕ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ МОЗГА КРЫС

НИИ кардиологии Минздрава БССР, Минск

Глюкоза является одним из основных субстратов синтеза макроэргических соединений мозга. Однако имеются единичные сообщения о нарушении биоэнергетических процессов в больших полушариях мозга при нарушении функции В-клеток поджелудочной железы [7, 15, 16]. Учитывая большой удельный вес нейропатий в структуре осложнений диабета, представляется актуальным изучение процессов утилизации глюкозы в мозге.

В настоящей работе проведено исследование активности ферментов и концентрации субстратов гликолиза, цикла Кребса, а также содержания адениловых нуклеотидов в больших полушариях мозга крыс при гипoinsулинемии.

### Методика

Опыты проводили на половозрелых крысах-самцах Вистар. Гипoinsулинемию вызывали у крыс, голодавших в течение 48 ч, путем внутрибрюшинного введения аллоксанидрата в дозе 12,5 мг на 100 г массы животного. Через 6 сут после введения аллоксана отбирали животных, у которых уровень глюкозы крови был в 5—6 раз выше, чем у интактных крыс. В гомогенатах больших полушарий мозга крыс определяли активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ, КФ 1.1.1.27) по методу [12] при использовании в качестве субстрата пирувата и по методу [17] при использовании в качестве субстрата лактата. Активность малатдегидрогеназы (МДГ, КФ 1.1.1.37) определяли по образованию как оксалоацетата, так и малата по методу [1].

Активность НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы (НАД-ИЦДГ, КФ 1.1.1.41) определяли спектрофотометрически [7].

Изоферментный спектр ЛДГ и МДГ исследовали методом зонального электрофореза по методу [5] в агар-агаре, приготовленном способом Грабара в модификации И. Тодорова [2]. Для выявления зон, обладающих ЛДГ-реакцией, использовали метод [11].

Концентрацию молочной, пировиноградной, яблочной и пивалевоуксусной кислот исследовали эизиматическим методом [3], а уровень адениловых нуклеотидов — методом тонкослойной хроматографии на микрокристаллической целлюлозе [4].

### Результаты и обсуждение

Установлено, что в больших полушариях мозга крыс с аллоксановым диабетом существенно изменялись биохимические показатели, характеризующие анаэробный гликолиз. Так, если активность ЛДГ при превращении пирувата в лактат не изменялась, то активность фермента, где в качестве субстрата использовали лактат, увеличивалась до  $2,64 \pm 0,10$  мкмоль на 1 мг белка в 1 с ( $n=10$ ;  $p<0,05$ ) по сравнению с активностью фермента у интактных животных —  $2,11 \pm 0,11$  ( $n=8$ ). Значительно изменялась и активность изоферментных фракций ЛДГ (табл. 1).

В больших полушариях мозга крыс увеличивалась концентрация молочной кислоты с  $0,14 \pm 0,007$  ( $n=6$ ) мкмоль на 1 мг белка в контрольной группе до  $0,24 \pm 0,01$  ( $n=10$ ;  $p<0,001$ ) при аллоксановом диабете и уменьшалось содержание пирувата до  $11,97 \pm \pm 0,82$  нмоль на 1 мг белка ( $n=10$ ;

Таблица 1

Изоферментный спектр ЛДГ в больших полушариях мозга крыс

Животные	Изоферменты ЛДГ, %				
	ЛДГ-1	ЛДГ-2	ЛДГ-3	ЛДГ-4	ЛДГ-5
Интактные	$41,30 \pm 1,30$	$13,38 \pm 0,80$	$14,34 \pm 0,46$	$22,82 \pm 0,77$	$8,16 \pm 0,38$
С аллоксановым диабетом	$30,37 \pm 0,50^*$	$20,86 \pm 0,60^*$	$20,59 \pm 0,73^*$	$19,19 \pm 0,72$	$8,99 \pm 0,45$

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 представлены средние ( $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$ ) 10 опытов. Звездочкой отмечено  $p<0,001$ .



Изоферментный спектр МДГ в больших полушариях мозга крыс

Животные	Изоферменты МДГ (%)			
	МДГ-1	МДГ-2	МДГ-3	МДГ-4
Интактные	6,94±0,27	47,62±0,67	40,42±0,78	5,02±0,97
Аллоксановый диабет	12,45±0,44*	50,75±0,57	24,36±0,82*	12,44±0,42*

$p < 0,001$ ) по сравнению с контрольным уровнем ( $50,0 \pm 3,67$ ,  $n = 9$ ).

Характерными особенностями изменения активности ЛДГ являлись увеличение скорости образования оксалоацетата и уменьшение малата, составляющее соответственно  $2,35 \pm 0,10$  в 1 с ( $n = 10$ ;  $p < 0,05$ ) и  $1,28 \pm 0,08$  ( $n = 10$ ;  $p < 0,05$ ) мкмоль на 1 мг белка в 1 с. У животных контрольной группы эти величины равнялись соответственно  $1,92 \pm 0,05$  и  $1,82 \pm 0,09$  ( $n = 6$ ). Изменение активности изоферментов МДГ в больших полушариях мозга животных представлены в табл. 2. Вместе с тем концентрация оксалоацетата и малата в мозге крыс при аллоксановом диабете не изменялась.

Активность НАД-ИЦД уменьшалась и была равна  $1,05 - 0,07$  нмоль на 1 мг белка в 1 с ( $n = 8$ ,  $p < 0,001$ ), тогда как в контроле эта величина составляла  $1,42 \pm 0,05$  нмоль на 1 мг белка в 1 с ( $n = 8$ ).

Таким образом, в больших полушариях мозга крыс с аллоксановым диабетом обнаружены достоверные изменения активности ферментов и концентрации субстратов гликолиза и цикла Кребса.

При исследовании содержания в мозге адениловых нуклеотидов (АТФ, АДФ и АМФ) выявлено только достоверное увеличение АМФ у животных с аллоксановым диабетом (табл. 3), а также тенденция к увеличению уровня АДФ и снижению АТФ.

Таблица 3

Содержание адениловых нуклеотидов в больших полушариях мозга крыс

Животные	Нуклеотиды, нмоль на 1 мг белка		
	АТФ	АДФ	АМФ
Интактные	250±11,0	45±3,3	20±1,5
С аллоксановым диабетом	200±13,0	80±10,0	32±3,3*

Согласно существующим представлениям, мозг относится к тканям, клетки которых не являются инсулин-зависимыми. Однако можно предположить, что изменение интенсивности метаболизма глюкозы в мозге опосредуется нарушением проницаемости клеток, поскольку, во-первых, инсулин существенным образом влияет на захват глюкозы из крови тканью мозга [8, 9], и во-вторых, имеются указания о прямом действии инсулина на ЦНС, которое реализуется через клеточную мембрану [13]. Предполагают, что изменение уровня молочной кислоты в мозге обусловлено нарушением регуляции, связанной с инсулином [10], что существенно влияет на процессы биоэнергетики [14].

Наряду с изменением активности ЛДГ и концентрации молочной кислоты обнаружены характерные изменения активности ферментов цикла трикарбоновых кислот. При этом уменьшение активности митохондриального изофермента МДГ-3 и НАД-ИЦДГ дает возможность выявить в мозге диабетических крыс снижение интенсивности процессов, протекающих в цикле трикарбоновых кислот.

Важными показателями нарушения интенсивности процессов синтеза макроэнергетических соединений в больших полушариях мозга крыс с аллоксановым диабетом являются снижение концентрации АТФ и увеличение содержания АДФ и АМФ.

Таким образом, в больших полушариях мозга крыс при гипoinsулинемии происходит изменение активности ферментов и концентрации субстратов гликолиза и цикла трикарбоновых кислот. Существенной особенностью изменения метаболизма в больших полушариях мозга крыс при гипoinsулинемии является снижение энергетической обеспеченности клеток, обусловленной нарушением окисления глюкозы в цикле Кребса.

# ЛИТЕРАТУРА

1. Кухта В. К., Чецевик А. Б., Барченко А. Т. // Актуальные вопросы врачебно-трудовой экспертизы реабилитации и профилактики инвалидности. — Минск, 1972. — С. 70—73.
2. Тодоров И. Клинические лабораторные исследования в педиатрии: Пер. с болг. — София, 1966. — С. 874.
3. Чецевик А. Б., Плотникова Л. М., Ваткевич Л. К. // Всесоюзный съезд врачей-лаборантов, 2-й: Тезисы докладов. — М., 1979. — С. 233—234.
4. Чецевик А. Б., Кухта В. К., Селицкая А. А. // Вопросы лабораторной диагностики. — Минск, 1975. — С. 228—229.
5. Юрков Ю. А., Алатырцев В. В. // Лаб. дело. — 1966. — № 12. — С. 705—707.
6. Ali F., Murthy A. S., Baquer N. Z. // Indian J. Biochem. Biophys. — 1980. — Vol. 17, N 1. — P. 42—44.
7. Goebel H., Klingenberg M. // Biochem. Z. — 1964. — Bd 340, N 4. — S. 441—464.
8. Goldfine I. D. // Biochim. biophys. Acta. — 1981. — Vol. 650, N 1. — P. 53—67.
9. Goodner C. Y., Hom F. G., Berrie M. A. // Endocrinology. — 1980. — Vol. 107, N 6. — P. 1827—1832.
10. Gupta R., Negi V. K., Pant M. C. // Indian J. exp. Biol. — 1978. — Vol. 16, N 7. — P. 827—828.
11. Helm H. // Clin. chim. Acta. — 1962. — Vol. 71. — P. 124—128.
12. Hill B. R., Levi C. // Cancer Res. — 1954. — Vol. 14. — P. 513—515.
13. Houten M. V., Posner B. I. // Diabetologia. — 1981. — Vol. 20, Suppl. — P. 225—266.
14. McCandless D. W. // Brain Res. — 1981. — Vol. 215, N 1—2. — P. 225—233.
15. Murthy A., Baquer N. // Indian J. Biochem. Biophys. — 1983. — Vol. 20, N 1. — P. 53—55.
16. Murthy A., Baquer N. // Arch. Biochem. — 1980. — Vol. 204, N 1. — P. 264—269.
17. Zimmerman H. J., Weinstein H. G. // J. Lab. clin. Med. — 1956. — Vol. 18, N 4. — P. 607—615.

Поступила 18.05.86

## HYPOINSULINEMIA AND BIOENERGETIC REACTIONS IN RAT BRAIN HEMISPHERE CORTEX

A. B. Cheschevik

Institute of Cardiology, Ministry of Public Health of the Byelorussian SSR, Minsk

Increase in activity of lactate dehydrogenase, of its isoenzymes LDH<sub>1</sub>, LDH<sub>2</sub> and LDH<sub>3</sub> as well as in content of lactic acid with simultaneous decrease in the pyruvic acid content were found in brain hemispheres of rats with alloxan diabetes. A decrease in the rate of energy reactions in rat brain hemispheres, caused by impairment of glucose oxidation in the Krebs cycle, proved to be the specific property of metabolic alterations in these cells under conditions of hypoinsulinemia.

УДК 616.24-003.66-07:616.153.915-39-074

Л. М. Безрукавникова, О. Г. Архипова, Е. А. Нейфах, Е. Б. Бурлакова

## НАРУШЕНИЕ КОНТРОЛЯ ЛИПОПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ У БОЛЬНЫХ ПЫЛЕВЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЛЕГКИХ

НИИ гигиены труда и профзаболеваний АМН СССР, Институт химической физики АН СССР, Москва

Хронические неспецифические заболевания легких в настоящее время занимают одно из ведущих мест в структуре заболеваемости населения. Одной из причин этого может быть загрязнение атмосферного воздуха вредными выбросами промышленных предприятий (токсическими веществами, газами, аэрозолями).

Известно, что в контакте с промышленными аэрозолями работают большие контингенты рабочих в угольной, горнодобывающей промышленности, машиностроении, производстве графитовых изделий и т. д. Особую опасность представляет воздействие канцерогеноопасных и фиброгенных аэрозолей, изучению механизма действия которых в последние годы уделяется большое внимание.

Воздействие фиброгенных пылей на организм работающих приводит к развитию фиброза легких (пневмоконйозы) и пылевых бронхитов. Экспериментальными исследованиями установлено, что в механизме действия фиброгенных пылей существенную роль играет усиление перекисного окисления липидов (ПОЛ) в легких [1—3, 6]. Данных об изменении ПОЛ у работающих в контакте с фиброгенными пылями и у больных пылевыми заболеваниями легких нет. Отсутствуют данные и о состоянии ПОЛ у больных пылевыми бронхитами, развивающимися у работающих в контакте с канцерогеноопасными пылями.

В данной работе изучали содержание перекисей липидов (ПЛ) и токоферола в плазме крови больных про-



# Содержание ПЛ и ТФ у больных пылевыми заболеваниями легких

Группа обследуемых	Число обследуемых лиц	ПЛ		ТФ	
		мкмоль/л	% к контролю	мкмоль/л	% к контролю
Пневмокониоз	56	$2,78 \pm 0,15^*$	187,8	$23,57 \pm 1,30$	100,4
Бронхит от фиброгенной пыли	30	$2,88 \pm 0,29^*$	194,6	$27,84 \pm 1,60^*$	118,6
Бронхит от канцерогенно-опасной пыли	49	$3,10 \pm 0,19^*$	209,5	$29,35 \pm 1,16^*$	125,0
Контроль	36	$1,48 \pm 0,06$	100,0	$23,48 \pm 0,91$	100,0

\*  $p < 0,01$  по сравнению с контролем.

фессиональными заболеваниями легких, возникшими от воздействия фиброгенной кварцсодержащей пыли (пневмокониозы, пылевой бронхит) и малофиброгенной канцерогенноопасной пыли, содержащей в своем составе полициклические ароматические углеводороды, в частности 3,4-бензпирен (пылевой бронхит).

## Методика

Кровь у больных и здоровых людей брали утром натощак из локтевой вены в пробирку с 0,1 мл гепарина. Центрифугирование проводили при 3000 об/мин при 4°C. Плазму отделяли и определяли содержание перекисей липидов по методу [7]: липопротеидные комплексы осаждали фосфорно-вольфрамовой кислотой, осадок ресуспендировали и проводили реакцию с 2-тиобарбитуровой кислотой, продукты реакции экстрагировали н-бутанолом. В качестве стандарта использовали 1,1,3,3-тетраэтоксинпропан. Флюоресценцию бутанольного экстракта измеряли при максимуме возбуждения 532 нм и эмиссии 550 нм. Содержание токоферола устанавливали по методу [5]: аутофлюоресценцию токоферола определяли в гексановом экстракте при максимуме возбуждения 295 нм и эмиссии 323 нм. В качестве стандарта использовали токоферол («Sigma», США). Проведены параллельные определения содержания ПЛ и токоферола в плазме крови сразу же после центрифугирования и в образце той же плазмы крови, хранившейся в течение 1 мес в замороженном состоянии при -20°C. Оттаивание замороженной плазмы проводили при 4°C и сразу же определяли содержание ПЛ. Соблюдение этих условий позволило получить хорошо воспроизводимые результаты определения ПЛ в свежей и замороженной плазме. Повторное замораживание-размораживание плазмы приводит к получению завышенных результатов содержания ПЛ, но не влияет на результаты определения содержания ТФ.

В условиях клиники обследованы 56 больных пневмокониозами, основную часть которых составили больные силикозом I и II стадий, в число обследованных включены также больные силикотуберкулезом и силикозом, осложненным хроническим бронхитом. Все они в прошлом работали в условиях воздействия повышенных концентраций пыли двуокиси

кремния. В сравнительном плане также обследованы 30 больных бронхитом, развившимся от воздействия кварцсодержащих пылей. Основную группу среди них составили лица с выраженной формой заболевания (бронхит II стадии), другую — 49 рабочих производства графитовых изделий, подвергавшихся воздействию канцерогенноопасной пыли (у 36 больных диагностирован пылевой бронхит I стадии, у 13 — II стадии).

Возраст обследованных колебался от 30 до 60 лет. Все они получали больничное питание.

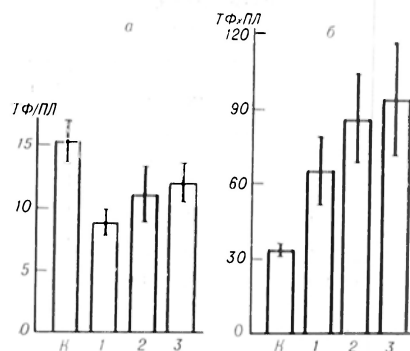
В контрольную группу были включены 36 практически здоровых людей в возрасте от 25 до 65 лет, не подвергавшихся воздействию профессиональных вредностей. Содержание ПЛ у 21 практически здоровой женщины колебалось от 0,82 до 1,9 мкмоль/л. У 16 практически здоровых мужчин содержание ПЛ варьировало от 0,78 до 2,17 мкмоль/л. В связи с тем что достоверных различий между значениями содержания ПЛ в плазме крови практически здоровых женщин и мужчин не было обнаружено, в качестве контрольной была принята среднесарифметическая величина для смешанной группы практически здоровых лиц.

Содержание ТФ в плазме крови практически здоровых женщин колебалось от 15,5 до 33,23 мкмоль/л, у здоровых мужчин — от 17,27 до 27,65 мкмоль/л. В качестве контрольной была принята среднесарифметическая величина для смешанной группы практически здоровых лиц.

## Результаты и обсуждение

Данные о содержании ПЛ и ТФ в плазме крови больных пылевыми заболеваниями легких представлены в таблице.

Как видно из представленных данных, содержание ПЛ в плазме крови больных всех групп значительно превышает контрольные величины. Содержание ТФ у больных пневмокониозами в среднем не отличается от нормы, но у больных бронхитом достоверно превышает контрольные величины, причем наиболее высокие значения отмечены у больных бронхитом от канцерогенноопасной пыли. Такое повышение



Молярные коэффициенты ТФ и ПЛ.

а — молярное соотношение ТФ/ПЛ; б — молярное произведение ТФ×ПЛ. К — контроль; 1 — пневмокониоз; 2 — бронхит от фиброгенной пыли; 3 — бронхит от канцерогеноопасной пыли.

ние содержания основного липидного антиоксиданта можно рассматривать как компенсаторную реакцию на усиление ПОЛ, влияние которой недостаточно эффективно.

В связи с этим при изучении изменений в системах ПОЛ — антиоксидантная защита необходимо оценивать не только абсолютные величины содержания ТФ и ПЛ, но и их молярные соотношения (ТФ/ПЛ), характеризующие эффективность компенсации усиленного образования ПЛ основным липидным антиоксидантом организма. Данные, представленные на рисунке, свидетельствуют о том, что, несмотря на компенсаторное увеличение содержания ТФ в плазме крови больных пылевыми бронхитами и нормальный уровень ТФ у больных пневмокониозами, рассчитанные индивидуально для каждого больного молярные соотношения ТФ/ПЛ при данных патологиях значительно ниже, чем в контроле. При бронхите от фиброгенной пыли это соотношение составляет 72 %, от канцерогеноопасной — 78 %, при пневмокониозе отношение ТФ/ПЛ не превышает 57 %.

Поскольку кровь осуществляет в организме транспорт между органами различных химических веществ, в том числе и биоантиоксидантов, представляет интерес изучение при различных патологиях коэффициента  $K_1 = \text{ТФ} \times \text{ПЛ}$ , характеризующего липидный антиоксидантный контроль ПОЛ в органах. Представленные на рисунке данные свидетельствуют о значительном повышении этого коэффициента при пылевых заболеваниях легких.

Наиболее выражено нарушение липидного антиоксидантного контроля в органах при пылевом бронхите от канцерогеноопасной пыли.

Анализ индивидуальных значений соотношения ТФ/ПЛ,  $K_1$  и предложенного в работе [4] коэффициента, характеризующего относительные изменения молярных соотношений ТФ/ПЛ, позволяет оценить форму и глубину липоперекисной патологии у больных.

На основании результатов исследования содержания ПЛ и ТФ в плазме крови больных пылевыми заболеваниями легких от воздействия фиброгенных и канцерогеноопасных пылей можно заключить, что при всех клинических формах пылевых болезней — пневмокониозах и пылевом бронхите — имеет место увеличение содержания ПЛ в организме больных при сохраненном уровне ТФ при пневмокониозах и повышенном — при пылевых бронхитах от воздействия как канцерогеноопасных, так и фиброгенных пылей. Увеличение содержания продуктов ПОЛ в плазме крови больных пневмокониозами, вероятно, отражает усиление липопероксидации в легких.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Архипова О. Г., Иванова А. С., Купина Л. М. // Всесоюзный симпозиум по патогенезу пневмокониозов, 2-й: Труды. — Караганда, 1978. — С. 95—105.
2. Бабушкина Л. Г., Кислицина Н. С., Белобрагина Г. В. Влияние кварцевой пыли и жировой нагрузки на показатели липопероксидации, липидного обмена и фиброгенеза у крыс // Деп. во ВНИИМИ МЗ СССР, № 6426-83.
3. Белецкий В. С. // Гиг. труда. — 1974. — № 11. — С. 47—48.
4. Нейфак Е. А. // Биоантиоксидант: Всесоюзное совещание: Тезисы. — Черногловка, 1983. — С. 94.
5. Черняускене Р. Ч., Вариаквичене З. З., Грибаускас П. С. // Лаб. дело. — 1984. — № 6. — С. 362—365.
6. Gabor S., Anca Z. // Int. Arch. Arbeitsmed. — 1974. — Bd 32. — S. 237—332.
7. Yagi K. // Biochem. Med. — 1976. — Vol. 15. — P. 212—216.

Поступила 03.12.86

#### IMPAIRMENTS OF LIPID PEROXIDATION IN THE PATIENTS WITH DUST-DEPENDENT DISEASES OF LUNGS

L. M. Bezrukovnikova, O. G. Arkhipova, E. A. Neifakh, E. B. Burlakova

Institute of Industrial Hygiene and Professional Diseases, Academy of Medical Sciences of the USSR, Institute of Chemical Physics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Content of lipid peroxides was increased in blood plasma of patients with dust-dependent diseases of lungs (fibrinogenous dust — pneumoconiosis, dust bronchitis; carcinogenous dust — dust bronchitis), whereas the tocopherol level was similar to normal values in pneumoconiosis and elevated in dust bronchitis. The increase in tocopherol content might be consi-

dered as a compensatory mechanism in response to augmented lipid peroxidation. At the same time, this compensation was not sufficiently effective, as a result of which the antioxidant activity was relatively decreased in blood plasma as well as the antioxidant control was impaired in tissues and accompanied by intensification of the free radical reactions.

УДК 616-008.934.586.3-055.5/7:616.153.1:577.152.2]-074

*Н. Б. Гусина, Г. Л. Цукерман*

## АКТИВНОСТИ ЛИЗОСОМНЫХ ГИДРОЛАЗ ПЛАЗМЫ И ЛЕЙКОЦИТОВ У ГОМО- И ГЕТЕРОЗИГОТ С РАЗЛИЧНЫМИ ВАРИАНТАМИ I-КЛЕТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ

Республиканский центр метаболических болезней, Могилев

I-клеточная болезнь относится к лизосомным заболеваниям накопления с Гурлер-подобным фенотипом. Причиной этого заболевания является генетический дефект специфической фосфатотрансферазы — UDP-ацетилглюкозамин: гликопротеин-N-ацетилглюкозаминилфосфотрансферазы [16]. Фермент катализирует фосфорилирование маннозных остатков олигосахаридных цепей кислых гидролаз, служащих опознавательными маркерами для рецептор-опосредованного захвата ферментов лизосомами [15]. Наиболее ярким биохимическим проявлением I-клеточной болезни является инверсия клеточно-плазменного градиента активности лизосомных гидролаз, т. е. резкое возрастание ферментативной активности во внеклеточной среде при нормальной или резко сниженной (в зависимости от типа клеток) внутриклеточной активности. Поэтому в клетках происходит значительное накопление кислых сульфатсодержащих гликозаминогликанов (ГАГ), гликолипидов и сиалогликопротеинов, что морфологически обнаруживается в виде необычных цитоплазматических включений в фибробластах, от которых и происходит название болезни «Inclusion cell» disease.

I-клеточная болезнь, которую называют также муколипидозом II типа (МЛ II), обладает выраженным клиническим полиморфизмом с наличием инфантильной (МЛ II) и ювенильной (псевдо-Гурлер-полидиетрофия, МЛ III) форм заболевания.

Основной задачей настоящей работы являлась оценка различных биохимических маркеров, позволяющих вы-

делить гомозиготных носителей I-клеточной болезни из группы Гурлер-подобных фенотипов, дифференциальная диагностика которых представляет значительные трудности.

### Методика

В обследуемую группу вошли ребенок 6 мес с I-клеточной болезнью, 3 детей в возрасте 4—12 лет с псевдо-Гурлер полидиетрофией, а также их родители.

Активность  $\beta$ -галактозидазы,  $\alpha$ -маннозидазы,  $\alpha$ -фукозидазы,  $\beta$ -гексозаминидазы,  $\beta$ -глюкуронидазы и  $\beta$ -глюкозидазы определяли с помощью флуорогенных субстратов — соответствующих 4-метилумбеллиферилгликозидов («Koch-Light»). Для определения активности арилсульфатазы А, галактоцереброзидазы и  $\alpha$ -идуронидазы использовали хромогенные субстраты — соответственно нитрокатехолсульфат («Koch-Light»), 2-N-(гексадеканойл)-амино-4-нитрофенил- $\beta$ -D-галактопиранозид и фенил- $\alpha$ -L-идуридин («Calbiochem»).

Плазму получали из гепаринизированной крови центрифугированием при 1000 g в течение 15 мин. Лейкоциты выделяли методом [4] и разрушали 5-кратным замораживанием — оттаиванием в жидком азоте. Активность  $\beta$ -гексозаминидазы в плазме определяли по методу [12], арилсульфатазы А — по модифицированному методу [4],  $\alpha$ -маннозидазы,  $\alpha$ -фукозидазы,  $\beta$ -глюкуронидазы и  $\beta$ -галактозидазы в плазме по методу [9] с некоторыми модификациями. Условия проведения ферментативных реакций представлены в табл. 1. Плазму больных перед определением разводили соответствующими буферами для  $\beta$ -гексозаминидазы в 200 раз,  $\alpha$ -маннозидазы и арилсульфатазы А — в 100 раз и  $\beta$ -глюкуронидазы — в 20 раз.

Активность  $\beta$ -гексозаминидазы в лейкоцитах определяли по методу [8],  $\alpha$ -идуронидазы — по [10], галактоцереброзидазы — по [7]. Активность  $\alpha$ -маннозидазы и  $\beta$ -глюкозидазы в лейкоцитах устанавливали по методу [14] с некоторыми модификациями, указанными в табл. 1.

Условия проведения ферментативных реакций

Ферменты	Количество биологического материала		pH	Концентрация субстрата, ммоль	Время инкубации, мин
	плазма, мкл	лейкоциты, мкг белка			
$\alpha$ -маннозидаза	50	15—20	4,0	1	60 — плазма 30 — лейкоциты
$\alpha$ -фукозидаза	50 1:10	15—20	5,0	1	15 — плазма 60 — лейкоциты
$\beta$ -галактозидаза	50	8—12	4,4	1+0,1 М натрий хлористый	30 — плазма 60 — лейкоциты
$\beta$ -глюкозидаза	—	60—90	5,4	16+0,25% таурохолат натрия+ +0,2% тритона X-100	120
$\beta$ -глюкуронидаза	50	—	4,3	2,5	15
Арилсульфатаза А	200	—	5,0	10	240
$\beta$ -гексозаминидаза	50 1:10	10—12	4,4	+1,5 М натрий хлористый 2,5	30 — плазма 10 — лейкоциты
$\alpha$ -идурунидаза	—	80—120	3,5	4,2+0,9% натрий хлористый	18 ч
Галактоцереброзидаза	—	100—200	4,5	0,45+0,25% таурохолат натрия+0,1% тритона X-100	18 ч

Для определения содержания свободных и связанных сиаловых кислот в лейкоцитах, клетки, выделенные из 10 мл крови, ресуспендировали в 1 мл 0,1 н. серной кислоты и разрушали пятикратным замораживанием — оттаиванием в жидком азоте. Часть исходного гомогената центрифугировали при 45 000 g в течение 30 мин при 4°C. Надосадок отделяли от мембранной фракции, которую ресуспендировали в объеме 0,1 н. серной кислоты, равном объему надосадка. Содержание свободных и связанных сиаловых кислот определяли в исходном гомогенате, надосадке и осадке по методу [19] с некоторой модификацией, заключающейся в экстракции окрашенного продукта метилэтилкетонном. При этом была вычислена величина поправки на содержание дезоксирибозы. Экскрецию кислых ГАГ с мочой определяли по методу [1] и выражали в миллиграммах уроновых кислот за 24 ч. Олигосахариды в моче находили по методу [11].

### Результаты и обсуждение

Экскреция кислых ГАГ с мочой была в пределах 1,9—8 мг за 24 ч при норме 1,2—6,2 мг. Значительной олигосахаридурии не обнаружено.

У всех больных наблюдалось резкое увеличение активностей лизосомных гидролаз в плазме, причем активность арилсульфатазы А и  $\alpha$ -маннозидазы превышала норму примерно в 100 раз (табл. 2). Обращало на себя внимание изменение соотношения термолabileного и термостабильного компонентов  $\beta$ -гексозаминидазы в плазме в сторону снижения процента термолabileной изоформы А. При I-клеточной

болезни не только у пробанда, но и у матери доля изоформы А соответствует значениям, характерным для гетерозигот по болезни Тэя — Сакса (32—46 %). Это явление, связанное, по-видимому, с возрастанием процента минорных термостабильных компонентов  $I_1$  и  $I_2$  в общей активности  $\beta$ -гексозаминидазы в плазме [6], можно использовать в качестве теста на гетерозиготное носительство МЛ II [18]. У больных с псевдо-Гурлер-полидистрофией и их родителей процент изоформы А в плазме колеблется от уровня гетерозигот по болезни Тэя — Сакса до нижних границ нормы. В целом же активность большинства лизосомных ферментов в плазме у облигатных гетерозигот существенно не отличалась от контрольных величин.

Из табл. 2 видно, что у отца больного И. активность  $\alpha$ -фукозидазы в плазме значительно снижена. Такой биохимический фенотип, как известно, встречается у 6—10 % здоровых людей в популяции [5]. Описаны и больные псевдо-Гурлер-полидистрофией с подобным фенотипом  $\alpha$ -фукозидазы [6]. К их числу, по-видимому, относится и больной И., у которого активность  $\alpha$ -фукозидазы в плазме оказалась нормальной.

Активность лизосомных гидролаз в смешанной популяции лейкоцитов с преобладанием гранулоцитов была в пределах нормы, за исключением зна-

Активность кислых гидролаз в плазме (в нмоль/ч/мл)

Обследованные	Арил- сульфа- таза А	Общая β-гексо- замини- даза	Изофор- ма А, %	β-галак- тозидаза	α-манно- зидаза	α-фукози- даза	β-глюкуро- нидаза
МЛП II:							
Пробанд К.	830	18 978	31	144,3	3 970	3 752	526
Мать К.	5	1 140	40	11	21	—	—
МЛП III:							
Пробанд Р.	732	24 600	46	50	3 600	2 918	653
Пробанд И.	684	12 700	48	68,2	1 900	329	293
Мать И.	25	2 068	51	15,3	39,3	220	20
Отец И.	26	1 724	53	6,0	42,8	55	53,3
Пробанд В.	615	36 712	48	67,2	4 924	2 350	554
Мать В.	29	1 667	46	9,4	53	325	52
Отец В.	28	1 657	38	6,2	21	1 150	68
Контроль n	12,1±6 30	1010±321 35	64±8 35	26±12 50	22±10 20	372±161 20	32,1±9 25

П р и м е ч а н и е. Здесь n на табл. 3 n — количество обследованных здоровых доноров.

чительно сниженной активности β-галактозидазы при I-клеточной болезни (табл. 3). В этом же случае наблюдалось снижение процента изоформы А при нормальной общей активности гексозаминидазы в лейкоцитах. Известно, что генетический дефект при I-клеточной болезни манифестирует лишь в некоторых типах клеток (в основном в фибробластах). Из лейкоцитов крови только в лимфоцитах обнаруживается выраженный дефицит многих лизосомных ферментов [13], а в гранулоцитах наиболее постоянным оказывается дефект β-галактозидазы [17].

В отличие от других лизосомных

гидролаз активность сиалидазы сиалогликопротеинов почти полностью отсутствует при I-клеточной болезни и снижена при псевдо-Гурлер-полидистрофии [6]. В связи с этим представлялось целесообразным исследовать содержание связанных сиаловых кислот в гомогенатах лейкоцитов. Как видно из табл. 4, содержание связанных сиаловых кислот в исходном гомогенате лейкоцитов при обеих формах I-клеточной болезни не превышало контрольных значений. Тем не менее соотношение концентраций этих соединений в растворимой и мембранной фракциях клеток у всех больных приближалось к единице и даже пре-

Т а б л и ц а 3

Активность лизосомных гидролаз в лейкоцитах (в нмоль на 1 мг белка в 1 ч)

Обследованные	β-гексо- замини- даза	Изофор- мы А, %	β-глюко- зидаза	α-фуко- зидаза	α-манно- зидаза	β-галак- тозидаза	α-идури- нидаза*	Галак- тоцереб- розида- за
МЛП II:								
Пробанд К.	2160	48	—	63	274	98	—	—
МЛП III:								
Пробанд Р.	1419	71	13,0	96	494	155	190	8,2
Пробанд И.	1010	54	—	86	386	204	277	—
Пробанд В.	2521	70	18,3	132	309	189	222	6,3
Контроль n	1222±540 60	73±8 60	8,2±2,1 60	73±28 30	205±50 30	286±96 65	346±178 30	4,8±1,6 50

\* Активность α-идуридазы выражена в нмолях на 1 мг белка за 18 ч.

Содержание связанных сиаловых кислот в растворимой и мембранной фракциях лейкоцитов (в нмоль на 1 мг белка)

Обследованные	Количество	Цельный гомогенат	Супернатант	Мембранная фракция	Р/М
I-клеточная болезнь	1	14,0	14,0	14,0	1,0
Псевдо-Гурлер-полидистрофия:	3				
пробанд Р.		18,4	13,3	15,0	0,9
» И.		14,6	14,9	14,0	1,1
» В.		12,5	14,0	8,85	1,5
Контроль	12	11—23,5	7,1—13,7	12—32	0,33—0,55

П р и м е ч а н и е. Р/М — растворимая и мембранная фракции соответственно.

вышало ее, в контрольной группе составляло 0,3—0,5 [3]. При исследовании содержания сиаловых кислот в фибробластах больных муколипидозами I, II и III обнаружено их значительно большее количество по сравнению с нормой именно в растворимой фракции. Концентрация связанных сиаловых кислот не отличалась в мембранной фракции фибробластов от нормы. Наши результаты сходны с данными, приведенными в работе [2], свидетельствующими о повышенном содержании нейтральных и аминосугаров, а также об увеличении содержания белков и сиаловых кислот в растворимых экстрактах лейкоцитов двух sibсов с МЛ III.

Очевидно, в лейкоцитах при различных формах I-клеточной болезни происходит накопление растворимых сиалосодержащих соединений, но этот процесс выражен значительно слабее, чем в фибробластах.

Таким образом, значительно различаясь клинически, исследуемые больные были во многом сходны по биохимическим показателям. Тем не менее у ребенка с классической I-клеточной болезнью биохимические признаки заболевания были более выраженными, что коррелировало с особой тяжестью течения. Больные псевдо-Гурлер-полидистрофией представляют собой гетерогенную группу. Вопрос о том, что лежит в основе этой гетерогенности и являются ли рассмотренные случаи разными генетическими вариантами I-клеточной болезни, требует дальнейшего изучения.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Кучинский А. Л. // Лаб. дело. — 1983. — № 9. — С. 38—40.
2. Berman E. R., Kohn G., Yatziu S., Stein

- H. // Clin. chim. Acta. — 1974. — Vol. 52, N 1. — P. 115—124.
3. Cantz M., Gehler J., Spranger J. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1977. — Vol. 74, N 2. — P. 732—738.
4. Dulaney J. T., Moser H. W. // The Metabolic Basis of Inherited Disease / Ed. J. B. Stanbury et al. 4-th Ed. — New York, 1978. — P. 770—809.
5. Durand P., Galli R., Borrone C. // Genetic Errors of Glycoprotein Metabolism / Ed. P. Durand, J. S. O'Brien. — Berlin, 1982. — P. 49—87.
6. Durand P., Pelizza A., Borrone C., Galli R. // Ibid. — P. 191—210.
7. Gal A. E., Brady R. O., Pentchev P. G. et al. // Clin. chim. Acta. — 1977. — Vol. 77. — P. 53—59.
8. Galjaard H. Genetic Metabolic Diseases. — Amsterdam, 1980. — P. 828.
9. Griffiths P. A., Milsom J. P., Lloyd J. B. // Clin. chim. Acta. — 1978. — Vol. 90, N 2. — P. 129—141.
10. Hall C. W., Liebaers I., DiNatale P., Neufeld E. F. // Meth. Enzymol. — 1978. — Vol. 79. — P. 439—456.
11. Humbel R., Collart M. // Clin. chim. Acta. — 1975. — Vol. 60. — P. 143—145.
12. Kaback M. M. // Meth. Enzymol. — 1972. — Vol. 28. — P. 862—867.
13. Kato E., Yokoi T., Taniguchi N. // Clin. chim. Acta. — 1979. — Vol. 95. — P. 285—290.
14. Nakagawa S., Kumin S., Nilovsky H. // Ibid. — 1980. — Vol. 101, N 1. — P. 33—44.
15. Neufeld E. F. // Harvey Lect. — 1979. — 1980. — Ser. 75. — P. 41—60.
16. Reilman M. L., Varki A., Kornfeld S. // J. clin. Invest. — 1981. — Vol. 67. — P. 1574—1579.
17. Tanaka T., Kobayashi M., Fukuda T. et al. // Hiroshima J. med. Sci. — 1979. — Vol. 28, N 4. — P. 189—193.
18. Vidgoff J., Buist N. R. M. // Hum. Genet. — 1977. — Vol. 36, N 3. — P. 307—316.
19. Warren L. // J. biol. Chem. — 1959. — Vol. 234, N 8. — P. 1971—1975.

Поступила 07.05.87

ACTIVITY OF ACID HYDROLASES IN  
BLOOD PLASMA AND LEUKOCYTES OF  
HOMO- AND HETEROZYGOTES WITH DIFFERENT  
VARIANTS OF I-CELL DISEASE

*N. B. Gusina, G. L. Tsukerman*

The Center of Metabolic Diseases, Mogilev

One patient with I-cell disease and three patients with pseudo Hurler polydystrophy as well as their relatives were examined. Activity of acid hydrolases was distinctly elevated in blood plasma of all the patients studied, while in leukocyte extracts it was within the normal

limits. The ratio of hexosaminidase A was distinctly decreased in blood plasma of the patient with I-cell disease and of her mother. "Low activity" variant of blood plasma  $\alpha$ -fucosidase was detected in one patient with pseudo Hurler polydystrophy and in his father. The ratio of bound sialic acids in supernatant and in individual leukocyte fractions was about 1 in all the patients examined as compared with 0.3-0.5 value in healthy persons. The data obtained suggest an excessive storage of soluble sialyl-containing derivatives in leukocytes of the patients with different variants of I-cell disease.

УДК 616.61+616.36+616.36-006]-008.939.6-008.931:577.152.344]-02:615.277.4

*В. П. Кушнер*

**АМИНОКИСЛОТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ СОБСТВЕННОЙ  
ФОСФОПРОТЕИНКИНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ  
ФРАКЦИЙ НЕГИСТОНОВЫХ БЕЛКОВ ХРОМАТИНА ПОЧЕК,  
ГЕПАТОМЫ И ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ОДНОКРАТНОМ  
ДЕЙСТВИИ ДИЭТИЛНИТРОЗАМИНА**

Институт цитологии АН СССР, Ленинград

В предыдущих исследованиях [3, 8, 9] было показано, что при градиентной ионообменной хроматографии на фосфоцеллюлозе свободных от ДНК препаратов негистоновых белков (НГБ) хроматина клеток гепатом и печени крыс, которым внутрибрюшинно однократно вводили гепатоканцерогены в отличие от НГБ печени интактных животных в зоне 0,4—0,5 М NaCl элюируется белковая фракция (фр. 0,4—0,5 М), обладающая собственной фосфопротеинкиназной активностью (СФА). Поскольку аналогичный результат был получен и при хроматографии препаратов НГБ почек интактных крыс, белки и фр. 0,4—0,5 М гепатом и «канцерогенной» печени по феноменологическому сходству, вероятно, можно отождествить с гетероорганическими антигенами почечной природы [4].

Аминокислотная специфичность СФА является серьезной качественной характеристикой участвующих в фосфорилировании белков, особенно специфических фосфопротеинкиназ. Так, большинство онкобелков — продуктов функционирования различных клеточных онкогенов — проявляют, как правило, тирозинфосфокиназную активность. Усиленная клеточная пролиферация, в том числе и при малигнизации, сопровождается выявлением по-

добных белков, свидетельствуя об экспрессии соответствующих онкогенов [1, 5].

Определение аминокислотной специфичности фосфорилирования НГБ из фр. 0,4—0,5 М позволит сравнить их по этой характеристике с онкобелками и установить, принимает ли эта группа белков (гетероорганических НРБ-антигенов почечной природы) участие в процессах, влияющих на функционирование онкогенов.

**Методика**

В работе использовали белых беспородных (100—150 г) крыс-самцов из питомника «Рапполово» АМН СССР. Гепатоканцероген диэтилнитрозамин (ДЭНА) вводили внутрибрюшинно по 200 мг на 1 кг массы животного в физиологическом растворе. Крыс забивали на 4-е сутки после введения ДЭНА. Из клеток печени этих крыс, а также из клеток перевиваемой гепатомы 27, в свое время индуцированной ДЭНА [6], выделяли фракции чистых ядер для дальнейшего получения свободных от ДНК препаратов НГБ в полном соответствии с методами [3, 4]. Далее проводили градиентную ионообменную хроматографию НГБ на фосфоцеллюлозе и определяли СФА во фр. 0,4—0,5 М, которую идентифицировали по содержанию NaCl с помощью натриевого электрода или рефрактометрически. Собранный материал фосфорилировали в 0,04 М трис-HCl буфере pH 7,5, содержащем 0,025 М  $MgCl_2$ , при 30 °C в присутствии ( $\gamma$ - $^{32}P$ )-АТФ [3, 4, 8, 9] производства ВО «Изотоп». После фосфорилирования в течение 10—15 мин от



избытка ( $\gamma$ - $^{33}\text{P}$ )-АТФ избавлялись суточным диализом при  $4^\circ\text{C}$  против 4 л дистиллированной воды. Измеряя радиоактивность внутри диализного мешка и вне его, судили о возможности дефосфорилирования, которое, если и имело место, позволяло все же получать белковые фракции с достаточно высокой радиоактивностью по  $^{33}\text{P}$ . Гидролиз меченых белков фр. 0,4—0,5 М проводили в 20,5%  $\text{HCl}$  в герметически закрытых сосудах в течение 2—3 сут при  $150^\circ\text{C}$ . Жидкие гидролизаты высушивали над щелочью в вакуум-экссикаторе. Сухие осадки растворяли в 2—3 мл дистиллированной воды и растворы фильтровали через слой активированного угля.

Прозрачные фильтраты проб по 0,3 мл на-слаивали на колонку ( $2,0 \times 30,0$  см), заполненную SE-сефадексом и уравновешенную 0,2 н. цитратным буфером pH 4,25. Элюирование вели тем же буфером при  $50^\circ\text{C}$  со скоростью 30 мл/ч, собирая фракции по 4,5—5,0 мл. При таких условиях не удалось добиться полного разрешения пиков всех аминокислот, и поэтому при хроматографии гидролизата фр. 0,4—0,5 М препарата НГБ интактной почки в гидролизат ввели аликвоты всех аминокислот, предшествующих тирозину, в соответствии с известными данными аминокислотного анализа. Таким образом, по соотношению к объему элюента тирозина и при контроле каждой хроматографической фракции нингидриновым методом мы установили положение цистеина и далее 4 групп аминокислот: А, Б, В, Г, состав которых расшифрован в подписи к рисунку.

Для определения радиоактивности плотные бумажные фильтры вымачивали в каждой из фракций и после высушивания переносили в жидкий толуольный сцинтиллятор.

### Результаты и обсуждение

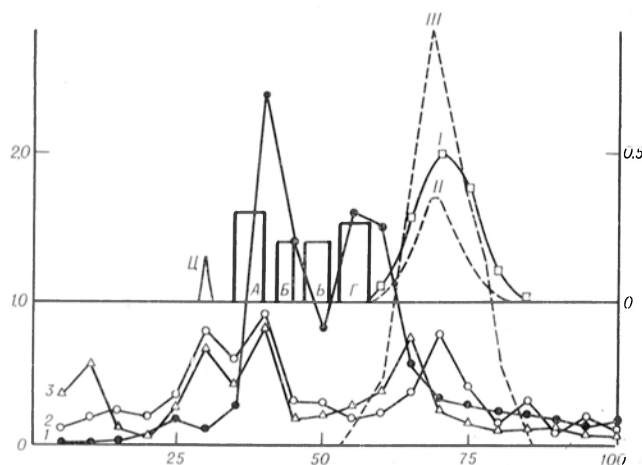
Для оценки результатов не имел принципиального значения тот факт, что, кроме цистеина, тирозина и фосфорилированного  $^{33}\text{P}$ -тирозина, полного разрешения для аминокислот в группах не было получено. Это становится очевидным из сравнительного анализа экспериментальных данных,

позволяющих с большой степенью достоверности оценить аминокислотную специфичность фосфорилирования в каждом отдельном случае и прежде всего в случае идентифицированных пиков тирозина и фосфорилированного тирозина в отношении других аминокислот.

На рисунке изображены профили элюента радиоактивных фракций гидролизатов фр. 0,4—0,5 М препаратов НГБ.

При сравнении профилей радиоактивности образцов 1, 2 и 3 с положением аминокислот и их групп можно видеть, что гидролизаты фр. 0,4—0,5 М всех исследованных препаратов НГБ не обладают моноаминокислотной специфичностью к фосфорилированию за счет собственных фосфопротеинкиназ. В почках интактных крыс основная доля  $^{33}\text{P}$  приходится на группу аминокислот А и Б, которые содержат способные к фосфорилированию аспарагиновую кислоту, треонин, серин и пролин. Характерно, что препараты, полученные из почек интактных крыс, имеют заметный эффект фосфорилирования по метионину (группа Г), но практически не содержат фосфорилированных цистеина и тирозина. В противоположность этому гидролизаты фр. 0,4—0,5 М НГБ гепатомы 27 и клеток печени крыс, получавших ДЭНА, совершенно не содержат фосфорилированного метионина, но зато имеют явную тенденцию к проявлению цистенно- и тирозинспецифической фосфопротеинкиназной активности.

По-видимому, это связано с процессами, которые, выявляясь феноменологически в появлении гетероорганых



Профиль элюции гидролизатов фракции 0,4—0,5 М  $\text{NaCl}$  различных препаратов НГБ.

По нижней и верхней осям абсцисс: объем элюата (в мл); по оси ординат: слева — величины радиоактивности,  $3 \cdot 10^4$  имп/мин; справа  $E_{280}$ . I — тирозин, II —  $^{33}\text{P}$ -тирозин, III — выход  $^{33}\text{P}$ -тирозина со свободной колонки. 1 — фр. 0,4—0,5 М НГБ почек интактных крыс; 2 — то же для НГБ клеток гепатомы 27; 3 — то же для НГБ клеток печени крыс после введения ДЭНА; Ц — цистенин\*, А — аспарагиновая кислота\*, треонин-треонин\*, серин\*; Б — глутаминовая кислота\*, пролин\*; В — глицин, аланин, цистин; Г — валин, метионин\*, изолейцин, лейцин. Звездочкой отмечены аминокислоты, способные к фосфорилированию при участии специфических фосфопротеинкиназ и ( $\gamma$ - $^{33}\text{P}$ )-АТФ. Площадь прямоугольников отражает относительную интенсивность нингидриновой реакции в соответствующих фракциях элюата.



антигенов почечной природы в клетках гепатом и «канцерогенной» печени, затрагивают состав белков фр. 0,4—0,5 М НГБ. Изменения касаются в данном случае именно специфических фосфопротеинкиназ, так как из всей массы кислых НГБ, свободновходящих из колонки, на фосфоцеллюлозе хроматографируются при дискретных значениях молярности NaCl только фосфопротеинкиназы, определяющие СФА соответствующих фракций [4]. С этих позиций понятны изменения, намечающиеся при действии гепатоканцерогенов, которые в гепатоме 27 приобретают уже вполне отчетливый характер: здесь максимум СФА приходится на фракцию элюата с максимальным содержанием тирозина.

Не исключено, что белки, имеющие тенденцию к тирозинфосфокиназной активности, появляются в НГБ хроматина клеток гепатомы и «канцерогенной» печени как следствие начальной экспрессии фосфопротеинкиназ почечной природы, не имеющих, согласно приведенным экспериментальным данным, тирозинкиназной специфичности. В качестве гетероорганических антигенов почечной природы, обладающих СФА, они были идентифицированы в НГБ фр. 0,4—0,5 М [2]. Возможно, благодаря их присутствию в хроматине создаются условия для растворимизации каких-либо клеточных онкогенов, среди продуктов функционирования которых значительную долю составляют тирозинспецифические фосфопротеинкиназы [7].

Автор благодарит А. А. Климову и А. Б. Грандиловскую за помощь в экспериментальной работе.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Киселев Ф. Л. // Экспер. онкол. — 1983. — № 6. — С. 3—10.
2. Кушнер В. П., Иванов В. А., Фель В. Я. // Цитология. — 1986. — № 1. — С. 96—100.
3. Кушнер В. П., Гершун В. А., Подгаецкая

Д. Я., Фель В. Я. // Экспер. онкол. — 1983. — № 5. — С. 23—27.

4. Кушнер В. П., Гершун В. А., Иванов В. А. и др. // Там же. — 1985. — № 5. — С. 30—34.
5. Шапот В. С., Шлякевич М. А., Лобаненков В. В. // Вопр. онкол. — 1983. — № 5. — С. 78—86.
6. Швембергер И. Н. // Цитология. — 1970. — № 8. — С. 951—955.
7. Hunter T., Cooper J. A. // Ann. Rev. Biochem. — 1985. — Vol. 54. — P. 897—930.
8. Kish V. M., Kleinsmith L. J. // J. biol. Chem. — 1974. — Vol. 249. — P. 750—760.
9. Thomson I. A., Chiu J. F., Sakuma K., Hnilica L. S. // Cancer Res. — 1977. — Vol. 37. — P. 3266—3273.

Поступила 07.04.87

#### AMINO ACID SPECIFICITY OF NATIVE PHOSPHOPROTEIN KINASE ACTIVITY IN SOME FRACTIONS OF NON-HISTONE PROTEINS FROM RAT KIDNEY, HEPATOMA AND LIVER TISSUES AFTER SINGLE ADMINISTRATION OF DIETHYLNITROSAMINE

V. P. Kushner

Institute of Cytology, Academy of Sciences of the USSR, Leningrad

Amino acid specificity of phosphorylation of some nuclear non-histone proteins was studied in the fractions, eluted by 0.4-0.5 M NaCl from phosphocellulose columns, using the reaction of  $^{32}\text{P}$  transfer, catalyzed by native phosphoprotein kinase, from  $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$  into the proteins. A number of amino acid residues, capable to reaction, were phosphorylated in the 0.4-0.5 M NaCl fraction of non-histone proteins from kidney of intact rats, from cells of hepatoma 27 and from liver cells after a single intraperitoneal administration of diethylnitrosamine. At the same time, methionine residue was markedly phosphorylated in the fraction of 0.4-0.5 M NaCl of intact rat kidney, whereas this effect was not found in the preparations of hepatoma 27 and in cells of "carcinogenous" liver tissue. As distinct from kidney non-histone proteins, proteins from the 0.4-0.5 M NaCl fraction of the latter preparations tended to exhibit tyrosine phosphokinase activity. It is well known that many of oncoproteins exhibited mainly the tyrosine-specific phosphoprotein kinase activity. The data obtained suggest that "tyrosine" shift in the preparations of non-histone proteins from tumoral cells or from rat liver cells, altered under the effect of hepatocarcinogenesis, may be an indication of functional activity of oncogenes.

[Е. Е. Шимонова], Г. В. Андреев

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ПЛАЗМИНОГЕНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ КРЫС

МГУ им. М. В. Ломоносова

Фибринолитическая система имеет важное физиологическое и биохимическое значение, поскольку она принимает участие в развитии сердечно-сосудистых заболеваний. В связи с этим появилась прямая необходимость в разработке методов, с помощью которых можно определить важнейшие компоненты этой системы как в клинике, так и в условиях эксперимента. Известно несколько модификаций казеннолитического метода определения концентрации плазминогена в плазме крови человека, где в качестве активатора плазминогена используют стрептокиназу. Вместе с тем из-за выраженной видовой специфичности стрептокиназы не может быть использована при определении содержания плазминогена в плазме крови некоторых видов экспериментальных животных. Хорошо активируя плазминоген человека, кошки, собаки и кролика, она слабо активирует плазминоген свиньи, лошади, крупного рогатого скота и совсем не активирует плазминоген крысы, мыши, овцы, козы и морской свинки. При добавлении минимальных количеств плазминогена человека стрептокиназа утрачивает видовую специфичность и активирует плазминоген всех видов животных. Считается, что в крови человека присутствует белковый предшественник, превращаемый стрептокиназой в активный фермент — активатор плазминогена [1].

Принимая во внимание эти свойства крови человека, мы на основе казеннолитического метода определения концентрации плазминогена в плазме крови человека [3] разработали модификацию для определения плазминогена в плазме крови белых крыс. Этим методом было определено содержание плазминогена в плазме крови здоровых крыс, а также после введения им тканевого активатора из сердца свиньи.

## Методика

Концентрацию плазминогена определяли в плазме крови здоровых белых крыс. Кровь

для анализа брали из *v. jugularis* с 3,8% цитратом натрия (1 объем цитрата и 9 объемов крови), центрифугировали при 2000 об/мин, плазму отделяли от форменных элементов. Исследование проводили немедленно или плазму до использования хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ . 4% раствор казеина готовили непосредственно перед определением. Казеин суспендировали в 0,1 М трис- $\text{HCl}$  буфере pH 8,0 с добавлением 7—8 мл на 100 мл 1 н.  $\text{NaOH}$  и нагревали на кипящей водяной бане до полного растворения. Раствор стрептокиназы из расчета 200 МЕ в 0,05 мл готовили в 0,05 М трис- $\text{HCl}$ -буфере pH 8,0 (препарат стрептокиназы 750 000 МЕ во флаконе, фирма «Behringwerke», ФРГ).

Эуглобулиновую фракцию выделяли из донорской плазмы человека методом Ниверевского [4] непосредственно перед определением. Хлорная кислота использовалась в концентрации 0,5 М. Оптическую плотность исследуемых растворов определяли на спектрофотометре марки VSU-2 (Австрия) при 275 нм против 0,5 М хлорной кислоты.

## Результаты и обсуждение

В целях устранения видовой специфичности стрептокиназы по отношению к плазминогену крысы стрептокиназу добавляли к плазме совместно с эуглобулиновой фракцией человека. Следует отметить, что эуглобулиновая фракция в использованных концентрациях не обладала собственной казеннолитической активностью.

Для определения концентрации плазминогена в плазме крыс предварительно подбирали разведение исследуемой плазмы, концентрацию стрептокиназы и эуглобулиновой фракции с целью выбора оптимальных условий количественной оценки содержания плазминогена. При этом учитывали, что для расчета активности плазминогена по формуле разницы оптической плотности ( $E_{275}$ ) опытной и контрольной проб должна составлять 0,060—0,350 ед. Показана необходимость использования плазмы крысы при ее разведении физиологическим раствором в 20 раз, активность стрептокиназы должна соответствовать 200 МЕ в 0,05 мл. Осадок эуглобулиновой фракции, полученный из 0,25 мл плазмы человека, растворяют не как обычно в 0,25 мл, а в 0,5 мл боратного ра-

створа. Раствор эглобулиновой фракции в количестве 0,05 мл разливали в исследуемые пробы сразу после растворения осадка во избежание образования сгустка.

Определение концентрации плазминогена в плазме крысы производили следующим образом: в пробирку, содержащую 0,4 мл 0,05 М трис-НСI-буфера pH 8,0, помещали 0,1 мл разведенной плазмы крысы, 0,05 мл раствора эглобулиновой фракции человека и 0,05 мл раствора стрептокиназы. В контрольную пробу вместо эглобулиновой фракции человека и стрептокиназы вносили 0,1 мл 0,05 М трис-НСI-буфера pH 8,0. Пробу инкубировали 7 мин при комнатной температуре, затем добавляли 0,4 мл 4 % раствора казеина и инкубировали в течение 2 ч при 37°C на водяной бане. Реакцию останавливали добавлением в каждую пробу 2,5 мл 0,5 М раствора хлорной кислоты. Пробу оставляли на 2 ч или на ночь при 4°C. Осадок отделяли центрифугированием при 1000 об/мин в течение 30 мин. Оптическую плотность растворов измеряли на спектрофотометре при 275 нм против 0,5 М хлорной кислоты. Активность плазминогена рассчитывали по формуле и выражали в казеинолитических единицах (КЕ). В случае определения содержания плазминогена в плазме крысы при взятом разведении плазмы эта формула имеет следующий вид:  $\Delta E_{275} \times 111$ , где  $\Delta E$  — разница между оптической плотностью опытной и контрольной проб.

С помощью этого метода была определена концентрация плазминогена в плазме крови 30 здоровых животных, которая в среднем равнялась  $24,5 \pm 0,3$  КЕ с индивидуальными колебаниями от 21 до 27 КЕ.

Исследовали также содержание плазминогена в плазме крыс после внутривенного введения им тканевого активатора плазминогена из сердца свиньи (2 и 10 мг на 200 г массы тела). Полученные результаты показыва-

ли, что в крови происходит некоторая активация плазминогена, которая возрастает с увеличением дозы активатора. Однократное введение животным 2 мг тканевого активатора через 10 мин приводило к незначительному снижению в плазме концентрации плазминогена (в среднем на 5—8 % по отношению к исходному уровню). При введении 10 мг тканевого активатора происходит более заметное снижение уровня плазминогена (в среднем на 16 %). Эти данные согласуются с результатами, свидетельствующими об отсутствии существенного влияния малых доз тканевого активатора на фибринолитическую активность крови и о возрастании этой активности с увеличением дозы активатора. Вместе с тем отмеченная активация плазминогена в крови животных после введения тканевого активатора, по-видимому, имеет вспомогательное значение при тромболизисе, так как показано, что при дозе 2 мг на 200 г массы происходит быстрый лизис тромба [2] без существенных изменений показателей системы фибринолиза.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Андреев Г. В. Фибринолиз: Биохимия, физиология, патология. — М., 1979.
2. Андреев Г. В., Шимонова Е. Е., Лютова Л. В., Серебрякова Т. Н. // Вопр. мед. химии. — 1981. — № 1. — С. 77—80.
3. Хватов В. Б., Петренко О. А. // Пробл. гематол. — 1975. — № 6. — С. 57—60.
4. Niewiarowski S. Krzepnicie krwi. — Warszawa, 1960. — P. 150—152.

Поступила 07.04.87

#### ESTIMATION OF THE PLASMINOGEN CONTENT IN RAT BLOOD PLASMA

E. E. Shimonova, G. V. Andreenko

M. V. Lomonosov State University, Moscow

Content of plasminogen was estimated in rat blood plasma using streptokinase and human blood euglobulin fraction in order to activate plasminogen. By means of the procedure described the content of plasminogen was evaluated in blood of healthy animals and of the animals treated with tissue activator of plasminogen from pig heart.

Т. Н. Никифорова, Л. И. Апуховская, С. П. Ивашкевич

## ИЗУЧЕНИЕ БЕЛКОВ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ D-ГИПОВИТАМИНОЗЕ

Киевский НИИ педиатрии, акушерства и гинекологии им. проф. П. М. Буйко (дир. — акад. АМН СССР проф. Е. М. Лукьянова)

D-гиповитаминоз сопровождается нарушением функциональной активности эритроцитов, которая коррелирует с изменением липидного состава их мембран [5]. Однако свойства биологических мембран обуславливаются не только их липидным составом, но и структурными белками, которые оказывают влияние на организацию липидного бислоя, изменяя транспорт веществ через мембрану, обладают способностью связывать ионы и могут служить дополнительным компартментом системы ионного транспорта на поверхности мембраны, непосредственно влияют на перенос ионов благодаря своим зарядам [4, 18, 19]. Изменение белковой части мембран эритроцитов может быть одной из причин укороченного времени жизни эритроцитов при некоторых патологических состояниях организма [17].

Весьма вероятно, что такие патологические проявления D-гиповитаминоза, как нарушения кальций-фосфорного обмена, являются следствием изменения функциональной активности мембранных белков. Для уточнения механизма наблюдаемых при D-гиповитаминозе нарушений функции эритроцитарных мембран исследовали содержание их основных белков.

### Методика

Работа проведена на крысах массой 30—40 г, содержащихся на рахитогенной диете в течение 30 дней. Контрольным животным вводили 13 МЕ витамина D<sub>3</sub> ежедневно.

Цельную кровь с добавкой гепарина (100 МЕ на 10 мл крови) центрифугировали со скоростью 1500 об/мин в течение 20 мин.

Полученную суспензию эритроцитов трижды промывали холодным физиологическим раствором. Мембраны эритроцитов получали, как описано ранее [1]. Разделение их на фракции непрочно и прочно связанных белков осуществляли, как описано ранее [20]. Непрочно связанные белки из мембран эритроцитов удаляли путем их экстракции 5 объемами 10% уксусной кислоты при 0°C в течение 40 мин с последующим центрифугированием в течение 45 мин при 28 000 g. Надосадочную жидкость отделяли и дважды диализовали против 0,1 М HCl с последующим

диализом против раствора, содержащего 0,1 М NaCl и 0,1 М ЭДТА. Липопротеидную фракцию, содержащую прочно связанные белки, промывали 10% раствором уксусной кислоты и водой с последующим центрифугированием при тех же условиях. Содержание белка находили методом Лоури [16]. Электрофорез белков проводили в 5,6% ПААГ в присутствии 0,5% додецилсульфата натрия, используя в качестве красителя кумасси голубой [9]. Белки перед нанесением на гель (30 мкг белка и их фракций) инкубировали в 4% додецилсульфате натрия, 1 М ЭДТА, 0,5% меркаптоэтанол, 10 М глицине pH 12,5 в течение 30 мин при 37°C с последующим диализом против 0,5% додецилсульфата натрия, 1 М ЭДТА, 10 М трис-HCl pH 7,4. Деисотметрирование гелей проводили при 550 нм, содержание спектрина и белка 3 определяли по площади пиков. Экстракцию липидов из растворимой и липопротеидной фракций осуществляли смесью хлороформ — метанол [6] с последующим их разделением и идентификацией посредством тонкослойной хроматографии в сочетании с хроматоспектрофотометрическим и калориметрическим определениями [1].

### Результаты и обсуждение

В настоящее время считают, что мембрана эритроцитов состоит из асимметричного липидного бислоя и асимметрично расположенных белков, большая часть которых находится на цитоплазматической стороне мембраны и некоторое количество проходит через бислой [4, 6, 18]. Степень прочности связи различных белков с мембранными компонентами неодинакова, поэтому возможность изменения их содержания при патологических состояниях весьма вероятна, что может привести к нарушению функциональной активности эритроцитов.

Результаты проведенных исследований (табл. 1) показали, что в эритроците содержится 0,9 пг суммарного белка. Экстракция мембран эритроцитов 10% уксусной кислотой дает возможность удалить 50% общих белков, которые, по всей вероятности, менее прочно связаны с липидными компонентами мембран и условно названы растворимой фракцией [20]. Оставшаяся фракция представляет собой комплекс белков с липидами.

Т а б л и ц а 1

Содержание суммарного белка (в  $\mu\text{г}$  на 1 эритроцит) в мембранах эритроцитов ( $M \pm m$ ;  $n=10$ )

Исследуемый объект	Контроль	D-гиповитаминоз
Мембраны	$0,90 \pm 0,09$	$0,86 \pm 0,08$
Липопротеидная фракция	$0,46 \pm 0,06$	$0,42 \pm 0,07$
Растворимая фракция	$0,44 \pm 0,05$	$0,44 \pm 0,04$

Ранее было показано, что при экспериментальном рахите увеличивается содержание стерина в мембранах эритроцитов [1]. В связи с этим исследовали содержание некоторых стерина и сквалена, являющегося предшественником в биосинтезе холестерина, в липопротеидной и растворимой фракциях белков. Как видно из табл. 2, в исследуемых фракциях белков идентифицированы холестерин и его эфиры, ланостерин и сквален. Основным стеринем этих фракций является холестерин, на долю которого приходится 95 и 70 % от общей суммы стерина в липопротеидной и растворимой фракциях белков соответственно. При экспериментальном D-гиповитаминозе содержание исследуемых стерина и сквалена увеличивается в обеих фракциях. Содержание холестерина в липопротеидной фракции увеличивается в 3 раза по сравнению с контролем, что согласуется с полученными данными по изменению содержания стерина в мембранах эритроцитов при данной патологии [1, 5]. Содержание стерина в растворимой фракции белков составляет около 4 % от их количества в липопротеидной фракции. Таким образом, при использовании метода разделения белков на 2 фракции липидные компоненты мембран находятся в липопротеидной фракции. Стерины в раствори-

мой фракции, по-видимому, прочно связаны с белками.

Известно, что рахит сопровождается глубокими нарушениями многих обменных процессов, в том числе синтеза белков. В частности, дефицит витамина D в организме приводит к уменьшению синтеза белков, транспортирующих  $\text{Ca}^{2+}$  из просвета кишечника в кровь. Отмеченные нарушения дают возможность предположить изменение содержания белков в эритроцитах, которое может воздействовать на многие их свойства и послужить причиной изменения прочности мембран. По данным электрофореза в ПААГ с додецилсульфатом натрия и денситометрии электрофореграмм белков мембран эритроцитов видно, что основными белками мембран являются спектрин (I) и белок 3 (II), на долю которых приходится соответственно 24 и 28 % от общей суммы белков мембран (рис. 1). Спектрин расположен на цитоплазматической стороне мембраны и является структурным белком, обеспечивающим образование специфической формы эритроцитов и их стабильность [11, 14]. Белок 3 обнаруживается на внешней и цитоплазматической стороне мембраны [7, 11]. Однако применение метода замораживания со скалыванием позволило установить, что белок 3 расположен на внутренней стороне мембраны [8] и несколько раз прошивает мембрану [7, 11]. Трансмембранная локализация белка 3 свидетельствует о том, что он играет важную функциональную роль в эритроцитах. Считают, что этот белок ответствен за транспорт глюкозы и фосфора в клетку [10, 11]. Экстракция мембран эритроцитов 10 % уксусной кислотой, как видно из данных электрофореза, дает возможность разделить два основных белка мембран. Спектрин как менее прочно связанный белок мембран экстраги-

Т а б л и ц а 2

Содержание липидов (в  $\mu\text{М}$  на 1 г белка) в белковых фракциях мембран эритроцитов ( $M \pm m$ )

Исследуемый объект	Липопротеидная фракция		Растворимая фракция	
	контроль	D-гиповитаминоз	контроль	D-гиповитаминоз
Холестерин	$236,0 \pm 10,0$	$764,0 \pm 21,0$	$10,4 \pm 1,0$	$17,1 \pm 2,1$
Эфиры холестерина	$4,7 \pm 0,7$	$12,8 \pm 1,0$	$1,7 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
Ланостерин	$2,3 \pm 0,2$	$4,8 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,3$	$2,9 \pm 0,2$
Сквален	$4,1 \pm 0,6$	$13,3 \pm 1,0$	$1,9 \pm 0,1$	$5,5 \pm 0,8$

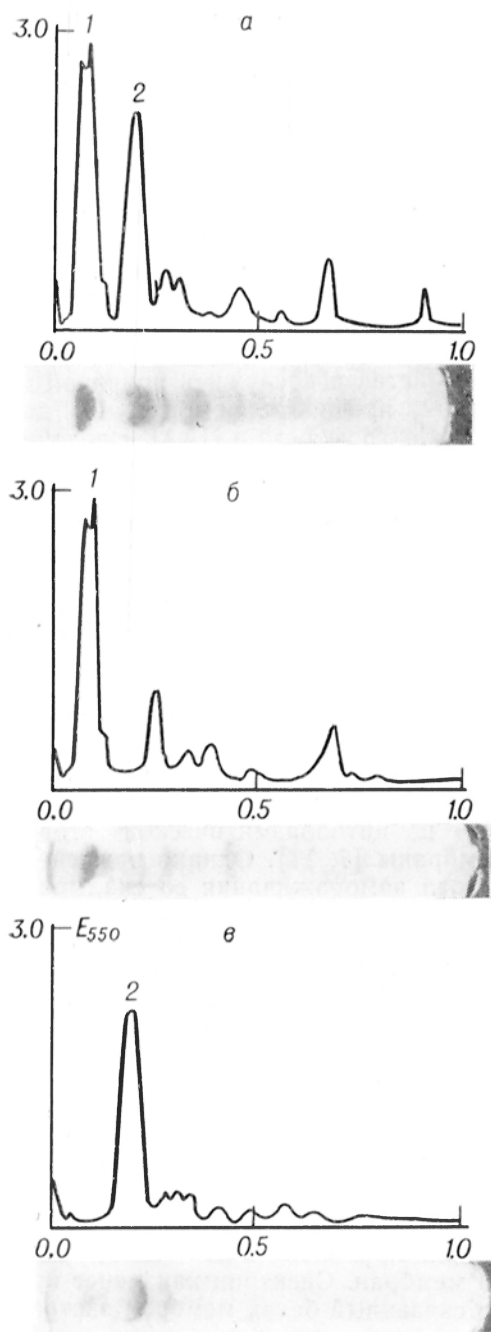


Рис. 1. Денситометрическое сканирование гелелектрофорезграмм белков мембран эритроцитов крыс.

По осям абсцисс — относительная миграция; по осям ординат — оптическая плотность. *а* — мембраны эритроцитов; *б* — растворимая фракция; *в* — липопротеидная фракция. 1 — спектрин; 2 — белок 3.

руется 10 % уксусной кислотой, тогда как белок 3 остается в липопротеидной фракции, что свидетельствует о более прочной его связи с мембранными

структурами. При этом на долю белка 3 приходится 70 % от общей суммы белков этой фракции.

При экспериментальном D-гиповитаминозе суммарное содержание белков мембран эритроцитов не изменяется. Однако это не исключает возможность изменения в них содержания индивидуальных белков. Так, у животных опытной группы на 36 % уменьшается содержание белка 3, в то время как содержание спектрина увеличивается на 14 %. Коэффициент отношения спектрина к более прочно связанному мембранному белку 3 у контрольных животных составляет  $0,84 \pm 0,05$ , в то время как при D-гиповитаминозе коэффициент отношения спектрина к белку 3 значительно выше —  $1,50 \pm 0,07$ . Можно предположить, что у животных, получавших рахитогенную диету, в клетках эритроцитов происходит связывание спектрина мембранами эритроцитов, что отмечается и при других формах патологии [17]. Увеличение содержания спектрина в эритроцитах при рахите может привести к большей эластичности мембраны клетки. Ранее было показано, что при D-гиповитаминозе увеличивается стойкость эритроцитов к осмотическим и кислотным гемолитикам [3]. Можно предположить, что повышенная стойкость эритроцитов при рахите объясняется увеличением содержания в их мембранах не только холестерина, но и спектрина. В то же время при экспериментальном рахите уменьшаются гликолитическая активность эритроцитов и содержание в них неорганического фосфора [5]. Одной из возможных причин этих нарушений, по-видимому, является уменьшение содержания белка 3, ответственного за транспорт глюкозы и фосфора в клетку. Однако нельзя исключить изменение функциональной активности белка 3 в связи с увеличением содержания стероидных компонентов и уменьшением количества фосфолипидов в мембранах [2, 5]. Увеличение содержания холестерина, вероятно, вызывает существенные изменения во взаимодействиях между отдельными компонентами мембран, в результате чего изменяются характер и прочность связи между белками и липидами, что в конечном результате может привести к изменению функциональной активности белков. Подобное предположение правмерно, поскольку установлена воз-



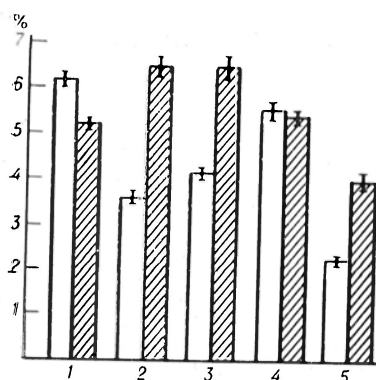


Рис. 2. Содержание белка 3 и спектрина в мембранах эритроцитов крыс при введении различных доз витамина D<sub>3</sub>.

1 — контроль; 2 — D-гиповитаминоз; 3 — D-гиповитаминоз+40 МЕ витамина D<sub>3</sub>; 4 — D-гиповитаминоз+400 МЕ витамина D<sub>3</sub>; 5 — D-гиповитаминоз+1200 МЕ витамина D<sub>3</sub>; светлые столбики — белок 3, заштрихованные — спектрин.

возможность связывания холестерина не только с фосфолипидами, но и с мембранными белками [15], одним из которых является белок 3, обладающий сильным сродством к холестерину. Белок-липидное взаимодействие осуществляется главным образом гидрофобными связями с циклической частью молекулы холестерина и водородными связями между белком и полярной гидроксильной группой холестерина [13]. Кроме того, отмечаемые при рахите явления ацидоза также могут вызывать изменение конформации белка, так как белок-липидный комплекс, образованный при пониженном рН, стабилен [12]. Ранее с применением метода потенциометрического титрования [5] обнаружены нарушение электростатического баланса в мембранах эритроцитов при экспериментальном D-гиповитаминозе, выражающееся в изменении количества и рК доступных для титрования полярных групп, и уменьшение электроотрицательности суммарного заряда мембран. Учитывая, что спектрин и белок 3 являются основными белками мембран эритроцитов и тот факт, что при D-гиповитаминозе увеличивается содержание холестерина в липопротеидной и растворимой фракциях мембран, можно полагать, что отмеченные изменения в электростатическом балансе отражают нарушения взаимодействия этих белков с липидными компонентами мембран.

Поскольку установлено, что при D-гиповитаминозе уменьшается содер-

жание белка 3 при увеличении количества спектрина в мембранах эритроцитов, представилось целесообразным выяснить влияние различных доз витамина D<sub>3</sub> на содержание этих белков. Животным с экспериментальным рахитом ежедневно в течение 10 дней вводили 40, 400 и 1200 МЕ витамина D<sub>3</sub> (рис. 2). Введение 40 МЕ витамина D<sub>3</sub> не изменяет содержание основных белков мембран эритроцитов. При введении животным 400 МЕ витамина D<sub>3</sub> содержание спектрина уменьшается, но увеличивается содержание белка 3. Однако введение дозы, превышающей в 100 раз физиологическую потребность (1200 МЕ), приводит к уменьшению содержания не только белка 3, но и спектрина. Причем содержание белка 3 уменьшается более чем на 30 % по сравнению с его количеством у D-гиповитаминозных животных. По-видимому, гипердозы витамина D ингибируют биосинтез белков клеточных мембран. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что при экспериментальном D-гиповитаминозе на фоне постоянного уровня суммарных белков наблюдаются значительные количественные изменения индивидуальных белков мембран эритроцитов. Это может являться причиной нарушения функциональной активности эритроцитов и рассматриваться как один из этапов развития D-гиповитаминоза.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Апуховская Л. И., Ивашкевич С. П., Вендт В. П. // *Вопр. мед. химии*. — 1979. — № 5. — С. 548—554.
2. Апуховская Л. И., Ивашкевич С. П., Омельченко Л. И. // *Там же*. — 1982. — № 3. — С. 105—110.
3. Лукьянова Е. М., Апуховская Л. И., Вендт В. П. и др. // *Вопр. охр. мат.* — 1977. — № 10. — С. 57—61.
4. Холодова Ю. Д. // *Молекулярная биология*. — Киев, 1976. — Вып. 15. — С. 56—63.
5. Холодова Ю. Д., Апуховская Л. И., Бондарь О. П. и др. // *Укр. биохим. журн.* — 1980. — Т. 52, № 5. — С. 597—603.
6. Dodge J. T., Mitchell C. F., Hanahan D. S. // *Arch. Biochem.* — 1963. — Vol. 100, N 1. — P. 119—123.
7. Drichamer J. K. // *J. biol. Chem.* — 1976. — Vol. 251, N 17. — P. 5115—5123.
8. Edwards H. M., Mueller T. J., Morrison M. // *Science*. — 1979. — Vol. 203. — P. 1343—1346.
9. Fairbanks G., Steck T. S., Wallach D. E. H. // *Biochemistry (Wash.)*. — 1971. — Vol. 10, N 13. — P. 2606—2617.
10. Fröman J., Åkerö F. // *Biochim. biophys. Acta*. — 1980. — Vol. 600, N 2. — P. 489—501.

11. Ho M. K., Guidotti G. // J. biol. Chem. — 1975. — Vol. 250, N 2. — P. 675—683.
12. Klappauf E., Schubert D. // Ber. Bunsenges. phys. Chem. — 1978. — Bd 82, N 9. — S. 889—890.
13. Klappauf E., Schubert D. // Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. — 1979. — Bd 360. — S. 1225—1235.
14. La Celle P. L., Weed R. I., Santillo P. A. // браны и болезни: Пер. с англ. — М., 1980. — С. 56—75.
15. London Y. M., Demel R. A., Geurts van Kessel W. S. M. et al. // Biochim. biophys. Acta. — 1975. — Vol. 332, N 1. — P. 69—84.
16. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol 193, N 1. — P. 265—275.
17. Palek J., Church A., Fairbanks G. // Мем-браны и болезни. Пер. с англ. — М., 1980. — С. 56—75.
18. Passow H. // Progr. Biophys. molec. Biol. — 1969. — Vol. 19. — P. 425—442.
19. Sanui H., Carvalho A. P., Pace N. // J. Cell. Comp. Physiol. — 1962. — Vol. 59. — P. 241—250.
20. Schubert D., Domning B. // Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. — 1978. — Bd 359. — S. 507—515.

Поступила 04.06.87

## ERYTHROCYTE MEMBRANE PROTEINS IN EXPERIMENTAL D-HYPOVITAMINOSIS

T. N. Nikiphorova, L. I. Apukhovskaya,  
S. P. Ivashkevich

Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology, Ministry of Public Health of the Ukrainian SSR, Kiev

Content of rat erythrocyte membrane proteins was studied in experimental rickets as well as during treatment of the disease with various doses of vitamin D<sub>3</sub>. Distinct alterations in content of spectrin and protein 3 simultaneously with approximately constant level of membrane total proteins were observed in D-hypovitaminosis. Composition of main membrane proteins tended to be normalized after administration of vitamin D<sub>3</sub> (400 IU) into the animals with experimental rickets within 10 days, while the vitamin at a dose exceeding 100-fold the physiological requirements, caused a decrease in the content of membrane proteins. Alterations in molecular structure of erythrocyte membranes appear to be among the factors responsible for inhibition of erythrocyte functional activity in rickets.

УДК 616.151.511-07:616-008.952.5-074:543.544

Ю. В. Магеровский, В. А. Монастырский, А. В. Гайда, И. И. Бирка,  
М. И. Вороняк

## ЧАСТИЧНАЯ ОЧИСТКА ТКАНЕВОГО ТРОМБОПЛАСТИНА МЕТОДОМ ГЕЛЬ-ПРОНИКАЮЩЕЙ ХРОМАТОГРАФИИ И ВОСПРОИЗВЕДЕНИЕ С ЕГО ПОМОЩЬЮ СИНДРОМА ГЕНЕРАЛИЗОВАННОГО ДЕКОМПЕНСИРОВАННОГО ТРОМБИНОГЕНЕЗА

Львовский НИИ гематологии и переливания крови

В клинической практике часто встречаются различные расстройства процессов свертывания крови и фибринолиза. Наиболее грозным из них является синдром генерализованного декомпенсированного тромбиногенеза (ГДТ-синдром), проявляющийся в виде диссеминированного микротромбоза, дезорганизации межуточной соединительной ткани и дегенеративных изменений клеток паренхиматозных органов [5, 6].

Для изучения патогенеза повреждений паренхиматозных органов при ГДТ-синдроме и разработки методов их профилактики и терапии существует необходимость воспроизведения генерализованного декомпенсированного тромбиногенеза в лабораторных условиях. Для того чтобы свести до минимума неспецифическую реакцию организма при моделировании ГДТ-синдро-

ма, целесообразно применение препаратов очищенного тканевого тромбопластина. Следует подчеркнуть, что весьма актуальной проблемой является уже сама по себе разработка методов очистки тканевого тромбопластина, поскольку в настоящее время препараты тромбопластина, пригодные для тонких коагулологических и научных исследований, отечественной промышленностью не выпускаются.

Цель настоящей работы — разработка метода получения тканевого тромбопластина, очищенного от ряда балластных белков, и воспроизведение с его помощью в эксперименте на животных ГДТ-синдрома.

### Методика

В качестве исходного сырья для получения тромбопластина использовали лнотфильно высушенный мозг человека (препарат тромбо-



пластин производства Львовского НИИ гематологии и переливания крови). Гомогенат тромбопластина готовили следующим образом: 5 г препарата гомогенизировали в фарфоровой ступке с 60 мл 0,15 М NaCl и центрифугировали при 6000 г в течение 20 мин. Осадок отбрасывали, а надосадочную жидкость, содержащую тромбопластическую активность, подвергали хроматографической очистке. Хроматографию проводили в стеклянных колонках длиной 10 см и диаметром 1 см, заполненных сорбентом и уравновешенных 0,15 М NaCl. Фракции собирали по 2 мл. Скорость элюирования составляла 0,08—0,4 мл/см<sup>2</sup>·мин. Содержание белка в растворах определяли спектрофотометрически по поглощению при длине волны 280 нм и с помощью кумасси бриллиантового голубого G-250 [19]. Для оценки активности тромбопластина определяли протромбиновое время по методу Квика [18].

Коагулологические тесты (уровень фибриногена, время рекальцификации, протромбиновое время) определяли у 5 кроликов до и после введения им очищенного тканевого тромбопластина (5 мл на 1 кг массы) с активностью 16—18 с по Квику.

С помощью электронной микроскопии наблюдали морфологические признаки развития ГДТ-синдрома при внутривенном введении очищенного тканевого тромбопластина (10 мл на 1 кг массы) 12 белым крысам-самцам. Для ультраструктурного анализа использовали миокард левого желудочка и корковый слой почек. Материал фиксировали в 1% растворе OsO<sub>4</sub>, обрабатывали по общепринятой методике и заливали в смесь эпоксидных смол эпон-аралдит [12]. Срезы готовили на ультрамикротоме («Tesla», ЧССР) и просматривали на электронном микроскопе УЭМБ-100К при ускоряющем напряжении 75 кВ.

В работе использовали кумасси бриллиантовый голубой G-250 («Serva», ФРГ), хроматографические носители: сефадекс G-200 («Pharmacia Fine Chemicals», Швеция), ультрагель AcA 34 (LKB, Швеция), акрилекс P-300 («Reanal», ВНР) и тойоперл HW-55F («Toyo Soda», Япония), эпоксидные смолы («Fluka», Швейцария).

## Результаты и обсуждение

Тканевый тромбопластин (тканевый фактор, или фактор III) представляет собой высокомолекулярный липопротеидный комплекс, который освобождается при поражении эндотелия сосудов и инициирует свертывание крови по внешнему пути [9]. К настоящему времени термин «тканевый тромбопластин» является еще недостаточно определенным, а сам комплекс — малоизученным. В литературе описаны методы выделения липидных компонентов тромбопластина и очистки апобелка III [7, 15, 17], однако в отдельности ни липидная, ни белковая часть не обладают свертывающей активностью [14, 16] и характеризуются низкой растворимостью в водных растворах при отсутствии детергентов.

Методы выделения тканевого тромбопластина, основанные на экстракции органическими растворителями [13, 20] или ультрацентрифугировании при высоких скоростях [8, 21], не дают возможности получать достаточно активные препараты. Показано [11], что при гомогенизации исходного сырья (обычно мозга или легких) значительная часть тромбопластической активности переходит в раствор, который для дальнейшей очистки не используется [17].

В данной работе предпринята попытка очистки тканевого тромбопластина из надосадочной жидкости, полученной после гомогенизации и центрифугирования лиофильно высушенной трупной мозговой ткани человека. Поскольку тромбопластин обладает высокой молекулярной массой (300 000 Д) [11, 17], можно было предположить, что при гель-проникающей хроматографии на сорбентах с пределом эксклюзии 200 000—300 000 Д тромбопластическая активность будет элюироваться из колонки в свободном объеме. Таким образом, можно было бы отделить тромбопластин от примесей, обладающих меньшими молекулярными массами. Поэтому в качестве адсорбентов для очистки тканевого тромбопластина нами были испытаны сефадекс G-200, акрилекс P-300, ультрагель AcA 34 и тойоперл HW-55F.

Поскольку в настоящее время понятие «удельная активность тромбопластина» не определено, для оценки степени чистоты препаратов, получаемых гель-фильтрацией, предложено использовать отношение поглощения раствора тромбопластина при длине волны 540 нм к концентрации белка в растворе, выраженной в миллиграммах на 1 мл. Такая оценка чистоты тромбопластина возможна в связи с липопротеидной природой последнего. Из-за наличия липидов водные растворы тромбопластина характеризуются мутностью, которую легко измерить по поглощению при длине волны 540 нм. Чем выше концентрация липидов в растворе, тем большим является поглощение. Но, так как тромбопластин представляет собой липопротеидный комплекс, он содержит определенное количество белков, связанных с липидами и не отделяющихся от них в отсутствие детергентов. Следовательно, соотношение поглощения раствора при 540 нм к концентрации белка будет постоянным для

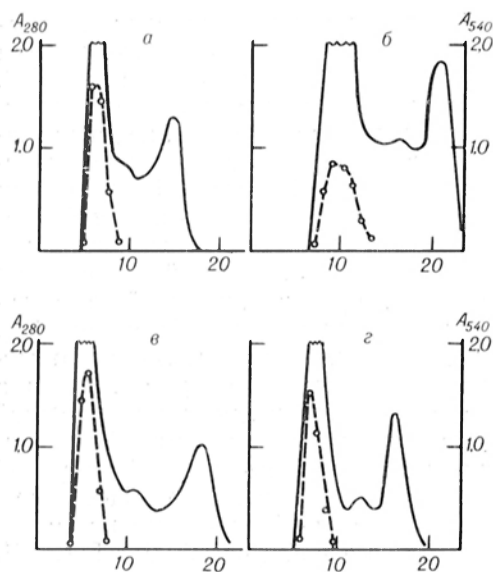


Рис. 1. Хроматография тромбопластина на сефадексе G-200 (а), ультрогеле АсА 34 (б), акрилексе Р-300 (в), тойоперле НВ-55F (г). Сплошная линия — поглощение раствора при 280 нм, пунктирная — то же при 540 нм. По оси абсцисс — № фракции.

каждого препарата тромбопластина и может использоваться как критерий его чистоты. Чем выше величина этого соотношения, тем больше степень очистки тромбопластина, поскольку в процессе очистки мы избавляемся от белков, не связанных с липидами и не обладающих свертывающей активностью.

Профили элюции тромбопластина на различных сорбентах представлены на рис. 1, а результаты очисток суммированы в таблице. Наилучшая степень очистки достигалась при использовании тойоперла НВ-55F, причем соотношение объема тромбопластина после очистки и до очистки было минимальным (1,5—2 раза). Хорошие результаты дает также применение сефадекса G-200, акрилекса Р-300 и ультрогеля АсА 34, однако скорость элюирования на этих сорбентах примерно в 5 раз ниже, чем на тойоперле НВ-55F.

Во всех случаях тромбопластическую активность обнаруживали во фракциях основного пика. Там же наблюдалось и максимальное поглощение при 540 нм. Следует учитывать, что содержание белка в этих фракциях, измеренное по поглощению при длине волны 280 нм, значительно завышено из-за присутствия липидов, рассеивающих свет. Концентрация белка во фракциях, содер-

жащих тромбопластическую активность, определенная с помощью кумаси бриллиантового голубого, не превышала 1 мг/мл.

При попытке использовать колонки больших размеров (50×2,5 см) для препаративного выделения тромбопластина, акрилекс Р-300 и ультрогель АсА 34 оказались малопригодными ввиду длительности процедуры очистки, обусловленной низкой скоростью элюирования. Кроме того, после проведения 1—2 циклов очистки данные сорбенты так сильно уплотнялись, что дальнейшее их использование становилось невозможным. Сефадекс G-200 выдерживал 5—6 циклов очистки, время, затраченное на 1 цикл, составляло 5—6 ч. Применение тойоперла НВ-55F показало наилучшие результаты как по времени, затраченному на 1 цикл, так и по количеству циклов. Поэтому в дальнейшем для препаративной хроматографии тромбопластина мы использовали только этот сорбент. Проведено 25 опытов по очистке тромбопластина и все они отличались хорошей воспроизводимостью (выход препарата, степень очистки, активность, скорость элюирования).

Полученные препараты тромбопластина обладали активностью 16—18 с (протромбиновое время) и успешно применялись нами для коагулологических тестов, активации протромбина в тромбин [4] и проведения экспериментов на животных. При внутривенном вливании кроликам очищенного тканевого тромбопластина у последних уже через 30 мин после введения уровень фибриногена снижался на 50 %, значительно удлинялось время рекальцификации и протромбиновое время, что свидетельствовало о выраженных нарушениях в системе гемостаза, развива-

Очистка тканевого тромбопластина на различных сорбентах

Сорбент	Концентрация белка в элюате, мг/мл	$E_{540}$	$E_{280}$ /концентрация белка, мг/мл	Кратность очистки
Сефадекс G-200	0,62	1,45	2,3	4,6
Акрилекс Р-300	0,70	1,70	2,4	4,8
Ультрогель АсА 34	0,42	0,86	2,0	4,0
Тойоперл НВ-55F	0,53	1,40	2,6	5,2
Неочищенный гомогенат	7,90	4,0	0,5	1,0

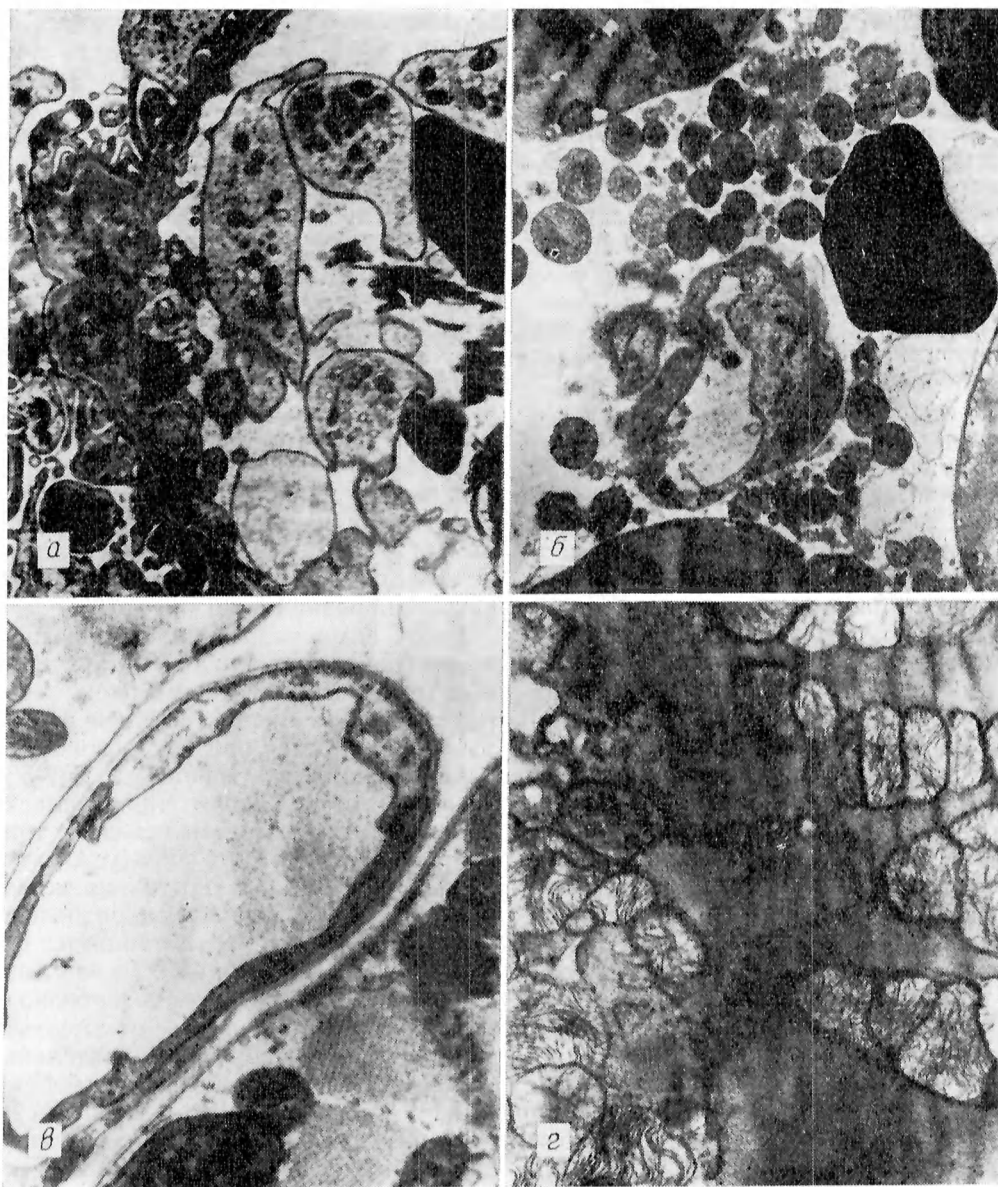


Рис. 2. Ультраструктурные изменения почек и миокарда крысы через 2 мин после введения очищенного тромбoplastина.

*а* — почка. Микротромб в капилляре клубочка. Ув. 10 000; *б* — миокард. Разрыхление и разрывы различных мембран кардиомиоцитов и эндотелиоцитов. Экстравазаты и экстрацеллюляты во внеклеточном пространстве. Ув. 6000; *в* — миокард. Изменение электронной плотности клеток «темный» и «светлый» эндотелиоциты. Ув. 10 000; *г* — миокард. Гомогенизация миофибрилл кардиомиоцита. Ув. 10 000.

ющихся по типу гипер-гипокоагуляции. Это подтверждают и электронно-микроскопические исследования (рис. 2). Так, уже через 2—3 мин после введения крысам очищенного тканевого тромбoplastина в капиллярах миокарда, клубочковых и перитубулярных капиллярах почек выявляется большое количество микротромбов в виде го-

могенных мелкозернистых или мелко-волоконистых электронно-плотных масс. Встречаются также тромбоцитарные, тромбоцитарно-фибринные микротромбы, а иногда и отдельные пучки волокон фибрина. Наличие микротромбов и особенно отдельных пучков волокон фибрина свидетельствует о том, что введение очищенного тканевого тромбoplastина вызывало у жи-

вотных развитие диссеминированного микротромбоза.

Одновременно с диссеминированным микротромбозом наблюдаются выраженные изменения межуточной соединительной ткани, клеточных элементов миокарда (в основном эндотелиоцитов и кардиомиоцитов) и клеток различных отделов нефрона почек (эпителиоцитов, эндотелиоцитов, подоцитов, мезангиоцитов). В отекающей строме этих органов, вследствие повреждения капилляров, появляются форменные элементы крови (экстравазаты).

В клетках происходят разрыхление и разрывы мембран митохондрий, эндоплазматической сети, аппарата Гольджи, кариотеки и плазмалеммы (см. рис. 2). Встречается выход органелл во внеклеточное пространство (экстрацеллюляты). В цитоплазме появляются электронно-плотные гомогенные массы преципитатов и коагулятов, а в большинстве случаев повышается электронная плотность клеток в целом. В некоторых клетках отмечаются признаки отека и, следовательно, просветление цитоплазмы (см. рис. 2). Наблюдается также уменьшение количества свободных полирибосом и зернистой эндоплазматической сети. В кардиомиоцитах, кроме того, происходит уменьшение количества гранул гликогена, гомогенизация и дезорганизация миофибрилл (см. рис. 2). Ядра одних клеток отекающие, крупные (гидропическая дегенерация), ядра других — сморщенные, электронно-плотные с краевой конденсацией хроматина (пикноморфная дегенерация).

Из проведенных электронно-микроскопических исследований следует, что внутривенное введение животным очищенного тканевого тромбопластина вызывает морфофункциональные изменения крови, стромы и клеток паренхимы почек и миокарда: диссеминированный микротромбоз, дезорганизацию межуточной соединительной ткани, дегенеративные изменения клеток. Таким образом, с помощью полученного препарата возможно воспроизвести не только синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания, наиболее характерной чертой которого является микротромбоз сосудистого русла, но и описанный в последние годы ГДТ-синдром [5, 6], характерными признаками которого (наряду с микротромбозом) является повреждение стромы и клеток

паренхиматозных органов. Следует отметить, что результаты исследований полностью согласуются с таковыми ряда авторов о способности препаратов тромбоина и тромбопластина существенно изменять структурно-функциональное состояние клеток и органов как *in vitro*, так и *in vivo* [3, 10]. При этом они также не противоречат многочисленным данным литературы о двухфазном характере изменений в самой системе гемостаза при появлении в сосудистом русле большого количества свободного тромбоина [1, 2]. Быстро развивающаяся фаза гиперкоагуляции, ведущая к диссеминированному микротромбозу, дезорганизации межуточной соединительной ткани и дегенеративным изменениям клеток (ГДТ-синдром), сменяется фазой гипокоагуляции, нередко представляющей собой компенсаторную реакцию организма.

Итак, нами разработанная простая и эффективная методика очистки тканевого тромбопластина методом гелевой фильтрации, причем наилучшие результаты достигаются при использовании в качестве сорбента тойоперла HW-55F. Полученные препараты тромбопластина могут успешно применяться не только в диагностических коагулологических тестах, но и в опытах на животных, например для воспроизведения ГДТ-синдрома. Это представляется особенно важным, поскольку до последнего времени ГДТ-синдром воспроизводили в эксперименте либо с помощью гетерогемотрансфузии, либо длительным раздавливанием мягких тканей бедра животных (т. е. на недостаточно чистых моделях), что существенно затрудняло изучение патогенеза, профилактики и лечения данного синдрома. Применение указанных препаратов позволяет устранить многие недостатки этих модельных систем, в частности значительно уменьшить влияние таких патогенетических факторов, как иммуноконфликт, плазмопотеря, токсемия, шок.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Калишевская Т. М. Регуляция жидкого состояния крови и ее свертывание. — М., 1982.
2. Кудряшов Б. А. Биологические проблемы регуляции жидкого состояния крови и ее свертывания. — М., 1975.
3. Кудряшов Б. А., Струкова С. М. // Успехи совр. биол. — 1984. — Т. 97, № 2. — С. 193—207.
4. Магеровский Ю. В. // Украинская респ. науч. конф. молодых ученых-медиков по

- вопросам гематологии и трансфузиологии, 6-я: Тезисы докладов. — Ивано-Франковск, 1985. — С. 172.
5. *Монастырский В. А.* Коагуляционная система и роль ее расстройств в патогенезе поражений структуры и функций паренхиматозных органов: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Львов, 1973.
  6. *Монастырский В. А.* // Пробл. гематол. — 1979. — № 7. — С. 19—23.
  7. *Björklid E., Storm E., Prydz H.* // Biochem. Res. Commun. — 1973. — Vol. 55. — P. 969—976.
  8. *Chargaff E., Moore D. H., Bendich A.* // J. biol. Chem. — 1942. — Vol. 145. — P. 595—603.
  9. *Davie E. W., Fujikawa K.* // Ann. Rev. Biochem. — 1975. — Vol. 44. — P. 799—829.
  10. *Fenton J. W. II.* // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1981. — Vol. 370. — P. 468—495.
  11. *Gardiner J. E., Howell R. M.* // Biochem. Soc. Trans. — 1980. — Vol. 8. — P. 133.
  12. *Glauert A.* // Practical Methods in Electron Microscopy / Ed. A. M. Glauert. — Amsterdam, 1975. — P. 55—71.
  13. *Hecht E., Oosterbaan-van Lit W. L.* // Trombos. Diathes. haemorrh. (Stuttg.). — 1967. — Bd 18. — S. 223—240.
  14. *Hecht E., Wijngaards G.* // Ibid. — 1969. — Bd 21. — S. 546—560.
  15. *Liu D. T. H., McCoy L. E.* // Trombos. Res. — 1975. — Vol. 7. — P. 199—211.
  16. *Nemerson Y.* // J. clin. Invest. — 1968. — Vol. 47. — P. 72—80.
  17. *Nemerson Y., Pitlick F. A.* // Biochemistry (Wash.). — 1970. — Vol. 9. — P. 5100—5105.
  18. *Quick A. J.* // J. biol. Chem. — 1935. — Vol. 109. — P. 73—74.
  19. *Read S. M., Northcote D. H.* // Analyt. Biochem. — 1981. — Vol. 116. — P. 53—64.
  20. *Walsh P. N.* // Brit. J. Haemat. — 1978. — Vol. 40. — P. 311—331.
  21. *Wijngaards G., Hemker H. C.* // Haemostasis. — 1977. — Vol. 6. — P. 89—97.

Поступила 04.06.87

# PARTIAL PURIFICATION OF TISSUE THROMBOPLASTIN BY MEANS OF GEL FILTRATION AND REPRODUCTION OF THE SYNDROME OF GENERALIZED DECOMPENSATED THROMBINOGENESIS USING THE PREPARATION OBTAINED

*Yu. V. Magerovsky, V. A. Monastirsky, A. V. Gaida, I. I. Birka, M. I. Voronyak*

Institute of Hematology and Blood Transfusion, Lvov

Tissue thromboplastin was purified using various chromatographic resins: Sephadex G-200, Ultragel AcA 34, Acrylex P-300 and Toyopearl HW-55F. The purity of the preparations obtained was evaluated by means of the ratio of the thromboplastin solutions absorbancy at 540 nm and a protein concentration in the solution expressed as mg/ml. The most purified preparations of tissue thromboplastin were obtained after gel filtration on Toyopearl HW-55F. The thromboplastin preparation produced was used for experimental reproduction of the syndrome of generalized decompensated thrombinogenesis.

УДК 612.45+612.351.11+612.173.1].015.1:577.152.344]:612.397.2.015.1

*Н. А. Дорошкевич, К. А. Мандрик, В. В. Виноградов*

## ПАЛЬМИТОИЛ-КОА-ДЕГИДРОГЕНАЗА НАДПОЧЕЧНИКОВ, ПЕЧЕНИ И СЕРДЦА КРОЛИКА

Институт биохимии АН БССР, Гродно; кафедра химии (зав. — проф. С. С. Радченко)  
Гродненского университета

Ацил-КоА дегидрогеназы катализируют первую реакцию  $\beta$ -окисления — дегидрирование КоА производных жирных кислот. Различают 3 фермента, обладающих специфичностью к длине ацильного радикала: бутирил-КоА-дегидрогеназа (КФ 1.3.99.2), октаноил-КоА-дегидрогеназа (КФ 1.3.99.3) и пальмитоил-КоА-дегидрогеназа (КФ 1.3.99.3) [13]. Функционирование всех 3 ферментов в клетке взаимосвязано. При окислении длинноцепочечной жирной кислоты ее дегидрирование в первых циклах  $\beta$ -окисления катализирует пальмитоил-КоА-дегидрогеназа, затем при уменьшении длины углеродной цепи субстрата включается октаноил-

КоА-дегидрогеназа и на последних этапах дегидрирование осуществляет бутирил-КоА-дегидрогеназа. По мнению ряда авторов, пальмитоил-КоА-дегидрогеназа является ферментом, определяющим скорость  $\beta$ -окисления [6, 12].

Ранее было показано [2], что митохондрии надпочечников в отличие от печени и сердца окисляют жирные кислоты с низкой скоростью. Поскольку транспорт жирных кислот в органеллы этих тканей существенно не отличался, было высказано предположение о слабой каталитической активности ферментов  $\beta$ -окисления в адреналовых железах. Цель настоящей работы — экспериментальная проверка этого пред-



положения, что позволит расширить представления об особенностях метаболизма липидов в различных тканях.

## Методика

В опыте использовано 20 кроликов самцов породы шиншилла массой 2,0—2,5 кг. Животных декапитировали, органы быстро извлекали и помещали в охлажденный до 0 °С 0,25 М раствор сахарозы. Часть митохондрий, полученных методом дифференциального центрифугирования [4] из надпочечников, печени и сердца, использовали для определения скорости окисления пальмитоил-КоА. При изучении активности ацил-КоА-дегидрогеназы митохондрии разрушали двукратным замораживанием — оттаиванием в жидком азоте с последующим оттаиванием. Митохондриальные мембраны осаждали центрифугированием при 15 000 g в течение 30 мин.

Активность ацил-КоА-дегидрогеназы определяли в среде инкубации, содержащей 0,05 М калий-фосфатный буфер pH 7,4, 0,5 М феназинметасульфат, 0,1 мМ 2,6-дихлорфенолиндифенол, 60 мкМ пальмитоил-КоА [5]. Использование данного метода для определения активности фермента в надпочечниках связано с определенными трудностями из-за высокого содержания аскорбиновой кислоты, восстанавливающей акценторы электронов. Поэтому полученную гиалоплазму подвергали специальной обработке активированным углем для удаления аскорбиновой кислоты. В пробирку с надсадом вносили активированный уголь из расчета 100 мг на 5 мл, смесь встряхивали в течение 10 мин и центрифугировали 15 мин при 3000 g. В ряде экспериментов ферменты из исследуемых тканей подвергали частичной очистке: центрифугирование 1 ч при 105 000 g, высаливание сульфатом аммония с насыщением от 40 до 70% и обессоливание на колонке с сефадексом G-25.

Скорость окисления пальмитоил-КоА митохондриями надпочечников, печени и сердца кроликов определяли радиометрическим методом. Среда инкубации содержала: 0,25 М сахарозу, 1 мМ ЭДТА, 0,03 М фосфатный буфер pH 7,4, 0,1% альбумин, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,05 мМ малат, 1 мМ АДФ, 0,5 мМ D,L-карнитин, 0,74 мБк 1-<sup>14</sup>C-пальмитоил-КоА (удельная радиоактивность 1,91 МБк/мг), 50 мкМ пальмитоил-КоА и суспензию митохондрий (1 мг митохондриального белка на пробу) [10]. Смесь инкубировали, встряхивая в закрытых сосудах 30 мин при температуре 37 °С. Реакцию останавливали добавлением 0,2 мл 2 н. HCl. Сосуды продолжали встряхивать в течение 1 ч. Выделившуюся углекислоту улавливали на фильтровальную бумагу, смоченную глицерином, образцы переносили во флакон с диоксидным сцинтиллятором и измеряли радиоактивность на счетчике «Magk-II» (США).

Электрофоретическое исследование ацил-КоА-дегидрогеназы проводили в 7,5% ПААГ при pH 8,4. На гель наносили 0,1 мл разрушенных митохондрий, что соответствовало 5 мг ткани. Электрофорез осуществляли на холоду (4 °С) в течение 2 ч при силе тока 2,0 мА на трубку. Ацил-КоА-дегидрогеназы выявляли феназинметасульфат-тетразолиевым методом, используя среду, содержащую

0,5 мМ пальмитоил-КоА, 50 мМ калий-фосфатный буфер pH 7,5, 0,5 мМ феназинметасульфат и 0,4 мМ нитротетразолиевый синий. Гелевые столбики денситометрировали на специально сконструированной приставке к спектрофотометру «Specord UV VIS» (Karl Zeiss Jena, ГДР) при длине волны 560 нм. Из денситограмм количественно рассчитывали активность ферментов (в условных единицах)

по формуле:  $A = \frac{H}{2} \cdot l \cdot 10$ , где  $A$  — активность ферментов,  $H$  — логарифм высоты пика,  $l$  — основание пика [1]. Белок определяли биуретовым методом [3].

## Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены данные по скорости окисления 1-<sup>14</sup>C-пальмитоил-КоА и дегидрирования пальмитоил-КоА в надпочечниках, печени и сердце кролика. Из таблицы видно, что наиболее интенсивно образуется <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> в сердце. В надпочечниках скорость выделения <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> была самая низкая, а печень занимала промежуточное положение. В такой же последовательности распределялась и активность ацил-КоА-дегидрогеназ, рассчитанная по скорости дегидрирования субстрата.

Изучение кинетических параметров частично очищенных ацил-КоА-дегидрогеназ из надпочечников, печени и сердца показало, что зависимость скорости реакции от концентрации субстрата имеет гиперболический характер (рис. 1). Величина K<sub>m</sub>, найденная из графика двойных обратных величин, составляла соответственно 6,58±0,84, 5,26±0,72 и 6,67±1,06 мкМ для фермента из надпочечников, печени и сердца. Это свидетельствует о том, что сродство фермента к субстрату в исследуемых тканях практически одинаково. Необходимо отметить, что K<sub>m</sub>, найденная в наших экспериментах, близка к значениям, полученным другими авто-

Таблица 1

Скорость окисления 1-<sup>14</sup>C-пальмитоил-КоА (в импульсах на 1 мг белка в 1 мин) и активность ацил-КоА-дегидрогеназы (мкмоль на 1 мг ткани в 1 мин) при окислении пальмитоил-КоА в надпочечниках, печени и сердце кролика

Ткань	Образование <sup>14</sup> CO <sub>2</sub>	Активность ацил-КоА-дегидрогеназы
Надпочечники	504±38	1,06±0,12
Печень	868±64	2,04±0,17
Сердце	2291±112	2,50±0,18

Примечание. Здесь и в табл. 2 в каждом случае проведено по 10 экспериментов.



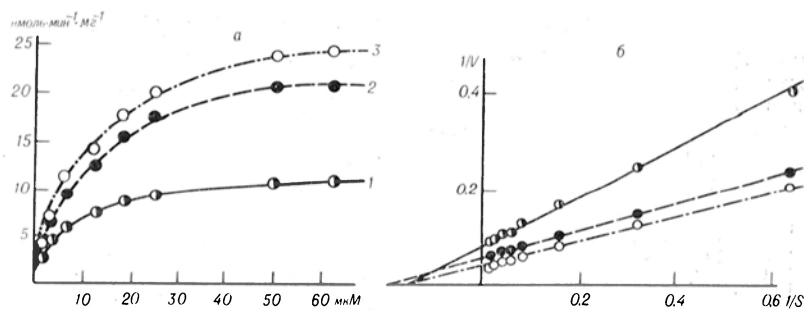


Рис. 1. Зависимость начальной скорости реакции пальмитоил-КоА-дегидрогеназы надпочечников (1), печени (2) и сердца (3) кролика от концентрации пальмитоил-КоА.

а и б — соответственно в прямых и обратных координатах. По оси абсцисс — концентрация субстрата (в мМ); по оси ординат — активность фермента (в нмоль в 1 мин на 1 мг белка).

рами для ацил-КоА-дегидрогеназ из печени крысы [11], печени и сердца быка [7, 8]. Однако активность фермента, рассчитанная на сырую массу ткани (см. табл. 1), существенно различалась в надпочечниках, печени и сердце. Неразличимая максимальная скорость при равной  $K_m$  связана, по-видимому, с различной концентрацией ферментного белка в исследованных тканях. Поскольку для определения кинетических характеристик был взят частично очищенный фермент, то при равном общем белке количество ацил-КоА-дегидрогеназ могло быть различным.

В целях выяснения этого предположения проведен электрофорез в ПААГ равного количества частично очищенного белка митохондрий надпочечников, печени и сердца. После 2-часового электрофореза и окрашивания кумасси синим выявлялась одна зона белков, которая занимала примерно  $1/3$  геля (катодная зона). Нефиксированные гели инкубировали в среде, описанной в методике. Продукты реакции в виде полос, окрашенных в темный цвет, обнаруживались в катодной зоне. Из денситограммы гелей следует, что эти продукты образуют две полосы (рис. 2).

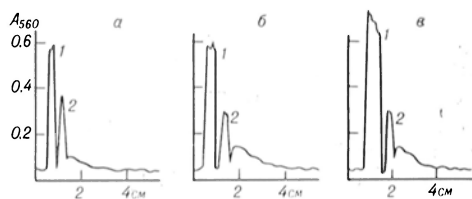


Рис. 2. Денситограммы электрофореграмм ацил-КоА-дегидрогеназ надпочечников (а), печени (б) и сердца (в) кроликов.

Согласно [8], проводивших разделение ацил-КоА-дегидрогеназ с помощью электрофореза в ПААГ, можно точно идентифицировать расположение длинноцепочечных и среднецепочечных дегидрогеназ на полученных электрофореграммах. В соответствии с данными [8], пик 1 на денситограмме соответствует пальмитоил-КоА-дегидрогеназе, а пик 2 — ацил-КоА-дегидрогеназе. Поскольку на каждый гелевый столбик наносили одинаковое количество митохондриального белка, то ширина полосы, окрашенной продуктами реакции, соответствовала массе ферментного белка, а интенсивность окраски зависела от скорости дегидрирования субстрата. Следовательно, площадь пика на денситограмме может служить в какой-то мере показателем активности фермента в исследуемой ткани. В табл. 2 представлены значения активности ацил-КоА-дегидрогеназ, рассчитанные этим методом. Как видно, скорость дегидрирования длинноцепочечной жирной кислоты определяется в основном активностью пальмитоил-КоА-дегидрогеназы и возрастает в ряду надпочечники → печень → сердце. Следует отметить, что ширина белковой полосы, соответствующая пальмитоил-КоА-дегидрогеназе, также была минимальной в надпочечниках.

Результаты, полученные для среднецепочечной ацил-КоА-дегидрогеназы при использовании в качестве субстрата пальмитоил-КоА, не могут служить объективным показателем активности данного фермента в ткани, так как примененный субстрат не является основным. По данным ряда авторов, активность среднецепочечной ацил-

Т а б л и ц а 2

Активность ацил-КоА-дегидрогеназ (в усл. ед.) в надпочечниках, печени и сердце кролика при использовании в качестве субстрата пальмитоил-КоА, рассчитанная по данным денситограмм

Ткань	Активность ферментов		
	пальмитоил-КоА-дегидрогеназа	октапоил-КоА-дегидрогеназа	общая
Надпочечники	30,8±2,2	22,5±1,3	53,3±2,5
Печень	53,1±4,2	29,6±3,2	82,7±5,3
Сердце	74,4±5,1	29,8±3,1	104,2±6,0

КоА-дегидрогеназы при дегидрировании пальмитоил-КоА составляет примерно 15—20 % от активности с октапоил-КоА [7, 9].

Таким образом, определение активности пальмитоил-КоА дегидрогеназы двумя различными методами показало, что низкая каталитическая активность фермента в адреналовых железах, по сравнению с печенью и сердцем, очевидно, отражает его незначительное содержание в митохондриях надпочечников.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградов В. В., Струмило С. А. // Вопр. мед. химии. — 1980. — № 8. — С. 169—174.
2. Мандрик К. А., Дорошкевич Н. А., Виноградов В. В. // Изв. АН БССР. — 1984. — № 6. — С. 112.
3. Плехан М. И. // Химия белка. — М., 1961. — Вып. I. — С. 191—195.

4. Соттоказа Дж. // Биохимическое исследование мембран: Пер. с англ. — М., 1979. — С. 54—74.
5. Bauche F., Sabourault D., Giudicelli J. et al. // Biochem. J. — 1983. — Vol. 215. — P. 457—464.
6. Christophersen B. O., Christiansen R. // Biochim. biophys. Acta. — 1975. — Vol. 388, N 3. — P. 402—412.
7. Davidson B., Schulz H. // Arch. Biochem. — 1982. — Vol. 212, N 1. — P. 155—162.
8. Dommes V., Kunau W. // J. biol. Chem. — 1984. — Vol. 259. — P. 1789—1797.
9. Furuta S., Miyazawa S., Hashimoto T. // J. Biochem. (Tokyo). — 1981. — Vol. 90. — P. 1739—1750.
10. Hashimoto S., Dayton S. // Life Sci. — 1974. — Vol. 14. — P. 945—955.
11. Ikeda J., Dabrowski C., Tanaka K. // J. biol. Chem. — 1983. — Vol. 258. — P. 1066—1076.
12. Kean E. A. // Biochim. biophys. Acta. — 1976. — Vol. 422. — P. 8—14.
13. Thorpe C. // Meth. Enzymol. — 1981. — Vol. 71. — P. 366—374.

Поступила 02.05.87

#### PALMITOYL-CoA DEHYDROGENASE FROM RABBIT ADRENAL GLANDS, LIVER AND HEART TISSUES

N. A. Doroshkevich, K. A. Mandrik, V. V. Vinogradov

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

Partially purified preparations of palmitoyl-CoA dehydrogenase from rabbit adrenal glands, liver and heart tissues exhibited similar kinetic parameters.  $K_m$  value constituted 6.58, 5.26 and 6.67  $\mu M$  for the enzyme from adrenal glands, liver and heart tissues, respectively. At the same time, palmitoyl-CoA dehydrogenase possessed lower catalytic capacity in adrenal glands due to the decreased amount of the enzyme as compared with that of liver or heart tissues.

УДК 616.517-07:616.152.41-02:616.591-007.1

М. С. Гончаренко, А. К. Кондакова, О. М. Бродская

#### СОСТОЯНИЕ КАЛЬЦИЕВОГО ГОМЕОСТАЗА КРОВИ У БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ В ПЕРИОД УСИЛЕННОГО ЭПИДЕРМОПОЭЗА

Харьковский НИИ дерматологии и венерологии

В настоящее время показано, что усиление пассивного транспорта ионов кальция в клетку действует как общий митогенный сигнал [9, 12, 17]. В частности, для раковых клеток установлено, что общим определителем их неограниченной пролиферации является нарушение кальциевого гомеостаза [10].

Известно, что основной мишенью па-

тологического процесса при псориазе является кожа. В сформированной псориазической бляшке на первый план выступают изменения эпидермиса, который пролиферирует в 7 раз быстрее, чем в норме [8]. Считают, что усиление эпидермальной пролиферации при псориазе связано с нарушениями в звеньях регуляторной цепи клеточного деления [6]. Поэто-

му, учитывая вышесказанное и используя псориаз как модель усиленного эпидермопоза, было целесообразно провести изучение состояния кальциевого гомеостаза у больных данным дерматозом и проследить некоторые аспекты его влияния на функциональную активность клетки. В связи с тем что при псориазе нарушения структурно-функционального состояния плазматических мембран носят общий характер [15], изучение кальциевого обмена проводили на модели плазма крови — эритроциты.

### Методика

Обследовано 40 больных распространенным псориазом в стадии обострения без сопутствующих патологий. Контрольную группу составили 36 практически здоровых лиц. Возраст доноров варьировал от 20 до 45 лет. Кровь для исследований брали натощак с 9 до 10 ч утра в идентичных условиях.

Содержание общего кальция в сыворотке крови и эритроцитах определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии на приборе «Сатурн-1» [2]. Уровень ионизированного кальция определяли с помощью кальций-селективных электродов (НПО «Квант», Москва). Концентрацию натрия и калия в эритроцитах определяли методом пламенной фотометрии на пламенном жидкостном анализаторе ПАЖ-1 [5]. Содержание малонового диальдегида (МДА) устанавливали спектрофотометрически по реакции с тиобарбитуровой кислотой [13]. Количество лизофосфатидилхолина в мембранах эритроцитов определяли методом тонкослойной хроматографии [4]. Изучение проницаемости эритроцитарных мембран для ионов  $K^+$  проводили с помощью калий-селективных электродов по методике, описанной ранее [3]. Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента — Фишера на микро-ЭВМ «Электроника БЗ-21».

### Результаты и обсуждение

У больных псориазом в период обострения заболевания (т. е. во время усиленного эпидермопоза) наблюдали достоверно сниженный уровень общего кальция в сыворотке крови на фоне нормальной концентрации ионизированных форм  $Ca^{2+}$  и повышенное содержание данного иона в эритроцитах (см. таблицу). Однако следует учитывать тот факт, что около 60 % общего количества ионов кальция в мембране эритроцитов связано с ее внешней поверхностью, а около 40 % — с внутренней стороной мембраны [1]. Поэтому полученные данные о высоком уровне кальция в эритроцитах могут свидетельствовать либо о

Состояние параметров кальциевого гомеостаза крови в норме и у больных псориазом в период усиленного эпидермопоза ( $M \pm m$ )

Содержание кальция, мМ	Норма	Псориаз	p
Эритроциты	$0,75 \pm 0,04$	$0,97 \pm 0,07$	$<0,001$
Отмытые эритроциты	$0,30 \pm 0,03$	$0,35 \pm 0,02$	$<0,05$
Сыворотка крови:			
общей	$2,82 \pm 0,06$	$2,62 \pm 0,07$	$<0,05$
ионизированной	$0,83 \pm 0,08$	$0,79 \pm 0,04$	

повышенном сродстве внешней плазматической мембраны к ионам  $Ca^{2+}$ , либо о высоком внутриклеточном содержании данного катиона. В связи с этим параллельно изучали эритроциты, полученные сразу после центрифугирования и удаления плазмы, и эритроциты, которые трижды отмывали физиологическим раствором, содержащим 5 мМ ЭГТА, в целях удаления внешнего мембраносвязанного кальция [16]. Оказалось, что и отмытые эритроциты сохраняют повышенный уровень кальция, что свидетельствует о высокой внутриклеточной концентрации данного катиона у больных псориазом (см. таблицу).

Наблюдаемое перераспределение кальция между сывороткой крови и эритроцитами связано, вероятно, с увеличением концентрации натрия в клетке, так как известно, что повышение внутриклеточного уровня натрия приводит к уменьшению скорости выхода кальция и накоплению данного иона в цитоплазме [7]. Нами было показано, что у больных псориазом в период усиленного эпидермопоза индекс соотношения эритроцитарных концентраций  $K^+/Na^+$  значительно снижен: при псориазе —  $20,56 \pm 0,86$ , в норме —  $25,25 \pm 1,52$  ( $p < 0,01$ ). Данный индекс является более надежным критерием, чем абсолютная концентрация катионов [18], и полученные результаты свидетельствуют об увеличении содержания ионов натрия в эритроцитах.

Таким образом, у больных псориазом наблюдается значительное перераспределение ионов кальция между клеткой и средой, которое выражается в накоплении кальция в эритроцитах и снижении содержания этого иона

в сыворотке крови, что может свидетельствовать о нарушении транспорта данного катиона, в частности об усилении пассивного входа кальция в клетку.

Известно, что ионы кальция могут служить стимулирующим фактором для таких важных биохимических процессов, протекающих на уровне мембранных систем клетки, как перекисное окисление липидов (ПОЛ) [14] и действие фосфолипаз [1]. Ионы  $\text{Ca}^{2+}$  способны модулировать проницаемость плазматических мембран эритроцитов, что приводит к внутриклеточным потерям физиологически важных ионов калия [11].

Проведенные нами исследования по изучению особенностей структурно-функционального состояния эритроцитарных мембран у больных псориазом позволили установить ряд факторов, которые свидетельствуют о том, что нарушение кальциевого гомеостаза клетки влечет за собой нарушение ее функциональной активности. Показано, что в период усиленного эпидермопоза в эритроцитах активируются процессы ПОЛ, о чем свидетельствует повышение уровня МДА: в норме —  $7,74 \pm 0,18$  мкмоль на 1 мл эритроцитов, при псориазе —  $10,45 \pm 0,45$  мкмоль на 1 мл эритроцитов ( $p < 0,001$ ). Отмечается также повышение активности фосфолипазы, о чем можно судить косвенным образом по возрастанию уровня лизофосфатидилхолина в эритроцитах, который является основным

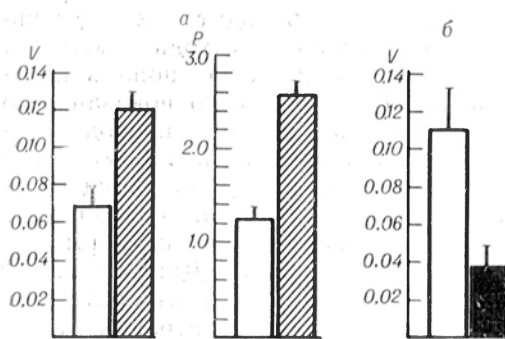
продуктом гидролиза фосфатидилхолина фосфолипазой  $\text{A}_2$ . Если в норме количество лизофосфатидилхолина в эритроцитах составляет  $1,9 \pm 0,2\%$  (от общего количества фосфолипидов), то при псориазе оно повышается до  $2,6 \pm 0,3\%$ .

Вследствие активации вышеуказанных процессов у больных псориазом наблюдаются значительные нарушения функции проницаемости эритроцитарных мембран для ионов  $\text{K}^+$  (см. рисунок): скорость спонтанной утечки калия из эритроцитов превышает соответствующий показатель в норме в 1,7 раза, коэффициент проницаемости — в 1,9 раза. При воздействии на эритроциты *in vitro* ингибитором фосфолипазы  $\text{A}_2$  тетракаином, обладающим кальцийсвязывающей способностью, отмечается снижение скорости спонтанной утечки ионов  $\text{K}^+$  из клетки в 2,7 раза (см. рисунок).

Таким образом, наблюдаемые изменения активности ПОЛ и фосфолипаз, нарушение проницаемости мембран для ионов  $\text{K}^+$ , которые самым непосредственным образом взаимосвязаны с кальциевым гомеостазом клетки, согласуются с тем, что у больных псориазом значительно изменяется перераспределение кальция между клеткой (эритроциты) и внеклеточной средой (сыворотка крови). Накопление кальция в эритроцитах косвенным образом указывает на то, что при псориазе происходит увеличение внутриклеточной концентрации данного иона. Поэтому можно предположить, что ионы кальция, накапливаясь внутри клетки, стимулируют целый ряд процессов, вызывающих нарушение ее функциональной активности и способствующих возникновению неконтролируемой пролиферации. При псориазе этот комплекс нарушений реализуется в клетках эпидермиса. Очевидно, нарушение кальциевого гомеостаза у больных псориазом имеет патогенетическую значимость.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бауман В. К. // Биомембраны: Структура, функции, методы исследования. — Рига, 1977. — С. 198–215.
2. Гадаскина И. Д., Гадаскина Н. Д., Филлов В. А. Определение промышленных неорганических ядов в организме. — Л., 1975. — С. 23–39.
3. Гончаренко М. С. // Структура и функции клеточного ядра. — Харьков, 1980. — С. 40.



Состояние проницаемости эритроцитарных мембран для ионов  $\text{K}^+$  в норме и при псориазе (а) и влияние тетракина на скорость спонтанной утечки  $\text{K}^+$  из эритроцитов доноров больных псориазом (б).

V — скорость выхода ионов  $\text{K}^+$  из эритроцитов, нмоль  $\text{K}^+$  на  $10^6$  эритроцитов в 1 мин. P — коэффициент проницаемости мембраны (п см/с). Светлые столбики — норма, заштрихованные — псориаз (период обострения), темные — после воздействия тетракина.

4. Кейтс М. Техника липидологии: Пер. с англ. — М., 1975.
5. Колб В. Г., Камышников В. С. Клиническая биохимия. — Минск, 1981.
6. Копьева Т. Н., Владимиров В. В. // Арх. пат. — 1983. — № 3. — С. 89—94.
7. Орлов С. П. // Успехи совр. биол. — 1981. — Т. 92, № 1. — С. 19—34.
8. Псориаз / Под ред. С. И. Довжанского. — Саратов, 1976.
9. Culbertson K. S., Whittingham D. G., Cobbold P. H. // Nature. — 1981. — Vol. 294. — P. 754—757.
10. Durham A. C. H., Walton J. M. // Biosci. Rep. — 1982. — Vol. 2, N 1. — P. 15—30.
11. Gardos G. // Acta physiol. hung. — 1959. — Vol. 15. — P. 121—125.
12. Hamaguchi P., Hiromoto Y. // Exp. Cell. Res. — 1981. — Vol. 134. — P. 171—179.
13. Ishihara M. // Clin. chim. Acta. — 1978. — Vol. 84, N 1. — P. 1—9.
14. Jain S. K., Shoshet S. B. // Biochim. biophys. Acta. — 1981. — Vol. 642, N 1. — P. 46—54.
15. Kumar R., Wiess D. P., Chuero L. A. // Brit. J. Derm. — 1983. — Vol. 109, N 37. — P. 267—275.
16. Palek J., Church A., Fairbanks G. // Мембраны и болезнь: Пер. с англ. — М., 1980. — С. 56—76.
17. Ridway E. B., Gilkey J. C., Jaffe L. F. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1977. — Vol. 74. — P. 623—627.
18. Sen A. K., Murthy R., Stancer H. C. et al. // Мембраны и болезнь: Пер. с англ. — М., 1980. — С. 119—133.

Поступила 04.06.87

## THE STATE OF CALCIUM HOMEOSTASIS IN BLOOD CELLS OF PATIENTS WITH PSORIASIS UNDER CONDITIONS OF INTENSIVE EPIDERMOPHOIESIS

M. S. Goncharenko, A. K. Kondakova,  
O. M. Brodskaya

Institute of Dermatology and Venerology,  
Kharkov

As a model of generalized impairments of the membrane structure in patients with psoriasis, an "erythrocyte-blood plasma" system was used for studies of calcium homeostasis. Distinct accumulation of  $Ca^{2+}$  in erythrocytes and reduction of  $Ca^{2+}$  content in blood plasma were observed in patients with psoriasis, thus demonstrating its redistribution between cells and medium. This  $Ca^{2+}$  transfer occurred due to an increase of  $Na^{+}$  concentration in the cells, which caused a decrease in the rate of  $Ca^{2+}$  excretion and led to elevation of the ion content in cytoplasmic fraction. The elevated intracellular concentration of  $Ca^{2+}$  in patients with psoriasis contributed to activation of lipid peroxidation as well as to selective increase in permeability of erythrocyte membranes for  $K^{+}$ . The data obtained suggest that a number of alterations in homeostasis of calcium may be considered among the factors responsible for activation of cellular proliferation in the patients with psoriasis.

УДК 616.391-008.64:577.164.111-07:[615.1/2+615.9].033/034

А. П. Лычко, А. А. Пентюк, Н. Б. Луцюк

## МЕТАБОЛИЗМ И ТОКСИЧНОСТЬ НЕКОТОРЫХ КСЕНОБИОТИКОВ ПРИ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ВИТАМИНА В<sub>1</sub> И ВВЕДЕНИИ ТИАМИНА И ТИАМИНДИФОСФАТА

Кафедра биологической химии Винницкого медицинского института им. Н. И. Пирогова

Активность и продолжительность действия многих лекарственных ксенобиотиков связаны с их биотрансформацией в организме, в частности, с обезвреживанием или превращением в активные метаболиты [3]. Пищевые факторы, в том числе витамины, играют важную роль в метаболизме ксенобиотиков [6].

Дефицит витамина В<sub>1</sub> приводит к повышению активности ряда ферментов метаболизма ксенобиотиков [15]. Избыток тиамина оказывает противоположное действие. Аналогичные данные получены нами [4]. Однако не ясно, насколько изменения активности этих ферментов существенны для ме-

таболизма и проявления биологического действия ксенобиотиков.

В связи с этим представляло интерес изучить метаболизм аминопирина, бензоата натрия и токсичность циклофосфамида при различной обеспеченности организма витаминами В<sub>1</sub>.

### Методика

Опыты проведены на 185 крысах-самцах популяции Вистар массой 140—250 г. Животных кормили в течение 30 дней полусинтетическим рационом [9], сбалансированным по всем нутриентам (контроль). Для получения недостаточности витамина В<sub>1</sub> из состава диеты исключали тиамин. Части животных подкожно вводили в течение 10 дней тиамин-

Влияние недостаточности витамина В<sub>1</sub> и введения тиамин и ТДФ на экскрецию метаболитов аминопирина

Характеристика групп	Экскреция, ч	Метаболиты (в мкмоль на 100 г массы тела; $M \pm m$ )		
		свободный 4-аминоантипирин	ацетилированный 4-аминоантипирин	общий 4-аминоантипирин
Контроль ( $n=8$ )	6	$0,47 \pm 0,037$	$0,81 \pm 0,107$	$1,27 \pm 0,107$
	12	$0,61 \pm 0,052$	$1,20 \pm 0,131$	$1,78 \pm 0,118$
	24	$0,71 \pm 0,065$	$1,37 \pm 0,162$	$1,98 \pm 0,133$
Недостаточность витамина В <sub>1</sub> ( $n=8$ )	6	$1,02 \pm 0,049^*$	$2,36 \pm 0,148^*$	$3,39 \pm 0,136^*$
	12	$1,44 \pm 0,065^*$	$3,36 \pm 0,208^*$	$4,80 \pm 0,147^*$
	24	$1,59 \pm 0,070^*$	$3,57 \pm 0,228^*$	$5,16 \pm 0,164^*$
Контроль ( $n=8$ )	6	$0,35 \pm 0,021$	$1,40 \pm 0,190$	$1,75 \pm 0,204$
	12	$0,50 \pm 0,030$	$2,00 \pm 0,190$	$2,50 \pm 0,209$
	24	$0,64 \pm 0,039$	$2,12 \pm 0,209$	$2,76 \pm 0,237$
Введение тиамин ( $n=8$ )	6	$0,34 \pm 0,014$	$1,35 \pm 0,182$	$1,69 \pm 0,187$
	12	$0,55 \pm 0,030$	$2,06 \pm 0,127$	$2,61 \pm 0,256$
	24	$0,69 \pm 0,030$	$2,19 \pm 0,241$	$2,88 \pm 0,253$
Контроль ( $n=6$ )	6	$0,24 \pm 0,011$	$1,15 \pm 0,090$	$1,39 \pm 0,097$
	12	$0,35 \pm 0,014$	$2,18 \pm 0,122$	$2,53 \pm 0,122$
	24	$0,45 \pm 0,018$	$2,25 \pm 0,133$	$2,70 \pm 0,134$
Введение ТДФ ( $n=7$ )	6	$0,20 \pm 0,017$	$0,97 \pm 0,059$	$1,17 \pm 0,068$
	12	$0,31 \pm 0,020$	$1,76 \pm 0,113$	$2,07 \pm 0,121^*$
	24	$0,39 \pm 0,020^*$	$1,83 \pm 0,119^*$	$2,22 \pm 0,128^*$

\* Здесь и в табл. 2 — достоверные различия ( $p < 0,05$ ) по отношению к соответствующему контролю.

бромид (6 мг/кг) или тиаминдифосфат (ТДФ, 10 мг/кг).

Содержание тиамин в печени контрольных и В<sub>1</sub>-дефицитных животных равнялось соответственно  $9,04 \pm 0,33$  и  $2,16 \pm 0,17$  мкг тиамин на 1 г сырой массы печени, активность транскетолазы крови —  $28,9 \pm 1,24$  и  $17,6 \pm 0,80$  мкмоль седогептулуро-7-фосфата на 1 мл эритроцитов в 1 ч.

Для исследования биотрансформации ксенобиотиков крысам внутрибрюшинно вводили 12,8 мкмоль аминопирина (30 мг/кг) и собирали мочу через 6, 12 и 24 ч после его введения. В моче определяли содержание метаболитов аминопирина, как описано [8]. Бензоат натрия вводили внутрибрюшинно из расчета 164 мкмоль на 100 г массы (200 мг/кг). Содержание гиппуровой кислоты и глюкуроноидов определяли по [11, 13]. Активность N-деметилирования диметиланилина и паргидроксилирования анилина в микросомах печени определяли в соответствии с рекомендациями [2]. Токсичность циклофосаида оценивали по выживаемости и продолжительности жизни крыс после внутрибрюшинного введения препарата в дозе, близкой к ДЛ<sub>50</sub>, — 230 мг/кг. Учет гибели животных проводили в течение 9 дней. Определена также ДЛ<sub>50</sub> циклофосаида для тиаминдефицитных крыс. Данные обработаны по методу Литчфилда — Уилкоксона [1].

## Результаты и обсуждение

Основным путем метаболизма аминопирина является его деметилирование цитохром-Р<sub>450</sub>-зависимыми монооксигеназами до 4-аминоантипирин, который в дальнейшем подвергается

ацетилированию [16]. Дефицит витамина В<sub>1</sub> увеличивает экскрецию 4-аминоантипирин, особенно его ацетилированной формы (табл. 1). Это согласуется с полученными нами данными [4] об активации микросомальных монооксигеназ у тиаминдефицитных животных. Активность N-деметилирования диметиланилина при дефиците тиамин составляет  $5,31 \pm \pm 0,29$  нмоль/мин на 1 мг белка против  $3,91 \pm 0,22$  нмоль/мин в контроле, а активность гидроксилирования анилина —  $0,66 \pm 0,25$  против  $0,47 \pm 0,013$  ( $p < 0,05$ ). Введение тиамин вызывает подавление активности гидроксилирования анилина с  $0,49 \pm \pm 0,013$  нмоль/мин на 1 мг белка в контроле до  $0,31 \pm 0,027$  нмоль/мин в опыте ( $p < 0,05$ ). Как видно из табл. 1, введение тиамин существенно не изменяет метаболизм аминопирина, а ТДФ вызывает подавление его биотрансформации.

Для исследования механизма действия тиамин и ТДФ нами проведены опыты in vitro. Добавление тиамин или ТДФ в инкубационную среду вызывает дозозависимое подавление N-деметилирования диметиланилина, причем ТДФ оказался более эффективным ингибитором по сравнению с тиамин. Он подавляет деметилиро-



Влияние недостаточности витамина В<sub>1</sub> и введения тиамин и ТДФ на экскрецию метаболитов бензойной кислоты

Характеристика групп	Экскреция, ч	Метаболиты (в мкмольях на 100 г массы тела; $M \pm m$ )			
		гиппуровая кислота		глюкурониды	
		фоновая экскреция	после введения бензоата натрия	фоновая экскреция	после введения бензоата натрия
Контроль ( $n=8$ )	6	5,86±0,49	128,4±5,5	5,66±0,48	55,5±2,9
	12	7,16±0,58	133,5±6,1	11,9±0,91	63,8±3,2
Недостаточность витамина В <sub>1</sub> ( $n=7$ )	6	4,32±0,61	84,8±6,4*	3,55±0,49	96,4±11,4*
	12	6,70±0,44	89,3±6,7*	10,2±1,08	111,8±13,4*
Контроль ( $n=6$ )	6	—	107,8±4,6	—	39,6±4,6
	12	4,6±0,6	113,2±4,9	12,6±0,76	49,3±1,6
Введение тиамин ( $n=6$ )	6	—	143,6±4,8*	—	34,4±2,1
	12	5,6±1,1	160,0±4,2*	16,6±2,8	47,2±2,4
Введение ТДФ ( $n=6$ )	6	—	140,2±2,3*	—	30,7±1,0
	12	5,9±0,8	155,8±2,1*	18,5±1,61*	42,2±1,4*

П р и м е ч а н и е. Знак — обозначает, что исследования не проводились.

вание в концентрации 1,5 мМ, сопоставимой с таковой в тканях.

Известно, что большая часть бензойной кислоты обезвреживается с образованием гиппуровой кислоты, меньшая — выводится из организма в виде глюкуронидов [14]. Поскольку бензойная кислота и глюкурониды в организме могут образовываться из эндогенных субстратов, нами исследовано их фоновое выведение (табл. 2). При недостаточности витамина В<sub>1</sub> значительно замедляется превращение бензойной кислоты в гиппуровую, а образование глюкуронидов, напротив, усиливается. Введение тиамин или ТДФ стимулирует конъюгацию бензойной кислоты, но угнетает образование глюкуронидов.

Активность процессов глюкуронирования бензойной кислоты, направленность биотрансформации аминопирина, активность N-деметилирования диметиланилина и парагидроксилирования анилина изменяются сходным образом. Такое сходство можно объяснить одинаковой субклеточной локализацией цитохром-Р<sub>450</sub>-зависимых ферментов и УДФ-глюкуронилтрансферазы. Эти ферменты сосредоточены в мембранах эндоплазматического ретикула, где цитохром-Р<sub>450</sub>-зависимые ферменты обеспечивают 1-ю фазу метаболизма ксенобиотиков, а УДФ-глюкуронилтрансфераза — 2-ю фазу. По-видимому, для тиамин и ТДФ характерно однотипное (угнетающее) действие на многие ферменты мембран эндоплазматического ретикула.

Угнетение конъюгации бензойной кислоты с глицином при дефиците тиамин можно объяснить тем, что этот процесс требует расхода 2 молекул АТФ [12], а при дефиците витамина В<sub>1</sub> снижается активность тиаминозависимых пируват- и α-кетоглутаратдегидрогеназ, которым принадлежит существенная роль в синтезе АТФ [7]. Усиление синтеза гиппуровой кислоты под влиянием тиамин и ТДФ происходит, вероятно, за счет активации этих дегидрогеназ.

Учитывая вышеприведенные данные, логично было предположить, что витамин В<sub>1</sub> способен изменять токсичность тех соединений, которые при метаболизме дают реактивные интермедиаты. К таким веществам, в частности, относится циклофосфамид, метаболизм которого приводит к образованию азотистого иприта фосфамидной кислоты и акролеина, цитотоксическое действие которых на 2—3 порядка выше, чем у исходного вещества [10].

Оказалось, что дефицит витамина В<sub>1</sub> ведет к усилению токсичности циклофосфамида. Так, ДЛ<sub>50</sub> у тиаминдефицитных крыс составляет 85 (65,3—110,5) мг/кг против 152 (133—173) мг/кг у контрольных животных. Предварительное введение крысам тиамин и особенно ТДФ ослабляет токсичность циклофосфамида, что проявляется в увеличении продолжительности их жизни с 3,3±0,74 дня (контроль) до 4,83±0,74 дня после введения тиамин ( $p>0,05$ ), однако на 5-й и 6-й дни опыта количество выжив-

ших животных было достоверно выше контроля ( $7,00 \pm 0,74$  дня при введении ТДФ;  $p < 0,05$ ). Защитное действие ТДФ при введении алкилирующих цитостатических препаратов было выявлено ранее [5].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бельский М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. — Л., 1963.
2. Карузина И. И., Арчаков В. И. // Современные методы в биохимии. — М., 1977. — С. 43—62.
3. Лакин К. М., Крылов Ю. Ф. Биотрансформация лекарственных веществ. — М., 1981.
4. Луцок Н. Б., Пентюк А. А., Лычко А. П. и др. // Биохимия, фармакология и медицинское применение производных витаминов и других предшественников коферментов. — Иркутск, 1983. — С. 78—79.
5. Малаховский А. И. // Всесоюзный симпозиум по тиамину: Материалы. — Минск, 1966. — С. 420—421.
6. Нестерин М. Ф., Коньшев В. А. // Фармакол. и токсикол. — 1980. — № 2. — С. 238—242.
7. Островский Ю. М. // Экспериментальная витаминология. — Минск, 1979. — С. 176—223.
8. Попов Т. А., Лесненко О. Б. // Гиг. и сан. — 1977. — № 9. — С. 23—24.
9. Спиричев В. В., Блажевич И. В., Исаева В. А. и др. // Вопр. питания. — 1978. — № 6. — С. 6—11.
10. Bales D. I., Foster A. B., Jarman M. // Biochem. Pharmacol. — 1981. — Vol. 30, N 22. — P. 3055—3066.
11. Dische E. // J. biol. Chem. — 1950. — Vol. 183, N 2. — P. 489—495.
12. Galley S. J., Sherratt S. A. // Biochem. J. — 1977. — Vol. 166, N 1. — P. 39—47.

13. Ogata M., Shimada Y., Kamiya H. et al. // Industr. Hlth. — 1981. — Vol. 19, N 3. — P. 155—161.
14. Thabrew M. I., Olorunsoge O. O., Olowookere I. O., Babahunmi E. A. // Xenobiotica. — 1982. — Vol. 12, N 12. — P. 849—853.
15. Wade A. E., Evans I. L., Seitz A. // Pharmacology. — 1976. — Vol. 14, N 2. — P. 104—114.
16. Vels M., Kellner H. M. // Brit. J. clin. Pharmacol. — 1980. — Vol. 10, Suppl. 2. — P. 299—307.

Поступила 04.06.87

#### METABOLISM AND TOXICITY OF SOME XENOBIOTICS IN DEFICIENCY OF VITAMIN B<sub>1</sub> AND AFTER ADMINISTRATION OF THIAMIN AND THIAMIN DIPHOSPHATE

A. P. Lychko, A. A. Pentyuk, N. B. Lutsyuk  
Chair of Biochemistry, Medical School, Vinnitsa

Metabolism of aminopyrine, sodium benzoate and toxicity of cyclophosphamide were studied in 185 male rats under conditions of various content of vitamin B<sub>1</sub> in the animals. Deficiency of thiamin led to an increase in excretion of 4-aminoantipyrine and especially of its acetylated derivative. After administration of thiamin metabolism of aminopyrine was not distinctly altered, while thiamin diphosphate inhibited the drug biotransformation. In deficiency of vitamin B<sub>1</sub> transformation of benzoic acid into hippuric acid was inhibited but formation of glucuronides was elevated. Administration of thiamin or thiamin diphosphate stimulated the benzoic acid conjugation and inhibited the glucuronides formation. Deficiency of vitamin B<sub>1</sub> accelerated the cyclophosphamide toxicity. Preadministration of thiamin and especially of thiamin diphosphate decreased the toxic effect of cyclophosphamide.

УДК 616.748.53-008.931:577.152.633+616.748.53-008.93:577.123.3]-053.9-02:616.833-089.85-092.9

В. В. Фролькис, О. К. Кульчицкий, А. В. Ясечко

#### КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ, АКТИВНОСТЬ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ И МЕМБРАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ВОЛОКОН ИКРОНОЖНОЙ МЫШЦЫ ВЗРОСЛЫХ И СТАРЫХ КРЫС ПРИ ДЕНЕРВАЦИИ

Лаборатория физиологии НИИ геронтологии АМН СССР, Киев

Изучение постденервационных изменений имеет существенное значение для понимания механизмов развития ряда неврологических синдромов. В этой связи особый интерес представляет система циклических нуклеотидов, которая рассматривается как универсальное промежуточное звено в реализации всех факторов нейротрофического контроля [4, 7]. Имеются данные, что при старении изменяется

нервная регуляция трофики поперечнополосатой мышечной ткани [3, 9]. Установлено также, что денервация, особенно в поздние сроки, приводит к росту базальной активности аденилатциклазы (АЦ) и фосфодиэстеразы [13]. Вместе с тем в литературе отсутствуют данные о возрастных особенностях влияния денервации на систему циклических нуклеотидов в скелетных мышцах.

Задачей настоящей работы являлось изучение постденервационных изменений концентрации цАМФ и цГМФ, базальной, адреналин- и фторидстимулируемой активностей АЦ и величины мембранного потенциала в волокнах икроножной мышцы у взрослых и старых крыс.

### Методика

Опыты проведены на белых беспородных крысах двух возрастных групп: 6—8 мес — взрослые и 25—28 мес — старые. Объектом исследования служила икроножная мышца. Животных наркотизировали внутривенным введением этиминала натрия (40—50 мг/кг массы). Денервацию вызывали, удаляя участок седалищного нерва длиной 5—6 мм в области верхней трети бедра.

Для определения концентрации циклических нуклеотидов навеску замороженной в жидком азоте ткани гомогенизировали в 6% трихлоруксусной кислоты при соотношении 1/10 (масса/объем). Денатурированный белок осаждали центрифугированием. Надосадочную жидкость нейтрализовали трехкратным промыванием водонасыщенным эфиром. Пробы упаривали досуха в вакууме при температуре 60—70 °C. Сухой остаток растворяли непосредственно перед определением в буфере для определения цАМФ и цГМФ. Определение концентрации циклических нуклеотидов проводили радиоконкурентным методом с помощью специальных наборов (Amersham, Англия).

При определении активности АЦ навеску измельченной мышечной ткани гомогенизировали в буфере следующего состава: трис- $\text{HCl}$  — 50 мМ,  $\text{MgCl}_2$  — 1 мМ, ЭДТА — 1 мМ (рН 7,5). Соотношение масса/объем составляло 1/10. Активность АЦ определяли в среде инкубации, состоящей из трис- $\text{HCl}$  — 50 мМ, ЭДТА — 1 мМ, дитиотреитола — 1 мМ, теофиллина — 5 мМ,  $\text{KCl}$  — 10 мМ,  $\text{MgCl}_2$  — 5 мМ, АТФ — 1 мМ, креатинфосфата — 20 мМ, креатинфосфокиназы — 1 мг/мл (рН 7,5). Реакцию инициировали добавлением приблизительно 100 мкг белка гомогената и проводили в течение 15 мин. Останавливали реакцию нагреванием в кипящей водяной бане. Денатурированный белок удаляли центрифугированием. Об активности АЦ судили по приросту цАМФ, содержание которого определяли, как указано выше. Для определения стимулируемой активности АЦ адреналин (50 мкМ) и фтористый натрий (10 мМ) добавляли в среду инкубации. Белок определяли модифицированным методом Лоури [12].

Измерение мембранного потенциала покоя (МП) проводили по общепринятой методике [2] в условиях *in vivo*. При этом на поверхность мышцы апплицировали раствор Кребса — Рингера следующего состава:  $\text{NaCl}$  — 135 мМ,  $\text{NaHCO}_3$  — 15,0 мМ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  — 1,0 мМ,  $\text{KCl}$  — 5,0 мМ,  $\text{MgCl}_2$  — 1,0 мМ,  $\text{CaCl}_2$  — 2,0 мМ, глюкоза — 11 мМ (рН 7,4).

При обработке экспериментальных данных использован *t*-критерий Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

Представленные в таблице данные показывают, что денервация вызывает изменения величины изучаемых показателей. Так, у взрослых и старых крыс через 30 мин после денервации отмечается рост содержания цАМФ. Такая же закономерность, но в еще большей степени имеется через 2 нед, при этом прирост цАМФ у старых животных достоверно выше, чем у взрослых. Выявленные возрастные особенности свидетельствуют о некотором усилении в старости влияния денервации на концентрацию цАМФ. Содержание цГМФ в икроножной мышце контрольных взрослых и старых крыс равняется  $29 \pm 3$  и  $31 \pm 2$  пмоль/г ткани соответственно. После денервации величина этого показателя не изменяется.

Несколько иные закономерности наблюдаются при изучении активности АЦ. Через 30 мин базальная активность фермента не изменяется, а адреналинстимулируемая достоверно снижается как у взрослых, так и у старых животных. В этот же срок у старых крыс падает фторидстимулируемая активность АЦ. Через 2 нед у животных обеих возрастных групп отмечается значительный рост базальной и стимулируемой активности АЦ. Таким образом, постденервационные изменения стимулируемой активности АЦ носят двухфазный характер — снижение через 30 мин и рост через 2 нед. Повышение концентрации цАМФ в ранние и отдаленные сроки после денервации, по-видимому, определяется различными механизмами. Можно предположить, что в ранние сроки (через 30 мин) наряду с подавлением адреналинстимулируемой активности АЦ в еще большей степени снижается активность фосфодиэстеразы. В отдаленные сроки (через 2 нед), согласно данным литературы [13], денервация вызывает в скелетных мышцах повышение активностей АЦ и фосфодиэстеразы, причем прирост активности первого фермента выражен в большей степени, чем второго.

Изменения величины МП имеют прямо противоположную направленность — вначале рост (30 мин), а затем снижение (2 нед). Подобная разнонаправленность постденерваци-

**Влияние денервации на концентрацию цАМФ, активность аденилатциклазы и величину мембранного потенциала в волокнах икроножной мышцы у взрослых и старых крыс**

Группа животных	Возраст животных	МП, мВ	цАМФ, пмоль/г ткани	Активность аденилатциклазы, пмоль цАМФ/(мин·мг белка)		
				базальная	адреналинстимулируемая	фторидстимулируемая
Контроль	Взрослые	80,9±0,4 (6)	340±29 (11)	5,7±0,4 (11)	11,4±0,6 (11)	17,2±1,4 (11)
	Старые	78,9±0,4 (5)	370±33 (10)	5,6±0,3 (10)	14,2±0,7 (10)	19,2±1,6 (10)
<i>p</i>		<0,05	>0,05	>0,05	<0,05	>0,05
Сдвиг по отношению к контролю после денервации						
Через 30 мин	Взрослые	4,1±1,1* (6)	120±47* (8)	-0,1±0,6 (8)	-2,5±0,8* (8)	-3,1±1,8 (8)
	Старые	2,2±0,6* (5)	250±57* (8)	-0,2±0,5 (8)	-4,0±0,9* (8)	-5,7±1,9* (8)
	<i>p</i>	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Через 2 нед	Взрослые	-15,0±1,1* (5)	276±54* (8)	3,7±0,7* (8)	5,1±1,3* (8)	12,2±2,3* (8)
	Старые	-11,8±0,8* (5)	707±99* (8)	4,1±0,8* (8)	9,1±1,9* (8)	14,5±3,1* (8)
	<i>p</i>	<0,05	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Примечание. Контрольные величины даны в виде  $M \pm m$ ; сдвиги этих величин после денервации — в виде  $(\bar{X}_0 - \bar{X}_K) \pm \sqrt{m_0^2 + m_K^2}$ ; в скобках — число обследованных мышц; *p* — достоверность различий между взрослыми и старыми животными; звездочка — постденервационный сдвиг достоверен ( $p < 0,05$ ).

онных сдвигов позволяет предположить наличие взаимосвязи между уровнем поляризации плазматической мембраны и активностью АЦ. Известно, что активация АЦ приводит к ингибированию транспортной АТФазы и развитию деполяризации [1]. Следовательно, снижение адреналинстимулируемой активности фермента через 30 мин после денервации может являться фактором, способствующим росту МП. Значительное повышение активности АЦ через 2 нед вследствие указанного выше механизма будет способствовать снижению величины МП. С другой стороны, гиперполяризация, отмеченная в ранние постденервационные сроки, обуславливает накопление внутриклеточного кальция, что может приводить к ингибированию АЦ. Вероятно, временные различия в интенсификации этих процессов и обуславливают выявленную разнонаправленность сдвигов.

Повышение базальной, адреналин- и фторидстимулируемой активности АЦ может являться одной из причин развития гиперчувствительности денервированных структур. Показано,

что в условиях денервации постсинаптическая гиперчувствительность сопряжена с ростом числа адреноресцентов [11] и увеличением базальной и стимулиндуцируемой активности АЦ [8]. В этой связи необходимо отметить, что особенно резкий рост уровня цАМФ (на 190 %), наблюдаемый у старых животных через 2 нед после денервации, может играть определенную роль в повышении чувствительности некоторых клеток к действию гуморальных факторов при старении. Наряду с этим рост концентрации цАМФ и чувствительности АЦ к адреналину может препятствовать реализации холинергических влияний на уровень цГМФ [10].

Таким образом, полученные данные позволяют предполагать, что существует определенная связь между изменениями МП и активностью АЦ. Известно, что уровень поляризации плазматической мембраны оказывает влияние на процессы биосинтеза белка и активность ряда ферментов [5, 6]. Можно предположить, что одним из механизмов этого влияния являются изменения в системе цАМФ — АЦ.

Описанные различия сдвигов величины МП и активности АП после денервации, очевидно, необходимо учитывать при разработке мер коррекции постденервационных нарушений.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Дорофеев Г. И., Кожемякин Л. А., Ивашкин В. Т. Циклические нуклеотиды и адаптация организма. — Л., 1978.
2. Костюк П. Г. Микроэлектродная техника. — Киев, 1960.
3. Никитин В. Н., Голубицкая Р. И., Силин О. П. и др. // Труды Харьк. ун-та. — 1956. — Т. 24. — С. 79—100.
4. Улумбеков Э. Г., Резвяков Н. П. // Нервный контроль структурно-функциональной организации скелетных мышц. — Л., 1980. — С. 84—104.
5. Фролькис В. В. Старение: Нейрогуморальные механизмы. — Киев, 1981.
6. Фролькис В. В., Парамонова Г. И. // Докл. АН УССР. Сер. Б. — 1980. — № 3. — С. 77—80.
7. Carlsen R. C. // J. Physiol. (Lond.). — 1975. — Vol. 247. — P. 343—361.
8. Chiu T. // Europ. J. Pharmacol. — 1978. — Vol. 52. — P. 385—388.
9. Gutmann E., Hanslikova V. // Gerontology. — 1976. — Vol. 22, N 4. — P. 280—300.
10. Kuo J. E., Kuo W. N. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1973. — Vol. 55. — P. 660—665.

11. Lefkowitz R. J. // Nature. — 1978. — Vol. 273. — P. 240.
12. Markwell M. A., Haas S. M., Reiber L. L., Tolbert N. E. // Analyt. Biochem. — 1978. — Vol. 87. — P. 206—210.
13. Pacifici G. M., Pellerino C., Maffei C., Beconcini D. // Ital. J. Biochem. — 1981. — Vol. 30. — P. 20—29.

Поступила 04.06.87

#### EFFECT OF DENERVATION ON CYCLIC NUCLEOTIDE CONCENTRATIONS, ON ADENYLATE CYCLASE ACTIVITY AND ON RESTING MEMBRANE POTENTIAL IN GASTROCNEMIUS MUSCLE FIBERS OF ADULT AND OLD RATS

V. V. Frolkis, O. K. Kulchitsky, A. V. Yasechko  
Institute of Gerontology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Kiev

The denervation-induced changes of cyclic nucleotide concentrations adenylate cyclase activity and resting membrane potential were studied in gastrocnemius muscle of adult and old rats. Under conditions of denervation alterations in resting membrane potential and in adrenaline-stimulated adenylate cyclase activity had a biphasic character in the muscle studied: resting membrane potential was increased and the adenylate cyclase activity was decreased following 30 min denervation, while the opposite effect was observed after 2 weeks denervation. The denervation did not alter cGMP concentration. In old animals more pronounced changes of cAMP level were found in denervated gastrocnemius muscle.

УДК 616.12-005.4-07:616.153.915-008.61-02:616.153.1:577.152.311

М. Г. Творогова, И. Н. Озерова, А. С. Нечаев, Н. Н. Жолус,  
Н. В. Перова

#### АКТИВНОСТЬ ОСНОВНЫХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ ОБМЕНА ЛИПОПРОТЕИДОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА

Институт профилактической кардиологии ВКНЦ АМН СССР, Москва

Гиперлипидемии и гипоальфахолестеринемии являются факторами риска развития ишемической болезни сердца (ИБС) и атеросклероза. Однако показано, что выраженные изменения уровня липидов плазмы крови имеют около  $\frac{2}{3}$  больных ИБС [3]. Поскольку причиной развития атерогенных нарушений спектра липопротеидов (ЛП) плазмы крови являются нарушения их метаболизма [7, 10], представляет интерес уровень активности основных ферментных систем трансформации ЛП в плазме крови у больных ИБС. Основными процессами трансформации ЛП в плазме крови

являются липопротеидлиполиз частиц, богатых триглицеридами (ТГ), и эстерификация холестерина (ХС) липопротеидов высокой плотности (ЛПВП), которые катализируются соответственно липопротеидлипазой (ЛПЛ, КФ 3.1.1.3) и лецитинхолестеринацилтрансферазой (ЛХАТ, КФ 2.3.1.43).

Задача настоящей работы — определить активность основных ферментных систем трансформации ЛП в плазме крови у больных ИБС и сопоставить полученные данные с липидным спектром плазмы крови.

**Активность ферментных систем трансформации ЛП и липидно-белковые показатели плазмы крови больных ИБС ( $M \pm m$ )**

Группа обследуемых	Эстерификация холестерина, %		ПГЛА, ммоль/мл/мин	Холестерин, мг/дл	Триглицериды, мг/дл	Холестерин, ЛПВП, мг/дл	Холестерин, ЛПНП, мг/дл	Апопротеин А-1, мг/дл
	ХЭСП	ЛХАТ						
1-я (12)	$6,6 \pm 0,22$	$1,2 \pm 0,05$	$14,2 \pm 2,75$	$224 \pm 14$	$230 \pm 29$	$39 \pm 3$	$135 \pm 16$	$126 \pm 5$
2-я (16)	$4,7 \pm 0,18$	$0,7 \pm 0,03$	$25,5 \pm 4,12$	$252 \pm 13$	$194 \pm 19$	$40 \pm 4$	$169 \pm 13$	$130 \pm 8$
3-я (11)	$5,4 \pm 0,31$	$0,9 \pm 0,08$	$27,5 \pm 4,46$	$202 \pm 11$	$134 \pm 24$	$37 \pm 2$	$139 \pm 10$	$120 \pm 8$
$p_{1-2}$	$<0,01$	$<0,01$	$<0,05$	—	—	—	—	—
$p_{1-3}$	$<0,01$	$<0,05$	$<0,05$	—	$<0,05$	—	$<0,05$	—
$p_{2-3}$	$<0,05$	$<0,05$	—	$<0,05$	$0,05 < p < 0,1$	—	$0,05 < p < 0,1$	—

Примечание. В скобках — число больных.

### Методика

Исследования проводили у 39 мужчин 40—59 лет, больных ИБС (коронарный атеросклероз документирован ангиографически), прошедших обследование в клиническом отделении № 1 Института профилактической кардиологии ВКНЦ АМН СССР.

Активность ферментов устанавливали радиометрическими методами. Общую постгепариновую липопротеидлипазную активность (ПГЛА) — суммарную активность ЛПЛ в печени и триглицеридлипазы печени, одновременное освобождение которых происходит после введения гепарина, определяли в крови обследуемых через 15 мин после введения 1000 ЕД гепарина [4]. Эстерификацию ХС характеризовали по холестеринэстерифицирующей способности плазмы (ХЭСП), выявляемой по методу Stokke, Nørgaard [11], и по активности ЛХАТ, определяемой по методу Glomset [6]. Концентрацию ХС, ТГ, а также ХС ЛПВП (в надосадках после удаления ЛП других классов гепарин-марганцевой преципитацией) определяли на автоматизированном анализаторе АА-П фирмы «Техникон» [8]. Уровень ХС липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) устанавливали расчетным методом [9]. Определение апопротеина А-1 проводили методом иммуноэлектрофореза [5].

### Результаты и обсуждение

Из 39 обследуемых больных ИБС 18 человек (46 %) имели уровень ХС и (или) ТГ, превышающий значение верхних границ нормы, установленных при обследовании популяции мужчин 40—59 лет, жителей Москвы и Ленинграда ( $ХС \geq 270$ ,  $ТГ \geq 200$  мг/дл), но гиперлипидемия была умеренной и ни у одного из обследованных уровень ХС или ТГ не превышал 400 мг/дл.

Для сопоставления активности ЛХАТ-реакции с другими показателями обмена ЛП все больные были разделены по показателям эстерификации ХС на 3 группы: 1-ю группу состави-

ли лица с высокой активностью ЛХАТ и ХЭСП, 2-ю — с низкой активностью ЛХАТ и ХЭСП, 3-ю — с разнонаправленным изменением активности ЛХАТ и ХЭСП (см. таблицу).

Из 12 больных, отнесенных к 1-й группе, 6 человек имели уровень ТГ и 1 больной — уровень ХС, превышающие верхние границы нормы [1]. Средний уровень ТГ у лиц этой группы был наиболее высоким, а также отмечалось снижение активности ЛПЛ. Из числа больных 2-й группы 3 обследуемых имели уровень ТГ, 2 лица — ХС и 5 лиц — ХС и ТГ, превышающие верхние границы нормы. В этой группе отмечен наиболее высокий средний уровень ХС и имелась тенденция к повышению ХС ЛПНП. Из 11 больных, отнесенных к 3-й группе, только 1 имел концентрацию ХС и ТГ, превышающую верхние границы нормы. Уровень липидов в этой группе больных не отличался от средних значений, определенных ранее [2]. Представленные данные свидетельствуют о том, что уровень ХС ЛПВП — основного субстрата ЛХАТ, не различался у лиц всех трех групп, так же как и концентрация апо А-1 — основного белка ЛПВП и активатора ЛХАТ.

Одновременное исследование активности фермента ЛХАТ и ХЭСП позволило выделить группы больных с реципрокными изменениями активности ЛХАТ при одинаковых средних уровнях субстрата (ХС ЛПВП) и активатора (апо А-1). Снижение ПГЛА, сопровождающееся повышением уровня ТГ у лиц 1-й группы, позволяет предположить, что у этих больных имеют



место нарушения метаболизма ЛП, связанные с деградацией частиц, богатых ТГ. Увеличение уровня общего ХС за счет ХС ЛПНП, выявленное у обследуемых 2-й группы, позволяет предположить, что снижение эстерификации ХС в плазме крови происходит либо в результате снижения активности фермента, либо, возможно, за счет изменения свойств субстрата, связанного с повышением уровня ХС, входящего в состав ЛПНП. Можно предположить, что причиной этого является нарушение удаления ХС из ЛПНП путем его прямого перехода с апо В- на апо А-содержащие частицы с последующей эстерификацией ХС.

Полученные данные свидетельствуют о том, что у больных ИБС имеются различные варианты отклонений в активности ключевых ферментных систем трансформации ЛП в плазме крови. Эти отклонения являются, по-видимому, важным этапом развития атерогенных нарушений метаболизма ЛП, имеющих место у больных ИБС даже при нерезко выраженной гиперлипидемии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Климов А. Н., Никульчева Н. Г. // Дислипидемии и ишемическая болезнь сердца / Под ред. Е. И. Чазова, А. Н. Климова. — М., 1980. — С. 26.
2. Константинова О. С. Эпидемиология основных факторов риска ИБС среди неорганизованного мужского и женского населения в возрасте 20—69 лет. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 1984.

3. Перова Н. В., Щербакова И. А., Нечаев А. С. и др. // Кардиология. — 1985. — № 10. — С. 91.
4. Творогова М. Г., Кантарджян И. Г., Неговская А. В. и др. // Лаб. дело. — 1982. — № 4. — С. 22.
5. Curry M., Alaupovic P., Suenram C. // Clin. Chem. — 1976. — Vol. 22. — P. 315.
6. Glomset J. // Meth. Enzymol. — 1969. — Vol. 15. — P. 139.
7. Mahley R., Innerarity T., Rull S. et al. // J. Lipid Res. — 1984. — Vol. 25. — P. 1277.
8. Manual of Laboratory Operations Lipid Research Clinics Programm. — Bethesda, 1974. — Vol. 1. — P. 75.
9. Rifkind B. // Atherosclerosis. — 1970. — Vol. 11. — P. 545.
10. Roheim P. // Amer. J. Cardiol. — 1986. — Vol. 57. — P. 3C.
11. Stokke K., Norum K. // Scand. J. clin. Lab. Invest. — 1971. — Vol. 27. — P. 21.

Поступила 07.04.87

#### ACTIVITY OF MAIN ENZYMATIC REACTIONS RESPONSIBLE FOR LIPOPROTEIN METABOLISM IN BLOOD PLASMA OF PATIENTS WITH HEART ISCHEMIC DISEASE

M. G. Tvorogova, I. N. Ozerova, A. S. Nechaev, N. N. Zholus, N. V. Perova

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

Evaluation of activity of main enzymatic systems involved in metabolism of lipoproteins, lipids and apoproteins in blood plasma of patients with heart ischemic disease, demonstrated that dissimilar alterations occurred in activity of the enzymatic systems responsible for transformation of lipoproteins in blood plasma. These alterations appear to be of great importance in the course of atherogenous impairments of lipoprotein metabolism found in the patients even in absence of distinct hyperlipidemia.

УДК 616.72-002.77-039-07:616.155.1/3-008.93:577.112.853

З. И. Волкова, Т. А. Астахова, Т. М. Трофимова, П. Я. Мильдияров

#### ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНЫ И $\beta$ -ГЛЮКУРОНИДАЗА КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

Институт ревматологии АМН СССР, Москва

Гликозаминогликаны (ГАГ) являются углеводным компонентом синтезируемых в хондроцитах протеогликанов, которые вместе с коллагеном составляют структурную основу хрящевой ткани. Концентрация протеогликанов в суставном хряще играет важную роль в поддержании его биомеханических свойств. ГАГ, кроме того, способствуют сохранению морфологической целостности и функциональ-

ной активности клеток [35]. В качестве структурного элемента ГАГ обнаружены в различных клетках организма, в том числе в форменных элементах периферической крови — эритроцитах, лейкоцитах, тромбоцитах [6, 9, 23, 24, 26, 29, 32]. Они входят в состав плазматических мембран, ядра, гликокаликса, обнаружены в лизосомах полиморфно-ядерных лейкоцитов [10, 27].

При ревматоидном артрите (РА) воспалительный процесс характеризуется прогрессирующей деструкцией костно-хрящевой ткани опорно-двигательного аппарата. Важное место в повреждении суставного хряща занимают нейтральные протеиназы и лизосомальные ферменты (ЛФ) нейтрофилов [17—20, 30, 31, 34, 37]. Показано, что при РА активность их повышается как в сыворотке крови, так и синовиальной жидкости [14].

В настоящей работе проведены комплексное исследование активности  $\beta$ -глюкуронидазы — одного из лизосомальных ферментов, участвующих в деградации протеогликанов, и определение содержания ГАГ в клетках периферической крови, сыворотке крови и моче у больных различными формами РА в целях выявления особенностей метаболических нарушений.

### Методика

Обследован 41 больной РА (27 с суставной формой заболевания, 14 с системными проявлениями) и 7 практически здоровых лиц. Кровь, взятую из вены, собирали в пробирку, содержащую 3% раствор ЭДТА из расчета 1 мл на 10 мл цельной крови, и помещали в термостат при 37 °C на 30—40 мин для осаждения эритроцитов. Нейтрофилы и мононуклеары выделяли в градиент плотности фиколла — верографина по методу [12], тромбоциты отделяли от мононуклеаров многократным отмыванием физиологическим раствором и центрифугированием. Количество клеток подсчитывали в камере Горяева (концентрация клеток составляла 4—8 млн/мл), затем клетки разрушали многократным замораживанием — оттаиванием (5—7 раз). К полученной суспензии добавляли физиологический раствор, содержащий 0,1% тритон X-100, и дважды центрифугировали на холоду в течение 20 мин. В надосадках определяли концентрацию белка по Лоури и активность  $\beta$ -глюкуронидазы по методу [16]. Активность фермента выражали в наномолях 4-метилумбеллиферона, освободившегося в результате действия фермента на субстрат (4-метилумбеллиферил —  $\beta$ -D-глюкуронид) в течение 1 ч в расчете на 1 млн. клеток, на 1 мг белка и на количество клеток в 1 мл крови [2, 25]. Активность фермента в сыворотке крови устанавливали по методу [5]. Концентрацию ГАГ в сыворотке крови определяли по методу [28], в моче по методу [11]. Для исследования брали утреннюю порцию мочи.

Для определения ГАГ в лейкоцитах кровь обрабатывали так же, как описано выше. Клетки многократно отмывали физиологическим раствором, от эритроцитов освобождали с помощью сапонины. Лейкоциты промывали в ацетоне, обезжиривали в смеси эфир — ацетон (3:1) в течение 4 ч при 38 °C, затем центрифугировали, промывали эфиром, высушивали и хранили в виде порошка при 0—4 °C. ГАГ

выделяли из лейкоцитов методом, включающим в себя переваривание проназой Е (10 мг на 100 мг клеток) в 0,5 М ацетатном буфере pH 7,5 в течение 24 ч при 65 °C с последующей обработкой ТХУ и диализом. Далее ГАГ осаждали 4 объемами этанола, насыщенного уксуснокислым натрием, осадки после центрифугирования повторно промывали абсолютным спиртом, эфиром, затем растворяли в 0,75 М NaCl и снова осаждали хлористым цетиламинидином. Содержание ГАГ в лейкоцитах определяли с использованием метода Танигуши и соавт. [36] с некоторыми модификациями. Концентрацию ГАГ выражали в микрограммах на 100 мг сухой массы клеток. Результаты, которые были получены при определении ГАГ в лейкоцитах практически здоровых людей, сопоставляли с данными литературы и обрабатывали методом вариационной статистики.

### Результаты и обсуждение

Как видно из данных, представленных в табл. 1, удельная активность  $\beta$ -глюкуронидазы у практически здоровых людей в нейтрофилах была в 2,3 раза выше, чем в мононуклеарах, и в 6 раз выше, чем в тромбоцитах. Если активность фермента выражали на 1 млн клеток или рассчитывали на абсолютное число их в 1 мл крови, то в нейтрофилах она была выше, чем в мононуклеарах, в 1,3 и 1,7 раза соответственно. При патологии наблюдалось увеличение удельной активности  $\beta$ -глюкуронидазы по сравнению с нормой во всех клетках крови, за исключением нейтрофилов и тромбоцитов больных РА с системными проявлениями заболевания, где удельная активность была в пределах нормальных величин. При этом была выявлена корреляция между активностью фермента в нейтрофилах и таковой в тромбоцитах и мононуклеарах ( $r = 0,73$ ,  $p < 0,001$  и  $r = 0,76$ ,  $p < 0,001$  соответственно).

Содержание белка в нейтрофилах и мононуклеарах у больных РА в расчете на 1 млн клеток снижалось по сравнению с нормой на 37,6 и 25,4 % соответственно (табл. 2). Достоверное снижение концентрации белка отмечалось только в нейтрофилах больных РА с суставной формой заболевания и у этих больных обнаружена самая высокая удельная активность фермента. Таким образом, удельная активность  $\beta$ -глюкуронидазы в нейтрофилах и мононуклеарах увеличивалась исключительно за счет снижения концентрации белка в клетках. Причем в группе больных РА с суставной фор-

Таблица 1

Активность  $\beta$ -глюкуронидазы форменных элементов крови у больных ревматоидным артритом (РА)

Группа обследованных	Нейтрофилы			Мононуклеары			Тромбоциты, нмоль* на 1 мг белка в 1 ч
	нмоль* на 1 мг белка в 1 ч	нмоль* на 1 млн клеток в 1 ч	нмоль* на 1 мл крови в 1 ч	нмоль* на 1 мг белка в 1 ч	нмоль* на 1 мл крови в 1 ч	нмоль* на 1 мл крови в 1 ч	
Доноры	583,8 $\pm$ 36,8 (7)	51,0 $\pm$ 3,4 (7)	143,3 $\pm$ 14,2 (5)	253,5 $\pm$ 23,3 (7)	37,9 $\pm$ 1,5 (7)	82,6 $\pm$ 9,7 (5)	99,0 $\pm$ 15,3 (7)
Больные РА	765,0 $\pm$ 67,1 (34)	41,8 $\pm$ 2,7 (32)	189,3 $\pm$ 16,6 (32)	539,0 $\pm$ 67,5 (34)	45,5 $\pm$ 3,4 (32)	67,3 $\pm$ 6,4 (29)	150,3 $\pm$ 15,1 (32)
<i>p</i>	<0,05	<0,05	<0,05	<0,001	<0,05	>0,05	<0,01
Больные РА с суставной формой заболевания	907,3 $\pm$ 95,4 (22)	44,6 $\pm$ 3,4 (21)	199,4 $\pm$ 22,1 (19)	641,6 $\pm$ 107,1 (22)	49,2 $\pm$ 4,9 (21)	71,2 $\pm$ 9,0 (19)	179,3 $\pm$ 19,7 (21)
<i>p</i> <sub>1</sub>	<0,05	>0,05	<0,05	<0,01	<0,05	>0,05	<0,05
Больные РА с системными проявлениями заболевания	583,0 $\pm$ 46,9 (12)	39,0 $\pm$ 4,8 (11)	181,4 $\pm$ 29,6 (10)	474,2 $\pm$ 76,8 (12)	39,8 $\pm$ 3,3 (11)	64,1 $\pm$ 8,3 (10)	104,8 $\pm$ 15,8 (11)
<i>p</i> <sub>11</sub>	>0,05	<0,05	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05
<i>p</i> <sub>I-II</sub>	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3, и 4 в скобках указано число обследуемых лиц. Звездочка — 4-метилумбеллиферон. *P*, *P*<sub>I</sub>, *P*<sub>11</sub> — достоверность по отношению к норме. *P*<sub>I-II</sub> — достоверность между группами.

мой заболевания наблюдалось полное соответствие между уровнем увеличения активности фермента и процентом снижения концентрации белка. Однако у больных РА с системными проявлениями заболевания уменьшение количества белка в клетках было более выраженным, чем увеличение активности фермента. Обнаружена зависимость удельной активности  $\beta$ -глюкуронидазы в нейтрофилах от состояния больного: на фоне благоприятного течения заболевания, как правило, отмечалась высокая активность фермента, тогда как неблагоприятное, быстро прогрессирующее заболевание сопро-

вождалось достоверным снижением удельной активности. Хотя снижение концентрации белка в клетках считается проявлением дистрофии, это явление при РА, согласно нашим данным, следует рассматривать как адаптивную реакцию организма, направленную на сохранение равновесия между процессами биосинтеза и катаболизма ГАГ.

Если активность фермента рассчитывали на 1 млн клеток, достоверное увеличение ее отмечалось лишь в мононуклеарах (преимущественно в группе больных РА с суставной формой заболевания). В нейтрофилах, на-

Таблица 2

Изменение концентрации белка и активности  $\beta$ -глюкуронидазы в лейкоцитах крови больных РА

Группа обследуемых	Нейтрофилы		Мононуклеары	
	белок, мкг на 1 млн. клеток	активность $\beta$ -глюкуронидазы, нмоль на 1 мг белка в 1 ч	белок, мкг на 1 млн. клеток	активность $\beta$ -глюкуронидазы, нмоль на 1 мг белка в 1 ч
Доноры	97,5 $\pm$ 14,6 (6)	583,8 $\pm$ 36,8 (7)	152,7 $\pm$ 13,6 (6)	253,5 $\pm$ 23,3 (7)
Больные РА	70,6 $\pm$ 9,2 (31)	765,0 $\pm$ 67,1 (34)	114,1 $\pm$ 16,2 (31)	539,0 $\pm$ 67,5 (34)
Больные РА с суставной формой заболевания	62,9 $\pm$ 5,7 (20)	907,3 $\pm$ 35,4 (22)	114,0 $\pm$ 15,8 (20)	641,6 $\pm$ 107,1 (22)
Больные РА с системными проявлениями заболевания	84,6 $\pm$ 14,9 (11)	583,0 $\pm$ 46,9 (12)	114,4 $\pm$ 17,0 (11)	474,2 $\pm$ 76,8 (12)

Количество лейкоцитов ( $10^6$  клеток на 1 мл крови) в периферической крови у больных РА

Группа обследуемых	Общее количество лейкоцитов	Нейтрофилы	Мононуклеары
Доноры	$5,12 \pm 0,24$ (5)	$2,81 \pm 0,38$ (5)	$2,18 \pm 0,4$ (5)
Больные РА	$6,12 \pm 9,57$ (36)	$4,53 \pm 0,5$ (30)	$1,5 \pm 0,19$ (30)
<i>p</i>	$>0,05$	$<0,01$	$>0,05$
Больные РА с суставной формой заболевания	$5,96 \pm 0,48$ (23)	$4,47 \pm 0,39$ (23)	$1,49 \pm 0,2$ (23)
<i>p</i> <sub>1</sub>	$>0,05$	$<0,01$	$>0,05$
Больные РА с системными проявлениями заболевания	$6,5 \pm 0,77$ (12)	$4,65 \pm 0,72$ (10)	$1,61 \pm 0,18$ (10)
<i>p</i> <sub>II</sub>	$>0,05$	$<0,05$	$>0,05$
<i>p</i> <sub>I-II</sub>	$>0,05$	$>0,05$	$>0,05$

против, обнаружено снижение активности, наиболее выраженное у больных с системными проявлениями, что согласуется с результатами работы [25], свидетельствующими о частичной потере жизнеспособности указанных клеток. Обращает внимание тот факт, что при РА обнаружено также уменьшение продолжительности жизни тромбоцитов [15]. При определении активности фермента с учетом абсолютного количества клеток в 1 мл крови в мононуклеарах выявилась тенденция к снижению, тогда как в нейтрофилах наблюдалось достоверное увеличение активности  $\beta$ -глюкуронидазы по всей группе больных в целом и, в частности, в группе с суставной формой заболевания. В нейтрофилах активность  $\beta$ -глюкуронидазы возросла за счет увеличения количества клеток, абсолютное число мононуклеаров несколько снижалось, что обусловило столь незначительный их вклад в уровень суммарной активности крови (табл. 3).

Поскольку содержание ГАГ определяли не в отдельных форменных элементах крови, а во всей фракции лейкоцитов, в целях сопоставления результатов содержания ГАГ и  $\beta$ -глюкуронидазы активность фермента выражали как сумму активности в нейтрофилах и мононуклеарах в виде среднего значения (табл. 4). Количество ГАГ в лейкоцитах достоверно увеличивалось у больных с суставной формой заболевания. При этом обнаружена прямая корреляция между изменением содержания ГАГ и удельной активностью фермента. У больных РА с системными проявлениями, отлича-

ющимися клинически более тяжелым течением заболевания, уровень удельной активности  $\beta$ -глюкуронидазы и содержание ГАГ в лейкоцитах периферической крови находились в пределах нормальных величин и были достоверно ниже, чем у больных с суставной формой заболевания, что может быть обусловлено либо торможением их синтеза в лейкоцитах, либо их выходом из клетки. Однако последнее, по-видимому, не является определяющим, так как активность фермента и концентрация ГАГ в биологических жидкостях существенно не различались между собой в этих группах.

При сравнительном анализе количества ГАГ в лейкоцитах и активности  $\beta$ -глюкуронидазы в нейтрофилах и мононуклеарах корреляционная связь была найдена только с мононуклеарами при расчете активности на 1 млн клеток или на абсолютное их число в 1 мл крови ( $r=0,45$ ,  $p>0,05$  и  $r=0,66$ ,  $p<0,001$  соответственно). Известно, что ГАГ в клетках находятся в форме протеогликанов [29] и могут образовывать комплексы с ЛФ [21], в результате чего активность последних либо увеличивается, либо уменьшается [22]. По-видимому, у больных РА подобные комплексы присутствуют только в мононуклеарах.

Содержание ГАГ в биологических жидкостях больных РА значительно повышается: в 2 раза в сыворотке крови и в 3 раза в моче. Полученные данные согласуются с результатами других исследователей, которые наряду с этим обнаружили у больных РА связь циркулирующего ГАГ (гиалуро-

Таблица 4

Содержание ГАГ и активность  $\beta$ -глюкуронидазы в лейкоцитах периферической крови и биологических жидкостях у больных РА

Группа обследуемых	ГАГ			$\beta$ -Глюкуронидаза		
	сыворотка крови, мг%	моча, мг Уроновых кислот на 1 г креатинина	лейкоциты, мкг на 100 г сухой массы	лейкоциты		сыворотка крови, нмоль на 1 мл в 1 ч
				нмоль на мг белка в 1 ч	нмоль на 1 млн клеток в 1 ч	
Доноры	$0,58 \pm 0,03$ (15)	$2,0 \pm 0,14$ (20)	$122,9 \pm 11,5$ (7)	$418,7 \pm 29,5$ (7)	$44,4 \pm 2,4$ (7)	$40,5 \pm 5,5$ (5)
Больные РА	$1,06 \pm 0,05$ (16)	$5,91 \pm 0,42$ (27)	$151,29 \pm 10,1$ (21)	$651,5 \pm 67,3$ (34)	$43,6 \pm 3,0$ (34)	$58,6 \pm 4,7$ (27)
$p$	$< 0,001$	$< 0,001$	$> 0,05$	$< 0,01$	$> 0,05$	$> 0,05$
Больные РА с суставной формой заболевания	$1,04 \pm 0,05$ (10)	$5,68 \pm 0,47$ (17)	$173,8 \pm 11,3$ (11)	$774,4 \pm 10,2$ (22)	$46,9 \pm 4,1$ (21)	$60,6 \pm 6,0$ (17)
$p_1$	$< 0,001$	$< 0,001$	$< 0,05$	$< 0,01$	$> 0,05$	$< 0,05$
Больные РА с системными проявлениями заболевания	$1,08 \pm 0,12$ (6)	$6,3 \pm 0,32$ (10)	$126,5 \pm 13,7$ (10)	$528,6 \pm 61,9$ (12)	$38,4 \pm 4,05$ (11)	$58,1 \pm 7,9$ (10)
$p_{II}$	$< 0,01$	$< 0,001$	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$
$p_{II-III}$	$> 0,05$	$> 0,05$	$< 0,05$	$< 0,05$	$< 0,05$	$> 0,05$

ната) с активностью воспалительного процесса [13]. Привлекает внимание следующая закономерность: у больных с ревматоидным васкулитом, определяющим системные проявления заболевания (кроме суставного синдрома отмечалась полинейропатия, лимфоаденопатия, амиотрофический синдром), удельная активность  $\beta$ -глюкуронидазы в нейтрофилах была снижена или находилась в пределах нормальных значений. Достоверное снижение активности фермента отмечалось в расчете на 1 млн клеток, что свидетельствует о функциональной неполноценности нейтрофилов при РА. Следствием этого может быть замедление процесса удаления из циркуляции ГАГ [3], поскольку нейтрофилы являются клетками, где присутствуют ферменты, участвующие в процессах их катаболизма. Изменение содержания ГАГ при РА в биологических жидкостях и суставном хряще отмечалось и ранее [1, 4, 7, 33]. Считают, что накопление ГАГ в сыворотке крови больных РА обусловлено интенсификацией их синтеза в печени и это является компенсаторной реакцией организма на деструктивные процессы, происходящие в соединительной ткани. В свою очередь со снижением активности  $\beta$ -D-галактозидазы и  $\alpha$ -D-глюкозидазы в сыворотке крови больных РА связывают низкий уровень завершеного фагоцитоза и накопление в организме патологических отложений [8].

В результате проведенных исследований обнаружено достоверное повышение удельной активности  $\beta$ -глюкуронидазы в нейтрофилах, мононуклеарных лейкоцитах и тромбоцитах. Увеличение удельной активности фермента в нейтрофилах обусловлено исключительно снижением концентрации белка в этих клетках. Однако в расчете на 1 млн. клеток активность в нейтрофилах достоверно снижалась, тогда как в мононуклеарных лейкоцитах возрастала более чем в 2 раза, при этом концентрация белка имела лишь тенденцию к снижению. Кроме того, у больных РА выявлена прямая корреляция между содержанием ГАГ в лейкоцитах и активностью  $\beta$ -глюкуронидазы в мононуклеарных клетках. Таким образом, при РА создается дефицит  $\beta$ -глюкуронидазы в нейтрофилах, тогда как в мононуклеарных лей-

коцитах активность этого фермента возрастает.

При сравнении изучаемых показателей в двух клинически различных группах больных РА (с системными проявлениями и суставной формой заболевания) были обнаружены четкие биохимические различия. Удельная активность  $\beta$ -глюкуронидазы в нейтрофилах, мононуклеарах, тромбоцитах и содержание ГАГ в лейкоцитах было достоверно выше у лиц с суставной формой РА. У больных РА с системными проявлениями содержание ГАГ в сыворотке крови и моче было выше, а в лейкоцитах ниже. Активность  $\beta$ -глюкуронидазы в нейтрофилах (как удельная, так и в расчете на 1 млн клеток) была достоверно ниже, чем у больных с суставной формой заболевания.

Таким образом, одной из причин, обуславливающих клинические особенности течения РА, является функциональное состояние лейкоцитов периферической крови.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Карякина Е. В. Клиническое значение определения гликозаминогликанов биологических жидкостей при ревматоидном артрите: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 1984.
2. Краснополяская К. Д., Сороковых Л. В., Кухаренко В. И. и др. // Биохимические основы наследственных заболеваний, связанных с нарушением обмена углеводов. — М., 1978. — С. 108—114.
3. Лабори А. Регуляция обменных процессов: Пер. с фр. — М., 1970.
4. Матвейков Г. П., Юсупова Н. А., Пшоник С. С. и др. // Тер. арх. — 1977. — № 11. — С. 20—23.
5. Страчунский Л. С. // Лаб. дело. — 1980. — № 6. — С. 329—332.
6. Харченко М. Ф., Шатская Т. А., Остроумова С. С. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 4. — С. 86—91.
7. Юсупова Н. А., Костюк В. П., Балесная А. Н. // Там же. — 1976. — № 4. — С. 507—513.
8. Юсупова Н. А., Безкровная В. Г., Крюк С. А., Чернова Т. А. // Лаб. дело. — 1980. — № 4. — С. 228—231.
9. Anderson L., Smith G., Shapiro B. // Clin. chim. Acta. — 1976. — Vol. 73, N 1. — P. 63—65.
10. Avila J., Convit J. // Biochem. J. — 1975. — Vol. 152. — P. 57—64.
11. Bitter T., Muir H. // Analyt. Biochem. — 1962. — Vol. 4. — P. 330—334.
12. English D., Andersen B. // J. immunol. Meth. — 1974. — Vol. 5, N 3. — P. 249—252.
13. Engstrom-Laurent A., Hallgren R. // Ann. rheum. Dis. — 1985. — Vol. 44. — N 2. — P. 83—88.
14. Fallet G., Micheli A., Boussine L. // Rheumatoid Arthritis / Ed. W. Muller et al. — London, 1971. — P. 177—187.
15. Farr M., Scoot D., Constable T. et al. // Ann. rheum. Dis. — 1983. — Vol. 42. — P. 545—549.
16. Glaser J., Sly W. // J. Lab. clin. Med. — 1973. — Vol. 81, N 6. — P. 969—977.
17. Greiling H., Koster L., Stuhlsatz H. et al. // Connective Tissues: Biochemistry and Pathophysiology. — Berlin, 1974. — P. 166—172.
18. Greiling H. // J. clin. Chem. clin. Biochem. — 1981. — Vol. 19, N 8. — P. 549—551.
19. Janoff A., Feinstein G., Malemud Ch., Elias J. // J. clin. Invest. — 1976. — Vol. 57, N 3. — P. 615—624.
20. Keiser H., Greenwald R., Feinstein G., Janoff A. // Ibid. — P. 625—632.
21. Kelley N., Harris E., Raddy S., Seedge C. // Textbook of Rheumatology. — Philadelphia, 1981. — Vol. 1. — P. 239—254.
22. Kint J., Dacremont G., Carton D. et al. // Science. — 1973. — Vol. 181. — P. 352—354.
23. Kolset S., Kjellen L., Lindahl U. et al. // Collagen Relat. Res. — 1983. — Vol. 3, N 1. — P. 75.
24. Laine R., Rush J., Russin T. et al. // Glycoconjugates. — Tokyo, 1981. — P. 501—502.
25. Mikulikova D., Stancikova M., Trnavsky K., Vlcek K. // Fys. reum. Vestn. — 1983. — Vol. 61, N 3. — P. 127—132.
26. Morgenstern E., Weber E. // Histochemistry. — 1974. — Vol. 40. — N 1. — P. 69—88.
27. Nicolson G., Singler S. // J. Cell. Biol. — 1974. — Vol. 60. — P. 236.
28. Niebes P., Schiffers M. // Clin. chim. Acta. — 1975. — Vol. 62. — P. 195—202.
29. Ohhashi Yoshiaki, Hasumi Fujio, Mori Yo // Biochem. J. — 1984. — Vol. 247, N 1. — P. 199—207.
30. Oronsky A., Inharro L., Perper P. // Arthr. a. Rheum. — 1973. — Vol. 26, N 4. — P. 560—561.
31. Oronsky A., Ignnarro L., Perper P. // J. exp. Med. — 1973. — Vol. 138. — P. 461—472.
32. Parmley R., Hurst R., Takagi M. et al. // Blood. — 1983. — Vol. 62, N 2. — P. 257—266.
33. Parry A., Flint M., Gillard G. et al. // FEBS Lett. — 1982. — Vol. 149, N 1. — P. 1—7.
34. Pryce-Jones R., Saklatvala J., Wood G. // Clin. Sci. — 1974. — Vol. 47, N 5. — P. 403—414.
35. Stephens R., Ghosh P., Taylor T. // Biochim. biophys. Acta. — 1975. — Vol. 399. — P. 101—112.
36. Tanigushi N., Nanla I., Koizumi S. // Biochem. Med. — 1974. — Vol. 11, N 3. — P. 217—226.
37. Vischer T. // International Congress of Rheumatology, 15-th: Abstracts. — Paris, 1981. — N 1465.

Поступила 09.10.86



GLYCOSAMINOGLYCANS AND  $\beta$ -GLUCURONIDASE ACTIVITY IN CELLS OF PERIPHERAL BLOOD AND IN BIOLOGICAL FLUIDS OF PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

Z. I. Volkova, T. A. Astakhova,  
T. M. Trofimova, P. Y. Muldiyrov

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

Content of glycosaminoglycans and  $\beta$ -glucuronidase activity were measured in leukocytes, blood serum and urine of patients with rheumatoid arthritis. Concentration of glycosaminoglycans was increased in blood serum

and urine of the patients. The most distinct increase as compared with healthy persons in content of these substances was found in leukocytes of the patients with joint form of rheumatoid arthritis. Activity of  $\beta$ -glucuronidase was also elevated in cells of peripheral blood, whereas content of protein was decreased in these cells. The enzymatic activity was reduced in the fraction of polymorphonuclear leukocytes of the patients as shown by estimation of the activity per  $10^6$  cells after fractionation using the Ficoll-verografin procedure. Deficiency of  $\beta$ -glucuronidase activity in polymorphonuclear leukocytes appears to be among the factors responsible for excess of glycosaminoglycans in blood serum and urine of the patients as well as for chronic inflammation under conditions of rheumatoid arthritis.

УДК 612.825.5+612.843.7].015.36:[547.466.63+547.466.64-06:612.843.7

T. M. Агаев, Г. А. Курбанова

ВЛИЯНИЕ РАННЕЙ ЗРИТЕЛЬНОЙ ДЕПРИВАЦИИ НА СИНТЕЗ  
ГЛУТАМИНОВОЙ И АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТ  
В МИТОХОНДРИЯХ ЦЕНТРАЛЬНЫХ СТРУКТУР ЗРИТЕЛЬНОГО  
АНАЛИЗАТОРА МОЗГА СОБАК

Институт физиологии им. А. И. Караева АН Азербайджанской ССР, Баку

Раннее исключение зрительной импульсации вызывает значительные нейрофизиологические, поведенческие и биохимические изменения в структурах зрительного анализатора мозга, особенно нейронов коркового отдела [1, 2, 7, 10, 11, 14, 18].

Известно, что основная часть зрительных афферентов оканчивается в нейронах слоя IV, формирующихся в онтогенезе позднее других корковых нейронов (длинноаксонные клетки слоя V дифференцируются в онтогенезе раньше) [15, 16]. Отсутствие специфических импульсов на ранних сроках постнатального онтогенеза, приводит, по-видимому, к существенному нарушению морфохимического развития указанных нейронов, о чем свидетельствуют значительные изменения площади нейронов и активности глутаматдегидрогеназы (ГДГ) в IV и V слоях коры [10, 11]. Отсутствие специфических импульсов в раннем онтогенезе оказывает наиболее существенное влияние на мономодальные нейроны зрительной коры, демонстрирующее в условиях депривации черты морфохимического недоразвития и снижение активности ГДГ [11]. Вместе с тем следует отметить, что на уровне нейронов коры мозга активность фермента ГДГ связана с нейро-

медиаторной функцией глутаминовой кислоты и разнообразными процессами превращения ее в мозге [12, 19, 20]. А. Е. Браунштейном [5, 6] было выдвинуто положение о том, что система дикарбоновых аминокислот, обладающая наибольшим числом перекрестных связей на путях азотистого обмена, является одной из центральных интегрирующих систем клеточного метаболизма.

В задачу настоящего исследования входило изучение биосинтеза глутаминовой и аспарагиновой кислот путем восстановительного аминирования и переаминирования в условиях зрительной депривации в митохондриях центральных структур зрительного анализатора мозга собак.

Методика

Для исследования использовали следующие отделы зрительного анализатора мозга собак: зрительную кору (поле 17; 3К), переднее двухолмие (ПД) и наружное коленчатое тело (НКТ). Границы корковых и подкорковых структур анализатора разделяли в соответствии с атласом [3]. Подопытных собак с момента рождения до 45—90-дневного возраста содержали в полной темноте, контрольных — при нормальной освещенности. После декапитации животных извлекали мозг и помещали его на лед в холодильную комнату.

Митохондрии выделяли в 0,32 М сахарозе методом дифференциального центрифугирова-

Таблица 1

Синтез глутаминовой кислоты путем восстановительного аминирования и персаминирования в митохондриях структур зрительного анализатора мозга собак при зрительной депривации (в мкмоль на массу митохондрий, выделенных из 1 г свежей ткани за 1 ч при 37°C;  $M \pm m$ ;  $n=5$ )

Возраст животных, дни	Условия опыта	Восстановительное аминирование			Персаминирование		
		$\alpha$ -кетоглутаровая кислота + $\text{NH}_4\text{Cl}$			$\alpha$ -кетоглутаровая кислота + аспарагиновая кислота		
		зрительная кора (поле 17)	переднее двухолмие	наружное коленчатое тело	зрительная кора (поле 17)	переднее двухолмие	наружное коленчатое тело
45	Норма	$2,78 \pm 0,04$	$2,65 \pm 0,05$	$3,35 \pm 0,04$	$2,11 \pm 0,01$	$2,43 \pm 0,04$	$2,60 \pm 0,01$
	Депривация	$0,90 \pm 0,04$ ( $<0,001$ )	$0,91 \pm 0,05$ ( $<0,001$ )	$0,99 \pm 0,03$ ( $<0,001$ )	$0,71 \pm 0,03$ ( $<0,001$ )	$0,79 \pm 0,04$ ( $<0,001$ )	$0,81 \pm 0,03$ ( $<0,001$ )
90	Норма	$4,95 \pm 0,02$	$4,59 \pm 0,01$	$3,71 \pm 0,02$	$2,46 \pm 0,03$	$2,34 \pm 0,02$	$3,39 \pm 0,01$
	Депривация	$1,76 \pm 0,05$ ( $<0,001$ )	$1,48 \pm 0,04$ ( $<0,001$ )	$1,25 \pm 0,08$ ( $<0,001$ )	$0,90 \pm 0,02$ ( $<0,001$ )	$0,78 \pm 0,01$ ( $<0,001$ )	$1,04 \pm 0,02$ ( $<0,001$ )

Примечание. Здесь и в табл. 2 в скобках — достоверность различий по сравнению с нормой.

ния [17] и гомогенизировали в тefлоновом гомогенизаторе с охлаждением на калийфосфатном буфере, рН 7,8–8,0. Полученный гомогенат использовали для изучения синтеза глутаминовой и аспарагиновой кислот из  $\alpha$ -кетоглутарата и щавелевоуксусной кислоты (ЩУК) путем восстановительного аминирования или персаминирования [5]. Инкубационная смесь состояла из 0,5 мл гомогената, 20 мкмоль кетокислоты и 10 мкмоль аминокислоты или  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Инкубацию проводили в ультратермостате в течение 1 ч при 37°C. Реакцию прекращали добавлением ТХУ до конечной концентрации 5% и кипячением в течение 4–5 мин. После охлаждения пробы центрифугировали 10 мин при 5000 об/мин. Осадок промывали 1 мл бидистиллированной воды. Надосадочную жидкость объединяли, выпаривали и растворяли в 0,4 мл смеси (5,6 мл 6 н.  $\text{HCl}$ ; 10,5 мл 96% спирта и воды до 100 мл). 50 мкл экстрактов наносили на хроматографическую бумагу FN-12 и FN-16 (ГДР). Дикарбоновые аминокислоты разделяли методом высоковольтного электрофореза [13, 14]. Содержание аминокислот рассчитывали по калибровочным графикам.

## Результаты и обсуждение

Результаты проведенного исследования (табл. 1) показывают, что при 45-суточной зрительной депривации синтез глутамата в митохондриях ЗК, ПД и НКТ путем прямого восстановительного аминирования снижается в 3,0–3,4 раза, по сравнению с нормой.

При удлинении сроков депривации до 90 сут синтез глутамата путем прямого восстановительного аминирования оставался подавленным в такой же степени.

Такие же изменения отмечаются в синтезе глутамата митохондриями исследованных структур мозга путем персаминирования  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты с аспаратом. Как при 45-, так и 90-суточной зрительной депри-

Таблица 2

Синтез аспарагиновой кислоты путем восстановительного аминирования и персаминирования в митохондриях структур зрительного анализатора мозга собак при зрительной депривации (мкмоль аспарагиновой кислоты на массу митохондрий, выделенных из 1 г свежей ткани за 1 ч при 37°C;  $M \pm m$ ;  $n=5$ )

Возраст животных, дни	Условия опыта	Восстановительное аминирование			Персаминирование		
		щавелевоуксусная кислота + $\text{NH}_4\text{Cl}$			щавелевоуксусная кислота + глутаминовая кислота		
		зрительная кора (поле 17)	переднее двухолмие	наружное коленчатое тело	зрительная кора (поле 17)	переднее двухолмие	наружное коленчатое тело
45	Норма	$0,91 \pm 0,03$	$0,96 \pm 0,03$	$1,09 \pm 0,04$	$0,95 \pm 0,03$	$0,94 \pm 0,02$	$1,06 \pm 0,01$
	Депривация	$0,60 \pm 0,02$ ( $<0,001$ )	$0,65 \pm 0,03$ ( $<0,01$ )	$0,68 \pm 0,03$ ( $<0,01$ )	$0,59 \pm 0,02$ ( $<0,02$ )	$0,55 \pm 0,03$ ( $<0,01$ )	$0,56 \pm 0,01$ ( $<0,001$ )
90	Норма	$0,84 \pm 0,05$	$0,91 \pm 0,03$	$0,97 \pm 0,05$	$1,13 \pm 0,01$	$1,00 \pm 0,02$	$1,01 \pm 0,01$
	Депривация	$0,69 \pm 0,02$ ( $<0,05$ )	$0,75 \pm 0,01$ ( $<0,05$ )	$0,71 \pm 0,06$ ( $<0,05$ )	$0,68 \pm 0,02$ ( $<0,001$ )	$0,57 \pm 0,01$ ( $<0,001$ )	$0,60 \pm 0,01$ ( $<0,01$ )

вации этот синтез снижался во всех исследованных отделах в 2,7—3,2 раза по сравнению с нормой.

Зрительная депривация подавляет синтез не только глутамата, но и аспартата (табл. 2). При 45-суточной зрительной депривации синтез аспартата путем прямого восстановительного аминирования в митохондриях ЗК, ПД и НКТ снижается на 32—36 %. При удлинении сроков депривации до 3 мес синтез аспартата остается сниженным, хотя, возможно, и в несколько меньшей степени, чем при 45-суточной депривации (на 18—27 %).

Некоторое снижение подавления синтеза аспартата за счет восстановительного аминирования при увеличении срока депривации могло быть связано с компенсаторными перестройками в изучавшихся структурах и изменениями модальности притоков импульсов.

Синтез аспартата путем переаминирования в митохондриях ЗК, ПД и НКТ при 45-суточной зрительной депривации снижается на 38—47 % по сравнению с нормой. При удлинении сроков депривации до 90 сут синтез аспартата остается практически на том же сниженном уровне во всех исследованных структурах зрительного анализатора.

Таким образом, дефицит зрительной импульсации приводит к существенному снижению синтеза глутаминовой и аспарагиновой кислот в митохондриях ЗК, ПД и НКТ путем как прямого восстановительного аминирования, так и переаминирования. Это снижение, по-видимому, связано с морфофункциональными перестройками клеточных структур зрительного анализатора в условиях зрительной депривации.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Агаев Т. М., Пигарева З. Д., Ифранмова З. Н. // *Вопр. мед. химии*. — 1981. — № 5. — С. 611—615.
2. Агаев Т. М. // *Укр. биохим. журн.* — 1982. — Т. 54, № 4. — С. 414—417.
3. Адрианов О. С., Меринг Т. А. *Атлас мозга собаки*. — М., 1959.
4. Бэйли Дж. *Методы химии белков*: Пер. с англ. — М., 1965.
5. Браунштейн А. Е. *Биохимия аминокислотного обмена*. — М., 1949.
6. Браунштейн А. Е., Азарх Р. М. // *Биохимия*. — 1957. — Т. 22, № 1—2. — С. 430—438.
7. Буснюк М. М., Пигарева З. Д. // *Журн. невропатол. и психиатр.* — 1954. — № 9. — С. 1345—1349.
8. Буснюк М. М. // *Функционально-структурные основы системной деятельности и механизмы пластичности мозга*. — М., 1974. — Вып. 3. — С. 381—386.
9. Буснюк М. М. // Там же. — 1975. — Вып. 4. — С. 220—227.
10. Буснюк М. М. // *Журн. невропатол. и психиатр.* — 1976. — № 12. — С. 1806—1810.
11. Волохов А. А., Шцлягина Н. Н. // *Журн. вып. нерв. деят.* — 1975. — № 4. — С. 799—808.
12. Дамбинова С. А. // *Нейрохимия*. — 1983. — Т. 2, № 4. — С. 426—440.
13. Козлов Э. А., Алиев Т. В. // *Укр. биохим. журн.* — 1972. — Т. 44, № 2. — С. 263—267.
14. Кунерт Э., Доведова Е. Л. // *Вопр. мед. химии*. — 1979. — № 4. — С. 460—466.
15. Полякова Г. И. // *Развитие центральной нервной системы*. — М., 1959. — С. 11—26.
16. Школьник-Яррос Е. Г. *Нейроны и межнейронные связи: Зрительный анализатор*. — Л., 1965.
17. De Robertis E. // *Science*. — 1967. — Vol. 156. — P. 907—914.
18. Hubel D., Wiesel T. // *J. Neurophysiol.* — 1963. — Vol. 26. — P. 994—1002.
19. Johnston G. A. R. // *Glutamic Acid: Advances in Biochemistry and Physiology* / Ed L. J. Filer et al. — New York, 1979. — P. 179—185.
20. Krnjevic N. // *Nature*. — 1970. — Vol. 228. — P. 119—124.

Поступила 11.11.86

#### EFFECT OF EARLY VISUAL DEPRIVATION ON SYNTHESIS OF GLUTAMIC AND ASPARTIC ACIDS IN MITOCHONDRIA OF DOG VISUAL ANALYZER CENTRAL STRUCTURES

T. M. Agayev, A. G. Kurbanova

Laboratory of Comparative and Age Biochemistry of Central Nervous System, Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Azerbaijan SSR, Baku

After 45 days visual deprivation synthesis via direct reductive amination and transamination of glutamic and aspartic acids was inhibited in mitochondria of dog visual cortex, *colliculi anterioris* and *corpus geniculatum externus*. Under conditions of long-term (90 days) visual deprivation synthesis of glutamic and aspartic acids was less effectively inhibited in mitochondria of the brain areas studied via the reductive amination and transamination, except of the aspartic acid synthesis by means of transamination, the rate of which was maintained at the level similar to the values observed after 45 days of visual deprivation.

В. С. Шугалей, А. А. Ананян, В. В. Козьмин

СИСТЕМА МИКРОСОМАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ПЕЧЕНИ  
ПРИ ГИПОКСИИ И ГИПЕРОКСИИ

Кафедра биохимии и лаборатория экологической адаптации животных к экстремальным факторам среды Ростовского университета

Важнейшим этапом функционирования системы микросомального окисления является фиксация молекулярного кислорода. Показано, что диффузия кислорода в клетки печени повышается с увеличением концентрации цитохрома Р-450 [14]. Процессы микросомального окисления потребляют около 40 % от общего количества поступившего кислорода [1]. Изменение концентрации кислорода во внешней среде должно оказать существенное влияние на работу всей системы. Учитывая значение системы микросомального окисления в поддержании концентрации целого ряда биологически активных соединений и ксенобиотиков, участие ее в процессах перекисного окисления [2], определяли содержание и каталитическую активность терминального фермента микросомального окисления цитохрома Р-450 печени в условиях гипоксии и гипероксии.

## Методика

Опыты проводили на самцах белых крыс массой 180—200 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. Животных опытных групп подвергали действию высотной гипоксии и гипероксии. Гипоксию вызывали, создавая давление в барокамере 0,029 МПа в течение 60 мин, что соответствует подъему на высоту 9000 м над уровнем моря, скорость декомпрессии 0,005 МПа/мин. Эксперименты по изучению гипероксии в режиме 0,7 МПа

до развития судорожных приступов проводили в барокамере со щелочным поглотителем углекислоты и водяных паров. Скорость компрессии и декомпрессии 0,2 МПа/мин. После соответствующей экспозиции животных декапировали, печень перфузировали 1,15 % раствором KCl, затем гомогенизировали в 0,25 М сахарозе на 0,01 М трис-HCl-буфере pH 7,4. Микросомную фракцию выделяли центрифугированием при 105 000 g из надосадочной жидкости, полученной после осаждения митохондрий при 11 000 g. Все этапы обработки ткани и выделения микросом проводили при температуре около 0°C. При связывании субстрата окисления цитохромом Р-450 образуется 2 основных типа комплексов, различающихся по форме дифференциальных спектров поглощения [9]. В связи с этим ферментативную активность цитохрома Р-450 определяли по реакции с амидопирином — субстратом I типа и анилином — субстратом II типа. Скорость деметилирования амидопирина и гидроксирования анилина оценивали соответственно по образованию формальдегида и пара-аминофенола [7]. Содержание цитохромов Р-450 и b<sub>5</sub> определяли спектрофотометрически на СФ UV VIS с использованием коэффициентов молярной экстинкции 91 и 164 см<sup>-1</sup> мМ<sup>-1</sup> [15]. Содержание микросомного белка определяли методом Лоури. Достоверность различий между опытными и контрольными группами определяли по *t*-критерию Стьюдента, резко отклоняющиеся варианты оценивали по критерию Шовене [8].

## Результаты и обсуждение

Пребывание животных в течение 1 ч на высоте 9000 м повышает содержание цитохрома Р-450 в печени на 213 %, при этом деметилирование

Каталитическая активность и содержание цитохрома Р-450 в микросомах печени крыс при гипоксии и гипероксии

Условия эксперимента	Субстраты, нмоль продукта на 1 мг белка в 1 мин		Цитохромы, нмоль на 1 мг белка	
	анилин	амидопирин	Р-450	b <sub>5</sub>
Контроль	0,58±0,02 (11)	3,42±0,39 (12)	0,42±0,08 (6)	0,14±0,04 (6)
Гипоксия	0,53±0,03 (11)	5,91±0,31 (9)	0,60±0,02 (6)	0,126±0,04 (6)
<i>p</i>	>0,1	<0,001	<0,02	>0,1
Изменения к контролю, %	-9	+73	+46	-7
Гипероксия	0,25±0,03 (13)	3,22±0,23 (12)	0,19±0,02 (8)	0,22±0,01 (9)
<i>p</i>	<0,001	>0,1	<0,01	<0,05
Изменения к контролю, %	-58	-6	-55	+62

Примечание: В скобках — число животных.

амидопирина — субстрата I типа — повышается на 48 % по сравнению с нормой. Метаболизм субстрата II типа — анилина — и количество цитохрома  $b_5$  при гипоксии не изменяются (см. таблицу).

При действии 0,7 МПа кислорода, например, содержание цитохрома Р-450 в печени снижается на 45 %, а гидроксилирование анилина — на 62 % по сравнению с контролем. Окисление амидопирина при гипероксии остается без изменений.

Таким образом, гипоксия и гипероксия вызывают разнонаправленные изменения в функционировании системы микросомального окисления. Оба исследуемых нами состояния организма можно охарактеризовать как несоответствие между потребностью клетки в кислороде и его тканевой концентрацией. Происходящие при участии цитохрома Р-450 оксигеназные реакции сопряжены с активацией молекулярного кислорода. Недостаток кислорода, необходимый для превращения ряда биологически активных соединений при гипоксии, компенсируется повышением общего количества цитохрома Р-450. Уникальным свойством цитохрома Р-450 является его индуцибельность, которую могут вызывать различные химические соединения, экстремальные воздействия и другие факторы [10, 17]. Индукцию синтеза цитохрома Р-450 расценивают как специфическую адаптацию к гипоксии [14].

По поводу состояния системы микросомального окисления при гипероксии в литературе существуют различные мнения [14, 13]. Мы связываем понижение содержания и каталитической активности цитохрома Р-450 с изменением интенсивности реакций перекисного окисления липидов (ПОЛ) в мембранах эндоплазматического ретикула печени. Применение антиоксидантов снижает скорость ПОЛ в мембранах гепатоцитов и стабилизирует концентрацию цитохрома Р-450 [3, 11, 13]. Отмеченное увеличение количества цитохрома  $b_5$  при гипероксии может быть связано с его большей устойчивостью к ПОЛ. Показано, что в микросомальной мембране цитохром Р-450 более чувствителен к ПОЛ, чем цитохром  $b_5$  [3, 4]. Кроме того, следует отметить общность спектральных характеристик цитохромов  $b_5$  и Р-420. Так, количество последнего при дейст-

вии 0,7 МПа повышается в связи с инактивацией цитохрома Р-450 и, очевидно, происходит наложение спектра поглощения цитохрома Р-420 на спектр поглощения цитохрома  $b_5$ . При ряде экстремальных воздействий активация ПОЛ влечет за собой снижение каталитической активности и общего количества цитохрома Р-450 [5, 6, 12]. Причинами, вызывающими такие изменения, являются деструкция гема, превращение в неактивный цитохром Р-420 и солибилизация его из мембраны [4, 16]. Последствием ПОЛ может быть «разрыхление» гидрофобного слоя и связанная с этим деструкция мембранных ферментов.

Полученные в работе результаты свидетельствуют об определенной специфике ответа системы микросомального окисления на гипо- и гипероксию. При гипоксии повышается скорость окисления субстрата I типа (амидопирина), при гипероксии, напротив, подавляется окисление субстрата II типа (анилина).

Таким образом, повышение количества цитохрома Р-450 при гипоксии и снижение его уровня при гипероксии можно расценивать как один из механизмов участия системы микросомального окисления в развитии гипоксического и гипероксического синдромов. Недостаток кислорода вызывает компенсаторное увеличение активности этой системы, связанное с возрастанием общей концентрации цитохрома Р-450. Возрастание концентрации кислорода в условиях гипероксии вызывает деструктивные изменения системы микросомального окисления, выражающиеся в снижении общего количества цитохрома Р-450 и ингибировании его гидроксилирующей активности. Изоферменты цитохрома Р-450, обладающие деметилирующей активностью, являются, по-видимому, более устойчивыми к изменению в среде концентрации кислорода. Эта активность компенсаторно возрастает при снижении количества кислорода и остается без изменений в условиях гипероксии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. — М., 1975.
2. Арчаков А. И. Оксигеназы биологических мембран. — М., 1983.
3. Биленко М. В., Каган В. Е., Велиханова Д. М., Комаров Л. Г. // Бюл. экспер. биол. — 1983. — № 4. — С. 30—32.

4. Бурлакова Е. Б., Джалябова М. И., Гвахария В. О. и др. // Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. — М., 1982. — С. 113—140.
5. Деев Л. И., Ахалая М. Я., Илларионова Е. А., Кудряшов Ю. Б. // Бюл. экспер. биол. — 1983. — № 5. — С. 51—53.
6. Карагезян К. Г., Овсепян А. М., Адонц К. Г. // Вопр. мед. химии. — 1985. — № 2. — С. 62—64.
7. Карузина И. И., Арчаков А. И. // Современные методы в биохимии. — М., 1977. — С. 49—62.
8. Кокунин В. А. // Укр. биохим. журн. — 1975. — Т. 47, № 6. — С. 776—790.
9. Мазуров А. В., Тверитинов В. И., Карякин А. В., Арчаков А. И. // Биохимия. — 1980. — Т. 45, № 3. — С. 427—482.
10. Мишин В. М., Ляхович В. В. Множественные формы цитохрома Р-450. — Новосибирск, 1985.
11. Новиков К. Н., Дудченко А. М., Уголев А. Т. и др. // Бюл. экспер. биол. — 1983. — № 11. — С. 50—52.
12. Семенюк А. В., Колесова Л. И., Ситникова Д. В. и др. // Там же. — № 1. — С. 37—39.
13. Смирнов Ю. В., Лукиенко П. И. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 6. — С. 51—53.
14. Longmuir I. S., Gottlieb S. F., Pashko L. L., Marlin P. // Undersea biomed. Research — 1980. — Vol. 7, N 3. — P. 161—170.
15. Omura T., Sato R. // J. biol. Chem. — 1964. — Vol. 239, N 7. — P. 2370—2379.
16. Pasqualli-Rouchitti I., Bini A., Botti B. et al. // Lab. Invest. — 1980. — Vol. 42, N 4. — P. 457—468.
17. Tanaka T., Miyazaki Y. // Toxicology. — 1984. — Vol. 33, N 3—4. — P. 239—244.

Поступила 24.07.87

# LIVER TISSUE MICROSOMAL OXIDATIVE SYSTEM IN RATS WITH HYPOXIA AND HYPEROXIA

V. S. Shugaley, A. A. Ananyan, V. V. Kozmin  
State University, Biological Institute, Rostov-on-Don

Content and catalytic activity of cytochrome P-450 were studied using amidopyrine as a substrate of the I type and aniline as a substrate of the II type. In hypoxia content of cytochrome P-450 and metabolism of amidopyrine were increased, while the enzyme content and the substrate metabolism were decreased in hyperoxia.

УДК 615.356:577.161.5].015.42:[612.015.16:577.152.321

В. А. Лидер

## ВЛИЯНИЕ ВИТАМИНА К НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ГЛИКОЛИЗА И ПЕНТОЗОФОСФАТНОГО ЦИКЛА

Ижевский медицинский институт

Первые сообщения о положительном влиянии природных и синтетических нафтохинонов на процессы регенерации были сделаны А. В. Палладным [9]. В последующем эта точка зрения нашла экспериментальное и клиническое подтверждение [2, 14]. Вместе с тем до настоящего времени остается неясным механизм такого влияния [3]. Наряду с этим возможность прямого участия нафтохинонов

в транспорте электронов в митохондриях на уровне многоклеточных организмов остается спорной [15]. Все более широкое использование в клинике для лечебных и профилактических целей антивитаминов К, производных оксикумарина, сопровождается [7] развитием вторичной недостаточности в организме витамина К [7]. Это проявляется на состоянии не только системы гемокоагуляции, но и процес-

Таблица 1

Активность альдозазы фруктозо-1,6-бисфосфата (усл. ед. на 1 г сырой ткани) и глюкозофосфатизомеразы (в мкмоль на 1 г сырой ткани) у крыс с пищевым К-авитаминозом

Исследуемый орган	Альдолаза фруктозо-1,6-бисфосфата		Глюкозофосфатизомеразы	
	контроль	опыт	контроль	опыт
Печень	6,0±0,3	11,1±1,3*	85,0±1,9	124,0±12,9*
Миокард	3,8±0,2	6,1±0,15*	78,0±2,5	123,0±1,7*
Скелетные мышцы	2,1±0,31	4,5±0,16*	82,0±1,3	105,0±4,0*
Селезенка	5,1±0,3	8,6±1,1*	55,0±1,9	68,0±1,9*
Легкие	6,7±1,4	14,0±3,6*	23,0±1,1	34,0±1,4*
Головной мозг	4,8±0,4	6,1±0,12*	33,0±2,2	42,0±1,3*

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 представлены средние ( $M \pm m$ ) данные 8—9 опытов. Звездочкой обозначено  $p < 0,05—0,001$ .



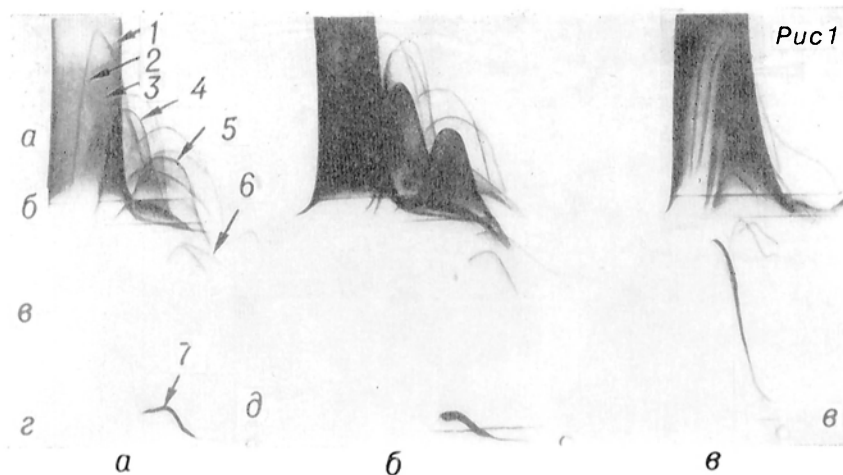


Рис. 1. Реакции белков сыворотки крови с хондритин-4-сульфатом и ЦТАБ при pH 8,7.

Здесь и на рис. 2: А — контрольная иммуноэлектрофоретическая картина; Б и В — реакция при концентрации полисахарида 0,1 и 10 мг/мл соответственно. а — гель, содержащий 5 % козьей поливалентной антисыворотки против сывороточных белков человека, б — промежуточный агарозный гель, в — гель, содержащий 0,001 % ЦТАБ, г — гель первого направления электрофореза, д — лунка для сыворотки крови (2 мкл). Здесь и на рис. 2: 1 — альбумин, 2 — орозомикулоид, 3 —  $\alpha_1$ -антитринин, 4 — гаптоглобин, 5 — трансферрин, 6 — IgG, 7 — аффинный преципитат. Анод вверху.

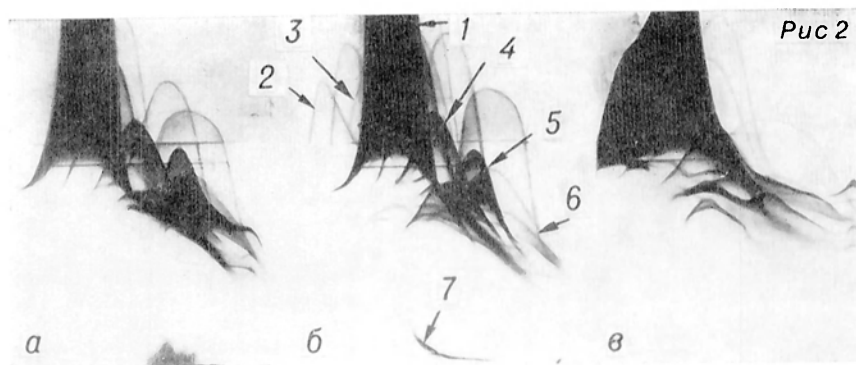


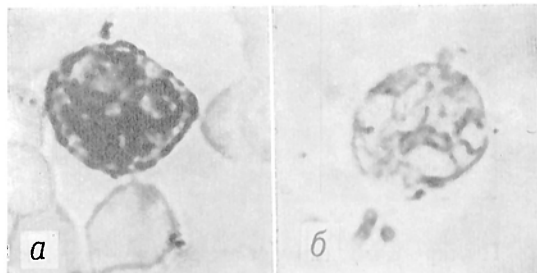
Рис. 2. Реакции белков сыворотки крови с гепарином и ЦТАБ при pH 6,6.

В гели первого направления электрофореза иммуноэлектрофоретических картин Б и В введен гепарин. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

К ст. Е. Р. Немцовой и соавт.

Рис. 1. Выявление ЛФ в нейтрофилах больных раком пищевода иммунопероксидазным методом.

а — до гемосорбции; б — после гемосорбции.



К ст. В. В. Честкова  
и соавт.

Рис. 1. Иммуноэлектрофорез белков экстракта мозга и печени с антисывороткой к ФАГ печени человека.

На расстоянии 4 мм в гель внесли 4 мкг белка экстракта пе-



чени и 40 мкг белка экстракта мозга и ввели электрофорез в первом направлении (направление миграции белков указано стрелкой). После электрофореза во втором направлении гель окрашивали Кумасей R-250 для выявления линий преципитации. Левое плечо линии преципитации образовано антигеном экстракта мозга, правое — антигеном печени.

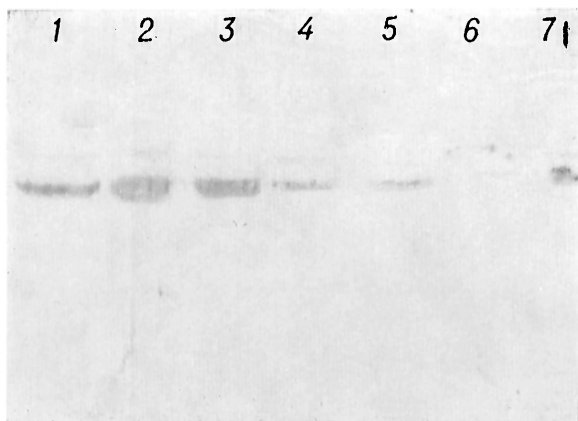
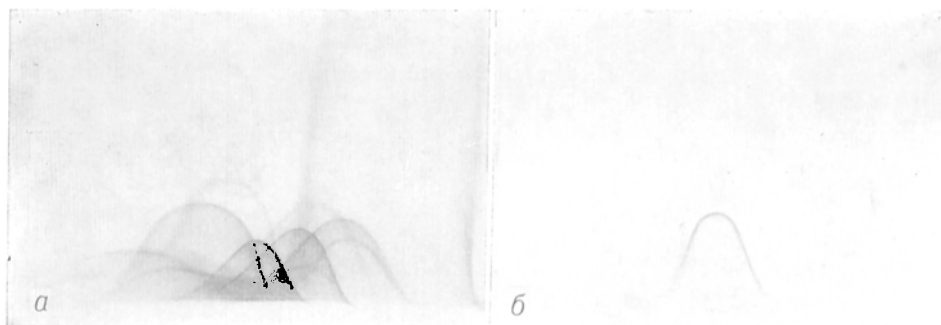


Рис. 3. Иммуноблоттинг белков экстрактов органов с антителами против ФАГ человека.

На дорожки наносили по 40 мкг белков экстракта органов больного А. 1—7 — экстракты почки, мозга, печени, мышцы сердца, легкого, селезенки и тонкой кишки соответственно.

К ст. Г. А. Олефиренко и соавт.

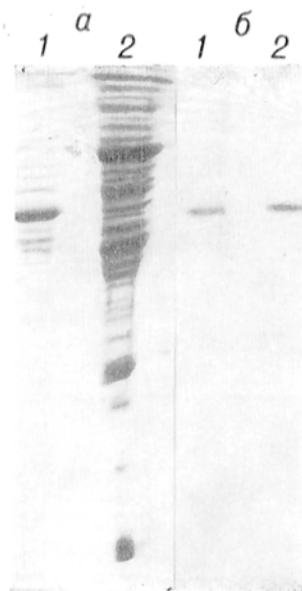


Перекрестный иммуноэлектрофорез с поливалентной антисывороткой к белкам децидуальной ткани.

а — экстракт децидуальной ткани; б — препарат АМГФ.

Рис. 2. Выявление ФАГ с помощью иммуноблоттинга белков экстракта печени.

А — электрофореграмма 4 мкг частично очищенной ФАГ печени человека (1) и 40 мкг белков экстракта печени (2). Б — иммуноблоттинг белков с геля тот же, что А, с антителами против ФАГ печени человека.



сов анаболизма в поврежденной ткани [12]. Показано, что *л*-хиноны могут успешно применяться как адаптогены для защиты от лучевого поражения, лечения ран и ожогов, туберкулеза, при опухолевом росте и сердечно-сосудистых заболеваниях [4].

В связи с этим было целесообразно исследовать влияние различной обеспеченности витамином К организма экспериментальных животных на состояние гликолиза и пентозофосфатного цикла (ПФЦ), которые в условиях ингибирования аэробных окислительных процессов являются основным источником восстановленных эквивалентов НАД·Н<sub>2</sub> и НАДФ·Н<sub>2</sub>, лимитирующих скорость обмена липидов (фосфолипидов) и белков, а также на содержание в тканях ДНК, которое отражает митотическую активность клеток и соотношение в них процессов анаболизма и катаболизма.

### Методика

Эксперименты были проведены на 99 белых крысах-самцах массой 130—180 г. Пищевой дефицит витамина К вызывали содержанием крыс в обменных клетках с решетчатым дном на полусинтетической диете без витамина К (1-я группа). [13]. Контролем служили животные, находившиеся в течение 5—6 нед на диете, лишенной витамина К, но дополнительно получали витамин К<sub>3</sub> (викасол) из расчета 10 мг на 100 г диеты (2-я группа). Животных 3-й группы содержали на обычном виварном рационе и им скармливали антивитамин К — пелентан (30 мг на 1 кг массы в течение 8—12 дней). Крысам 4-й группы наряду с пелентаном вводили α-токоферол (2 мг на 100 г массы ежедневно внутримышечно) в течение 12 дней. Животных декапитировали под легким эфирным наркозом. Развитие дефицита витамина К в организме крыс 1-й и 4-й групп контролировали по состоянию гемокоагулирующей системы (тромбэластографией, ТРОМБ-1), а также определением (4—5 раз) протромбинового индекса в процентах в крови, взятой из хвостовой вены. Для животных всех групп соблюдался принцип спаренного кормления. Воду животные получали без ограничений. Активность альдолазы фруктозо-1,6-бисфосфата (КФ 4.1.2.13) определяли по Bruns в модификации [10], глюкозофосфатизомеразу (КФ 5.1.3.9) исследовали по Bodansky в модификации [6], активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.49) — по Dishe [1]. Количественное содержание в тканях подопытных животных ДНК — по Dishe в модификации Barton [11]. Полученные результаты обработаны статистически с использованием критериев достоверности Стьюдента [8].

### Результаты и обсуждение

В условиях развития в организме дефицита витамина К (табл. 1) ак-

Т а б л и ц а 2  
Активность глутаматдегидрогеназы (мкмоль/ч на 1 мг белка) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (мкмоль/ч на 1 мл) у крыс с пищевым К-авитаминозом и скармливанием пелентана

Условия эксперимента	Глутаматдегидрогеназа						Дегидрогеназа глюкозо-6-фосфата			
	печень		мышцы		почки		эритроциты		плазма крови	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
Пищевой К-авитаминоз	23,0 ± 1,0	16,2 ± 1,1*	4,5 ± 0,04	3,9 ± 0,12*	11,9 ± 0,9	11,4 ± 1,0	0,261 ± 0,02	0,36 ± 0,03*	0,027 ± 0,004	0,126 ± 0,011*
Скармливание пелентана	26,0 ± 1,7	16,2 ± 0,9*	5,6 ± 0,18	4,0 ± 0,14*	12,4 ± 1,1	10,8 ± 0,9	0,256 ± 0,012	0,329 ± 0,016*	0,031 ± 0,008	0,119 ± 0,012*

Содержание ДНК (в мкг на 1 г сырой ткани) в различных органах крыс при пищевом К-авитаминозе и скормливания пеллетана

Исследуемый орган	Пищевой К-авитаминоз		Введение пеллетана		
	контроль	опыт	контроль	пеллетан	$\alpha$ -токоферол + пеллетан
Головной мозг	654,0 $\pm$ 47,0	352,0 $\pm$ 21,0*	700,0 $\pm$ 58,0	290,0 $\pm$ 33,0*	624,0 $\pm$ 14,0
Скелетные мышцы	574,0 $\pm$ 47,0	206,0 $\pm$ 20,0*	499,0 $\pm$ 38,0	167,0 $\pm$ 35,0*	301,0 $\pm$ 23,0*
Легкие	801,0 $\pm$ 13,0	457,0 $\pm$ 89,0*	529,0 $\pm$ 48,0	432,0 $\pm$ 57,0*	366,0 $\pm$ 18,0*
Печень	929,0 $\pm$ 23,0	718,0 $\pm$ 19,0*	908,0 $\pm$ 34,0	769,0 $\pm$ 87,0*	712,0 $\pm$ 31,0*
Почки	864,0 $\pm$ 18,0	714,0 $\pm$ 7,0*	871,0 $\pm$ 19,0	539,0 $\pm$ 39,0*	718,0 $\pm$ 16,0*

тивность альдозазы фруктозо-1,6-бисфосфата, глюкозофосфатизомеразы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы нарастала ( $p < 0,01$ ). Особенно выражены были эти изменения в печени, миокарде, легких и эритроцитах животных 1-й группы. Выявленная нами закономерность изменения активности ферментов гликолиза и ПФЦ носила односторонний характер и коррелировала с глубиной и длительностью К-авитаминоза у крыс, содержащихся на витамин К-дефицитной диете 4—6 нед.

Сходные результаты были получены и у животных 3-й группы, что не противоречит данным литературы [5]. Обнаруженные изменения, вероятно, носят компенсаторный характер и могут являться в условиях К-авитаминоза следствием первичного ингибирования аэробных окислительных реакций в митохондриях [15]. Это нашло подтверждение при определении активности глутаматдегидрогеназы (табл. 2). Во всех исследованных тканях активность глутаматдегидрогеназы снижалась и прежде всего в тех тканях, в которых нарастала активность ключевых ферментов гликолиза и ПФЦ (печень, легкие, почки). Следствием изменения направленности метаболизма в тканях К-авитаминозных животных является, очевидно, развитие дефицита восстановленных эквивалентов НАД $\cdot$ H<sub>2</sub> и НАДФ $\cdot$ H<sub>2</sub>.

Пищевой К-авитаминоз сопровождался также снижением содержания в тканях ДНК ( $p < 0,01$ ). Аналогичные результаты были получены и у животных 3-й группы (табл. 3). Учитывая большое структурное сходство и некоторую общность механизма биологического действия п-хинонов (витаминов К и Е), исследовали изменение

содержания ДНК в тканях К-авитаминозных животных при дополнительном введении в организм  $\alpha$ -токоферола. Полученные результаты свидетельствуют, что  $\alpha$ -токоферол способствует сохранению нормального уровня ДНК.

Таким образом, можно сделать вывод, что метаболические нарушения имеют одинаковый характер как в условиях пищевого К-авитаминоза, так и при длительном введении в организм антивитаминов К — производных оксикумарина, широко используемых в настоящее время в клинике при лечении сердечно-сосудистых заболеваний.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Асатиани В. С. Ферментные методы анализа. — М., 1969. — С. 596—601.
2. Богданов Н. Г. // Экспериментальная витаминология. — Минск, 1979. — С. 58—79.
3. Богданов Н. Г. // Всесоюзный биохимический съезд, 5-й: Тезисы докладов. — М., 1985. — Т. 1. — С. 279—280.
4. Бурлакова Е. Б. // Там же. — С. 85—85.
5. Воробьева Л. А., Сорокина Л. А. // Уральская науч. конф. физиологов, биохимиков, фармакологов, 7-я: Тезисы докладов. — Ижевск, 1973. — С. 243—244.
6. Каменев В. Ф. // Лаб. дело. — 1974. — № 12. — С. 745—746.
7. Лакин К. М., Крылов Ю. Ф., Еникеева Д. А., Богданов Н. Г. // Фармакол. и токсикол. — 1974. — № 5. — С. 620—624.
8. Ойвин И. А. // Материалы по патологии крови и нарушениям сосудистой проницаемости. — Душанбе, 1959. — С. 149—161.
9. Палладин А. В. // Бюл. экспер. биол. — 1947. — № 4. — С. 239—247.
10. Товарницкий В. И., Волуйская В. И. // Лаб. дело. — 1955. — № 5. — С. 5—7.
11. Хагнер Д. // Методы вирусологии и молекулярной биологии: Пер. с англ. — М., 1972. — С. 184—186.
12. Чазов Е. И., Лакин К. М. // Литикоагулянты и фибринолитические средства. — М., 1977. — С. 54—148.
13. Mameesh M. C., Johnson B. C. // Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.). — 1959. — Vol. 101. — P. 467—468.

14. *Martius C., Nitz-Litzow D.* // Biochim. biophys. Acta. — 1954. — Vol. 13. — P. 152—153.
15. *Wosilait W. D.* // Biochem. Pharmacol. — 1966. — Vol. 15. — P. 204—206.

Поступила 12.11.86

# ON THE MECHANISM OF VITAMIN K EFFECT ON ENZYMATIC ACTIVITY IN GLYCOLYSIS AND PENTOSE PHOSPHATE CYCLE

V. A. Lider

Medical School, Izhevsk

Effect of naphthoquinone levels on the activity of enzymes involved in glycolysis and pentose phosphate cycles was studied in male rats. Under conditions of primary and secondary K-avitaminosis the enzymatic activity, limiting these cycles, (aldolase of fructose-1,6-diphosphate, glucose phosphate isomerase and glucose-6-phosphate dehydrogenase) was increased, while the mitochondrial glutamate dehydrogenase activity was decreased. As a result of metabolic transformations under conditions of K-avitaminosis (primary and secondary) concentration of DNA in the animal tissues was lowered.

УДК 616.379-008:64-092.9-07:616.155.1-008.943.7-02:612.275.1

Н. Е. Тихонова, Э. М. Кучук

## ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ВЫСОКОГОРЬЯ НА СВЯЗЫВАНИЕ ИНСУЛИНА ЭРИТРОЦИТАМИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АЛЛОКСАНОВОМ ДИАБЕТЕ

Институт физиологии им. И. П. Павлова АН СССР, Ленинград, Киргизский медицинский институт, Фрунзе

У жителей высокогорья областей Киргизии редко встречается сахарный диабет, причем течение его характеризуется относительной легкостью [1, 4]. В более легкой форме, чем в условиях равнины, протекает в высокогорье и аллоксановый диабет у крыс [2]. У этих животных в процессе адаптации к высокогорью повышается потребление глюкозы мышечной и жировой тканями [5, 6], что, по-видимому, зависит от прямого эффекта инсулина. Как известно, инсулин усиливает проницаемость клеточных мембран этих тканей для глюкозы. Следовательно, возрастание поглощения глюкозы требует повышения доступности инсулина для этих тканей.

Целью настоящего исследования было выяснение некоторых механизмов, обеспечивающих доступность инсулина для тканей и изучение особенностей углеводного гомеостаза в условиях высокогорья.

### Методика

Исследования проведены на 120 крыс-самцах массой 120—150 г в г. Фрунзе (720 м над уровнем моря) и на перевале Тюя-Ашу (3200 м над уровнем моря). Животным после 18 ч голодания внутривенно вводили аллоксан из расчета 170 мг на 1 кг массы тела. Спустя 14 дней 56 диабетических и 50 контрольных животных были исследованы в условиях равнины и высокогорья на 3, 7 и 14-й дни периода адаптации.

Содержание глюкозы в крови определяли орто-толуидиновым методом, содержание инсулина и глюкагона в плазме крови — радиоиммунологическим методом с помощью наборов реактивов Института изотопов (НИИ) для инсулина и фирмы "DRG International" (США) для глюкагона. Связывание инсулина специфическими рецепторами на эритроцитах проводили по методу [14]. На основании анализа рецепторного связывания по методу [17] устанавливали количество мест связывания (рецепторов) на 1 эритроцит и сродство к инсулину для высоко- и низкоаффинного класса рецепторов по методу [13]. Число мест связывания рассчитывали на среднее количество эритроцитов в пробе, составлявшее  $2,8 \cdot 10^9$  клеток в 1 мл.

### Результаты и обсуждение

У крыс при введении аллоксана развивался сахарный диабет, о чем судили по увеличению уровня глюкозы в крови на 14-й день после инъекции ( $p < 0,001$ ). В условиях высокогорья на 3-й день уровень гликемии снизился в равной степени (в 1,7 раза) у контрольных крыс, достигнув нижней границы нормы, а также у диабетических крыс, сохранивших, несмотря на это, в среднем умеренную гипергликемию. На 7-й день отмечалась тенденция к повышению уровня гликемии у животных обеих групп. На 14-й день содержание глюкозы в крови у контрольных животных восстановилось до значений, имевших место на равнине, а у диабетических

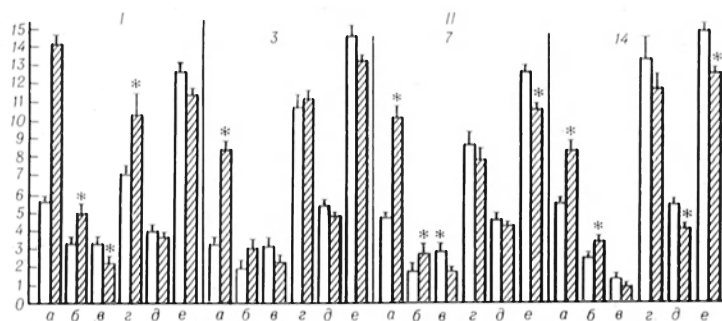


Рис. 1. Содержание в крови крыс глюкозы, инсулина, глюкагона, гемоглобина, эритроцитов и степень рецепторного связывания инсулина эритроцитами в процессе адаптации к высокогорью.

I — равнина; II — высокогорье; 3, 7, 14 — дни адаптации; а — глюкоза (в ммоль/л); б — инсулин (в мкЕд/мл·10<sup>-1</sup>); в — глюкагон (в пг/мл·10<sup>-2</sup>); г — связывание инсулина эритроцитами (в %); д — эритроциты (в число клеток на 1 л·10<sup>12</sup>); е — гемоглобин (в г/л·10<sup>-1</sup>). Светлые столбики — контроль, заштрихованные — аллоксановый диабет; звездочка — достоверное различие между показателями контрольной и опытной групп.

крыс оставалось сниженным, что свидетельствовало о благоприятной динамике сахарного диабета (табл. 1).

Содержание глюкагона в крови животных опытной группы было выше, чем у контрольных, во все периоды наблюдения ( $p < 0,05$ ). Динамика этого показателя в процессе адаптации к высокогорью характеризовалась первоначальным снижением у животных обеих групп с последующей тенденцией к восстановлению.

Содержание инсулина в крови у диабетических крыс было ниже, чем у контрольных, во все изученные периоды и особенно низким на 14-й день. Следует отметить, что и у животных контрольной группы в условиях высокогорья уровень инсулина в крови был ниже, чем у крыс в условиях равнины ( $p < 0,001$ ).

У диабетических животных в равнинных условиях связывание инсулина специфическими рецепторами на эритроцитах было выше, а содержание инсулина в крови, напротив, — ниже, чем у контрольных животных (см. рис. 1, 2). Это свидетельствует в пользу выявленного для инсулина механизма саморегуляции рецепторного взаимодействия. Обнаружено, что более высокий уровень связывания инсулина эритроцитами крови диабетических крыс в условиях равнины обусловлен повышенным сродством к инсулину рецепторов, относящихся к высоко- и низкоаффинному классу, количество же рецепторов на клетку у диабетических крыс было ниже, чем у контрольных (83 против 137).

В процессе адаптации к высокогорью у контрольных животных (см. рис. 2, А) на 3-й день уровень связывания инсулина эритроцитами возрос ( $p < 0,05$ ), на 7-й день он несколько снизился, а на 14-й день снова значительно увеличился ( $p < 0,001$ ). Активация инсулин-рецепторного взаимодействия обуславливалась увеличением количества связывающих мест на клетку в 3 раза и умеренным возрастанием сродства к инсулину низкоаффинного класса рецепторов.

У диабетических крыс в процессе адаптации к высокогорью связывание инсулина эритроцитами изменялось менее существенно. На 3-й день оно было примерно таким же, как и у подопытных животных в условиях равнины, на 7-й день уровень связывания инсулина снизился, а на 14-й день снова возрос до исходных значений и даже несколько превысил их. При этом сродство рецепторов к инсулину мало изменялось, хотя количество рецепторов на клетке увеличилось почти в 2 раза. Таким образом, уровень инсулин-рецепторного взаимодействия в условиях равнины был выше у диабетических крыс, однако в условиях высокогорья он возрос у них в меньшей мере, чем у контрольных животных, и у них оказалось меньше занятых рецепторов в эритроците (155 против 416). Это указывает на снижение адаптационных возможностей к условиям высокогорья у крыс с аллоксановым диабетом.

В высокогорье у контрольных и аллоксандиабетических крыс возросло



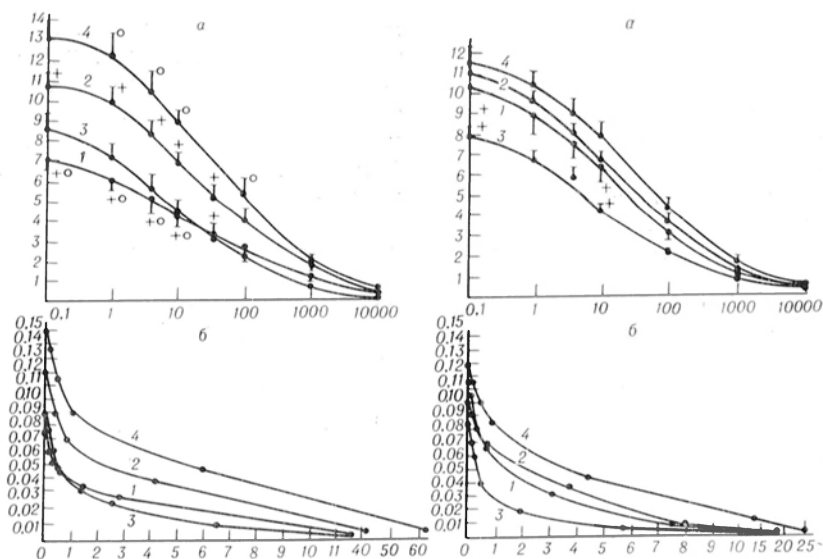


Рис. 2. Рецепторное связывание инсулина эритроцитами у контрольных крыс (слева) и при аллоксановом диабете (справа) в процессе адаптации к высокогорью. *а* — конкурентные вытеснения  $^{125}\text{I}$ -инсулина немеченным гормоном; *б* — специфическое связывание  $^{125}\text{I}$ -инсулина эритроцитами в координатах графика Скэтчарда. На верхних рисунках по оси абсцисс — концентрация немеченого инсулина (в нг/мл); по оси ординат — связанный  $^{125}\text{I}$ -инсулин (в %). На нижних рисунках: по оси абсцисс — количество связанного  $^{125}\text{I}$ -инсулина (в нг/мл); по оси ординат — отношение связанного  $^{125}\text{I}$ -инсулина к свободному. 1 — равнина; 2, 3, 4 — 3, 7, 14-й дни адаптации. Статистически достоверная разница между группами 1 и 2 или 3 обозначена +, между группами 1 и 4 обозначена кружком.

количество эритроцитов в 1 мл крови ( $p < 0,01$ ) и увеличилось содержание гемоглобина в крови ( $p < 0,01$ ), хотя у диабетических крыс эти изменения были менее значительными.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в процессе адаптации к высокогорью меняются не только эритропоэтические показатели — количество эритроцитов и уровень гемоглобинов в крови, но и чувствительность клеток к инсулину. Так, у контрольных и диабетических крыс в условиях высокогорья снижалось содержание инсулина в крови, однако это не привело к резкому возрастанию уровня гликемии. У контрольных крыс при этом уровень глюкозы в крови не менялся, а у диабетических констатировалась гипергликемия. Однако в обеих группах, и особенно в контрольной, у крыс возросло специфическое связывание инсулина эритроцитами крови. Представляется, что изменение этой функции может быть рассмотрено в качестве возможного фактора, включающегося в механизм адаптации организма к условиям высокогорья.

Известно, что в условиях высокогорья имеет место гипобарическая гипоксия. Адаптация к ней с адекватным

снабжением тканей кислородом обеспечивается двумя механизмами: путем увеличения содержания в эритроцитах 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ), который является главным регулятором сродства гемоглобина к кислороду, и за счет повышения продукции эритропоэтина и увеличения количества циркулирующих в крови эритроцитов. 2,3-ДФГ является продуктом гликолиза в эритроцитах, его содержание зависит от активности инсулинзависимых ферментов: гексокиназы и дифосфоглицератмутаза. Уже в первые часы пребывания в условиях гипоксии резко усиливается гликолиз в эритроцитах и возрастает уровень 2,3-ДФГ, достигая максимума через 24 ч [8, 10, 15]. При этом заметно снижается сродство гемоглобина к кислороду и кислород становится более доступным для тканей [9, 20]. Не исключено, что усиление активности гликолиза и повышенное образование 2,3-ДФГ в эритроцитах происходит при участии инсулина. Вероятно, поэтому инсулин начинает более интенсивно связываться с эритроцитарными рецепторами. На участие инсулина в механизме увеличения уровня 2,3-ДФГ в эритроцитах указывает снижение 2,3-

ДФГ и других фосфорилированных интермедиатов гликолиза в эритроцитах больных сахарным диабетом [16, 19].

По-видимому, усиление связывания инсулина эритроцитами в первые дни пребывания в горах обусловлено необходимостью обеспечить активный гликолиз в клетках, повысить в них уровень 2,3-ДФГ, который определяет более низкое сродство гемоглобина к кислороду и более легкую отдачу последнего тканям, испытывающим кислородное голодание.

Известно, что гипоксия может стимулировать в 6—8 раз скорость продукции эритроцитов из костного мозга в циркуляцию. При этом происходит «омоложение» эритроцитарной популяции за счет выхода в кровь ретикулоцитов из депо [8]. Количество специфических рецепторов на эритроцитах в большей мере зависит от возраста клетки, причем оно значительно выше на менее зрелых клетках. Так, ретикулоцит содержит в несколько раз больше связывающих мест на своей поверхности, чем зрелый эритроцит [7, 12, 18]. Вероятно, увеличение инсулин-рецепторного взаимодействия, отмеченное у крыс в высокогорье, объясняется изменением возрастного состава эритроцитов в крови. Количество эритроцитов в 1 мл крови возрастает у крыс в процессе адаптации к высокогорью, но степень их зрелости не анализировалась. Интересно отметить, что в молодых эритроцитах и ретикулоцитах концентрация 2,3-ДФГ выше, чем в зрелых эритроцитах, а сродство гемоглобина к кислороду в них ниже, чем во всей популяции эритроцитов [3, 11]. Это хорошо согласуется с большей связывающей способностью, т. е. с большей чувствительностью этих клеток к инсулину.

Фазность изменения уровня инсулин-рецепторного взаимодействия на эритроцитах можно объяснить следующим: в первые 3—4 дня пребывания в горах связывание инсулина эритроцитами повышается, по-видимому, за счет увеличения в крови менее зрелых форм эритроцитов, интенсивно покидающих депо, и за счет некоторого снижения уровня инсулина в крови. На 7—8-й день запасы ретикулоцитов и молодых эритроцитов в костном мозге, как и в депо, могут быть снижены, вследствие того что новообразование клеток является относительно более

медленным процессом, чем выброс готовых форм. Этим можно объяснить снижение инсулин-рецепторного связывания в этот период. Примечательно, что и количество эритроцитов в 1 мл крови и содержание гемоглобина в эти сроки не повышались. Отмеченное на 14-й день увеличение инсулин-рецепторного связывания можно объяснить тем, что костный мозг к этому времени уже обеспечил дополнительный выход вновь образованных ретикулоцитов в кровь. Действительно, у крыс обеих групп к этому сроку несколько возросли показатели эритропоэза.

Более интенсивное связывание инсулина рецепторами на эритроцитах отражает, по-видимому, общий процесс, свойственный и другим инсулин-зависимым тканям. Косвенно это подтверждается данными, в соответствии с которыми в условиях высокогорья повышается потребление глюкозы жировой тканью и увеличивается ее чувствительность к инсулину [5, 6]. Возрастание клеточной и тканевой чувствительности к инсулину, характерное как для интактных, так и (в меньшей степени) для диабетических крыс в условиях высокогорья, обеспечивает более интенсивный метаболизм глюкозы. Это может в какой-то степени смягчить течение диабета. Тем не менее относительная легкость и меньшая частота сахарного диабета в горных условиях требуют более детального изучения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бугрова А. Е. // Труды Кирг. мед. ин-та. — 1977. — Т. 123. — С. 78—82.
2. Джумалиев А. Д. // Сов. здравоохран. Киргизии. — 1973. — № 3. — С. 7—11.
3. Иржак Л. И. Гемоглобины и их свойства. — М., 1975.
4. Калюжный И. Т., Жарова В. Д. // Труды Кирг. мед. ин-та. — 1975. — Т. 105. — С. 23—34.
5. Копытин Б. М., Джумалиев А. Д., Кучук Э. М. // Здравоохран. Киргизии. — 1979. — № 2. — С. 35—38.
6. Кучук Э. М., Копытин Б. М., Джумалиев А. Д. // Актуальные проблемы эндокринологии. — Фрунзе, 1979. — С. 71—72.
7. Лейбуш Б. П., Кольчев А. П., Бондарева В. М. // Онтогенез. — 1984. — Т. 15, № 3. — С. 290—296.
8. Павлов А. Д. // Молекулярные механизмы адаптации эритроцитов. — Рязань, 1979. — С. 5—10.
9. Симановский Л. П. // Бюл. эксп. биол. — 1976. — Т. 81. — С. 415.

10. Соловьев А. И. // Молекулярные механизмы адаптации эритроцитов. — Рязань, 1979. — С. 118—120.
11. Edwards M. J., Rigas D. A. // J. clin. Invest. — 1967. — Vol. 46. — P. 1579.
12. Eng J., Lee L., Jallow P. S. // Diabetes. — 1980. — Vol. 29. — P. 164—166.
13. Kahn C. R., Freuehet P., Roth J. // J. biol. Chem. — 1974. — Vol. 249. — P. 2249—2257.
14. Mc Elduff A., Eastman C. J. // Aust. J. exp. Biol. med. Sci. — 1981. — Vol. 59. — P. 439—448.
15. Quartini U., Lieciardi A. // Boll. Soc. ital. Biol. sper. — 1983. — Vol. 59. — P. 553—559.
16. Scionti L., Puxeddu A., Calabrese G. et al. // Horm. Metab. Res. — 1982. — Vol. 14. — P. 233—236.
17. Skatchard G. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1949. — Vol. 51. — P. 660—672.
18. Thomopoulos P. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1978. — Vol. 85. — P. 1460—1465.
19. Tillmann W., Merten A., Lakomek M. et al. // Blut. — 1981. — Bd 43. — S. 125—128.
20. Winders R. L., Farber M., Atkinson K. F.,

Manfredi F. // Comp. Biochem. Physiol. — 1974. — Vol. 49-A. — P. 287—290.

Поступила 21.11.86

## EFFECT OF HIGH ALTITUDE ON BINDING OF INSULIN WITH ERYTHROCYTES IN ALLOXAN DIABETES

N. E. Tikhonova, E. M. Kuchuk

I. P. Pavlov Institute of Physiology, Academy of Sciences of the USSR, Leningrad, Medical School, Frunze

Alterations in content of glucose, insulin and glucagon in blood as well as binding of insulin with specific erythrocyte receptors were studied in 120 rats with alloxan diabetes and in intact animals. Content of insulin and glucagon was decreased in rat blood within 14 days of maintaining at high altitude, whereas glycemia developed only slightly. Binding of insulin with erythrocytes was increased more distinctly in control rats, which exhibited low index of this function at low altitude. Importance of this mechanism in activation of cellular glycolysis, an increase of 2,3-diphosphate glucose level in erythrocytes as a compensatory response to high altitude hypoxia are discussed.

УДК 616.348-006-008.931:577.152.633]:616.348-006-008.939.15

Л. М. Берштейн, И. Г. Ковалева, И. В. Правосудов

## УСИЛЕНИЕ ГЕТЕРООТВЕТА АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ В ОПУХОЛЯХ ТОЛСТОЙ КИШКИ: СВЯЗЬ С ЛИПИДНЫМ СОСТАВОМ ТКАНИ

НИИ онкологии им. проф. Н. Н. Петрова Минздрава СССР, Ленинград

Трансформация гормонозависимости ткани при развитии в ней опухоли может носить количественный или качественный характер. Показано, что в некоторых новообразованиях, исходящих, в частности из коры надпочечников, аденилатциклаза — АЦ (КФ 4.6.1.1), мембранный фермент, участвующий в передаче гормонального сигнала посредством образования 3',5'-АМФ, приобретает способность реагировать на неспецифические, необычные для данной ткани гормоны [7, 12]. Аналогичный феномен обнаружен в клеточных линиях опухолей легких (BEN) и молочной железы (MCF-7, T-47D) человека, в которых найдена АЦ, реагирующая на кальцитонин [11]. Механизм подобного явления, обозначенного как усиление гетероответа АЦ [2], и его значение окончательно не выяснены, хотя высказано предположение, что возникновение реакции на неспецифические

гормоны может быть следствием экспрессии так называемых «эктопических» рецепторов [8, 12] и показано, что появление у новообразований молочной железы чувствительности к кальцитонину способствует реализации антипролиферативного эффекта последнего *in vitro* [9]. В целях дальнейшего анализа данного вопроса исследовали особенности гормональной регуляции АД в ткани рака прямой и ободочной кишки и сопоставляли полученные результаты с липидным составом опухолей, принимая во внимание роль физико-химических свойств клеточных мембран в осуществлении функции биологического распознавания [1].

### Методика

Материал для исследования от 29 больных (ткань опухоли и внешне нормальный участок слизистой оболочки кишечника, расположенный на максимально возможном удалении от

нее) получали во время операции. После гомогенизации при 0—4 °С в 10 объемах 0,05 М трис-НСl-буфера рН 7,5, фильтрации через капрон и центрифугирования при 2200 g определяли активность АЦ [6] в осадочной фракции, которую суспендировали в том же буфере. Инкубационная среда с общим объемом 200 мкл содержала 0,05 М трис-НСl, 2 мМ ЭДТА, 10 мМ кофеина, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ АТФ, 20 мМ креатинфосфата и 0,5 мг/мл фосфокреатинкиназы; время инкубации 20 мин при 37 °С. Реакцию останавливали кипячением проб на водяной бане в течение 3 мин. Образующийся в результате реакции цАМФ определяли с помощью наборов фирмы «Amersham» (Англия). Общй и свободный холестерин (ХС) и фосфолипиды в опухолевой ткани определяли методами опубликованными ранее [3], содержание белка — по методу Лоури. В работе использовали: а) β-агонисты (стимуляторы «общего» действия) — адреналин конечная концентрация 10<sup>-4</sup>М, «Reanal» (ВИП) и изопротеренол, 10<sup>-4</sup> М («Серва»); б) факторы с тропностью к тканям энтероанкреатической системы (специфические стимуляторы) — вазоактивный интестинальный полипептид, 10<sup>-7</sup>М (ВИП) и глюкагон 2×10<sup>-5</sup>М («Серва», ФРГ); в) неспецифические гормоны — хронический гонадотропин (ХГ) 1,5·10<sup>-8</sup> М («Reanal»), тиреотропин 400 м. е./мл («Армур»), свиной кальцитонин 2·10<sup>-5</sup>М, а также фторид натрия 5·10<sup>-3</sup>М (ч. д. а., СССР). Влияние ВИП и глюкагона на АЦ оценивали в присутствии ГТФ, 10<sup>-4</sup>М («Reanal»). Полученные данные подвергали статистической обработке<sup>1</sup>.

## Результаты и обсуждение

Базальная активность во внешне нормальной ткани кишечника составляла в среднем 29,2±2,9 пмоль цАМФ/мг белка/20 мин, а в ткани

опухоли — 25,5±2,5 пмоль цАМФ/мг белка/20 мин. Под воздействием всех факторов, за исключением кальцитонина, в опухолевой ткани несколько снижалась и относительная активность (ОА) АЦ, которую выражали отношением стимулированной активности к исходной активности фермента, некоторое увеличение ОА АЦ при действии кальцитонина в сочетании с уменьшением ее при влиянии ВИП и глюкагона свидетельствовало о достоверном и избирательном увеличении соотношения реакции фермента на кальцитонин/ВИП и кальцитонин/глюкагон в опухоли по сравнению с внешне нормальной слизистой оболочкой кишечника (табл. 1). Избирательность относительного усиления реакции на кальцитонин подтверждается и сравнительными данными о частоте обнаружения в опухоли большей (не менее чем в 1,5 раза по сравнению с нормальной тканью) величины ОА АЦ на различные стимуляторы (табл. 2).

Более частое увеличение ОА АЦ в ткани новообразований относительно реакции фермента на кальцитонин было свойственно группе опухолей с относительно более высоким содержанием ХС и его фракций (см. табл. 2). Это подтверждается и величиной коэффициента ранговой корреляции по Спирмену (с отношениями общй ХС/фосфолипиды  $r=+0,69$  и свободный ХС/фосфолипиды  $r=+0,70$ ,  $p<0,05$ ). Следует отметить, что в новообразованиях ободочной кишки содержание общего ХС и его эфиров снижено, а содержание свободного ХС повышено по сравнению с таковыми опухолями прямой кишки, и на этом фоне в них

<sup>1</sup> Выражаем признательность д-ру Л. А. Гендролису (Каунасский завод эндокринных препаратов) и проф. V. Mutt (Королевский институт, Стокгольм, Швеция), предоставивших для исследования соответствующие кальцитонин и вазоактивный интестинальный полипептид.

Таблица 1

Стимуляция ОА АЦ в опухолевой и нормальной тканях кишечника

Ткань	Относительная ОА АЦ								Соотношение ОА			
	адреналин	изопреналин	фторид натрия	ВИП	глюкагон	кальцитонин	тир.отроп. ппн	хор.гонолин	кальцитонин/ВИП	кальцитонин/глюкагон	тир.отроп.п/глюкагон	хор.гонолин/глюкагон
Опухоль	1,08±0,15	1,42±0,22	2,76±0,32	1,31±0,21	1,10±0,09	1,09±0,14	0,72±0,10	0,67±0,12	1,03±0,12*	1,34±0,14*	0,84±0,08	0,77±0,08
Нормальная слизистая оболочка кишечника	1,39±0,11	1,52±0,41	3,43±0,38	1,53±0,12	1,38±0,31	0,97±0,10	0,88±0,17	0,71±0,11	0,60±0,07	0,88±0,06	0,78±0,07	0,73±0,12

Примечание. Звездочкой отмечено  $p<0,05$ .

Содержание липидов и реакция в опухолевой ткани

Стимуляторы или соотношение реакций на них АЦ	Частота усиления ОА АЦ, в %	Липидный состав опухолей, характеризовавшихся большей (по сравнению с нормальной тканью) реакцией АЦ на соответствующее воздействие		
		эфир ХС, %	общий ХС фосфолипиды	свободный ХС фосфолипиды
Адреналин	11,6	11,6	0,302	0,285
ВИП	20,0	2,4	0,257	0,252
Фторид натрия	20,7	13,8	0,363	0,308
Глюкагон	20,7	15,2	0,364	0,315
Тиреотропин	22,2	12,1	0,328	0,285
Тиреотропин/глюкагон	22,2	18,3	0,406	0,319
Хориогонин	26,7	12,2	0,330	0,282
Изопреналин	26,7	8,8	0,341	0,305
Хориогонин/глюкагон	26,7	30,9	0,506	0,348
Адреналин/глюкагон	27,8	24,4	0,438	0,324
Кальцитонин	38,5	14,5	0,440	0,359
Кальцитонин/глюкагон	61,5	22,9	0,478	0,359
Кальцитонин/ВИП	66,7	15,5	0,406	0,328

чаще наблюдалось относительное усиление реакции АЦ на кальцитонин (данные не представлены).

Таким образом, показано, что усиление гетероответа АЦ (в первую очередь на кальцитонин) наблюдается и при раке толстой кишки. Частота обнаружения этого явления коррелирует с липидным составом опухолевой ткани. Изменения последнего могут отражаться на свойствах клеточных мембран [1, 13] и (косвенно) на функционировании генома [10], что в совокупности, по-видимому, способствует экспрессии эктопических рецепторов для неспецифических гормонов. С другой стороны, в этих условиях не исключена и возможность качественной и количественной модификации G(N)-белков, объединяющих мембранные рецепторы и каталитическую субъединицу АЦ в единый АЦ-комплекс [14]. Обсуждение причин различий в частоте усиления гетероответа АЦ между новообразованиями прямой и ободочной кишки, избирательности эффекта кальцитонина, а также прикладных аспектов работы выходит за рамки настоящей статьи. Тем не менее следует подчеркнуть, что полученные данные говорят о возможности регуляции гормоночувствительности опухолевой ткани путем воздействий на липидный состав опухолевых клеток, в частности при помощи средств, устраняющих проявления синдрома канкрофилии [4, 5].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бергельсон Л. Д. Мембраны, молекулы, клетки. — М., 1982.
2. Берштейн Л. М. // Всесоюзный симпозиум по циклическим нуклеотидам, 5-й: Тезисы. — Рязань, 1985. — С. 41.
3. Берштейн Л. М., Ковалева И. Г. // Вопр. онкол. — 1985. — № 8. — С. 85—89.
4. Берштейн Л. М., Ковалева И. Г., Розенберг О. А. // Бюл. экспер. биол. — 1985. — № 9. — С. 334—336.
5. Дильман В. М. Эндокринологическая онкология. — Л., 1983.
6. Ткачук В. А., Балденков Г. И. // Биохимия. — 1978. — Т. 43, № 6. — С. 1097—1110.
7. Юдаев И. А., Афиногенова С. А., Казеев К. И., Жукова Т. В. // Там же. — 1981. — Т. 46, № 1. — С. 55—61.
8. Cikes M. // Europ. J. Cancer. — 1978. — Vol. 14, N 3. — P. 211—215.
9. Iwasaki Y., Iwasaki J., Freake H. C. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1983. — Vol. 110, N 1. — P. 235—242.
10. Manzoli F. A., Capitani S., Maraldi N. M. // Advanc. Enzyme Regulat. — 1979. — Vol. 17. — P. 175—194.
11. Martin T. J., Moseley J. M., Findlay D. M. // Hormones in Normal and Abnormal Tissues. — Berlin, 1981. — Vol. 1. — P. 429—457.
12. Schorr J., Ney R. L. // J. clin. Invest. — 1971. — Vol. 50, N 5. — P. 1295—1300.
13. Shinitzky M. // Biochim. biophys. Acta. — 1984. — Vol. 738, N 2. — P. 251—261.
14. Rodbell M. // Nature. — 1980. — Vol. 284, N 5751. — P. 17—22.

Поступила 20.11.86

# AMPLIFICATION OF ADENYLATE CYCLASE RESPONSE UNDER CONDITIONS OF COLON TUMORS: RELATION TO THE TISSUE LIPID COMPOSITION

L. M. Berstein

N. N. Petrov Institute of Oncology, Leningrad

Hormonal regulation of the adenylate cyclase activity was studied in tumors of rectum

УДК 612.313.1.015.1:577.152.344.042.2

Т. П. Вавилова, Н. И. Ларионова, Ю. А. Петрович

## ИНГИБИТОРЫ ТРИПСИНОПОДОБНЫХ ПРОТЕИНАЗ СМЕШАННОЙ СЛЮНЫ ЧЕЛОВЕКА

Московский медицинский стоматологический институт им. Н. А. Семашко, МГУ им. М. В. Ломоносова

Смешанная слюна (С) животных и человека содержит высоко- и низкомолекулярные ингибиторы сериновых и тироновых протеиназ [6, 7, 13, 14]. В состав С наряду с секретом слюнных желез входят микроорганизмы, слущенные эпителиальные клетки, лейкоциты. Предполагается, что сывороточные и местносинтезируемые ингибиторы, предотвращая деструкцию клеток, выполняют защитную функцию [14]. Среди здоровых лиц  $\alpha_1$ -ингибитор протеиназ определяется в С у  $1/3$  обследованных,  $\alpha_2$ -макроглобулин — у 9 %, антитилкопротеиназа — у 100 % [14]. При пародонтите активность протеиназ в С возрастает [1, 7, 8]. Вместе с тем при воспалении пародонта активность  $\alpha_1$ -ингибитора протеиназ падает [7], а активность кислотостабильных ингибиторов меняется в зависимости от степени воспаления: при легкой степени снижается, при тяжелой возрастает [6]. Неясно, с чем связано в большинстве случаев изменение ингибиторной емкости С: с уменьшением поступления в С ингибиторов или повышенным их расходом при образовании комплекса фермент — ингибитор. Выяснение поставленных вопросов связано с методическими трудностями, возникающими при работе со столь неоднородной и сложной по составу биологической жидкостью.

Целью данной работы явилась разработка доступной для клиники методики определения высоко- и низкомолекулярных ингибиторов трипсиноподобных протеиназ в С человека с последующим исследованием их активности при воспалении пародонта.

and colon. A relative increase in sensitivity of the enzyme to inappropriate stimulators (especially to calcitonine) and lowering of the adenylate cyclase response in presence of more specific effectors (glucagon) were observed in 35-40 % cases of these tumors. The positive correlation was found between the frequency of adenylate cyclase response and the content of cholesterol and its fractions in the tumor tissues. Possible hormone-dependent mechanisms in the tumor tissues are discussed.

### Методика

В работе использовали следующие препараты: трипсин бычий, «Spofa»; этиловый эфир N- $\alpha$ -бензоил-L-аргинина солянокислый (БАЭЭ), «Sigma»; трис-HCl, «Calbiochem» и реактивы отечественного производства.

**Обработка смешанной слюны.** Часть хорошо перемешанной и свежесобранной С центрифугировали при 8000 об/мин в течение 30 мин. Для исследования отбирали надосадок, который хранили при 4 °С.

**Получение термостойкообработанной С (ТКС).** 1 мл хорошо перемешанной С смешивали с равным объемом 6 % ТХУ, выдерживали 30 мин при 4 °С, затем 10 мин при 60 °С и центрифугировали 30 мин со скоростью 8000 об/мин. Надосадок подщелачивали насыщенным раствором  $K_2CO_3$  до pH 8,0 [3, 10].

**Определение БАЭЭ-эстеразной активности** проводили при 25 °С, добавляя 0,1—0,2 мл С к смеси, состоящей из 1,8—1,9 мл 1/15 М фосфатного буфера pH 8,0, содержащего  $2 \cdot 10^{-3}$  М ЭДТА (рабочий буфер) и 1 мл  $1,5 \cdot 10^{-3}$  М раствора БАЭЭ в том же буфере. Изменение оптической плотности регистрировали на спектрофотометре «Векспан», модель 35, против контрольной пробы, содержащей 2 мл буфера и 1 мл раствора БАЭЭ при длине волны 253 нм. БАЭЭ-эстеразную активность С вычисляли (в мкмоль на 1 л в 1 мин) по формуле [5]

$$\frac{E_{253}/\text{мин} \cdot 2,73 \cdot 1000}{a} \quad (\text{в мкмоль на 1 л в 1 мин}),$$

где  $E_{253}$  — прирост оптической плотности за 1 мин при 253 нм; 2,73 — пересчетный коэффициент для вычисления количества БАЭЭ, гидролизованного в пробе при данных условиях (в мкмоль);  $a$  — количество С, взятой для анализа (в мл); 1000 — пересчет на 1 л слюны.

**Определение анитриптической активности (АТА) С и ТКС.** В кюветах смешивали 0,1 мл С или 0,2 мл ТКС с 5 мкг трипсина в 0,1 мл  $10^{-3}$  М раствора HCl, содержащего 0,033 М  $CaCl_2$  и рабочий буфер (общий объем 2 мл). Смесь выдерживали 5 мин при 25 °С и добавляли к ней 1 мл  $1,5 \cdot 10^{-3}$  М раствора БАЭЭ в рабочем буфере. Изменение  $E_{253}$  регистрировали.



стрировали как и при определении БАЭЭ-эстеразной активности. АТА вычисляли (в мкмоль на 1 л в 1 мин) по формуле

$$\frac{(E_{253}/\text{мин}, K - E_{253}/\text{мин}, i) \times}{a} \quad \text{(в мкмоль на 1 л в 1 мин),}$$

где  $E_{253}/\text{мин}$ ,  $K$  и  $E_{253}/\text{мин}$   $i$  — прирост оптической плотности за 1 мин при 253 нм соответственно в контрольной и опытной пробах. Контрольная проба содержала 5 мкг трипсина в  $10^{-3}$  М растворе  $\text{HCl}$ , 0,033 М  $\text{CaCl}_2$ , рабочий буфер и 1 мл  $1,5 \cdot 10^{-3}$ ,  $a$  — количество  $S$ , взятой в пробу (в мл),  $b$  — разведение  $S$  при добавлении ТХУ.

## Результаты и обсуждение

Точное определение ингибиторов протеиназ в биологических жидкостях и тканевых экстрактах представляет собой трудную задачу. Согласно основополагающим работам [11], необходимо проводить преинкубацию протеиназы с раствором, содержащим ингибитор, при  $25^\circ\text{C}$ , время инкубации не должно превышать 5 мин с тем, чтобы не происходило активирования проферментов, прогрессивного торможения «медленно реагирующими ингибиторами», а также ферментной инактивации ингибиторов и автолиза протеиназ. Кроме того, указывается [11], что казеин и гемоглобин как субстраты не должны использоваться для определения ингибиторов протеиназ, так как они не обеспечивают специфичности, короткого времени и низкой температуры инкубации. По этой причине при обработке метода определения АТА в  $S$  и ТКС были использованы различные условия эксперимента.

Изучение возможности применения 0,05 М и трис- $\text{HCl}$ , 0,1 М вероналового и 1/15 М фосфатного буферов для определения АТА в  $S$  показало, что наиболее воспроизводимые результаты могут быть получены в 1/15 М фосфатном буфере pH 8,0, содержащем

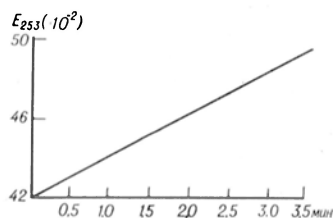


Рис. 1. Оптическая плотность ( $E_{253}$ ) раствора  $S$  при использовании трис- $\text{HCl}$  в качестве среды инкубации (0,5 мл  $S$  + 2,5 мл  $5 \cdot 10^{-2}$  М трис- $\text{HCl}$  pH 8,0).

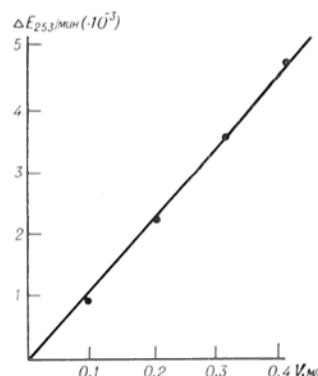


Рис. 2. БАЭЭ-эстеразная активность в зависимости от объема  $S$ .

$2 \cdot 10^{-3}$  М ЭДТА. Добавление комплекса в буфер не влияет на активность трипсина и позволяет не только использовать  $\text{Ca}^{2+}$  для активации и стабилизации растворов трипсина, но и предупредить помутнение растворов, появляющееся во время измерения, что может явиться существенным источником ошибок [11]. Центрифугирование  $S$  также позволяет снизить мутность растворов при определении эстеразной активности и АТА. Трис- $\text{HCl}$ -буфер нельзя использовать для корректного определения обеих активностей смешанной  $S$ , поскольку добавление  $S$  к буферу даже в отсутствие субстрата вызывает значительное изменение оптической плотности при 253 нм во времени (рис. 1). Кроме того, специальными экспериментами показано, что торможение не изменяется при инкубации трипсина с различными образцами  $S$  в течение 5—15 мин. Комплекс фермент — ингибитор образуется уже через 5 мин, поэтому преинкубация в дальнейшем продолжалась 5 мин.

При определении АТА следует учитывать величину БАЭЭ-эстеразной активности  $S$ . В каждом конкретном случае скорость гидролиза БАЭЭ под действием  $S$  прямо пропорциональна объему  $S$ , добавленному в кювету спектрофотометра (рис. 2). Поэтому БАЭЭ-активность  $S$  можно определять в 0,1—0,5 мл  $S$ . Величина БАЭЭ-активности  $S$  в норме колеблется в пределах от 43,7 до 163,8 мкмоль на 1 л в 1 мин и в 38 % случаев не определяется. При воспалении слизистой оболочки полости рта БАЭЭ-активность также не определяется в 41,2 % случа-

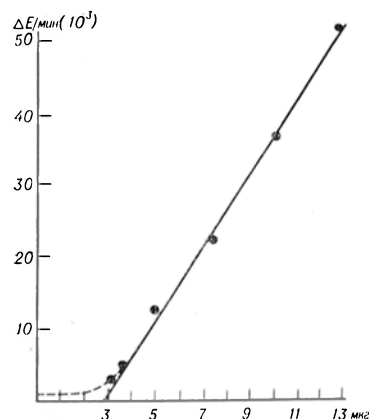


Рис. 3. Кривая титрования 0,4 мл ТКС трипсином.

По оси абсцисс — количество трипсина в пробе.

ев и колеблется от 0 до 109 мкмоль на 1 л в 1 мин. Среднее значение при патологии составляет  $41 \pm 10$  мкмоль на 1 л в 1 мин, что значительно ниже, чем у лиц без патологии пародонта ( $102 \pm 20$  мкмоль на 1 л в 1 мин). Некоторые количественные различия в данных, полученных ранее [1, 7], возможно, связаны с использованием трис-HCl-буфера.

Ингибиторы трипсиноподобных протеиназ, содержащиеся в С человека, способны образовывать с трипсином довольно прочный комплекс, поэтому АТА может быть измерена в С путем титрования определенного ее объема растворами фермента различной концентрации (рис. 3). С другой стороны, АТА характеризуется линейной функцией в пределах от 0 до 0,7 мл ТКС (рис. 4). В связи с этим, для удобства сопоставления результатов при использовании различных образцов С,

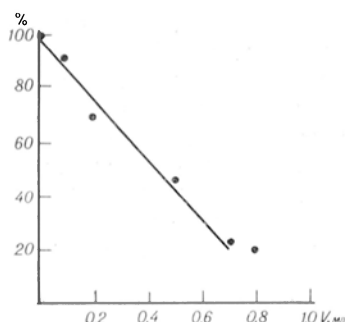


Рис. 4. Зависимость ингибирования трипсина (3,3 мг) от объема ТКС.

По оси абсцисс — объем ТКС; по оси ординат — остаточная активность трипсина (в %).

БАЭЭ-эстеразная и антитриптическая активность в смешанной слюне человека (в мкмоль на 1 л в 1 мин)

Группа обследуемых	БАЭЭ-активность	АТА смешанной слюны	АТА термостойкой слюны
Здоровые лица (n=12)	$102 \pm 20$	$140 \pm 26$	$414 \pm 68$
Больные пародонитом (n=22)	$41 \pm 10$	$60 \pm 18$	$616 \pm 74$
p	<0,05	<0,05	<0,05

выбрали объемы С и ТКС 0,1 и 0,2 мл соответственно и количество трипсина в пробе 5 мг, так как наиболее достоверные результаты получены при степени ингибирования в пределах 30–70 % [5, 11].

У лиц без патологии зубочелюстной системы АТА в С обнаружена во всех исследуемых образцах, причем она выше БАЭЭ-эстеразной активности (см. таблицу). По-видимому, в С протеиназы находятся в комплексе с их природными ингибиторами, причем избыточное количество ингибиторов подавляет диссоциацию комплексов. О достаточной прочности комплексов протеиназ С в норме с их природными ингибиторами, свидетельствует тот факт, что в случае определения БАЭЭ-эстеразной активности С при добавлении синтетического субстрата не наблюдается конкурентного вытеснения ингибиторов и скорость образования N-бензоил-L-аргинина является постоянной. Возможность использования конкурентного вытеснения для оценки прочности комплекса фермент — белковый ингибитор была показана ранее на примере трипсина и панкреатического ингибитора [2]. При термостойкой обработке С у лиц без патологии пародонта АТА увеличивалась в 1,5–10 раз. Увеличение АТА после обработки С, по-видимому, связано с наличием в С значительного количества комплексов протеиназ с термостойкими ингибиторами трипсиноподобных протеиназ. При воспалении пародонта АТА обнаруживается только в 50 % случаев и колеблется от 0 до 254 мкмоль на 1 л в 1 мин. Сопоставление БАЭЭ-эстеразной активности и АТА у больных с пародонитом не выявило прямой или обратной зависимости между ними в каждом конкретном случае. После терм-

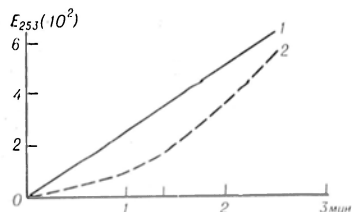


Рис. 5. Кинетика выделения продукта гидролиза БАЭЭ под действием равновесной смеси трипсин+ТКС в норме (1) и при пародонтите (2).

кислотной обработки С при пародонтите АТА во всех случаях значительно возрастает. Это указывает на значительную активность термокислостабильных ингибиторов в С при воспалении. В результате в С при воспалении наблюдается снижение БАЭЭ-активности и АТА. Увеличение АТА при термокислотной обработке С при пародонтите может быть связано не только с освобождением ингибиторов из комплексов с протеиназами, но и из лейкоцитов, количество которых в С при воспалении увеличивается. Существенно, что для ингибиторов протеиназ в лейкоцитах установлена способность связывать тиоловые и сериновые протеиназы [12].

Активность термокислостабильных ингибиторов в С при пародонтите в несколько раз превышает АТА ТКС у здоровых лиц. Это связано с различиями в ингибирующих свойствах. Так, комплексы ингибиторов с трипсином при пародонтите менее прочны, чем в норме. Это следует из конкурентного вытеснения термокислостабильных ингибиторов, которое отчетливо проявляется при исследовании кинетики АТА (рис. 5). Увеличение во времени скорости гидролиза субстрата, добавленного к комплексу белкового ингибитора с ферментом, вызывается смещением равновесия:  $EI \xrightleftharpoons[k=1]{E+I}$  в сторону диссоциации комплекса [2]. Подобное явление наблюдали при патологии в 50 % случаев, в то время как у здоровых лиц этого не отмечалось.

Выявленные изменения в ингибирующих свойствах термокислостабильных ингибиторов при пародонтите могут быть связаны с образованием их частично расщепленных форм под действием различных протеиназ (таких, как катепсины, слабощелочные

протеиназы лейкоцитов), поскольку имеются сведения об увеличении активности этих ферментов при воспалении [6, 7, 8] и частичном протеолизе ингибиторов протеиназами лейкоцитов при эндобронхитах [4, 9, 15, 16].

Таким образом в смешанной С человека определена активность термолабильных и термостабильных ингибиторов протеиназ. Термокислотная обработка С приводит к увеличению АТА. При пародонтите АТА в ТКС значительно возрастает, что объясняется освобождением ингибиторов из комплексов с протеиназами, присутствующих в жидкой части С, а также, возможно, из лейкоцитов. При пародонтите термокислостабильные ингибиторы образуют комплекс с трипсином, отличающийся от подобного комплекса, образуемого данными ингибиторами в норме.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Барабаш Р. Д. Энзимологические механизмы в патогенезе воспалительно-дистрофического поражения пародонта: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1981.
2. Ларионова Н. И., Казанская Н. Ф., Якубовская Р. И. // Биохимия. — 1979. — Т. 44, № 1. — С. 3—17.
3. Партикова В. Ф., Оглоблина О. Г., Якубовская Р. И. и др. // Современные методы в биохимии. — М., 1977. — С. 192—204.
4. Оглоблина О. Г. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 1. — С. 3—13.
5. Пасхина Т. С., Егорова Г. П., Зыкина В. П. и др. // Современные методы в биохимии. — М., 1968. — Т. 2. — С. 232—261.
6. Пустовойт Е. В., Оглоблина О. Г., Сорочинская Е. И., Пасхина Т. С. // Стоматология. — 1985. — № 5. — С. 35—38.
7. Хоменко Л. А. Ферменты протеолиза и их ингибиторы в патогенезе, диагностике и лечении пародонтита: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Киев, 1979.
8. Шайдуллина Х. М. Активность лизосомальных протеиназ в слюне, слизистой оболочке десны и зубном налете при различных состояниях пародонта: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 1984.
9. Burnett D., Stockley R. A. // Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. — 1980. — Bd 361. — S. 781—789.
10. Fritz H., Oppitz K. H., Mecke D. et al. // Ibid. — 1969. — Bd 350. — S. 1541—1550.
11. Fritz H., Trantschold J., Werle E. // Bergmeyer H. U. Methoden der enzymatischen Analyse. — Weinheim, 1970. — Bd 2. — S. 1021—1038.
12. Kopitar M., Brzin G. J., Vonar T. Z. et al. // FEBS Lett. — 1978. — Vol. 91, N 2. — P. 355—359.
13. Minakata K., Minoru A. // Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. — 1984. — Bd 365. — S. 399—403.

14. Ohlsson M., Rosengren M., Tegner H., Ohlsson K. // Ibid. — 1983. — Bd 364. — S. 1324—1328.
15. Rasche B. // Atemwegs — Lungenkr. — 1980. — Bd 6. — S. 5—8.
16. Stockley R. A., Burnett D. // Amer. Rev. resp. Dis. — 1979. — Vol. 120. — P. 1081—1096.

Поступила 28.11.86

#### INHIBITORS OF TRYPSIN-LIKE PROTEINASES IN HUMAN MIXED SALIVA

T. P. Vavilova, N. I. Larionova, Ya. A. Petrovich

Medical Stomatological School, M. V. Lomonosov State University, Moscow

Both BAEE esterase and antitryptic activities (ATA) were studied in mixed saliva of

healthy persons and of patients with parodontosis. The ATA was measured in the saliva supernatant and in mixed saliva after thermo-acid treatment. The BAEE esterase activity was not found in 38 % of healthy persons and in 41.2 % of the patients with parodontosis; its mean values were lower in parodontosis as compared with normal state. The ATA could be measured in the saliva supernatant in Tris-HCl buffer; the activity was decreased in the saliva supernatant of the patients with parodontosis. Thermo-acid treatment increased the ATA values. In parodontosis ATA was increased 1.5-fold after the treatment, which appears to occur due to liberation of inhibitors from the complexes with proteins found in saliva and/or from leukocytes. In some cases the inhibitory properties of ATA were dissimilar in parodontosis after the thermo-acid treatment.

УДК 616.153.96-02:616.153:577.112.853

Н. А. Зорин

### ПАРАДОКСАЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ СУЛЬФАТИРОВАННЫХ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ С БЕЛКАМИ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

ЦНИЛ Новокузнецкого института усовершенствования врачей

Сульфатированные гликозаминогликаны (СГАГ) являются одним из главных компонентов соединительной ткани [2, 3] и в небольших количествах содержатся в составе плазмы крови [8] и мочи [10]. В щелочной среде они активно реагируют с белками сыворотки крови, изменяя их заряд и соответственно электрофоретическую подвижность [4, 5]. Однако вопрос о возможности подобных реакций в условиях, приближенных к физиологическим, пока не изучался.

Гидрофобные белки и СГАГ изменяют заряд и при реакции с катионными детергентами — четвертичными аммонийными солями, такими как цетилтриметиламмония бромид (ЦТАБ) [6, 7, 9]. Небольшие (до 0,1 г/л) концентрации ЦТАБ достаточны для формирования преципитатов гликозаминогликанов (ГАГ) при использовании метода биоспецифического электрофореза [7] и способны резко увеличивать катодную подвижность преципитатов белков сыворотки крови в случаях применения методов количественного иммуноэлектрофореза [6]. Таким образом, в щелочной среде СГАГ и ЦТАБ оказывают на белки крови прямо противоположное действие. Целью данной работы было изучение реакций между белками сыворотки крови,

СГАГ и ЦТАБ в единой аналитической системе при различных значениях pH среды.

#### Методика

Сыворотка крови была получена от 10 беременных женщин (III триместр беременности) и использовалась либо в нативном виде, либо после хранения при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Для идентификации антигенов, входящих в ее состав, применяли метод перекрестного иммуноэлектрофореза с промежуточным гелем, в который вводили ту или иную моноспецифическую антисыворотку [1]. Полный спектр антигенов изучали с помощью козьей антисыворотки против белков сыворотки крови человека (НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи — НИИЭМ) и кроличьей антисыворотки против белков сыворотки крови беременных женщин [4—6]. Отдельные антигены идентифицировали с использованием моновалентных антисывороток против иммуноглобулинов (НИИЭМ), орозомукоида,  $\alpha_1$ -антитрипсина, гаптоглобина и трансферрина («Sevas», Чехословакия). Моноспецифические антисыворотки против альбумина, ассоциированного с беременностью  $\alpha_2$ -гликопротеина (АБГ) и трофобластического  $\beta_1$ -гликопротеина (ТБГ) были получены путем внутрикожной иммунизации кроликов высокоочищенными препаратами указанных белков [4].

Использовали калиевую соль гиалуроновой кислоты («Реахим», СССР), натриевую соль гепарина («Srofa», Чехословакия) и N-цетил-N, N, N-триметиламмония бромид («Merck», ФРГ), применявшиеся без дальнейшей очистки.

Реакции между белками сыворотки крови, СГАГ и ЦТАБ изучали при помощи комбинации перекрестного биоспецифического и имму-

ноэлектрофореза [1; 7]. Электрофорез в первом направлении (зональный электрофорез сыворотки крови) во всех случаях проводили в 1 % агарозном геле (агароза-L, ЛКВ, Швеция;  $m_r = 0,02$ ) в течение 1 ч при градиенте потенциала 10 В/см. Для этих целей использовали электрофоретический комплекс Mulliphor (ЛКВ, Швеция), а также 0,02 М буферы pH 6,6, 8,7 и 10,0 [11]. В гель первого направления электрофореза предварительно вводили различные количества СГАГ (от 0,1 до 10 мг/мл). По окончании разделения зональные электрофореграммы вырезали и переносили на край стеклянной пластины-подложки (рис. 1, на вклейке). Для обнаружения белков сыворотки крови, обладающих высоким сродством к ЦТАБ, рядом с гелем первого направления электрофореза формировался агарозный гель, содержащий 0,001 % ЦТАБ. Примыкающий к нему участок агарозного геля ограничивал гель с ЦТАБ от геля, содержащего антисыворотку (см. рис. 1). Электрофорез во втором направлении проводили в течение 16 ч при градиенте потенциала 2 В/см. Полученные иммуноэлектрофореграммы обрабатывали по общепринятым методикам [1]. Их сначала окрашивали 0,1 % раствором аллианового голубого («Loba Chemie», Австрия), что позволяло выявить ГАГ, а затем 0,5 % раствором амидо черного 10 В («Reanal», ВНР) для обнаружения преципитатов антиген — антитело [1]. Реакции считали достоверными, если миграция преципитатов изменялась по сравнению с контрольными иммуноэлектрофореграммами не менее чем на 5 %.

### Результаты и обсуждение

При использовании конвенциональных условий иммуноэлектрофореза (pH 8,7) был обнаружен дозозависимый эффект концентрации СГАГ (см. рис. 1). Малые концентрации хондроитин-4-сульфата (0,1 мг/мл) увеличивали анодную миграцию всех антигенов сыворотки крови на 17—20 % (см. рис. 1). Анодная подвижность возрастала при электрофорезе как в первом, так и во втором направлении. Увеличение концентрации данного полисахарида до 1 мг/мл снижало анодную миграцию антигенов сыворотки на 12—15 % при электрофорезе в первом направлении, но в равной мере увеличивало ее при электрофорезе во втором направлении. Максимальная из используемых концентраций (10 мг/мл) полисахарида снижала миграцию в первом направлении в среднем на 60 %, а часть антигенов приобретала выраженную катодную подвижность (см. рис. 1). Одновременно в равной пропорции возрастала анодная подвижность преципитатов, в том числе аффинного преципитата, формирующегося в зоне геля, содержащего ЦТАБ.

Минимальные концентрации гепарина (0,1 мг/мл) увеличивали анодную миграцию преципитатов на 10—15 %, подвижность же аффинного преципитата возрастала на 60 %. Десятикратное увеличение содержания его в геле первого направления электрофореза повышало миграцию антигенов в среднем на 25 %. При концентрации полисахарида 10 мг/мл анодная подвижность антигенов снижалась на 10 %, но возрастала при электрофорезе во втором направлении. Следует отметить, что анодная миграция аффинного преципитата возрастала в среднем на 60 % как в первом, так и во втором направлении электрофореза.

При pH 6,6 на контрольной иммуноэлектрофореграмме преципитаты глобулинов смещались в гель, содержащий ЦТАБ, а аффинный преципитат формировался в геле первого направления электрофореза (рис. 2, см. вклейку). Наименьшая концентрация гепарина увеличивала анодную миграцию некоторых антигенов (орозомуконида,  $\alpha_1$ -антитрипсина) на 10—30 %, тогда как подвижность большей части белков сыворотки крови в первом направлении электрофореза практически не менялась. Подобная картина наблюдалась и при увеличении концентрации гепарина до 1 мкг/мл. Большая концентрация полисахарида резко изменяла картину электрофореза (см. рис. 2). Подвижность антигенов в первом направлении электрофореза возрастала на 15—22 %, но существенно снижалась во втором. Преципитаты были растянуты вплоть до стартовой лунки и имели неправильную форму, а аффинный преципитат полностью исчезал.

Сходным образом протекали реакции белков сыворотки крови с хондроитин-4-сульфатом. Однако во всех случаях возрастала катодная миграция антигенов в первом направлении электрофореза обратно пропорционально количеству полисахарида, введенного в реакцию. Это явление наблюдалось при электрофорезе как в первом направлении, так и во втором.

В высокощелочной среде (pH 10,0) введение СГАГ в гель первого направления электрофореза не влияло на миграцию антигенов независимо от количества полисахаридов.

Таким образом, в нейтральной и слабощелочной среде СГАГ оказыва-

ют дозозависимое парадоксальное действие на электрофоретическую подвижность белков сыворотки крови. Малые концентрации полисахаридов увеличивают анодную подвижность антигенов, тогда как значительные — резко снижают ее. По-видимому, в первом случае гидрофобные молекулы СГАГ неспецифически реагируют с белками сыворотки крови, образуя относительно небольшие отрицательно заряженные комплексы. Во втором случае, по-видимому, размеры этих комплексов существенно возрастают и препятствуют их миграции в агарозном геле. С этих позиций становится объяснимой увеличенная подвижность преципитатов антигенов во втором направлении электрофореза. Вероятно, в условиях максимального насыщения СГАГ антигенные детерминанты белков сыворотки крови оказываются заблокированными, вследствие чего они теряют часть антигенных свойств и их реакции с антителами протекают по типу частичной антигенной идентичности [1]. Подобным образом гепарин ведет себя в условиях ракетно-линейного иммуноэлектрофореза, где он вытесняет белки сыворотки крови из комплексов с гиалуронатом [4]. ЦТАБ в этих условиях практически не оказывает влияния на реакции между белками и СГАГ. Зато он активно реагирует с определенными компонентами сыворотки крови, связывая их в виде аффинных преципитатов. Возможно, эти соединения являются протеогликанами, так как аффинные преципитаты окрашиваются как алциановым голубым, так и амидо черным 10В. Это подтверждается также отсутствием реакций между белками, ГАГ и ЦТАБ при незначительных концентрациях гепарина [6, 7, 9]. В противном случае наблюдалась бы картина линейного биоспецифического электрофореза [7]. Увеличение площади аффинных преципитатов и ограничение их анодной подвижности в первом направлении в присутствии больших концентраций СГАГ, по-видимому, объясняются вытеснением из комплексов ЦТАБ избытком полисахаридов. Обратное явление — уменьшение площади преципитатов СГАГ — ранее наблюдалось при введении в реакцию избытка белков сыворотки крови [7]. Следует отметить, что подобные явления конкуренции за рецептор более выражены

для предполагаемых протеогликанов сыворотки крови и гликопротеинов, чем для альбумина, не содержащего в своей структуре глицидных компонентов.

Все вышеизложенное наиболее характерно для условий конвенционального иммуноэлектрофореза, который проводится при pH 8,6. При pH 6,6 и малой концентрации гепарина увеличение анодной подвижности характерно лишь для аффинного преципитата и выраженных гликопротеинов, таких как орозомукоид и ТБГ. Высокие концентрации данного полисахарида вызывают растягивание преципитатов. Форма их становится асимметричной, появляются дополнительные пики преципитации, имеющие идентичную антигенную природу. Ранее сходное явление было обнаружено при изучении миграции ТБГ в гелях, содержащих гепарин [5]. Эти явления могут быть прежде всего связаны с закупориванием пор геля крупными комплексами из СГАГ и белков сыворотки крови. Кроме того, они свидетельствуют о гетерогенности некоторых белков по степени сродства к СГАГ. В указанных условиях аффинный преципитат из протеогликанов сыворотки крови и ЦТАБ не образуется. Вероятно, причиной этого являются вышеуказанные реакции конкуренции, протекающие иным образом, чем в щелочных условиях.

Высокощелочная среда практически не позволяет СГАГ вступать в реакцию с белками сыворотки крови, но не влияет на биоспецифические взаимодействия.

Парадоксальные реакции сывороточных белков и СГАГ имеют глубокий биологический смысл. В условиях недостаточного насыщения гидрофобные молекулы СГАГ обладают выраженными дезагрегатными свойствами. Они препятствуют связям, основанным на электростатических взаимодействиях, т. е. угнетают реакции агглютинации [2, 3], вытесняют белки из комплексов с гиалуронатом [4] и снижают активность реакций антиген — антитело. Избыток их, напротив, ведет к образованию крупных комплексов. Возможно, белки сыворотки крови реагируют подобно структурным гликопротеинам соединительной ткани, соединяясь друг с другом цепочками СГАГ. Не исключено, что такие комплексы



уже могут быть гидрофильными. Таким образом, реакции СГАГ с белками и катионным детергентом ЦТАБ определяются соотношениями этих компонентов и pH окружающей среды.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что СГАГ в зависимости от концентрации и pH среды могут обладать как дезагрегантными, так и агрегирующими свойствами. В слабокислой среде белки сыворотки крови проявляют наибольшее сродство к СГАГ, тогда как в щелочной среде их реакция с данными полисахаридами сходна с реакцией индивидуальных антигенов и снижается пропорционально росту pH. Комбинация перекрестного биоспецифического и иммуноэлектрофореза позволяет обнаруживать в составе сыворотки крови соединения, обладающие высоким сродством к ЦТАБ, и оценивать в идентичных условиях реактивность СГАГ по отношению к ним и иным антигенам сыворотки крови.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Аксельсен П., Крелль И., Вееке Б. // Руководство по количественному иммуноэлектрофорезу: Методы и применение: Пер. с англ. — М., 1977.
2. Бычков С. М. // Вопр. мед. химии. — 1981. — № 6. — С. 726—736.

3. Бычков С. М., Захарова М. М. // Там же. — 1979. — № 3. — С. 227—237.
4. Зорин Н. А. // Там же. — 1983. — № 5. — С. 41—43.
5. Зорин Н. А., Зорина Р. М. // Там же. — 1984. — № 4. — С. 26—28.
6. Зорин Н. А., Кривоносов С. К. // Там же. — № 6. — С. 143—144.
7. Зорин Н. А., Себелева О. А. // Там же. — 1986. — № 2. — С. 134—137.
8. Ali S. J. // Biochim. biophys. Acta. — 1969. — Vol. 177, N 3. — P. 641—643.
9. Bhakdi S., Bhakdi-Lehnen B., Bjerrum O. J. // Ibid. — 1977. — Vol. 470, N 5. — P. 35—44.
10. Dobre V. // Rev. roum. Biochim. — 1980. — Vol. 11. — N 11. — P. 23—26.
11. Pluzek K., Bjerrum O. J. // J. biochem. biophys. Meth. — 1982. — Vol. 6, N 4. — P. 261—265.

Поступила 01.12.86

#### PARADOXICAL REACTIONS OF SULFATED GLYCOSAMINOGLYCANS WITH HUMAN BLOOD SERUM PROTEINS

N. A. Zorin

Medical School, Novokuznetsk

Sulfated glycosaminoglycans at low concentrations exhibited desaggregating properties in neutral and weakly-alkaline media, whereas these substances at high concentrations possessed aggregating characteristics as shown by combination of biospecific and immunoelectrophoreses. Features of the phenomenon observed as well as specific reactions of proteins, glycosaminoglycans and cationic detergents are discussed.

УДК 612.822.1:547.466.3].014.46:615.214.3

Т. Л. Карасева, Ж. И. Цапенко, Н. Я. Головенко, С. Э. Тимофеева,  
Н. Г. Лукьяненко

#### ОБМЕН ГАММА-АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС В УСЛОВИЯХ ВВЕДЕНИЯ ИМ НООТРОПНЫХ СРЕДСТВ

Физико-химический институт им. А. В. Богатского АН УССР, Одесса

Положительное влияние гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) и ее производных (пирацетама, оксибутирата натрия, пантогама и др.) на обменные процессы в нервных клетках и выраженное антигипоксическое и антиамнестическое их действие привели к широкому использованию этих соединений в клинической практике в качестве так называемых «ноотропных» средств [10]. Однако механизмы их действия во многом остаются неясными и малоизученными. По данным одних авторов [4], пирацетам по характеру действия на центральную нерв-

ную систему (ЦНС) имеет элементы сходства с основными известными ГАМК-ергическими веществами: аминалоном, оксибутиратом натрия, и при многократном его введении в больших дозах усиливается активность ГАМК в ЦНС. Другие исследователи [1] не отмечают такого влияния, а связывают механизмы действия ноотропов с обменом моноаминов в ЦНС.

Ранее нами были синтезированы и изучены фармакологические свойства азокраун-эфиров, содержащих в своей структуре циклические и линейные фрагменты ГАМК, которые обладают

высокой ноотропной активностью, превосходящей по эффекту пирацетам [5, 11].

Цель данной работы — изучить влияние N, N-бис-пирролидинометил-диазо-18-краун-6 и пирацетама на систему превращения ГАМК в ткани головного мозга крыс.

### Методика

Опыты проводили на 120 белых крысах-самцах массой 180—220 г. Азакраун-эфир и пирацетам вводили внутривентрикулярно в физиологическом растворе в фармакологически активных дозах (соответственно 100 и 400 мг/кг) однократно и многократно (7 дней).

Крыс декапитировали, мозг замораживали в жидком азоте в течение 3 мин после декапитации. Обработку мозговой ткани проводили, как описано в работе [13]. Навески мозга массой 1 г гомогенизировали в 10 мл 80 % раствора этанола. После центрифугирования в течение 20 мин при 5000 об/мин осадок промывали в 10 мл 80 % раствора этанола и объединенный фильтрат выпаривали досуха на водяной бане. Выпаренный экстракт растворяли в 3,5 мл подкисленного бидистиллата и производили дальнейшую очистку экстракта от липидов в соответствии с работой [8].

Разделение ГАМК и глутаминовой кислоты осуществляли методом тонкослойной хроматографии аминокислот на пластинках Silufol-254 в 80 % водном растворе фенола по методу [2]. Количественное содержание ГАМК в гомогенате головного мозга крыс определяли спектрофотометрически с помощью прибора «Specol-10» [7].

Активность ГАМК-трансаминазы (ГАМК-Т; КФ 2.6.1.19) в митохондриях головного мозга крыс определяли по приросту глутаминовой кислоты [9]. Инкубационная смесь состояла из 0,5 мл митохондрий в трис-ацетатном буфере pH 8,2, 0,1 мл 0,02 % пиридоксальфосфата (ПАЛФ), 0,05 мл (40 мкмоль) ГАМК, 0,05 мл (40 мкмоль)  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты, 0,5 мл трис-ацетатного буфера. Пробы инкубировали 1 ч при 37 °C. Реакцию останавливали добавлением 0,2 мл 25 % раствора трихлоруксусной кислоты. После центрифугирования 5 мкл надосадочной жидкости (НОЖ) наносили на пластинку.

При определении активности глутаматдекарбоксилазы (ГДК; КФ 4.1.1.15) инкубационная смесь состояла из 0,5 мл 10 % гомогената в калий-фосфатном буфере pH 7,0, 0,081 мкмоль ПАЛФ в 0,5 мл калий-фосфатного буфера pH 6,2 и 10 мкмоль глутаминовой кислоты в конечном объеме 2 мл. После 1 ч инкубации при 37 °C в атмосфере азота реакцию останавливали 10 мл 96 % этанола и пробы оставляли на 24 ч при комнатной температуре. Затем пробы центрифугировали при 3000 g в течение 15 мин, НОЖ переносили в испарительные чашки, осадок промывали 1,0 мл 76 % раствором этанола, объединенную НОЖ выпаривали на водяной бане досуха, сухой остаток ресуспендировали в 2,0 мл воды и центрифугировали при 10 000 g в течение 45 мин. НОЖ выпаривали досуха, осадок растворяли в 0,4 мл воды и пробы по 5 мкл наносили на пластинку [8, 9].

Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования [8], содержание белка определяли по Лоури [14].

Для количественного определения ДНК и РНК гомогенат головного мозга крыс обрабатывали по методу Шнейдера 10 % хлорной кислотой. Содержание ДНК и РНК определяли спектрофотометрически на «Specol-10» по методу [12].

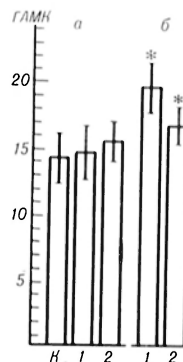
Данные обрабатывали статистически, используя *t*-критерий Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

Как свидетельствуют данные, представленные на рисунке, через 1 ч после однократного введения азакраун-эфира с пирролидиновыми фрагментами общее содержание ГАМК в гомогенате головного мозга крыс достоверно не изменяется. Содержание ГАМК в контроле и опыте составляет соответственно 14,05 и 14,64 мкмоль на 1 г сырой ткани мозга. Нами не отмечено также изменений и в активности ферментов ГАМК-Т и ГДК в головном мозге крыс (табл. 1).

Пирацетам, введенный однократно в дозе 400 мг/кг, также не изменяет существенно общего содержания ГАМК и активности ГАМК-Т и ГДК, что находит подтверждение в литературе [6].

Эффекты ноотропов и, в частности, пирацетама, проявляются только при их длительном введении в больших дозах. Поэтому нами изучалось также влияние азакраун-эфира и пирацетама на активность ГАМК-Т и ГДК, общее содержание ГАМК в головном мозге крыс в указанных дозах в течение 7 дней.



Общее содержание ГАМК (в мкмоль на 1 г ткани) в гомогенатах головного мозга крыс при однократном (а) и многократном (б) введении им азакраун-эфира и пирацетама в дозах 100 и 400 мг/кг соответственно.

К — контроль; 1 — азакраун-эфир; 2 — пирацетам; n=15. Звездочкой отмечено  $p < 0,05$ .

Т а б л и ц а 1

Изменение ферментативной активности ГАМК-Т и ГДК головного мозга крыс при однократном и многократном введении азакраун-эфира (100 мг/кг) и пирацетама (400 мг/кг) ( $M \pm m$ ;  $n=15$ )

Соединение	Активность ГАМК-Т и митохондрих, мкмоль глутаминной кислоты на 1 мг белка в 1 ч		Активность ГДК в гомогенате, мкмоль ГАМК на 1 мг белка в 1 ч	
	однократное	многократное	однократное	многократное
Контроль	$2,12 \pm 0,23$	$2,12 \pm 0,20$	$0,48 \pm 0,06$	$0,33 \pm 0,025$
Азакраун-эфир	$2,08 \pm 0,31$	$1,70 \pm 0,15^*$	$0,40 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,014$
Пирацетам	$1,86 \pm 0,25$	$1,80 \pm 0,14^*$	$0,41 \pm 0,04$	$0,35 \pm 0,022$

Пр и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2 звездочкой отмечено  $p < 0,02$ .

При многократном введении азакраун-эфира по сравнению с однократным применением существенно влияет на общее содержание ГАМК в гомогенате головного мозга крыс (см. рисунок). Так, общее содержание ГАМК в опыте на 40 % выше, чем в контроле. Пирацетам при длительном введении также увеличивает общее содержание ГАМК в головном мозге, но в меньшей степени, чем азакраун-эфир (на 22,1 % относительно контроля). При этом активность ГАМК-Т в митохондриях головного мозга при введении азакраун-эфира и пирацетама снижается на 49,4 и 39,8 % соответственно.

Как свидетельствуют литературные данные, ГАМК-производные могут как ингибировать, так и активировать ГАМК-Т [6]. По данным работы, пирацетам не оказывает влияния на активность ГАМК-Т и содержание ГАМК; в соответствии с другими данными [6] пирацетам в опытах как *in vivo*, так и *in vitro* существенно снижает активность ГАМК-Т, что согласуется с полученными нами результатами.

Результаты проведенных нами исследований не выявили изменений в ферментативной активности ГДК как при однократном, так и многократном введении исследуемых соединений (см. табл. 1).

Увеличение содержания ГАМК в мозге при длительном введении азакраун-эфира и пирацетама объясняется, по-видимому, значительно большим торможением активности ГАМК-Т по сравнению с ГДК, в результате чего скорость образования ГАМК в ткани мозга превышает скорость ее утилизации.

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что азакраун-

эфир и пирацетам при длительном введении влияют на обмен ГАМК в ткани головного мозга крыс. Влияние азакраун-эфира (100 мг/кг) по сравнению с пирацетамом (400 мг/кг) выражено в большей степени при значительно меньшей дозе.

Предполагается, что одним из возможных механизмов действия ноотропов на память и обучение является увеличение синтеза белка и нуклеиновых кислот. Исходя из этого, мы определяли количество белка, ДНК и РНК в гомогенатах головного мозга крыс при однократном и многократном введении азакраун-эфира и пирацетама.

Данные, представленные в табл. 2, свидетельствуют о том, что азакраун-эфир и пирацетам при однократном введении не изменяют содержания белка и нуклеиновых кислот в головном мозге крыс.

В отличие от этого, при длительном введении краун-эфира на 25 % увеличивается содержание белка, соответственно по сравнению с контролем на 32,6 и 36,8 % возрастает содержание ДНК и РНК. Пирацетам увеличивает содержание белка более чем в 2 раза по сравнению с контролем и на 25 % повышает содержание РНК в ткани головного мозга крыс. Полученные нами данные согласуются с мнением других исследователей о том, что пирацетам стимулирует синтез РНК и белков только при многократном введении [3].

Таким образом, результаты проведенных нами исследований свидетельствуют о том, что азакраун-эфир и пирацетам при их длительном введении существенно влияют на обмен ГАМК, содержание белка и нуклеиновых кислот в ткани головного мозга крыс, что

Общее содержание белка и нуклеиновых кислот в гомогенате головного мозга крыс при введении краун-эфира и пирацетама в дозах 100 и 400 мг/кг соответственно ( $n = 18-20$ ;  $*p < 0,05$ )

Соединение	Белок, мг на 1 г сырой массы ткани		ДНК, мг на 1 г сырой массы ткани		РНК, мг на 1 г сырой массы ткани	
	однократно	многократно	однократно	многократно	однократно	многократно
Контроль	$56,62 \pm 3,05$ (100)		$0,77 \pm 0,04$ (100)		$2,17 \pm 0,13$ (100)	
Краун-эфир	$63,21 \pm 3,56^*$ (111,6)	$71,43 \pm 5,67^*$ (126,0)	$0,47 \pm 0,01^*$ (60,8)	$1,02 \pm 0,01^*$ (132,6)	$2,10 \pm 0,02$ (96,7)	$2,97 \pm 0,04^*$ (136,8)
Пирацетам	$59,51 \pm 7,32$ (105,1)	$128,0 \pm 8,60^*$ (226,07)	$0,42 \pm 0,01^*$ (54,5)	$0,63 \pm 0,005^*$ (82,0)	$2,01 \pm 0,03^*$ (94,0)	$2,74 \pm 0,01^*$ (125,0)

Примечание. В скобках — процентное содержание.

до некоторой степени может служить биохимическим подтверждением механизмов действия ноотропов.

С другой стороны, полученные данные могут служить основой для целенаправленного синтеза и особенно скрининга ноотропов с помощью биохимических моделей, а не сложных и трудоемких моделей, используемых обычно для этой цели.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Алликметс Л. Х., Ряго Л. К. // Всесоюзный симпозиум «Фармакология производных гамма-аминомасляной кислоты»: Тезисы докладов. — Тарту, 1983. — С. 7—8.
2. Ахрем А. А., Кузнецова А. И. Тонкослойная хроматография. — М., 1964. — С. 31—36.
3. Кленикова В. А., Глуценко Г. С., Тунева С., Тунчева У. // Физиол. журн. СССР. — 1982. — Т. 68, № 1. — С. 9—12.
4. Ковалев Г. В. // Фармакология и клиника гамма-аминомасляной кислоты и ее аналогов. — Волгоград, 1979. — С. 11—23.
5. Лукьяненко Н. Г., Богатский А. В., Воронина Т. А. и др. // Хим.-фарм. журн. — 1985. — № 6. — С. 691—693.
6. Никитина З. С., Андреев Б. В., Полевой Л. Г., Сытинский И. А. // Всесоюзный симпозиум «Фармакология производных гамма-аминомасляной кислоты»: Тезисы докладов. — Тарту, 1983. — С. 104—106.
7. Орехович В. И. // Современные методы в биохимии. — М., 1964. — Вып. 1. — С. 162—180.
8. Прохорова М. И. // Методы биохимических исследований. — Л., 1982. — С. 29—32; 241—243.
9. Промыслов М., Соловьева Т. В., Анискина Р. И. // Вопр. мед. химии. — 1968. — № 6. — С. 619—622.
10. Раевский К. С. // Фармакол. и токсикол. — 1981. — № 5. — С. 517—527.
11. Тимофеева С. Э., Воронина Т. А., Карасева Т. Л. и др. // Там же. — 1986. — № 4. — С. 13—15.
12. Чаргафф Э., Дэвидсон Дж. // Нуклеиновые кислоты: Химия и биология: Пер. с англ. — М., 1957. — С. 8—12; 427—429.
13. Шатунова Н. Ф., Сытинский И. А. // Нервная система. — Л., 1962. — Вып. 3. — С. 12—15.
14. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.

Поступила 30.12.86

#### METABOLISM OF $\gamma$ -AMINOBUTYRIC ACID IN RAT BRAIN AFTER ADMINISTRATION OF NOOTROPIC DRUGS

T. L. Karaseva, Zh. N. Tsapenko, N. Ya. Golovenko, S. E. Timofeeva, N. G. Luk'yanenko

Physico-Chemical Institute, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

N, N-bis-pyrrolidonomethyl-diaza-18-crown-6 and pyracetam, which are structural analogues of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) and exhibit nootropic properties, affected the GABA metabolism, the content of total protein, DNA and RNA in rat brain after long-term administration at pharmacologically active doses of 100 mg/kg and 400 mg/kg, respectively. As compared with control values, content of GABA in rat brain was increased by 40 % after administration of N,N-bis-pyrrolidonomethyl-diaza-18-crown-6 and by 28 % — after treatment with pyracetam. At the same time, activity of GABA transaminase was decreased by 49.4 % and 39.8 %, respectively, while the decarboxylase activity was unaltered.

*И. Н. Горшкова, Е. А. Ноева, В. А. Полесский, Н. В. Перова,  
Э. К. Рууге*

## **ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРМОИНДУЦИРОВАННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ЛИПОПРОТЕИДАХ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ГИПОАЛЬФАЛИПОПРОТЕИДЕМИИ И ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА МЕТОДОМ СПИНОВЫХ ЗОНДОВ**

ВКНЦ АМН СССР, Москва

В проблеме выяснения молекулярных механизмов патогенеза атеросклероза особое место занимает исследование взаимосвязи между физико-химическими характеристиками липопротеидов (ЛП) плазмы крови и их функционированием. Согласно современным представлениям [9], липопротеиды высокой плотности (ЛПВП) способны акцентировать холестерин (ХС) с мембран клеток периферических тканей и переносить его в печень для дальнейшего катаболизма. Эта функция ЛП может модулироваться их физико-химическими характеристиками, в частности степенью упорядоченности, физическим состоянием липидов поверхностного слоя частиц, электрическим зарядом поверхности. Многочисленные эпидемиологические и клинические обследования показали, что понижение в плазме крови уровня ХС ЛПВП — гипоальфалиппротеидемия — увеличивает вероятность развития ишемической болезни сердца (ИБС) и других клинических проявлений атеросклероза [2].

Методом ЭПР-спектроскопии спиновых зондов показано, что при гипоальфалиппротеидемии изменяются не только концентрация ЛПВП в плазме крови, но и способность основных подклассов ЛПВП — ЛПВП<sub>2</sub> и ЛПВП<sub>3</sub> связывать спин-меченные производные липидов [8, 6]. При гипоальфалиппротеидемии выявлены также уменьшение проницаемости поверхностного слоя ЛПВП для аскорбата [1], изменение сродства апопротеинов к фосфолипидам [3]. Однако достоверных различий в параметрах спектров ЭПР спиновых зондов, встроенных в гидрофобные области ЛПВП<sub>2</sub> и ЛПВП<sub>3</sub> в норме и при гипоальфалиппротеидемии не установлено [6], несмотря на различный в этих условиях белково-липидный состав частиц [4, 5, 15]. В то же время обнаружено снижение

жидкости липидов в поверхностном слое ЛПВП<sub>2</sub> и ЛПВП<sub>3</sub> больных ИБС по сравнению с контролем [6].

Таким образом, проведенное ранее исследование ЛПВП методом ЭПР поставило вопрос о более детальном изучении структурной организации ЛПВП<sub>2</sub> и ЛПВП<sub>3</sub> при гипоальфалиппротеидемии. Несмотря на то что ЛП, как и биологические мембраны, функционируют в организме при постоянной температуре, существенную информацию о молекулярной организации этих систем, возможной связи между их структурой и функциями могут дать эксперименты с варьированием температуры [12, 13, 19]. Задачей настоящей работы явилось сравнительное исследование термоиндуцированных структурных изменений в поверхностных липидных областях ЛПВП<sub>2</sub> и ЛПВП<sub>3</sub> в норме и при гипоальфалиппротеидемии. Сравнивали также температурное поведение ЛП, выделенных из плазмы крови лиц без признаков ИБС, с нормальным уровнем ХС ЛПВП и с гипоальфалиппротеидемией — риск-фактором ИБС, и ЛП, выделенных из плазмы крови больных ИБС. Все больные ИБС имели атеросклероз венечных артерий, документированный ангиографически. Предварительные результаты наших исследований были опубликованы ранее [7, 14]. О термоиндуцированных перестройках в поверхностном монослое ЛП судили по температурным зависимостям параметров спектров ЭПР, солубилизованных в ЛП спиновых зондов: производных стеариновой кислоты (с парамагнитным фрагментом при атомах С<sub>5</sub> и С<sub>16</sub>), пентадексана, фосфатидилхолина и сфингомиелина.

### **Методика**

В работе использованы ЛП, выделенные из плазмы крови мужчин в возрасте 30—55 лет: больных ИБС и лиц без признаков этого за-

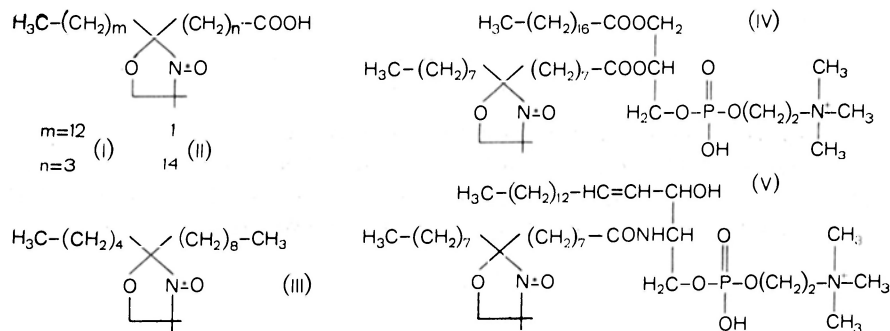


Рис. 1. Структурные формулы спиновых зондов I—V.

болевания. Диагноз ИБС ставился на основе клинического и коронароангиографического обследований, проведенных в стационаре НИИ клинической кардиологии ВКНЦ АМН СССР. Заключение об отсутствии признаков ИБС основывалось на критериях однократного стационарного эпидемиологического обследования в НИИ профилактической кардиологии ВКНЦ АМН СССР.

Выделение ЛПВП<sub>2</sub> и ЛПВП<sub>3</sub> из плазмы крови проводили методом последовательного препаративного ультрацентрифугирования [17] на ультрацентрифуге модели L 5-50 фирмы «Beckman» (ротор 40,3, 38 000 об/мин). Концентрацию ХС и триглицеридов определяли на автоанализаторе ЛА-II фирмы «Technicon». Считали, что гипоальфапопротеидемия соответствует уровню ХС ЛПВП менее 34 мг на 1 дл плазмы, а норме — от 35 до 70 мг на 1 дл плазмы [10]. Выделенные подфракции ЛПВП рецентрифугировали в растворах соответствующих плотностей. Контроль чистоты полученных препаратов ЛПВП<sub>2</sub> и ЛПВП<sub>3</sub> осуществляли (совместно с А. Д. Морозкиным и Н. В. Медведовой) методом скоростной флотации в аналитической ультрацентрифуге модели Е фирмы «Beckman» (США). Оптические измерения в процессе центрифугирования проводили с использованием адсорбционной сканирующей системы ( $\lambda=280$  нм), которая в отличие от шпирен-оптики позволяет количественно оценивать присутствие в образце нефлотирующих в плотности 1,21 г на 1 мл примесей (альбумин и др.), а также примесей, флотирующих в этой плотности быстрее, чем ЛПВП [11]. Для использованных в работе препаратов получены значения коэффициентов флотации  $S_f$ , характерные для ЛПВП<sub>2</sub> (3—9) и ЛПВП<sub>3</sub> (0—3). Препараты ЛП перед началом ЭПР-исследований диализовали против раствора, содержащего 0,14 М NaCl, 2 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 0,01 % ЭДТА, 0,01 М фосфатный буфер pH 7,4.

В качестве спиновых зондов использовали (рис. 1) 5-ДОКСИЛ-стеарат (зонд I) и 16-ДОКСИЛстеарат (зонд II) фирмы «Syva», 6-ДОКСИЛпентадекан (зонд III) (предоставлен д-ром Р. Мельхорном, Калифорнийский университет, США), а также 1-стеарил-2-(9-ДОКСИЛгептадеканойл) - 3-сп-фосфатидилхолин (зонд IV) и N-9-ДОКСИЛгептадеканойл-2R, 3S, 4E-сфингозин-1-фосфатидилхолин (зонд V). Радикалы IV и V синтезированы А. Ю. Мишариным, НИИ экспериментальной кардиологии ВКНЦ АМН СССР. Спин-мече-

нис ЛП производили путем добавления нитроксильных радикалов из концентрированных (10 мМ) спиртовых растворов до конечной концентрации  $(0,4-1,0) \cdot 10^{-4}$  М. «Парамагнитный тушитель» хромоксалат калия  $\text{K}_3[\text{Cr}(\text{C}_2\text{O}_4)_3] \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$  (получен А. А. Тимошиным, физический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова) добавляли к препаратам, меченным зондом III, из концентрированного (0,8 М) раствора до конечной концентрации менее 0,02 М. Регистрацию спектров ЭПР проводили на спектрометрах Е-4 и Е-109Е фирмы «Varian», снабженных системами термостатирования образцов. Измерения проводили при СВЧ-мощности 10—20 мВт, амплитуде ВЧ-модуляции 1 Гс.

Для характеристики структурной упорядоченности окружения спиновых зондов в ЛП использовали следующие параметры [12], оп-

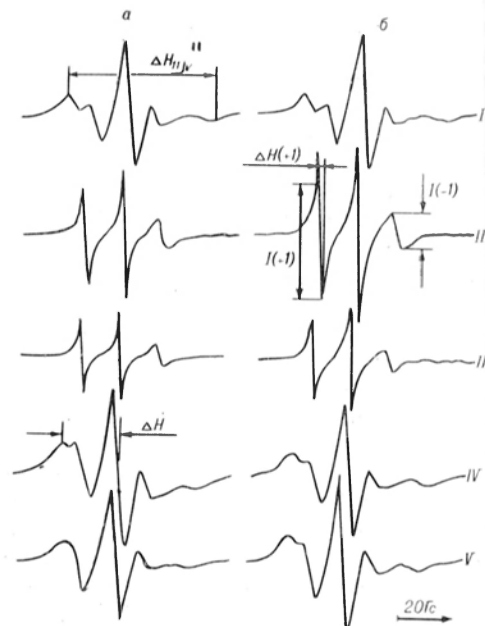


Рис. 2. Спектры ЭПР спиновых зондов I—V в ЛПВП<sub>2</sub> (а) и ЛПВП<sub>3</sub> (б), выделенных из плазмы крови мужчины без признаков ИБС (ХС ЛПВП — 44 мг на 1 дл плазмы), 37 °С. Спектры ЭПР зонда III в ЛП регистрировались в присутствии 15 мМ хромоксалата калия.



ределяемые по спектрам ЭПР (рис. 2): 1) расстояния между крайними экстремумами спектра ( $\Delta H_{\parallel}$ ), а также между низкопольным максимумом и центром среднего компонента спектра ( $\Delta H$ ), характеризующие жидкость окружения радикала; 2) время корреляции вращательной диффузии спиновых зондов  $\tau$ , пропорциональное вязкости локального окружения радикала.  $\tau$  рассчитывали по формуле:

$$\tau = 6,65 \cdot 10^{-10} \Delta H (-1) \{ [I (-1)/I (-1)]^{1/2} - 1 \}, \text{ с.}$$

При построении графиков линейных зависимостей использовали метод наименьших квадратов с учетом критерия  $\chi^2$  при 5 % уровне значимости [16]; при статистической обработке данных использовали критерий Стюдента. Обработку результатов проводили на микро-ЭВМ модели 9825A фирмы «Hewlett Packard».

## Результаты и обсуждение

Известно [12], что точки изломов на графиках температурных зависимостей параметров спектров ЭПР спиновых зондов, встроенных в мембрану, определяют критические температуры, при которых происходят немотонные структурные перестройки в непосредственном окружении парамагнитного фрагмента зонда. Нами были использованы зонды, отличающиеся по химическому строению и месту локализации парамагнитного фрагмента в поверхностном монослое ЛП. Зонды I и II встраивались в фосфолипидные области ЛП так, чтобы парамагнитный фрагмент погружался в липиды на глубину, соответственно  $\sim 8$  и  $\sim 22$  Å [6]. Зонд I может локализоваться и в области белок-липидного контакта [13]. Сравнение кинетики восстановления сигналов ЭПР зондов I, II и III аскорбатом (данные не приведены) показало, что парамагнитный фрагмент спин-меченого пентадекана погружается в поверхностный монослой ЛП на глубину  $\sim 19$  Å. Зонды IV и V располагаются в ЛП, вероятно, таким же образом, как соответствующие компоненты ЛПВП — фосфатидилхолин и сфингомиелин.

Зарегистрированы спектры ЭПР зондов I—V в ЛПВП<sub>2</sub> в интервале температур от 0 до 60 °С. Спектры ЭПР при 37 °С приведены на рис. 2. Для удобства обработки спектров от ЛП, меченных зондом III, к этим препаратам добавляли хромоксалат калия, который путем магнитного диполь-дипольного взаимодействия с радикалами [12] уширяет компоненты спектров ЭПР зондов в среде инкуба-

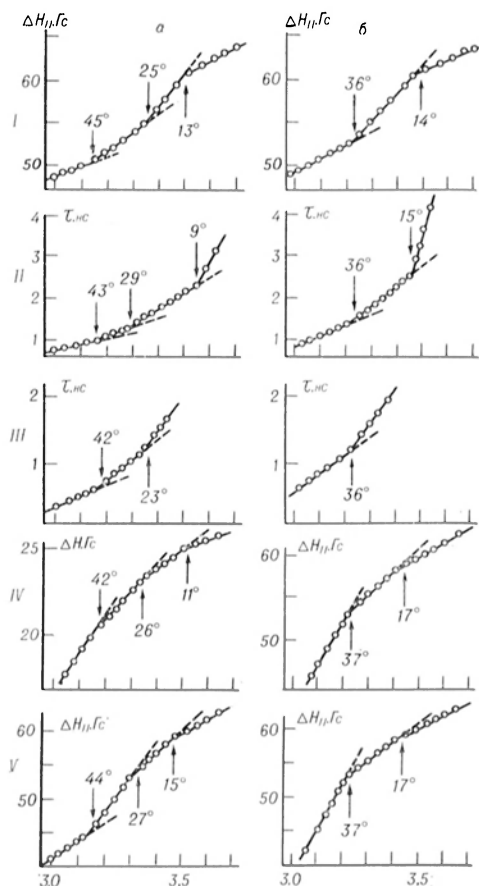


Рис. 3. Температурная зависимость параметров спектров ЭПР зондов I—V в ЛПВП<sub>2</sub> (а) и ЛПВП<sub>3</sub> (б), выделенных из плазмы крови мужчины без признаков ИБС (ХС ЛПВП — 44 мг на 1 дл плазмы).

Здесь и на рис. 4: стрелками обозначены значения критических температур.

ции до их полного исчезновения и в течение эксперимента не проникает внутрь ЛП. На рис. 3 приведены типичные кривые температурной зависимости параметров спектров ЭПР спин-меченных ЛПВП<sub>2</sub> и ЛПВП<sub>3</sub>, выделенных из плазмы крови лиц без признаков ИБС с нормальным уровнем ХС ЛПВП. Выбор параметра спектра ЭПР ( $\Delta H_{\parallel}$ ,  $\Delta H$ ,  $\tau$ ) определялся формой спектра. В интервале температур от 0 до 16 °С кривые температурной зависимости спектральных параметров зонда III в ЛПВП<sub>2</sub> и ЛПВП<sub>3</sub> не были построены ввиду наложения в этом интервале сигналов ЭПР от сильно- и слабоиммобилизованных молекул радикала. Ход температурных кривых имел одинаковые закономерности для всех использованных зондов I—V в

препаратах, полученных из плазмы крови 6 здоровых доноров без признаков ИБС с нормальным уровнем ХС ЛПВП. В диапазоне от 0 до 60 °С графики температурной зависимости спектральных параметров зондов в ЛПВП<sub>2</sub> имели 3 излома: в интервалах 8—15, 23—30 и 40—48 °С, в ЛПВП<sub>3</sub> — 2 излома: в интервалах 10—17 и 35—37 °С. Поскольку использованные в этих опытах зонды имели различное химическое строение и их парамагнитный фрагмент располагался в ЛП на разной глубине от поверхности частицы, можно утверждать, что в ЛПВП<sub>2</sub> и ЛПВП<sub>3</sub> в соответствующих температурных интервалах происходят изменения молекулярной упаковки, затрагивающие всю липидную область поверхностного монослоя частиц. В случае однокомпонентных модельных мембран подобный излом на температурных кривых соответствует значению температуры, при которой происходят изменения фазового состояния молекул липида, образующего мембрану (переход типа гель — жидкий кристалл). Однако входящие в ЛП фосфолипиды гетерогенны по своему составу, и полученные точки изломов соответствуют, вероятно, значениям критических температур, при которых происходит изменение границ областей фазового разделения липидов в поверхностном монослое ЛПВП<sub>2</sub> и ЛПВП<sub>3</sub>.

Из приведенных графиков видно, что значения критических температур различны для ЛПВП<sub>2</sub> и ЛПВП<sub>3</sub>. Это может быть связано с различиями в белково-липидном составе двух основных подклассов ЛПВП: в ЛПВП<sub>3</sub> по сравнению с ЛПВП<sub>2</sub> увеличено процентное содержание белка, лизолецитина, сфингомиелина [4, 5, 15]. Ранее мы показали [6], что в ЛПВП<sub>3</sub> по сравнению с ЛПВП<sub>2</sub> углеводородные цепи молекул фосфолипидов более упорядочены по всей глубине поверхностного монослоя. Возможно, более плотная упаковка молекул обеспечивает большую термическую устойчивость поверхностного монослоя ЛПВП<sub>3</sub> по сравнению с ЛПВП<sub>2</sub>, чем объясняется отсутствие переходов в ЛПВП<sub>3</sub> при 23—30 °С.

При анализе температурной зависимости параметров вращательной диффузии спиновых зондов в ЛПВП<sub>2</sub> и ЛПВП<sub>3</sub>, выделенных из плазмы кро-

ви больных ИБС и лиц без признаков ИБС в норме и с гипоальфаинопротеидемией, обнаружено, что ход температурных кривых для ЛПВП<sub>2</sub> зависит от уровня ХС ЛПВП в плазме крови. При гипоальфаинопротеидемии, кроме изменения значений критических температур, исчезал излом при 23—30 °С. Наличие ИБС и коронарного атеросклероза было сопряжено со сдвигом высокотемпературной точки излома на кривых для ЛПВП<sub>3</sub> от 35—37 к 42—48 °С (для лиц без признаков ИБС  $t_2 = 36,6 \pm 0,4$ ,  $n = 6$ ; для больных ИБС  $t_2 = 44,6 \pm 1,0$ ,  $n = 8$ ;  $p < 0,001$ ). На рис. 4 представлены графики для зонда 1, полученные усреднением по соответствующим группам. Как отмечалось выше, на основе анализа спектральных параметров при фиксированной температуре не удалось выявить изменений жидкостности липидов в ЛПВП при гипоальфаинопротеидемии, однако обнаружено уменьшение жидкостности полярных липидов в ЛПВП при ИБС [6]. Полученные данные относительно ЛПВП<sub>2</sub> позволяют предположить, что в этих частицах при гипоальфаинопротеидемии все же происходит увеличение компактности упаковки полярных липидов, что делает невозможным структурный переход в них при 23—30 °С. Обнаруженная особенность температурного поведения ЛПВП<sub>2</sub> при гипоальфаинопротеидемии может быть связана с увеличением в частицах относительного содержания сфингомиелина и лизолецитина [5, 15], которое, как известно, способствует уменьшению подвижности липидов. При ИБС в ЛПВП<sub>3</sub> увеличиваются процентные отношения белок/фосфатидилхолин (от  $3,0 \pm 0,2$  до  $3,9 \pm 0,1$ ;  $p < 0,05$ ) и сфингомиелин/фосфатидилхолин (от  $0,22 \pm 0,02$  до  $0,28 \pm 0,01$ ;  $0,05 < p < 0,1$  [15]).

Полученные данные позволяют предположить, что образование новых жидкокристаллических областей в поверхностном монослое ЛПВП<sub>3</sub> в отсутствие ИБС происходит в физиологическом интервале температур, а при наличии заболевания — при более высоких температурах. Это может привести к тому, что способность ЛПВП<sub>3</sub> акцептировать ХС с сосудистой стенки и этерифицировать его снижена у больных ИБС по сравнению с таковой у лиц без признаков заболевания. Согласно существующим представлениям,

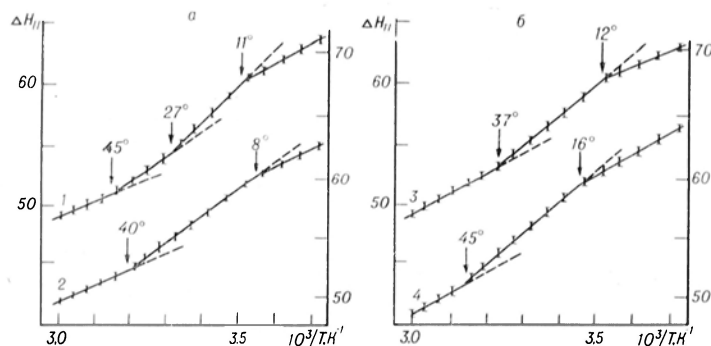


Рис. 4. Температурная зависимость параметра  $\Delta H_{||}$  спектров ЭПР спинного зонда I в ЛПВП<sub>2</sub> (а) и ЛПВП<sub>3</sub> (б).

Графики получены усреднением по группам: в случае ЛПВП<sub>2</sub> — в норме ( $n=8$ , кривая 1) и при гипоальфалипипротемии ( $n=6$ , кривая 2), в случае ЛПВП<sub>3</sub> — для лиц без признаков ИБС ( $n=6$ , кривая 3) и больных ИБС ( $n=8$ , кривая 4). По оси ординат — расстояние между крайними экстремумами спектра,  $\Delta H_{||}$ , Гс. Кривые 1, 3 построены относительно левой оси ординат, 2, 4 — относительно правой.

именно ЛПВП<sub>3</sub> осуществляют захват ХС с мембран сосудистой стенки [9] и наиболее эффективно используются в качестве субстрата ферментом лецитин-холестерин - ацетилтрансферазой (ЛХАТ), осуществляющим этерификацию ХС [18]. Из литературы известно, что экзогенный ХС захватывается легче липидными областями, находящимися в жидкокристаллическом (а не в гелевом) состоянии [20]. Показано также [22], что энергия активации фермента ЛХАТ уменьшается при переходе фосфатидилхолина из гелевого состояния в жидкокристаллическое. Таким образом, можно ожидать, что особенность физического состояния полярных липидов ЛПВП<sub>3</sub> у больных ИБС связана со снижением способности частиц акцентировать ХС с мембран гладкомышечных и эндотелиальных клеток, что способствует атеросклеротическому поражению сосудистой стенки.

Полученные данные позволяют предположить, что в ЛПВП<sub>3</sub> лиц без признаков ИБС в физиологическом интервале температур фазовое состояние липидов может легко меняться при изменениях таких параметров крови, как концентрация двухвалентных катионов и ионная сила (которые могут быть связаны, например, с уровнем артериального давления [21]). Происходящее при этом изменение размеров областей, в которых липиды ЛПВП<sub>3</sub> находятся в жидкокристаллическом состоянии, должно оказывать влияние на способность частиц акцентировать и этерифицировать ХС. При наличии

ИБС, когда критические температуры находятся вдали от физиологических значений, подобная регуляция по-видимому, затруднена.

Термоиндуцированные структурные переходы в ЛП больных ИБС изучались ранее с помощью спинного зонда I [13]. Температуры структурных перестроек, определенные в работе [13], для ЛПВП<sub>2</sub> в норме и значения критических температур для ЛПВП<sub>3</sub> ( $37 \pm 1^\circ C$  в случае лиц без признаков ИБС и  $14 \pm 2^\circ C$  в случае больных ИБС) согласуются с нашими данными. Зарегистрированные нами переходы в ЛПВП<sub>3</sub> при  $11,5 \pm 2,0^\circ C$  (в случае лиц без признаков ИБС) и при  $44,6 \pm 1,0^\circ C$  в случае больных ИБС отсутствуют на приведенных в работе [13] температурных кривых, возможно, вследствие имеющихся различий в отборе материала для исследования.

Итак, в настоящей работе показано, что термоиндуцированные переходы в ЛПВП<sub>2</sub> при гипоальфалипипротемии становились иными, чем в норме, что может свидетельствовать о некотором «уплотнении» поверхностного монослоя частиц. Это в свою очередь может привести к затруднению встраивания в ЛПВП<sub>2</sub> эфиров ХС, образующихся на ЛПВП<sub>3</sub> в результате реакции, катализируемой ЛХАТ, а следовательно, к еще более интенсивному переходу эфиров ХС к липопротеидам очень низкой плотности, что должно способствовать отложению ХС в сосудистой стенке. Температурное поведение полярных липидов ЛПВП<sub>3</sub> менялось лишь при наличии ИБС и доку-

ментированного атеросклероза, что согласуется с данными об относительной неизменности химического состава и концентрации в плазме данного подкласса при дисальфалипопротеидемиях [5].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Артемова Л. Г., Торховская Т. И., Щербакова И. А. и др. // *Вопр. мед. химии*. — 1979. — № 6. — С. 758—765.
2. Ахметели М. А., Жуковский Г. С. // *Липопротеиды высокой плотности и атеросклероз*. — М., 1983. — С. 253—260.
3. Бергельсон Л. Д., Молотковский Ю. Г., Герасимова Е. Н. // *Там же*. — С. 67—78.
4. Герасимова Е. Н., Перова Н. В. // *Вопр. мед. химии*. — 1985. — № 1. — С. 32—40.
5. Герасимова Е. Н., Фам Тхи Май, Сучкова С. И. и др. // *Бюл. Всесоюз. кард. науч. центра*. — 1981. — № 2. — С. 86—93.
6. Горшкова И. Н., Перова Н. В., Рууге Э. К. и др. // *Вопр. мед. химии*. — 1982. — № 1. — С. 106—112.
7. Горшкова И. Н., Рууге Э. К., Перова Н. В., Герасимова Е. Н. // *Всесоюзная конф. по нитрокислым радикалам: Тезисы*. — Черноголовка, 1982. — С. 98.
8. Керимов Т. М., Перова Н. В., Сучкова С. И. и др. // *Вопр. мед. химии*. — 1978. — № 4. — С. 559—566.
9. Климов А. Н. // *Укр. биохим. журн.* — 1984. — Т. 56, № 3. — С. 345—354.
10. Климов А. Н., Герасимова Е. Н., Шестов Д. Б. и др. // *Кардиология*. — 1979. — № 4. — С. 61—67.
11. Медведева Н. В., Морозкин А. Д., Бушмакина И. Г. и др. // *Биол. мембраны*. — 1987. — № 8. — С. 849—856.
12. Метод спиновых меток. Теория и применение. Под ред. Л. Берлинера. Пер. с англ. М., 1979.
13. Панасенко О. М., Азизова О. А., Торховская Т. И., Дудаев В. А. // *Вопр. мед. химии*. — 1984. — № 6. — С. 40—45.
14. Рууге Э. К., Герасимова Е. Н., Горшкова И. Н., Перова Н. В. // *Липопротеиды высокой плотности и атеросклероз*. — М., 1983. — С. 103—113.

15. Фам Тхи Май. Фосфолипидный состав липопротеидов высокой плотности у больных ишемической болезнью сердца: Дис. ... канд. биол. наук. — М., 1983.
16. Худсон Д. Статистика для физиков: Пер. с англ. — М., 1970.
17. Щербакова И. А., Перова Н. В., Карманский А. М. и др. // *Вопр. мед. химии*. — 1981. — № 1. — С. 102—107.
18. Barter F. J., Hopkins G. J., Gorjatschko L., Jones M. // *Biochim. biophys. Acta*. — 1984. — Vol. 793. — P. 260—268.
19. Laggner P., Kostner G. M. // *Europ. J. Biochem.* — 1978. — Vol. 84. — P. 227—232.
20. Rasin S. // *Biochim. biophys. Acta*. — 1978. — Vol. 513. — P. 401—404.
21. Resnic L. M., Laragh J. H., Sealey J. E., Alderman M. H. // *New Engl. J. Med.* — 1983. — Vol. 309. — P. 888—891.
22. Soutar A. K., Pownall H. J., Hu A. S. et al. // *Biochemistry*. — 1974. — Vol. 13. — P. 2828—2836.

Поступила 29.12.86

#### THERMO-INDUCED CHANGES IN HUMAN HIGH DENSITY LIPOPROTEINS IN HYPOALPHALIPOPROTEINEMIA AND CORONARY HEART DISEASE STUDIED BY MEANS OF SPIN LABEL METHOD

I. N. Gorshkova, E. A. Noeva, V. A. Polessky, N. V. Perova, E. K. Ruuge

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

Thermo-induced structural reorganization in human high density lipoproteins subclasses HDL<sub>2</sub> and HDL<sub>3</sub> have been studied by means of electronic paramagnetic resonance method. A number of spin labels were used: 5- and 16-DOXYL stearates, DOXYL-labelled derivatives of pentadecane, phosphatidyl choline and sphingomyelin. In hypoalphalipoproteinemia one of the thermo-induced transitions in HDL<sub>2</sub> (at 23-30°) was not observed. In coronary heart disease the critical temperature for HDL<sub>3</sub> was shifted from the physiological values and located at 42-48°. The data obtained are discussed from the point of view of their potential role in atherogenesis.

УДК 612.115.35-064:612.411.015.348

Б. А. Кудряшов, Л. А. Ляпина, М. А. Шишкина, Л. Д. Азиева

#### ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВОГО ФАКТОРА СЕЛЕЗЕНКИ, ИНГИБИРУЮЩЕГО ГЕПАРИН

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

В ткани селезенки здоровых крыс присутствует белок, блокирующий неферментативную фибринолитическую активность (НФА) плазмы крови и ее антикоагулянтные свойства [3, 4]. При выяснении механизма действия этого белкового фактора из селезенки

(ФС) на НФА комплексных соединений гепарина с белками крови было установлено, что ФС взаимодействует с гепарином, вызывая диссоциацию его комплексов с белками крови, с образованием комплекса, антикоагулянтная активность которого не превышает ан-

тикоагулянтные свойства эквивалентной по отношению к комплексу дозы гепарина [5].

Цель настоящей работы — изучение некоторых физико-химических свойств ФС и выяснение его влияния на процесс тромбогенеза в условиях *in vitro*.

### Методика

ФС получали от здоровых крыс-самцов массой тела 180—200 г и от здоровых кроликов массой тела 2,5—3 кг по методу, описанному ранее [5] с некоторой модификацией (после диализа проводили ультрацентрифугирование в градиенте плотности сахарозы с последующей лиофилизацией).

Во фракциях, полученных из ткани селезенки, определяли содержание белка по методу Лоури [11]. Методом электрофореза в ПААГ контролировали чистоту полученных препаратов в присутствии додецилсульфата натрия и определяли относительную и абсолютную электрофоретическую подвижность белка в трис-ацетатном электродном буфере pH 7,2. Электрофоретическую подвижность ФС рассчитывали по методу [10]. Спектральный анализ проводили в Ф-области спектра (240—300 нм) на спектрофотометре «Unicam SP-800» [6].

Аминокислотный анализ ФС крыс осуществляли на аминокислотном анализаторе фирмы «Hitachi», гидролиз белка проводили в течение 4 ч [1].

В опытах *in vitro* плазму крыс инкубировали при 37 °C с ФС в течение 30 мин, добавляя 40—200 мкг ФС на 1 мл плазмы. В контроле вместо ФС использовали равный объем физиологического раствора. Влияние ФС на неферментативный фибринолиз (НФ) плазмы, обусловленный действием комплексных соединений гепарина с белками крови определяли по методу [2], на антикоагулянтные свойства плазмы — общепринятым методом по тромбиновому времени и на изменение концентрации фибриногена — по методу [8]. Препарат ФС исследовали на наличие фибринолитической активности (ФА) [7] с использованием стандартных пластинок фибрина для определения активаторов пламиногена и собственной фибринолитической активности препаратов и прогреты при 86 °C (для денатурации пламиногена) пластины для определения собственной ФА препаратов.

### Результаты и обсуждение

При электрофоретическом исследовании диализата, содержащего ФС до процесса ультрацентрифугирования, обнаруживали две белковые полосы, окрашивающихся раствором кумасси [9]. Белок, полученный после ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы, был гомогенен, так как на электрофореграмме выявлялась 1 полоса белка, соответствующая под-

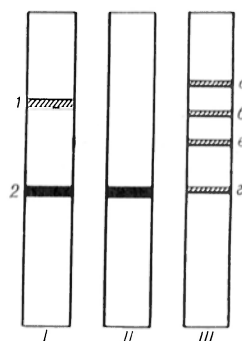


Рис. 1. Электрофореграммы препаратов, выделенных из селезенки крысы.

I — диализат, II — ФС, III — свидетели: а — альбумин, б — овальбумин, в — трицин, г — рибонуклеаза.

вижности ФС. Во фракции 2 (фактически ФС) содержалось 75—80 % белка от общего белка диализата. Определено, что в 1 г ткани селезенки здоровой крысы может присутствовать от 100 до 200 мкг ФС (рис. 1).

Изучены величины относительной (по величине  $R_f$ ) и абсолютной электрофоретической подвижности фракции 2 диализата и гомогенного ФС крысы и кролика. Все измерения электрофоретической подвижности препаратов были проведены в стандартных условиях (pH 7,2; ионная сила раствора 0,1). Как видно из приведенных на рис. 1 электрофореграмм, фракция 2 диализата идентична по своей электрофоретической подвижности фракции чистого препарата ФС, и обе они сопоставимы по этому параметру с рибонуклеазой. ФС кролика обладает большей электрофоретической подвижностью, чем ФС крысы. В табл. 1 приведены данные относительной электрофоретической подвижности ФС крысы и кролика. В результате расчета абсолютной электрофоретической

Таблица 1

Относительная электрофоретическая подвижность ФС крысы и кролика

Время электрофореза, ч	ФС крысы	ФС кролика
3	$0,805 \pm 0,004$	$0,821 \pm 0,002$
2,5	$0,586 \pm 0,003$	—
3	$0,952 \pm 0,002$	—

Примечание. Опыты проводили в разное время при одинаковых условиях; представлены средние ( $M \pm m$ ) данные 10 экспериментов.

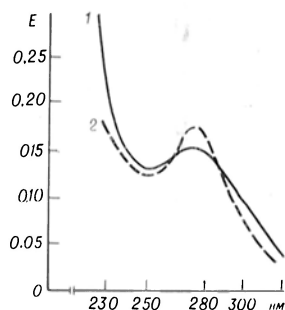


Рис. 2. Спектры поглощения ФС крысы (1) и кролика (2).

подвижности ФС в трис-ацетатном электродном буфере pH 7,2 получены следующие значения: для гомогенного ФС крысы и фракции 2 диализата крысы  $13,9 \pm 15,2 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2 \text{В}^{-1} \text{с}^{-1}$ ; для гомогенного ФС кролика  $16,0 \pm 19,4 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2 \text{В}^{-1} \text{с}^{-1}$ . ФС — катионный белок, при электрофорезе он передвигался к аноду.

Вся последующая работа проводилась с гомогенным ФС кролика и крысы. Спектры поглощения ФС крысы в области 230—300 нм представлены на рис. 2. Спектр поглощения ФС имеет ярко выраженный максимум в области 280 нм, что свидетельствует о белковой природе препарата. Отношение  $E_{280}/E_{260}$  для препарата ФС крысы составляет 1,5. Подобный спектр поглощения получен для препарата ФС кролика с максимумом в области 278 нм и отношением  $E_{280}/E_{260}$ , равном 1,55. Таким образом, и по электрофоретическим, и по спектральным свойствам ФС крысы и кролика однотипны.

При исследовании аминокислотного состава гомогенного ФС крысы обнаружено значительное содержание аспарагиновой и глутаминовой кислот, глицина, аланина, лизина и аргинина (табл. 2).

Таблица 2

Аминокислотный состав препаратов ингибитора неферментативного фибринолиза из ткани селезенки

Аминокислота	Содержание, %
Аспарагиновая	16,8
Треонин	4,1
Серин	6,2
Глутаминовая	12,7
Пролин	4,3
Глицин	12,0
Аланин	11,5
Цистин	1,2
Валин	2,9
Метионин	0,2
Изолейцин	1,4
Лизин	11,2
Тирозин	1,9
Фенилаланин	2,9
Лейцин	4,9
Гистидин	2,0
Аргинин	9,2

В опытах *in vitro* установлено, что ФС крысы и кролика не обладает собственной ФЛ и не активизирует плазминоген, так как оба препарата не вызвали лизиса стандартных и прогретых пластин стабилизированного и нестабилизированного фибрина.

ФС крысы *in vitro* достоверно снижал суммарную ФЛ плазмы крови животных при всех используемых концентрациях. Оптимальной в отношении блокирования суммарного фибринолиза плазмы оказалась концентрация 80—120 мкг на 1 мл плазмы (табл. 3). Это подавление ФЛ плазмы под влиянием ФС обусловлено его полной блокадой НФ плазмы, о чем свидетельствует отсутствие зон лизиса на нестабилизированном фибрине под влиянием плазмы крови, проинкубированной с 3 %  $\epsilon$ -аминокапроновой кислотой, и с ФС в концентрации 200 мкг

Таблица 3

Влияние разных доз ФС крысы на показатели суммарной ФЛ плазмы, ее НФ, тромбинового времени и концентрации фибриногена

Показатель	Доза ФС крысы, мкг на 1 мл плазмы					
	0	40	80	120	180	200
Суммарная ФЛ, мм <sup>2</sup>	52 ± 1,8	38 ± 3,0	22 ± 1,3	28 ± 2,2	31 ± 3,0	33 ± 1,8
НФ, мм <sup>2</sup>	24 ± 3,0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Тромбиновое время, с	42 ± 1,8	37 ± 4,0	20 ± 3,1	20 ± 1,1	23 ± 3,0	21 ± 1,1
Концентрация фибриногена, мг%	289 ± 12	279 ± 10	291 ± 8	284 ± 9	290 ± 12	284 ± 8



на 1 мл плазмы. В последующих экспериментах было обнаружено, что ФС, выделенный из ткани селезенки кролика, снижал *in vitro* НФА плазмы крови крысы, а ФС, полученный из ткани селезенки крысы, в равной степени блокировал НФ плазмы крови крысы, быка и человека. В условиях *in vitro* максимальной активностью в отношении угнетения НФ плазмы обладал ФС крысы в концентрациях 80 мкг/мл для плазмы человека и 80—120 мкг/мл для плазмы крови быка и крысы.

При изучении действия ФС на процесс тромбогенеза в плазме показано, что ФС крысы проявляет значительную прокоагулянтную активность. Из данных табл. 3 видно, что ФС крысы в дозах от 40 до 200 мкг/мл вызывает статистически достоверное сокращение тромбоинового времени. Так, время образования сгустка в реакции взаимодействия плазмы с тромбином под влиянием ФС сокращалось до 20—23 с, тогда как тромбоиновое время контрольных проб плазмы с добавлением физиологического раствора составило 42 с. Следует отметить, что добавление к плазме крови крысы ФС в дозе от 40 до 200 мкг/мл плазмы не влияло на концентрацию фибриногена.

На основании полученных результатов можно заключить, что из ткани селезенки крыс и кроликов выделен гомогенный при электрофорезе в геле полиакриламида белок, имеющий характерные для него спектральные и электрофоретические свойства. В состав данного белка в превалирующем количестве входят следующие аминокислоты: аспарагиновая и глутаминовая кислоты, аргинин и лизин. Данный белок способен подавлять суммарную ФА плазмы в результате воздействия на НФ, который он полностью блокирует, и снижать антикоагулянтные свойства плазмы, что может быть обусловлено его воздействием на гепарин, как это было показано ранее [5]. По-видимому, белковый фактор — ин-

гибитор НФ, аналогичный ФС крысы, содержится и у других видов млекопитающих, что дает возможность предсказать наличие подобного фактора и в ткани селезенки человека.

Авторы статьи приносят благодарность Л. А. Баратовой за предоставленную возможность проведения аминокислотного анализа.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Баратова Л. А., Белянова Л. П. // Методы биохимического эксперимента. — М., 1974. — С. 3—37.
2. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А. // Лаб. дело. — 1971. — № 6. — С. 326—329.
3. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А. // Биохимия животных и человека. — Киев, 1982. — Вып. 6. — С. 64—73.
4. Ляпина Л. А. // Система свертывания крови и фибринолиз. — Саратов, 1975. — Ч. 1. — С. 109—110.
5. Ляпина Л. А., Азиева Л. Д. // Физиол. журн. СССР. — 1985. — Т. 71, № 7. — С. 916—920.
6. Юденфрент С. Флуоресцентный анализ в биологии и медицине: Пер. с англ. — М., 1965. — С. 125.
7. Astrup T., Müllerts S. // Arch. Biochem. — 1952. — Vol. 40. — P. 346.
8. Bidwell E. // Biochem. J. — 1953. — Vol. 55. — P. 497.
9. Farbank S. G., Steck T. L., Wallach F. U. // Biochemistry (Wash.). — 1971. — Vol. 13. — P. 2606—2616.
10. Grassman W., Hübner L. // Naturwissenschaften. — 1953. — Bd 9, N 40. — S. 272—273.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall L. L. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.

Поступила 12.12.86

#### CHARACTERISTICS OF A PROTEIN FACTOR ISOLATED FROM SPLEEN TISSUE

B. A. Kudrjashov, L. A. Lyapina, M. A. Shishkina, L. D. Azieva

M. V. Lomonosov State University, Moscow

A low molecular protein with molecular mass about 15 kDa was isolated from spleen of healthy rabbits and rats. Spectral, electrophoretic properties and amino acid composition of the protein were studied. Biological activity of the protein was connected with inhibitors of nonenzymatic fibrinolysis.

П. К. Телушкин, С. П. Филиппов

# АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ И СОДЕРЖАНИЕ СУБСТРАТОВ ЦИКЛА КРЕБСА В ТКАНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ИНСУЛИНОВОЙ ГИПОГЛИКЕМИИ И В ВОССТАНОВИТЕЛЬНОМ ПЕРИОДЕ

Ярославский медицинский институт

Механизм нарушений функций мозга при инсулиновой гипогликемии и купирующего действия глюкозы остается невыясненным. Одной из возможных причин возникновения и развития инсулинового нервного синдрома может быть недостаток энергетических субстратов [17, 18]. Вместе с тем содержание макроэргических соединений в ткани мозга в состоянии гипогликемической комы не уменьшается [10, 19], что может быть следствием сохранения уровня ресинтеза макроэргов или уменьшения их утилизации.

Основным процессом, обеспечивающим клетки богатыми энергией соединениями, является цикл трикарбоновых кислот (ЦТК). Однако вопрос об обеспечении циклом Кребса связанных с функцией энергозатрат нейрона является дискуссионным [9].

Сведений, касающихся комплексного исследования активности ЦТК при инсулиновой гипогликемии и восстановлении в литературе обнаружить не удалось. В связи с этим была поставлена задача исследовать активность ферментов и содержание субстратов ЦТК в состоянии гипогликемической комы и в различные сроки после купирования ее глюкозой в целях оценки возможных причин сохранения уровня макроэргических соединений при инсулиновой гипогликемии и о роли ЦТК в реализации купирующего действия глюкозы.

## Методика

Опыты выполнены на белых крысах-самцах массой 180—200 г. Все животные содержались на обычном рационе и перед опытом голодали в течение 18—24 ч. Исследовали ткань больших полушарий головного мозга интактных животных (контроль), крыс, деканитированных на пике выраженной гипогликемической комы, вызванной введением 40 ЕД/кг инсулина внутримышечно, и через 5, 15 и 30 мин после внутрижелудочного введения коматозным животным глюкозы (3,0 мл 40 % раствора).

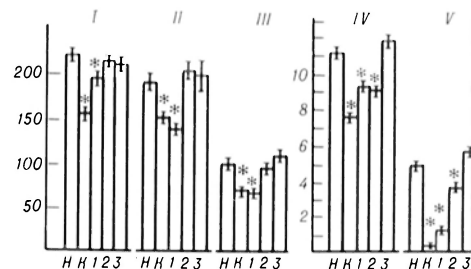
Суммарную фракцию митохондрий получали методом дифференциального центрифугиро-

вания [1]. Среда выделения включала в себя 0,25 М сахарозу, 0,1 М трис-НСI буфер pH 7,4 и 1,0 мМ ЭДТА. Все процедуры, связанные с обработкой ткани и выделением митохондрий проводили при 0—4 °С. Конечный осадок митохондрий суспендировали в среде солиubilизации и стабилизации [20], хранили при 0 °С и через 30 мин использовали для определения ферментной активности. Чистоту полученных фракций контролировали методом маркерного анализа [5].

Активность НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы (НАД-ИЦДГ; КФ 1.1.1.41) и НАД-зависимой малатдегидрогеназы (НАД-МДГ; КФ 1.1.1.37) определяли спектрофотометрически [15, 16], активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ; КФ 1.3.99.1) и  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназы ( $\alpha$ -КГДГ; КФ 1.2.4.2) с дихлорфенолииндофенолом в присутствии феназинметасульфата [3]. Измерение ферментной активности проводили при 25 °С. Белок определяли по Лоури [13]. Для определения уровня субстратов ткань мозга фиксировали в жидком азоте. Содержание цитрата находили пентабромацетоновым методом, уровень пирувата,  $\alpha$ -кетоглутарата, лактата и глутамата, а также глюкозы в плазме крови — энзиматически [4]. Результаты экспериментов обрабатывали статистически с применением *t*-критерия Стьюдента.

## Результаты и обсуждение

Содержание глюкозы в крови нормальных животных составило  $5,94 \pm \pm 0,14$  ммоль/л. Через 2,5—3 ч после введения инсулина у крыс развивалась



Содержание субстратов (ЦТК) в ткани больших полушарий мозга крыс при инсулиновой гипогликемии и в восстановительном периоде. По оси ординат: I—III — ммоль на 1 г ткани, IV и V — мкмоль на 1 г ткани, I — цитрат, II — пируват, III —  $\alpha$ -кетоглутарат, IV — глутамат, V — лактат, Н — норма, К — кома, 1, 2, 3 — соответственно 5, 15, 30 мин после купирования комы глюкозой.

Активность НАД-ИЦДГ,  $\alpha$ -КГДГ, СДГ (в ммоль на 1 мг белка в 1 мин) и НАД-МДГ (в мкмоль на 1 мг белка в 1 мин) в ткани больших полушарий головного мозга крыс при инсулиновой гипогликемии и в восстановительном периоде

Фермент	Норма	Кома	После купирования комы глюкозой, мин		
			5	15	30
НАД-ИЦДГ	59,4 $\pm$ 2,1 (13)	61,8 $\pm$ 1,9 (16)	62,9 $\pm$ 3,0 (8)	60,5 $\pm$ 3,0 (8)	57,6 $\pm$ 2,2 (11)
$\alpha$ -КГДГ	37,5 $\pm$ 0,8 (24)	34,6 $\pm$ 0,7 (8)*	—	36,1 $\pm$ 0,6 (11)*	30,0 $\pm$ 0,8 (6)*
СДГ	45,6 $\pm$ 0,8 (24)	37,9 $\pm$ 2,0 (8)*	—	36,7 $\pm$ 0,9 (7)*	39,0 $\pm$ 1,1 (12)
НАД-МДГ: митохондрии	0,80 $\pm$ 0,03 (18)	0,83 $\pm$ 0,05 (12)	0,77 $\pm$ 0,04 (8)	0,71 $\pm$ 0,04 (8)	0,78 $\pm$ 0,03 (12)
надосадок	1,25 $\pm$ 0,04 (17)	1,05 $\pm$ 0,04 (21)*	1,43 $\pm$ 0,04 (7)	1,24 $\pm$ 0,09 (8)	1,19 $\pm$ 0,05 (13)

Примечание. В скобках — число опытов в каждой серии. Здесь и на рисунке звездочкой обозначены статистически достоверные различия —  $p < 0,05$ .

гипогликемическая кома; количество глюкозы в крови при этом уменьшилось до  $0,39 \pm 0,12$  ммоль/л. Уровень субстратов в ткани мозга в состоянии комы достоверно снижался (см. рисунок) на 21 и 30 % для пирувата и цитрата и на 33 и 31 % для  $\alpha$ -кетоглутарата и глутамата соответственно. Активность СДГ и  $\alpha$ -КГДГ при инсулиновой гипогликемии также достоверно уменьшалась — соответственно на 20 и 15 % (см. таблицу), активность митохондриальной НАД-МДГ не менялась при всех изученных состояниях. Уменьшение активности СДГ и  $\alpha$ -КГДГ в сочетании со снижением уровня субстратов свидетельствует о падении «мощности» ЦТК в состоянии гипогликемической комы. Сохранение высокого уровня макроэргических соединений в ткани мозга может явиться следствием снижения утилизации их за счет уменьшения энергоемких биосинтетических процессов, в частности синтеза белка в нервной ткани [12].

Через 5 и 15 мин после введения крысам, находящимся в состоянии гипогликемической комы, глюкозы уровень последней в крови возрастал до  $2,17 \pm 0,51$  и  $3,17 \pm 0,36$  ммоль/л соответственно. Через 5 мин после введения глюкозы происходило купирование комы. Содержание цитрата при этом не достигло нормального уровня,  $\alpha$ -кетоглутарата не отличалось от такового в состоянии гипогликемической комы, а уровень пирувата имел тенденцию к дальнейшему уменьшению. Активность СДГ, сниженная в состоянии комы, при купировании не восстанавливалась. Содержание глутамата зна-

чительно повышалось, не достигая, однако, нормального уровня через 5 мин после введения глюкозы коматозным крысам.

Активность НАД-ИЦДГ не менялась при всех изученных состояниях. В соответствии с имеющимися сведениями о регуляции активности этого фермента в ткани головного мозга [2] вероятным объяснением медленного роста уровня цитрата в восстановительном периоде является недостаточная скорость его образования. Содержание цитрата,  $\alpha$ -кетоглутарата и пирувата нормализовалось только через 15 мин после купирования комы глюкозой.

Таким образом, восстановление нарушенных при гипогликемии функций нервной системы не сопровождается активацией начальных этапов ЦТК. Довольно быстрый рост уровня глутамата и связанное с этим отвлечение субстратов из цикла в сочетании с низкой скоростью образования  $\alpha$ -кетоглутарата свидетельствует о том, что работа ЦТК в ранние сроки после купирования гипогликемической комы не направлена на увеличение энергопродукции; потребление кислорода, сниженное в состоянии комы, также не увеличивается при купировании ее глюкозой [8].

Синтез глутамата предполагает выход  $\alpha$ -кетоглутарата, а значит и оксалоацетата из цикла Кребса. Снижение уровня пирувата через 5 мин после купирования комы глюкозой может быть связано с восстановлением его в лактат, окислительным декарбоксилированием, а также с карбоксилированием и образованием оксалоаце-

тата. Поскольку содержание лактата, сниженное в состоянии комы, через 5 мин после купирования ее глюкозой увеличивается незначительно, основная масса пирувата в это время, по-видимому, используется в реакциях, протекающих в митохондриях. Последнее требует транспорта НАД·Н, образующегося в ходе дегидрирования 3-фосфоглицеринового альдегида, из цитоплазмы в митохондрии. Этот перенос осуществляется в ткани мозга преимущественно с помощью малат-аспаратного шунта [6]. Изменения активности цитоплазматической НАД-МДГ в состоянии комы и при купировании ее глюкозой можно связать с изменением уровня восстановленности пиридиновых нуклеотидов.

Таким образом, изменения в содержании субстратов ЦТК в ранние сроки восстановления после инсулиновой гипогликемии в условиях снижения активности СДГ, по-видимому, могут быть связаны с синтезом глутамата, содержание которого увеличивается. Глутаминовая кислота в ткани мозга является нейромедиатором [11], источником интермедиатов системы ГАМК [7] и глутаматсодержащих пептидов [14], и изменения ее уровня, а также уровня связанных с ней метаболитов могут играть существенную роль в возникновении и развитии гипогликемической комы и реализации купирующего действия глюкозы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Глебов Р. Н., Дмитриева Н. М. // Биохимия. — 1974. — Т. 39, № 4. — С. 822—827.
2. Еценко Н. Д. // Нейрохимия. — 1982. — № 2. — С. 200—213.
3. Кравченко Р. С. // Современные методы в биохимии. — М., 1977. — С. 44—45.
4. Методы биохимических исследований: Липидный и энергетический обмен / Под ред. М. И. Прохоровой. — Л., 1982. — С. 195—197; 190—192; 202—204; 222—224; 224—246; С. 234—236.
5. Покровский А. А., Арчаков А. И., Мухамбетова Л. Х. и др. // Митохондрии: Структура и функция в норме и патологии. — М., 1971. — С. 131—136.
6. Строев Е. А. // Дегидрогеназы в норме и патологии. — Горький, 1980. — С. 28—36.

7. Сытинский И. А. Гамма-аминомасляная кислота в деятельности нервной системы: Биохимия, фармакология, физиология, клиника. — Л., 1972. — С. 155—168.
8. Филиппов С. П. // Пробл. эндокринол. — 1964. — № 6. — С. 97—101.
9. Чумаченко А. А., Воронова Н. В., Березняк Ю. Л. // Нейрохимия. — 1982. — № 2. — С. 148—155.
10. Ghajar J. V. G., Plam F., Duffy T. E. // J. Neurochem. — 1982. — Vol. 38. — P. 397—409.
11. Johnson J. L. // Brain Res. — 1972. — Vol. 37. — P. 1—19.
12. Kiessling M., Xie Y., Kleihues P. // J. Cereb. Blood Flow Metab. — 1983. — Vol. 3, Suppl. 1. — P. 472—473.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
14. Namata Y., Watanabe T., Wada H. // J. Biochem. (Tokyo). — 1983. — Vol. 94. — P. 1268—1278.
15. Ochoa S. // Meth. Enzymol. — 1955. — Vol. 1. — P. 735—736.
16. Plaut G. W. E., Aogaichi T. // J. biol. Chem. — 1968. — Vol. 243. — P. 735—736.
17. Siesjö B. K. Brain Energy Metabolism. — New York, 1978.
18. Socoloff L. // J. Neurochem. — 1977. — Vol. 29. — P. 13—26.
19. Vannucci R. C., Nardis E. E., Vannucci S. J. et al. // Amer. J. Physiol. — 1981. — Vol. 240. — P. 192—199.
20. Watanabe T., Coto H., Ogasawa N. // Biochim. biophys. Acta. — Vol. 358. — P. 240—246.

Поступила 08.12.86

#### ENZYMATIC ACTIVITY AND CONTENT OF SUBSTRATES INVOLVED IN THE KREBS CYCLE IN RAT BRAIN UNDER CONDITIONS OF INSULIN-DEPENDENT HYPOGLYCEMIA AND DURING THE RESTORATION PERIOD

P. K. Telushkin, S. P. Filippov

Medical School, Yaroslavl

Alterations in enzymatic activity and in content of substrates involved in the Krebs cycle and in content of glutamate were studied in brain of rats with insulin-dependent coma and in various periods of the coma restoration with glucose. After administration of glucose content of the Krebs cycle substrates and succinate dehydrogenase activity, which were lowered during the coma, were not normalized, whereas the content of glutamate and activity of cytoplasmic NAD-dependent malate dehydrogenase were increased in brain. Functional impairments of the nervous system in hypoglycemia and the restoration effect of glucose appear to involve some alterations in glutamate metabolism in brain.

## РАЗЛИЧИЯ МЕЖДУ КОЛЛАГЕНАМИ ИНТЕРСТИЦИАЛЬНЫХ ТИПОВ В ИХ ВЛИЯНИИ НА БИОСИНТЕЗ ДНК, РНК И АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ В БИОПТАТАХ ТКАНЕЙ РАН КРЫС

Институт хирургии им. А. В. Вишневского АМН СССР, Москва

Закономерная смена интерстициальных типов коллагена, характерная для процессов развития органов и тканей, имеет место также в грануляционной ткани ран. На раннем этапе заживления юные фибробласты синтезируют коллаген типа III, а затем (по мере созревания, т. е. на 6—8-е сутки) коллаген типа I, который накапливается в грануляционной ткани при одновременном понижении уровня коллагена типа III [20]. Высказываются предположения, что коллаген типа III обеспечивает высокую структурную стабильность за счет большего числа остатков оксипролина и цистина [13] и способствует созреванию грануляционной ткани [5].

Возможно, что коллагены типов I и III неоднозначно влияют на метаболические процессы в грануляционной ткани. На это указывают различия в связывании коллагенов указанных типов со специфическими рецепторами мембран тромбоцитов, фибробластов и гладких мышц [9, 10, 16]. Взаимодействуя с тромбоцитами, коллаген способствует их агрегации и высвобождению из них в среду ионов кальция, АТФ, АДФ, серотонина и других медиаторов, в том числе усиливающих пролиферацию фибробластов и гладких мышц [6, 15]. Связывание коллагена с фибробластами и миоцитами активирует дифференцировку клеток [3, 14], что также играет важную роль в репаративных процессах при заживлении ран. Вместе с тем до настоящего времени нет работ, посвященных влиянию коллагенов типов I и III на метаболические процессы в грануляционной ткани ран.

В настоящей работе исследовали влияние растворимых форм коллагена типов I и III на некоторые метаболические процессы, характеризующие направленность репаративных изменений в грануляционной и мышечной ткани ран экспериментальных животных, а

именно биосинтез ДНК и РНК, активность аденилат- и гуанилатциклазы (соответственно АЦ и ГЦ), а также активность ряда ферментов энергетического обмена: лактатдегидрогеназы (ЛДГ), малатдегидрогеназы (МДГ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) и креатинфосфокиназы (КФК).

### Методика

Работа выполнена на беспородных крысах-самцах массой 150—170 г с экспериментальными ранами (полнослойный дефект кожи спины  $2,5 \times 2,0$  см). Животных оперировали под эфирным наркозом. Материалом служили биоптаты мышц и(или) грануляционной ткани массой 200 мг, взятые из ран на 1, 3 и 7-е сутки после операции. Биоптаты помещали в инкубационную среду [19]. В пробы добавляли 200 мкг коллагена типов I или III, растворенного в 0,1 мл 0,05 N уксусной кислоты. Выделение коллагенов типа I и III из кожи плода коровы и их фракционирование проводили по описанному ранее методу [17, 18].

Вслед за раствором коллагена для определения биосинтеза ДНК и РНК в пробы (конечный объем 3 мл) добавляли соответственно тимидин-5-метил- $^3\text{H}_2$  (удельная радиоактивность 41 Ки/ммоль) из расчета 0,8 МБк на пробу и уридин-5- $^3\text{H}_1$  (удельная радиоактивность 31 Ки/ммоль) из расчета 0,6 МБк на пробу. Пробы инкубировали 5 ч при 37°C и постоянном встряхивании. После инкубации биоптаты отделяли от среды центрифугированием, дважды промывали холодным раствором Кребс—Рингера с меченым 1 % тимидином или 1 % уридином, гомогенизировали на холоду и в гомогенатах определяли содержание и удельную радиоактивность ДНК и РНК [2].

Активность АЦ и ГЦ устанавливали в гомогенатах грануляционной ткани на 3-и и 7-е сутки после операции по методу [21] с незначительными модификациями, используя в качестве субстрата [ $^{32}\text{P}$ ]-АТФ и [ $^{32}\text{P}$ ]-ГТФ.

Исследования проводили непосредственно перед добавлением растворов коллагена в инкубационную среду (нулевая точка), и через 5, 10, 20, 60 мин после инкубации с коллагеном типа I или III в конечной концентрации 67 мкг на 1 мл инкубационной среды. Параллельно в гомогенатах грануляционной ткани после 60 мин инкубации в отсутствие или в присутствии коллагена определяли активность ЛДГ [22], МДГ [8], Г-6-ФДГ [11] и КФК [4]. Статистическую обработку данных проводили по Стьюденту при  $n \geq 10$ .

## Результаты и обсуждение

Как видно из рис. 1, коллаген типа I, добавленный к биоптатам мышечной или грануляционной ткани, взятым на 1-е и 3-и сутки после операции, не вызывает существенных изменений величины удельной радиоактивности нуклеиновых кислот и лишь на 7-е сутки в грануляционной ткани наблюдается ингибирование включения меченых предшественников: в ДНК на 40 % ( $p < 0,01$ ) и в РНК на 26 % ( $p < 0,01$ ). Коллаген типа III в отличие от такового типа I в 1-е сутки после операции стимулирует включение меченых предшественников в ДНК мышц на 27 % ( $p < 0,05$ ), а на 3-и сутки в ДНК и РНК грануляционной ткани — соответственно на 67 % ( $p < 0,01$ ) и 70 % ( $p < 0,01$ ). При этом удельная радиоактивность нуклеиновых кислот мышц практически не изменяется. На 7-е сутки после операции коллаген типа III не оказывает существенного влияния на величины удельной радиоактивности ДНК и РНК.

Результаты действия коллагена типа III, четко проявляющиеся стимуляцией синтеза ДНК и РНК на 3-и сутки после операции, дают основание думать, что в грануляционной ткани под влиянием коллагена типа III в

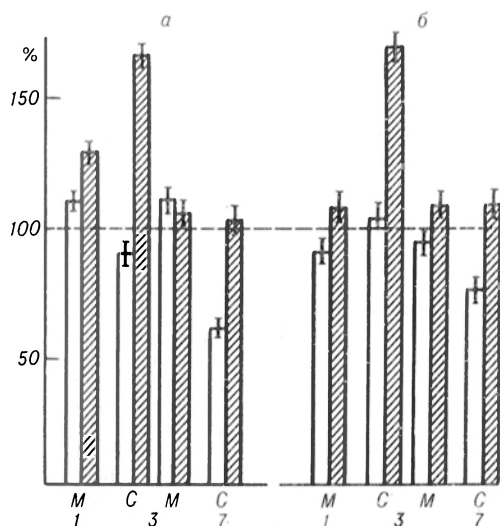


Рис. 1. Влияние коллагена типа I и III на биосинтез ДНК (а) и РНК (б) в биоптатах мышечной (М) и грануляционной (Г) ткани. По оси абсцисс — сутки после операции, по оси ординат — изменения (в %) по отношению к величинам контрольных проб, принятых за 100 %. Светлые столбики — влияние коллагена типа I, заштрихованные — то же типа III.

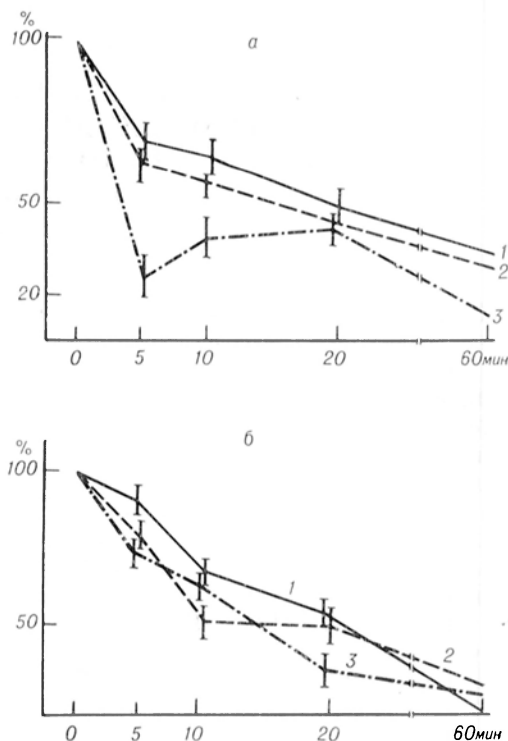


Рис. 2. Изменения активности аденилатциклазы в грануляционной ткани на 3-и (а) и 7-е (б) сутки после операции под влиянием коллагена типа I и III.

По оси абсцисс — время инкубации (в мин), по оси ординат — изменения (в %) по отношению к нулевой точке (базальная активность до начала инкубации с коллагеном типа I или III). 1 — контроль; 2 и 3 — влияние коллагена типа I и III соответственно.

эти же сроки изменяется активность АЦ и ГЦ, обусловленная перестройкой мембран, рецепторы которых под влиянием коллагена инициируют изменения циклазной системы, одного из посредников пролиферации клеток [1].

Данные, представленные на рис. 2, подтверждают это предположение. На 3-и сутки после операции коллаген типа III в течение первых 5 и 10 мин инкубации угнетает активность АЦ соответственно на 75 ( $p < 0,01$ ) и 60 % ( $p < 0,01$ ) и одновременно повышает активность ГЦ на 35—40 % ( $p < 0,01$ ). Эффекты действия коллагена типа I на активность АЦ выражены в меньшей степени, однако тенденция к снижению ее уровня под влиянием коллагена типа I прослеживается на протяжении всего эксперимента. На 7-е сутки после операции оба типа коллагенов понижают активность АЦ с той лишь разницей, что под влиянием кол-



4\* Влияние коллагена типа I и III на активность ЛДГ, Г-6-ФДГ, МДГ и КФК в грануляционной ткани ран на 3-и и 7-е сутки после операции и в интактной печени

Условия эксперимента	Объект исследования	ЛДГ (3-и сутки)	Г-6-ФДГ (3-и сутки)	МДГ		КФК	
				3-и сутки	7-е сутки	3-и сутки	7-е сутки
Контроль Коллаген типа I Коллаген типа III	Грануляционная ткань То же » »	79,56±7,12 100,0±8,14 80,36±6,40	21,39±1,05 21,22±0,97 20,04±1,21	28,46±0,38 28,16±2,12 17,65±2,38	29,52±1,66 35,29±1,33 37,02±0,92	4,46±0,10 4,88±0,24 2,50±0,30	4,61±0,38 4,52±0,36 4,97±0,13
Контроль Коллаген типа I Коллаген типа III	Печень » »	193,60±5,15 197,70±3,88 220,80±6,08	26,80±1,88 29,19±2,11 35,73±1,50	126,68±2,66 164,12±6,18 188,13±4,00		0,54±0,08 0,56±0,11 0,62±0,07	

Примечания. ЛДГ выражена в микромолях пирувата на 1 мг белка в 1 мин, КФА — в микромолях креатинфосфата на 1 мг белка в 1 мин; МДГ — в микромолях оксалацетата на 1 мг белка в 1 мин, КФК — в микромолях креатинфосфата на 1 мг белка в 1 мин. Условия определения активности ферментов в гомогенатах печени и в грануляционной ткани ран идентичны.

лагена типа I по сравнению с величинами контрольных проб этих же временных интервалов (см. рис. 2) минимальные величины наблюдаются на 10-й минуте, а под влиянием коллагена типа III — на 20-й минуте инкубации. При этом активность ГЦ возрастает на 20—27 % ( $p<0,05$ ).

Наблюдаемые под влиянием коллагенов типа I и III изменения активности циклазной системы в грануляционной ткани (понижение активности АЦ и повышение активности ГЦ) согласуются с результатами работы [12] об ингибировании образования цАМФ в сомитах эмбрионов, культивируемых на коллагене, и данными [7] о содержании цАМФ и цГМФ в фибробластах и тромбоцитах при взаимодействии с коллагеном. По-видимому, понижение активности АЦ, особенно выраженное на 3-и сутки после операции под влиянием коллагена типа III, является одной из причин выраженной активации биосинтеза ДНК и РНК в грануляционной ткани. Правомомерность этого предположения основана на данных о роли повышенных концентраций цГМФ в клетках и низких концентраций цАМФ в системе отношений цГМФ/цАМФ в качестве факторов, активирующих пролиферацию фибробластов и некоторых других типов клеток [1, 7].

Неоднозначность действия коллагена типа I и III проявляется и в отношении ферментов энергетического обмена (см. таблицу). Коллаген типа III на 3-и сутки после операции угнетает активность МДГ на 38 % ( $p<0,01$ ) и КФК на 44 % ( $p<0,01$ ) и не вызывает изменений активности ЛДГ и Г-6-ФДГ. На 7-е сутки после операции направленность изменений МДГ изменяется, возрастает под влиянием коллагена типа I и III соответственно на 20 ( $p<0,05$ ) и 25 % ( $p<0,05$ ), а активность КФК остается без изменений.

Представленные данные свидетельствуют не только о неодинаковых регуляторных эффектах коллагена типа I и III, но и различиях, обусловленных состоянием грануляционной ткани на разных стадиях раневого процесса. Следовательно, физиологический или биохимический ответ в значительной мере зависит от состояния и, по-видимому, от типа ткани, которая рецептирует молекулы коллагена. Подтверждением этому служит сравнение вы-

исприведенных результатов с данными экспериментов, выполненных на интактной печени крыс, которая также богата соединительнотканскими элементами. Выявлено, что коллаген типа I и III в гомогенатах печени, как и в грануляционной ткани на 7-е сутки после операции, повышает активность МДГ на 30 ( $p < 0,01$ ) и 49 % ( $p < 0,01$ ). В то же время коллаген типа III не влияет на уровень активности Г-6-ФДГ и на 33 % ( $p < 0,01$ ) активизирует К-6-ФДГ, чего не наблюдалось в опытах с грануляционной тканью.

Результаты настоящего исследования расширяют наши представления о функциях растворимых форм коллагена типа I и III в качестве регуляторов тканевого метаболизма. В частности, закономерное накопление коллагена типа III (или продуктов его деградации) в молодой грануляционной ткани оказывает определенное действие на рецепторный аппарат клеток, изменяет уровни активности АЦ и ГЦ, стимулирует биосинтез нуклеиновых кислот, изменяет активность ряда ферментов энергетического обмена и, следовательно, стимулирует пролиферативные процессы в тканях на ранних стадиях заживления ран.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Берридж М. Д. // В мире науки: Пер. с англ. — М., 1985. — № 12. — С. 98—109.
2. Жантеева Е. М., Богоявленская Н. В. // Вопр. мед. химии. — 1972. — № 5. — С. 545—549.
3. Лебедев Д. А. // Успехи совр. биол. — 1979. — Т. 88, № 1 (4). — С. 36—49.
4. Левин Ф. Б., Якубсон И. М. // Лаб. дело. — 1978. — № 4. — С. 321—324.
5. Серов В. В., Шехтер А. Б. Соединительная ткань. — М., 1981.
6. Слущкий Л. И. // Успехи совр. биол. — 1984. — Т. 97, № 1. — С. 116—130.
7. Федоров Н. А. Биологическое и клиническое значение циклических нуклеотидов. — М., 1979.
8. Bergmeyer H., Bernt E. // Methods of Enzymatic Analysis. — New York, 1974. — Vol. 4. — P. 613—618.
9. Bolduini C., Sinigaglia F., Salvini C. et al. // Haemostasis. — 1984. — Vol. 14, N 2. — P. 158—163.
10. Gerstenfeld L., Grauford D., Boedker R.,

- Doty P. // Molec. Cell. Biol. — 1984. — Vol. 4, N 8. — P. 1483—1492.
11. Kornberg A. // Meth. Enzymol., 1955. — Vol. 1. — P. 323—327.
12. Kosher R. A., Savage M. P. // Exp. Zool. — 1979. — Vol. 208, N 1. — P. 35—40.
13. Miller A. // Biochemistry of Collagen. — New York, 1976. — P. 85—120.
14. Parry G., Zee E., Farson D. et al. // Exp. Cell Res. — 1985. — Vol. 156, N 2. — P. 487—499.
15. Sait G., Imada J., Takagi J. et al. // J. biol. Chem. — 1986. — Vol. 261, N 3. — P. 1355—1358.
16. Sompath T., Natunson M., Keddi A. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1984. — Vol. 81, N 11. — P. 3419—3423.
17. Sykes B. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1976. — Vol. 72, N 4. — P. 1472—1480.
18. Trelstad R. // Analyt. Biochem. — 1976. — Vol. 71, N 4. — P. 114—119.
19. Uitto J. // Biochim. biophys. Acta. — 1970. — Vol. 201, N 3. — P. 438—444.
20. Viljanto J., Penttinen R., Raekallio S. // Acta chir. scand. — 1981. — Vol. 147, N 1. — P. 7—13.
21. White F. F. // Meth. Enzymol. — 1974. — Vol. 38. — P. 41—57.
22. Wroblewski F., Zedue J. // Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.). — 1955. — Vol. 90. — P. 210—217.

Поступила 06.01.87

#### DIFFERENCES BETWEEN COLLAGENS OF THE INTERSTITIAL TYPES AND THEIR EFFECT ON BIOSYNTHESIS OF DNA, RNA AND ACTIVITY OF SOME ENZYMES IN BIOPTIC SAMPLES OF RATS WOUND TISSUES

M. A. Zaidenberg, V. I. Andreev

A. V. Vishnevsky Institute of Surgery, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Effect of collagen soluble forms of the I and III types on biosynthesis of DNA, RNA on activity of adenylate and guanylate cyclase as well as on activity of several key enzymes of energy metabolism was studied in bioptic samples of wound granulation tissue and in homogenates of intact rat liver tissue *in vitro*. Effects of the collagen soluble forms were shown to depend on their type and the step of wounds healing. Collagen of the III type stimulated DNA and RNA biosynthesis inhibited adenylate cyclase and activated guanylate cyclase within 3 days after the operation. Activities of lactate-, malate-, glucose-6-phosphate dehydrogenases and creatine phosphokinase were also dissimilarly altered in presence of collagens of the I and III types. The data obtained suggest that collagens of the I and III types affected dissimilarly the metabolic processes in wound tissues within various steps of their healing.

М. М. Рахимов, Қ. Т. Алматов, Д. Т. Мирталипов, Г. М. Қасимова,  
Н. И. Ходжаева, А. А. Абдушукуров, О. Н. Горбатая

## ОБРАЗОВАНИЕ ФОСФАТИДИЛЭТАНОЛА ПРИ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Ташкентский университет им. В. И. Ленина, Ташкентский медицинский институт

Структурно-функциональные свойства мембран во многом определяются их фосфолипидным составом, который регулирует проницаемость их для различных веществ и продуктов метаболизма, сопряженность и последовательность многочисленных ферментативных процессов. В настоящее время считается установленным, что хроническое воздействие этанола сопровождается заметными перестройками липидной структуры мембран [3]. Показано, что изменение структуры мембран под действием этанола связано с изменением их фосфолипидного состава [15, 16]. Данное обстоятельство имеет важное значение для адаптации мембран к повреждающему воздействию алкоголя [7]. Процесс изменения фосфолипидного состава мембран, по-видимому, является следствием активации адаптационных механизмов, направленных на сохранение целостности мембран. Не исключено, что при воздействии этанола одним из факторов, участвующих в изменении химического и физического состояния мембран и их фосфолипидов, может быть непосредственное включение этанола в полярную часть молекул фосфолипидов с образованием аномального фосфолипида — фосфатидилэтанол (ФЭ) [12, 15, 16]. Его образование возможно в результате протекания реакции трансфосфатидилирования, катализируемой фосфолипазой D мембран, в которую может вовлекаться этанол [10]. Однако экспериментального доказательства это предположение пока не получило. Учитывая вышесказанное, мы поставили перед собой следующие задачи: изучить распределение ФЭ в органах подопытных животных, принимавших этанол (в печени, сердце, мозге, легких, почках, кишечнике, эритроцитах и митохондриях); выяснить возможность образования ФЭ при участии эндогенной фосфолипазы D мембран, наличие которой в митохондриях нами показано ранее [2, 9]; установить, образуется ли этот фосфолипид в эри-

троцитах больных хроническим алкоголизмом ввиду возможного диагностического значения этого явления.

### Методика

При исследовании на животных в опыт брали белых крыс-самцов массой 100—150 г. Эксперименты с алкоголизацией осуществляли в соответствии с работой [9]. Для этого крыс разделили на 3 группы по 10 животных в каждой: 1-я группа была контрольной, животным 2-й группы вводили внутривентально этанол, крысы 3-й группы получали этанол с жидким кормом.

Митохондрии из печени выделяли, используя в качестве среды выделения 10 mM трис-HCl-буфер pH 7,4, содержащий 0,25 M сахарозы [1].

Для выделения «теней» митохондрий 17 мл суспензии митохондрий (с концентрацией белка 20 мг/мл) разбавляли 68 мл 2 mM трис-HCl-буфера pH 7,4 и выдерживали для набухания в течение 20 мин при медленном перемешивании на магнитной мешалке при 2—4 °C. Сокращение митохондрий осуществляли путем добавления 1/3 объема 40 % раствора сахарозы в том же буфере. После этого митохондрии центрифугировали при 16 000 g в течение 40 мин, осадок («тени» митохондрий) промыли 80 мл 2 mM трис-HCl-буфера pH 7,4, содержащего 10 % сахарозы. Все операции по выделению и фрагментации митохондрий проводили при 2—4 °C.

Для клинико-биохимических исследований были отобраны больные хроническим алкоголизмом II и III стадий (возраст от 21 года до 48 лет) по классификации, представленной в работе [11]. Больные были разделены на 3 группы. В 1-ю и 2-ю группы вошли 18 больных, у которых отмечались симптомы алкогольного абстинентного синдрома различной интенсивности. Из них 8 больных поступили в стационар в состоянии опьянения (1-я группа). Анализ на алкоголь у этих больных показал наличие у них в крови 0,2—0,8 % этилового спирта. У остальных 10 больных за 2—5 дней до поступления в стационар выявлялась массивная алкоголизация, в момент исследования имели место симптомы лишения алкоголя различной степени выраженности (2-я группа). У этой группы больных алкоголизация была искусственно увеличена: за 1 ч до исследования они получили по 100 мл 50 % этилового спирта. Еще 6 больных поступили в стационар в состоянии алкогольного психоза (3-я группа). Исследование эритроцитов крови было проведено в день поступления больных в стационар, до начала лечения. Контрольную группу составили 16 психически и соматически здоровых мужчин в возрасте от 19 до 45 лет,

у которых исключался эпизодический прием алкоголя.

Во всех случаях эритроциты выделяли из крови, собранной в пробирки с 3,8 % раствором цитрата натрия (1 мл на 10 мл крови). Кровь центрифугировали при 2000 g в течение 10 мин, надосадочную жидкость и слой лейкоцитов и тромбоцитов отсасывали. Эритроциты дважды промывали физиологическим раствором и осаждали центрифугированием.

Фосфолипиды из клеток и внутриклеточных органелл экстрагировали по методу [6]. Процентное содержание фосфолипидов в эритроцитах, митохондриях и «тенях» митохондрий определяли методом проточной горизонтальной хроматографии в модификации [5] в системе растворителей хлороформ—метанол—28 % аммиак (65 : 25 : 5). Обнаружение ФЭ проводили на стандартных пластинках (Silufol, ЧССР) после двумерной тонкослойной хроматографии. Система растворителей в первом направлении хлороформ—метанол—вода (65 : 25 : 4), во втором—бутанол—уксусная кислота—вода (60 : 20 : 20). Идентификацию ФЭ проводили с помощью качественных реакций, а также встречным синтезом из фосфатидилхолина (ФХ) и этанола, используя фосфолипазу D из среднеазиатской редьки [8]. Содержание ФЭ определяли по фосфору [21].

Для определения изменений содержания фосфатидных (ФК) и лизофосфатидных кислот (ЛФК) митохондрии или «тени» митохондрий инкубировали при 37°C в течение 2 ч. В качестве среды инкубации использовали 0,01 M трис-HCl-буфер pH 7,4, содержащий 0,25 M сахарозу. При изучении влияния ионов кальция, ЭГТА и ЭДТА на изменение уровня ФК и ЛФК в среду инкубации добавляли 2 или 10 mM Ca<sup>2+</sup>, 2 mM ЭГТА или 5 mM ЭДТА. После инкубации фосфолипиды экстрагировали и ФК, ЛФК определяли количественно, как описано выше.

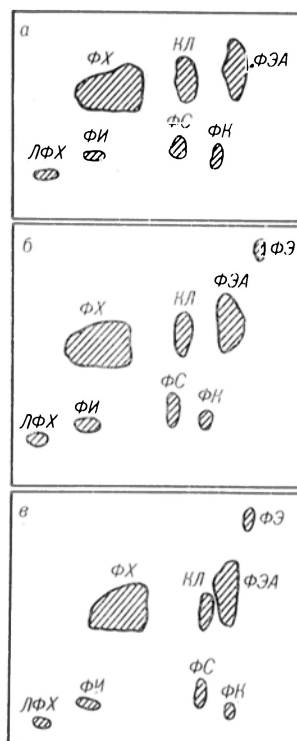
Для определения содержания холина и этаноламина 0,2--0,5 мл суспензии митохондрий разбавляли ацетатным буфером pH 5,6 до 4--10 мл, подвергали воздействию ультразвука (44 кГц в течение 4 мин), затем добавляли субстрат до конечной концентрации 2 мг/мл: ФХ, фосфатидилэтанолламин (ФЭЛ) или сумму фосфолипидов яичного желтка. Обработку ультразвуком повторяли (5 мин), вводили активатор—Ca<sup>2+</sup> (2 mM) и инициатор реакции—диэтиловый эфир (20 %). Смесь инкубировали при интенсивном перемешивании 0,5--4 ч при 37°C. После инкубации фосфолипиды экстрагировали хлороформом. В водном слое белки осаждали добавлением 10 % трихлоруксусной кислоты, центрифугировали, в центрифугате определяли содержание холина и этаноламина [8]. При определении этаноламина для полного осаждения белков водный слой нагревали на кипящей водяной бане в течение 15 мин. Исходное содержание холина и этаноламина устанавливали до инкубации аналогично.

Измерение содержания продуктов трансферазной реакции, катализируемой фосфолипазой D митохондрий—фосфатидилметанола, ФЭ и лизофосфатидилметанола (ЛФМ)—выполняли методом двумерной тонкослойной хроматографии, как описано выше. Реакцию проводили в тех же условиях, что и при анализе холина и этаноламина, но в реакционную среду вводили второй субстрат—этанол (8 % по объему) или метанол (4 % по объему).

Для определения летучих соединений в гидролизате пята, соответствующие ФЭ, экстрагировали хлороформом с нескольких тонкослойных хроматограмм; растворитель удаляли. Затем полученный продукт суспендировали в 1 мл 0,05 M ацетатного буфера pH 5,6, содержащего фосфолипазу D (0,1 мг/мл), Ca<sup>2+</sup> (50 mM), инкубировали 4 ч при 25°C. После инкубации смесь замораживали жидким азотом, создавали вакуум форвакуумным насосом, затем постепенно размораживали, а летучие компоненты улавливали с помощью патрона с активированным углем. Пробу активированного угля с адсорбированными компонентами вводили в измерительную ячейку масс-спектрометра МАТ-311 и регистрировали масс-спектры летучих соединений.

## Результаты и обсуждение

На рисунке приведены хроматограммы фосфолипидов митохондрий после двумерной тонкослойной хроматографии. В митохондриях печени нормальных животных выявляются ФХ, ФЭА, кардиолипин (КЛ), фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилинозит (ФИ), ФК, ЛФХ. Анализ фосфолипидов митохондрий из печени крыс, получавших этанол внутривентриально и с жидким кормом, показал, что в их составе обна-



Двумерная тонкослойная хроматография фосфолипидов митохондрий печени крыс.

а — в норме; б — при внутривентриальном введении этанола; в — при введении этанола с жидким кормом.

Т а б л и ц а 1  
ФЭ во фракциях фосфолипидов из органов крыс  
при алкогольной интоксикации

Источник фосфолипидов	Контроль	Введение этанола	
		внутрибрюшинно	с жидким кормом
Печень	—	+ - + +	+ +
Сердце	—	+ - +	+
Мозг	—	—	—
Почки	—	+	+
Кишечник	—	+	+
Легкие	—	—	—
Эритроциты	—	+	+

П р и м е ч а н и е. (—) — отсутствие, (+) — присутствие, (+-+) — среднее содержание, (+-+-+) — наибольшее содержание ФЭ (оценено по площади пятна и интенсивности окраски на тонкослойных пластинках).

руживался фосфолипидный компонент, отсутствующий в контрольной группе. Этот фосфолипид идентифицирован нами как ФЭ (см. ниже).

ФЭ обнаруживался не только в митохондриях. Так, изучение фосфолипидного состава других органов и эритроцитов показало, что этот фосфолипид присутствует у алкоголизованных животных не только в печени, но и в почках, сердце, кишечнике и эритроцитах. Он не был обнаружен в мозге и легких (табл. 1). Тот факт, что ФЭ выявляется в митохондриях печени, позволяет изучать возможность образования ФЭ на уровне этих органов. ФЭ, возможно, образуется и в эритроцитах больных хроническим алкоголизмом, что может иметь диагностическое значение.

Основанием для идентификации обнаруженного фосфолипида как ФЭ служили следующие факты. Новый фосфолипид по значениям подвижности в используемых системах растворителей соответствовал ФЭ, синтезированному искусственно при помощи фосфолипазы D из среднеазиатской редьки по описанной ранее методике [10]. Реакционная среда для синтеза этого фосфолипида в общем объеме 2,5 мл содержала 0,05 М ацетатный буфер pH 5,6, 5 мМ ФХ, 160 мг силикагеля, 0,5 мл этанола. Синтезированный ФЭ был отделен от остальных компонентов реакционной среды хроматографически и сравнен с фосфолипидом, обнаруженным у подопытных животных. Оба фосфолипида имели одинаковые подвижности в системах,

используемых для хроматографии ( $R_f^I=0,91$ ;  $R_f^{II}=0,81$ ), оба давали положительную реакцию с реактивом Васьковского и отрицательную с реактивами Драгендорфа и нингидрином. При гидролизе обоих фосфолипидов фосфолипазой D из редьки образовывались ФК и этанол. Это было доказано при помощи регистрации масс-спектров летучих продуктов реакции, в результате которой были получены основные пики, соответствующие массовым числам 48 (M), 47 (M-1), 46 (M-2), 15 ( $CH_3$ ), 14 ( $CH_2$ ), характерные для спектра этанола.

Эти факты позволили сделать предположение, что этанол, помимо известных его путей превращения в организме, может непосредственно включаться в состав фосфолипидов. Не исключено, что такое включение может протекать за счет взаимодействия фосфолипидов мембран и этанола и катализироваться эндогенными ферментами или ферментными системами. Одним из таких ферментов может выступать фосфолипаза D, которая способна катализировать реакцию между этанолом и мембранными фосфолипидами с образованием ФЭ в результате замещения алкильной группы в полярной части молекулы фосфолипида на этанол. В модельных системах эти реакции хорошо изучены [10, 13].

Поскольку имеются сведения о присутствии фосфолипазы D в тканях животных [19, 20] и о наличии этого фермента в митохондриях [9, 14, 18], была исследована возможность образования ФЭ в митохондриях под воздействием эндогенной фосфолипазы D. Для установления наличия фосфолипазы D в митохондриях изучали динамику изменения содержания продуктов ее гидролитического действия на фосфолипиды и лизофосфолипиды — ФК и ЛФК, холина и этаноламина — при инкубации органелл. Исследовали также возможность образования продуктов ее трансферазного действия — ФЭ и фосфатидилметанола (ФМ) — в митохондриях *in vitro*. В первом случае митохондрии инкубировали в течение 2 ч при 37°C в 10 мМ трис-HCl-буфере pH 7,4, содержащем 0,25 М сахарозу. При этом было установлено увеличение содержания ФК с 1,3 до 4,0 % от общего содержания фосфолипидов (т. е. в 3,1

Образование фосфатидных и лизофосфатидных кислот, холина, этаноламина и продуктов трансфери-  
разной реакции при инкубации (37 °C) в течение 2 ч ( $M \pm m$ )

Условия опыта	Продукты реакции					
	фосфатид- ная кис- лота	лизофос- фатидная кислота	холин или эта- ноламин, мкмоль, на мг белка	фосфати- дилмета- нол	лизофос- фатидил- метанол	фосфати- дилэта- нол
	в % к сумме фосфо- липидов			в % к общему количеству фос- фолипидов в начале инкубации		
Митохондрии	4,0±0,5	6,0±0,6	—	—	—	—
Митохондрии+2 мМ CaCl <sub>2</sub>	4,6±0,5	6,7±0,7	—	—	—	—
Митохондрии+2 мМ ЭГТА	3,4±0,2	5,2±0,3	—	—	—	—
«Тени» митохондрий	5,0±0,7	6,4±0,5	—	—	—	—
«Тени» митохондрий+10 мМ CaCl <sub>2</sub>	5,6±0,6	7,4±0,6	—	—	—	—
«Тени» митохондрий+5 мМ ЭДТА	1,8±0,2	3,2±0,3	—	—	—	—
Митохондрии+5 мМ ФХ	—	—	6,1±0,5	—	—	—
Митохондрии+5 мМ ФЭА	—	—	57,0±4,9	—	—	—
Митохондрии+5 мМ ФХ+4% метанол	—	—	—	2,0±0,1	0,5±0,01	—
Митохондрии+5 мМ ФЭА+4% мета- нол	—	—	—	4,0±0,2	0,8±0,02	—
Митохондрии+5 мМ ФХ+8% этанол	—	—	—	—	—	0,5±0,01
Митохондрии+5 мМ ФЭА+8% эта- нол	—	—	—	—	—	3,0±0,3

Примечание. Содержание ФК и ЛФК в начале инкубации было следующим: в мито-  
хондриях  $1,3 \pm 0,3$  и  $1,9 \pm 0,3\%$ , в «тенях» митохондрий  $1,2 \pm 0,2$  и  $2,0 \pm 0,3\%$  от суммы фосфоли-  
пидов (по фосфору).

раза) и ЛФК — от 1,9 до 6,0 % (в 3,15  
раза; табл. 2).

Эти данные позволяют предполо-  
жить, что фосфолипаза D действительно  
присутствует в митохондриях. Од-  
нако часть ЛФК и ФК может образо-  
ваться за счет их АТФ-зависимого  
синтеза из эндогенных субстратов. По-  
этому были проведены те же экспери-  
менты с «тенями» митохондрий, кото-  
рые не осуществляли АТФ-зависимого  
синтеза ФК и ЛФК. Эти соединения  
синтезировались в митохондриях на  
наружной мембране [22]. Как пока-  
зали эксперименты, в «тенях» также  
происходило накопление продуктов  
гидролиза фосфолипидов и лизофосфо-  
липидов фосфолипазой D. Так, содер-  
жание ФК увеличилось в 4,2 раза,  
ЛФК — в 3,2 раза. Во всех случаях  
ионы Ca<sup>2+</sup>, известные как активаторы  
фосфолипазы D, повышали количество  
этих продуктов в 1,11—1,13 раза, а  
ЭГТА и ЭДТА, являющиеся ингиби-  
торами фермента, напротив, снижали  
его в 1,3—3,7 раза (см. табл. 2).

Помимо ФК и ЛФК, продуктами  
гидролитической реакции, катализи-  
руемой фосфолипазой D, являются  
спирты, отщепляемые от полярной ча-  
сти молекул фосфолипидов, в частно-  
сти холин и этаноламин при гидроли-  
зе ФХ и ФЭА. Для выявления фосфо-

липазы D в митохондриях органеллы  
инкубировали с экзогенными ФХ и  
ФЭА, предварительно подвергая инку-  
бационную смесь воздействию ультра-  
звука. Анализ водорастворимых про-  
дуктов реакции показал, что в ходе  
инкубации образовалось 6,1 мкмоль  
холина и 57 мкмоль этаноламина на  
1 мг белка.

При инкубации митохондрий в при-  
сутствии экзогенных фосфолипидов и  
спиртов под действием фосфолипазы D  
должны были образовываться соот-  
ветствующие фосфолипиды с обнов-  
ленными алкильными остатками. Дей-  
ствительно, если в среду инкубации  
вводили в качестве экзогенных спир-  
тов метанол или этанол, то в ходе ин-  
кубации происходило образование ФМ  
и ФЭ — фосфолипидов, не присущих  
митохондриям. Хроматографический  
анализ продуктов реакции показал,  
что за 2 ч инкубации в реакционной  
среде образуется ФМ: 2 % от обще-  
го количества фосфолипидов системы,  
если в качестве субстратов были ис-  
пользованы метанол и ФХ и при инку-  
бации митохондрий с 4 % метанолом  
и ФЭА. В этом случае, помимо ФМ,  
было обнаружено 0,5 и 0,8 % ЛФМ  
соответственно. Образование ЛФМ мо-  
жет быть связано с трансалкилирую-  
щим действием фосфолипазы D на



Таблица 3  
Изменение содержания фосфолипидов в мембранах эритроцитов больных хроническим алкоголизмом (в % к сумме фосфолипидов) ( $M \pm m$ )

Фосфолипид	Контроль	Абстинентный синдром						Алкольный делирий		
		1-я группа	% к конт-ролю	p	2-я группа	% к конт-ролю	p	3-я группа	% к конт-ролю	p
ФХ	27,80 ± 1,28	32,56 ± 1,57*	117,1	<0,05	31,01 ± 1,12	111,5	>0,05	28,44 ± 1,33	102,3	>0,5
ЛФХ	7,63 ± 0,25	5,08 ± 0,35**	66,5	<0,001	5,50 ± 0,72	72,1	<0,01	7,54 ± 1,32	98,8	<0,5
ФЭА	15,26 ± 0,51	21,50 ± 0,80**	140,8	<0,001	23,69 ± 1,96	154,6	<0,001	18,95 ± 1,40	124,2	<0,02
ЛФЭА	8,98 ± 0,27	8,06 ± 0,18**	89,7	<0,001	9,27 ± 1,23	103,2	<0,5	10,23 ± 0,28	113,9	<0,001
КЛ	8,98 ± 0,61	6,33 ± 0,70**	70,5	<0,001	8,45 ± 0,92	94,1	<0,5	6,96 ± 0,61	77,5	<0,02
ЛКЛ	0,75 ± 0,14	1,65 ± 0,18**	220,0	<0,001	0,79 ± 0,20	105,3	<0,5	1,60 ± 0,33	213,3	<0,02
ФС	3,91 ± 0,20	4,55 ± 0,42*	116,3	<0,05	3,62 ± 0,66	92,6	<0,2	4,41 ± 0,08	112,7	<0,05
ФИ	1,69 ± 0,19	1,52 ± 0,39*	90,0	<0,001	1,63 ± 0,34	96,6	<0,5	1,60 ± 0,06	97,6	<0,5
СМ	19,60 ± 1,04	14,59 ± 0,95**	74,4	<0,001	12,92 ± 0,68	65,9	<0,001	16,09 ± 0,68	82,1	<0,01
ФК	2,06 ± 0,23	2,16 ± 0,36	104,8	<0,5	1,43 ± 0,22	69,4	<0,05	2,53 ± 0,07	122,8	<0,05
ЛФК	3,34 ± 0,23	1,95 ± 0,48	58,3	<0,01	1,69 ± 0,60	50,6	<0,01	1,65 ± 0,46	49,1	<0,001
ФЭ	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Примечание. (—) — отсутствие и (+) — присутствие ФЭ.

митохондриальные лизофосфолипиды, а также с гидролитическим действием эндогенной фосфолипазы  $A_2$  на образующийся ФМ. Если в этих опытах метанол заменяли на этанол, то в качестве продукта реакции был обнаружен ФЭ. Его содержание в тех же условиях инкубации составило соответственно 0,5 и 3 % при использовании в качестве экзогенных фосфолипидов ФХ и ФЭА. Из этих данных следует, что в митохондриях печени действительно протекают реакции гидролиза и трансфосфатидилирования, о которых шла речь выше. Это позволяет предположить, что ФЭ в митохондриях алкоголизированных животных образуется в результате трансферазных реакций, катализируемых эндогенной фосфолипазой D.

Обнаружение ФЭ в эритроцитах больных хроническим алкоголизмом может представлять интерес для целей диагностики. Нами был проанализирован фосфолипидный состав эритроцитов из крови больных с разными видами и степенью алкогольной патологии. Из табл. 3 видно, что ФЭ обнаруживался только у больных 2-й группы, у которых перед обследованием была проведена алкогольная провокация. Следует отметить, что алкогольная провокация здоровых людей не приводила к появлению в их эритроцитах этого фосфолипида. Таким образом, анализ эритроцитов на присутствие в них ФЭ может, по-видимому, иметь определенное значение при диагностике хронического алкоголизма. У больных 1-й и 3-й групп ФЭ не был обнаружен, однако фосфолипидный состав их эритроцитов существенно отличался от контроля. Эритроциты больных алкоголизмом независимо от вида и степени патологии имели сниженный уровень сфингомиелинов — СМ (в 1,22—1,51 раза) и ЛФК (в 1,71—2,03 раза). Изменение содержания других фракций фосфолипидов зависело от состояния больных алкоголизмом.

У больных 1-й группы обнаружено увеличение фракции ФХ, ФЭА и уменьшение содержания их лизосоединений. Это, по-видимому, связано с ускорением реакций ацилирования, которые катализирует эндогенная ферментная система, зависящая от АТФ, магния и коэнзима А и превращающая лизофосфолипиды в соответствующ-

щие фосфолипиды. Увеличение содержания основной фракции фосфолипидов мембран эритроцитов больных хроническим алкоголизмом в состоянии абстинентного синдрома сопровождалось уменьшением фракции КЛ на 29,5 %, что свидетельствует о сниженном синтезе этих соединений или усилении гидролитической активности фосфолипаз А, поскольку при этом одновременно в 2,2 раза повышалось содержание лизокардиолипинов — ЛКЛ.

Дополнительная алкоголизация больных в состоянии абстиненции (2-я группа), как указывалось выше, приводила к образованию в мембранах эритроцитов ФЭ. При этом содержание ФХ в некоторой степени снижалось, а содержание ФЭА, напротив, повышалось по сравнению с таковым у больных 1-й группы, которые этанол не получали.

При изучении фосфолипидов эритроцитарных мембран у пациентов 3-й группы (состояние алкогольного делирия) установлено, что содержание ФХ у них не отличалось от нормы, содержание ФЭА было вдвое меньше, чем у больных 1-й группы, но оставалось повышенным по сравнению с контролем, а количество лизофосфатидилэтанолamina (ЛФЭА) было больше, чем у лиц 1-й группы. Уровни КЛ, ЛКЛ и ФС были такими же, как у больных в состоянии абстиненции. Отличительной чертой алкогольного делирия было увеличение содержания ФК (на 22,8 %).

Таким образом, можно видеть, что при хроническом алкоголизме происходят изменения в фосфолипидном составе мембран эритроцитов, которые, по-видимому, зависят от вида и степени алкогольной патологии. Возможно, они отражают компенсаторно-приспособительные реакции мембранных структур на хроническую алкогольную интоксикацию.

Впервые образование ФЭ в клетках крыс при алкогольной интоксикации было показано в работах [12, 16], в которых было выдвинуто положение о том, что в биосинтезе ФЭ может участвовать фосфолипаза D. Новые данные, полученные в настоящей работе, позволяют заключить, что ФЭ может быть обнаружен в различных органах алкоголизированных животных: печени, почках, сердце, кишечнике. Он обнаружен также в эритроци-

тах и митохондриях печени крыс, получавших этанол. Показано участие фосфолипазы D митохондрий в синтезе этого аномального фосфолипида. ФЭ обнаружен в эритроцитах части больных хроническим алкоголизмом.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Алматов К. Т., Агзамов Х., Рахимов М. М., Туракулов Я. Х. // *Вопр. мед. химии.* — 1982. — № 4. — С. 50—56.
2. Алматов К. Т., Горбатая О. Н., Ходжаева Н. И. и др. // *Укр. биохим. журн.* — 1987. — Т. 59, № 4. — С. 93—96.
3. Бузов Ю. В., Ведерникова П. П. *Нейрохимия и фармакология алкоголизма.* — М., 1985.
4. Груздева К. М., Высокогорский В. Б. // *Биологические основы алкоголизма.* — М., 1984. — С. 59—64.
5. Каргаполов А. В. // *Биохимия.* — 1981. — Т. 46, № 4. — С. 691—697.
6. Кейтс М. *Техника липпидологии:* Пер. с англ. — М., 1975. — С. 74—77.
7. Рахимов М. М. // *Биологические мембраны и мембраноактивные соединения.* — Ташкент, 1985. — С. 267—291.
8. Рахимов М. М., Ахмеджанов Р., Ташмухамедов Б. А. // *Биохимия.* — 1979. — Т. 44, № 1. — С. 33—39.
9. Рахимов М. М., Горбатая О. Н., Пенькова Л. П. // *Вопр. мед. химии.* — 1987. — № 2. — С. 90—93.
10. Рахимов М. М., Мадьяров Ш. Р., Бабасов М. У. // *Узб. биол. журн.* — 1979. — № 3. — С. 7—10.
11. Стрельчук И. В. *Интоксикационные психозы.* — М., 1970.
12. Alling C., Gustavsson L., Mansson J. et al. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1984. — Vol. 793, N 1. — P. 119—122.
13. Dawson R. M. C. // *Biochem. J.* — 1967. — Vol. 102. — P. 205—210.
14. Dharmalingam K., Jayaraman J. J. // *Ibid.* — 1972. — Vol. 128. — P. 45.
15. Goldstein D., Chin J. // *Fed. Proc.* — 1981. — Vol. 40. — P. 2073—2076.
16. Gustavsson L., Alling C., Mansson J. // *Acta pharmacol. (Kbh.).* — 1983. — Vol. 53, N 2. — P. 10.
17. Littleton J. M. // *J. roy. Soc. Med.* — 1983. — Vol. 76, N 7. — P. 593—601.
18. Quarles R. H. // *Biochem. J.* — 1969. — Vol. 112. — P. 793—801.
19. Saito M., Kanfer J. N. // *Arch. Biochem.* — 1975. — Vol. 169. — P. 318—323.
20. Taki T. O., Kanfer J. N. // *J. biol. Chem.* — 1979. — Vol. 254, N 19. — P. 9761—9765.
21. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y., Vasendin J. M. // *J. Chromatogr.* — 1975. — Vol. 114, N 1. — P. 129—141.
22. Zborowsky J., Wojtczak L. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1967. — Vol. 187. — P. 73—79.

Получена 06.01.87

## FORMATION OF PHOSPHATIDYL ETHANOL IN ALCOHOL INTOXICATION

*M. M. Rakhimov, K. T. Almatov, D. T. Mirlalipov, G. M. Kasimova, N. I. Khodzhaeva, A. A. Abdushukurov, O. N. Gorbataya*

State University, Medical School, Tashkent

Phospholipid composition was studied in membranes of various tissues as well as of mitochondria and erythrocytes of rats with alcohol intoxication. A new phospholipid — phosphatidyl ethanol, which was absent in tissues of control animals, was detected in liver, heart, kidney, small intestine tissues as well as in erythrocytes and liver mitochondria of rats consuming ethanol independently on the alcohol administration procedure used. Studies of rat liver mitochondria and mitochondrial "ghosts"

showed that formation of phosphatidyl ethanol and phosphatidic acid was catalyzed by membranal endogenous phospholipase D. Phosphatidyl ethanol appears to be of importance in membranotropic effect of ethanol — one of main factors participating in alcohol pathology development. This phospholipid was found also in erythrocytes and blood of patients with chronic alcoholism, which were subjected to alcohol provocation before examination. In erythrocytes of the other group of patients with chronic alcoholism, not provoked with alcohol, the phosphatidyl ethanol fraction was not found but content of phosphatidyl ethanolamine was distinctly increased. In patients with delirium tremens phosphatidyl ethanol was not observed, content of phosphatidyl ethanolamine was not increased, while amount of phosphatidic acid was considerably elevated.

УДК 615.355:577.152.314].036.8:616.155.392-08

*А. С. Карсакевич, О. Б. Кинстлер, А. Ж. Дауварте, И. А. Вина*

## ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ L-АСПАРАГИНАЗЫ НА ОСНОВЕ ВОДОРАСТВОРИМОЙ КАРБОКСИМЕТИЛЦЕЛЛЮЛОЗЫ: БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Институт органического синтеза АН Латвийской ССР;  
Институт микробиологии им. А. Кирхенштейна АН Латвийской ССР, Рига

Среди ферментов медицинского назначения особое место занимает L-аспарагиназа (КФ 3. 5. 1.1) — фермент, обладающий выраженной противолейкозной активностью и хорошо зарекомендовавший себя при лечении острой лимфобластической лейкемии человека [1, 5]. Однако факторами, сдерживающими более широкое применение L-аспарагиназы, как и других ферментов, вводимых парентерально, являются иммунологическая несовместимость (в 20—25 % случаев), высокая скорость инактивации его протеазами крови, а также антителами (благодаря антигенности L-аспарагиназы), быстрое выведение из кровяного русла.

Устранить эти недостатки с целью создания более эффективных терапевтических форм L-аспарагиназы можно с помощью методов иммобилизации фермента на водорастворимых полимерах [3]. В этой связи значительный интерес представляло биологическое изучение стабилизированных форм L-аспарагиназы, модифицированной водорастворимой карбоксиметилцеллюлозой (КМЦ), применяемой в фармацевтической промышленности в качестве наполнителя и пролонгатора дей-

ствия лекарственных соединений [6, 7].

Ковалентный метод связывания фермента с КМЦ описан нами ранее [4]. Однако вопрос о влиянии степени модификации L-аспарагиназы данным полимером на биологические свойства конечного продукта не обсуждался. Такие исследования могут иметь большое значение при выборе оптимальной иммобилизованной формы L-аспарагиназы с максимальным сохранением всех положительных свойств, приобретенных в результате полимерной модификации фермента.

Цель данной работы — экспериментальное изучение противолейкозной активности иммобилизованных образцов L-аспарагиназы, отличающихся количественным содержанием ковалентно связанной КМЦ, а также кинетическое исследование пролонгированности действия в плазме крови наиболее активных образцов.

### Методика

Использовали L-аспарагиназу *E. coli* — высокоочищенный фермент с удельной активностью 120—150 МЕ/мг белка (экспериментальный завод Института органического синтеза АН Латвийской ССР). Лиофилизирован-

ные образцы получали в соответствии с методикой [4], используя различные весовые соотношения массы полимера и фермента: 0,5/1, 1/1, 4/1. Дополнительно для блокировки оставшихся реакционно способных групп полимера добавляли глицин в 2,5-кратном избытке по отношению к данному количеству КМЦ.

Ферментативную активность нативной и иммобилизованной L-аспарагиназы определяли методом прямой несселеризации [2], а содержание белка — методом Лоури [8].

Биологическую активность КМЦ-аспарагиназ оценивали по их противовейкозному эффекту в опытах на мышах. Лимфоидную лейкомию L 5178y прививали мышам-самцам BDF<sub>1</sub> внутривенно в количестве 10<sup>6</sup> клеток на мыш. День прививки принимали за нулевой. Лечение проводили ежедневно с 3-го по 7-й день опыта внутривенным введением образцов L-аспарагиназы и КМЦ-аспарагиназ в дневных дозах 50, 100, 200 МЕ на 1 кг массы тела. Ферментные образцы растворяли в физиологическом растворе в 1-й день введения и хранили при 5°C. В каждой группе было 6 животных. Мышей контрольной группы не лечили. Наблюдение за животными проводили в течение 60 дней. Критериями эффективности противовейкозного действия испытываемых образцов служили увеличение продолжительности жизни животных по сравнению с контрольной группой и количество полностью выживших животных в каждой группе.

Для оценки скорости выведения L-аспарагиназы и КМЦ-аспарагиназы ферментные образцы в 3 параллельных опытах вводили внутривенно через ушную вену кроликам (2,5—2,6 кг) породы Белый великан в дозе 400 МЕ на 1 кг массы тела в 2 мл физиологического раствора. Пробы крови подопытных животных (2—3 мл) отбирали через определенные промежутки времени в гепаринизированные пробирки, центрифугированием отделяли красные кровяные тельца и в полученной плазме определяли L-аспарагиназную активность.

Соответствующие параметры скорости выведения ферментных препаратов и коэффициентов корреляции [9, 10] рассчитывали по экспериментальным точкам методом наименьших квадратов. Активность выражали в про-

центах по отношению к среднему значению ферментативной активности, установленному через 1 ч после введения образцов.

## Результаты и обсуждение

Как видно из табл. 1, противовейкозное действие КМЦ-аспарагиназ показало их более высокую (в 1,25—3,2 раза) эффективность по сравнению с L-аспарагиназой. Наилучшие результаты дало лечение КМЦ-аспарагиназой, полученной при весовом соотношении КМЦ и фермента 1/1, и обладающей достаточно высокой ферментативной активностью. Небольшое или значительное содержание полимера в конечном продукте приводило к некоторому снижению лечебного эффекта. При использовании КМЦ-аспарагиназ вылечено 100 % животных.

Далее проведено сравнительное биологическое исследование на кроликах с целью определения кинетических характеристик процесса циркуляции в крови КМЦ-аспарагиназы, обладающей наибольшей противовейкозной активностью, и L-аспарагиназы. Наличие первоначальной фазы сравнительно быстрого (в течение первых 7—10 ч) и последующей фазы медленного снижения аспарагиназной активности указывало на целесообразность определения кинетических параметров процессов циркуляции активных образцов по методу двухфазной модели [10] и методом [9]. Первый подход позволил вычислить константы элиминации ( $K_e$ ) и период полужизни ( $T_{1/2}$ ) образцов отдельно для каждой

Таблица 1

Противовейкозная активность КМЦ-аспарагиназ

Образец	Соотношение КМЦ/L-аспарагиназа, мг/мг	Ферментативная активность, МЕ/мг белка	Лечебная доза, МЕ на 1 кг массы тела	Средняя продолжительность жизни, дни	Продление жизни по сравнению с контролем, %	p	Количество выживших животных, %
L-аспарагиназа		121,4	50	27,2±3,8	25,3	0,1	—
			100	32,5±2,3	49,8	0,001	—
			200	52,2±5,0	>140,6	0,001	66,7
КМЦ-аспарагиназа	0,5/1	114,1	50	29,8±1,1	37,3	0,001	—
			100	53,3±4,4	>145,6	0,001	66,7
			200	57,2±2,8	>163,6	0,001	83,3
КМЦ-аспарагиназа	1/1	90,2	50	32,7±1,0	50,7	0,001	—
			100	56,5±3,5	>160,4	0,001	83,3
			200	60,0±0,0	>176,5	0,001	100,0
КМЦ-аспарагиназа	4/1	40,7	50	31,2±1,3	43,8	0,001	—
			100	42,7±5,8	>96,8	0,002	33,3
			200	60,0±0,0	>176,5	0,001	100,0

Таблица 2

## Кинетические параметры снижения аспарагиназной активности в крови кроликов

Ферментный образец	Двухфазная модель						Метод [9]	
	1-я фаза			2-я фаза			$T_{50\%}$ , ч	$r^{2*}$
	$k_0$ , ч <sup>-1</sup>	$T_{1/2}$ , ч	$r^{2*}$	$k_0$ , ч <sup>-1</sup>	$T_{1/2}$ , ч	$r^{2*}$		
L-аспарагиназа	0,122	5,67	0,968	0,019	37,50	0,993	7,03	0,995
КМЦ-аспарагиназа (соотношение полимер/фермент 1/1)	0,096	7,22	0,982	0,014	47,75	0,956	13,22	0,998

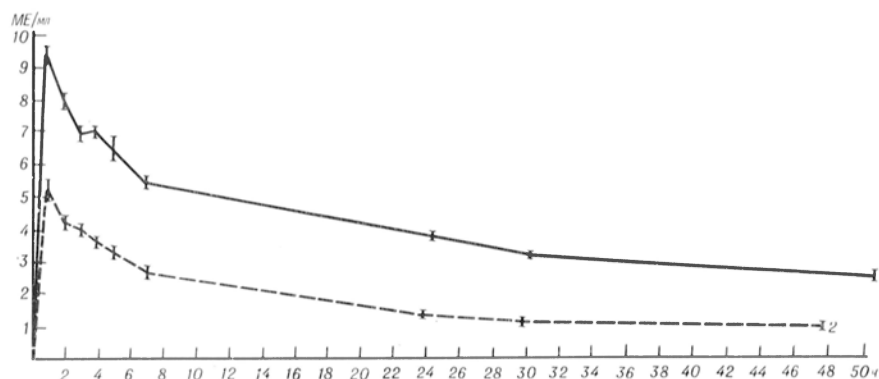
\* Коэффициент корреляции.

фазы, второй — время, по истечении которого в крови сохраняется 50 % исходной активности фермента без учета ее двухфазного снижения ( $T_{50\%}$ ). Из табл. 2 видно, что препарат КМЦ-аспарагиназы сохраняет свое активное начало в крови более длительное время, чем нативный фермент. Кроме того, оказалось, что после внутривенного введения одинакового количества фермента (400 МЕ на 1 кг массы) уровень аспарагиназной активности в плазме крови подопытных животных в среднем примерно в 2 раза выше после введения КМЦ-аспарагиназы, чем после введения немодифицированного фермента (см. рисунок).

Естественно было предположить, что эффективность терапевтического действия полимерных конъюгатов L-аспарагиназы достигается как за счет более медленного выведения ферментных образцов из кровяного русла, так и, вероятно, за счет их повышенной

стабильности в организме. Последнее предположение тем более обосновано, если учесть, что воздействие протеолитических ферментов в довольно больших концентрациях на нативную и связанную с КМЦ L-аспарагиназу в условиях *in vitro* показало повышенную устойчивость последней к протеолизу [4].

Таким образом, показано, что применение в качестве противолейкозных средств высокомолекулярных КМЦ-производных L-аспарагиназы может быть более эффективным, чем применение нативного фермента. В то же время биологическая активность конечных продуктов иммобилизации в определенной степени зависит от количества связанного с ферментом полимера. При этом возможность варьирования процесса полимерной модификации L-аспарагиназы позволяет выбрать наиболее оптимальный вариант иммобилизации.



Изменение аспарагиназной активности в плазме крови кроликов после внутривенного введения 400 МЕ на 1 кг массы тела КМЦ-аспарагиназы (1) и L-аспарагиназы (2).

По оси абсцисс — длительность эксперимента, по оси ординат — аспарагиназная активность.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Дауварте А. Ж., Зидермане Л. А., Жагат Р. М. // Изв. АН ЛатвССР. — 1978. — № 4. — С. 111—123.
2. Жагат Р. А., Шпрунка И. К., Эйдусе И. А. и др. // Изв. АН ЛатвССР, сер. хим. — 1972. — № 1. — С. 73—76.
3. Карсакевич А. С., Вина И. А. // Вопр. мед. химии. — 1985. — № 4. — С. 2—12.
4. Кинстлер О. Б., Карсакевич А. С., Шуличенко С. Н., Жагат Р. А. // Химия природ. соед. — 1979. — № 3. — С. 383—388.
5. Николаев А. Я. // Пробл. гематол. — 1969. — № 7. — С. 51—60.
6. Пормале М. Я., Кашкина Н. А., Калниньш А. Я. и др. А. с. 255236 СССР, 1976.
7. Пормале М. Я., Кашкина Н. А., Калниньш А. Я. и др. А. с. 803880 СССР, 1976.
8. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
9. Putter J. // Rec. Res. Cancer Res. — 1970. — Vol. 33. — P. 64—74.
10. Roberts R., Sobel B. E. // Enzymes in Cardiology: Diagnosis and Research. — Chichester, 1979. — P. 97—114.

Поступила 13.01.87

## HIGH MOLECULAR DERIVATIVES OF L-ASPARAGINASE PRODUCED AFTER IMMOBILIZATION OF THE ENZYME ON WATER-SOLUBLE CARBOXYMETHYL CELLULOSE: BIOLOGICAL PROPERTIES

A. S. Karsakevich, O. B. Kinstler, A. Zh. Dauvarte, I. A. Vina

Institute of Organic Synthesis, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Latvian SSR, Riga

L-asparaginase, covalently bound with water-soluble CM-cellulose, exhibited the elevated antileukemic activity in mice with inoculated lymphoid leukemia L5178y as compared with the native enzyme. The antileukemic activity of the immobilized enzyme was shown to depend on the content of the polymer bound with the enzyme; the polymer amount may be altered during the enzyme modification. The prolonged effect of immobilized L-asparaginase was observed in rabbit circulation.

УДК 612.015.1:577.152.361[.014.46:547.36

К. Р. Утеулин, Ш. А. Джакелова, А. Т. Иващенко, Н. И. Кусаинова

## ГИДРОФОБНЫЕ СВОЙСТВА НЕКОТОРЫХ ФОСФОГИДРОЛАЗ

Казахский университет им. С. М. Кирова, Институт ботаники АН КазССР, Институт физической культуры, Алма-Ата

Каталитические характеристики ферментов во многом определяются их гидрофобными свойствами [5—7]. До настоящего времени исследовано влияние большого числа различных по структуре гидрофобных соединений на активность ряда ферментов. Однако гидрофобные свойства фосфогидролаз изучены недостаточно, в частности требуется выяснить, как и в какой степени регулируются эти свойства. К числу соединений, эффективно изменяющих активность фосфогидролаз, относятся одноатомные спирты [7, 9, 11—13], которые использованы нами для оценки гидрофобных свойств аниончувствительных АТФаз митохондрий и эритроцитов (КФ 3.6.1.35),  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы (КФ 3.6.1.37) и глюкозо-6-фосфатазы (КФ 3.1.3.9).

### Методика

Субмитохондриальные частицы (СМЧ) получали из печени крысы по описанной ранее методике [4].  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазу из мозга крысы выделяли по модифицированному методу [1]. Препараты глюкозо-6-фосфатазы из печени крысы [15] и аниончувствительной АТФ-

азы мембран эритроцитов крысы [3] получали известными методами.

АТФазную активность СМЧ определяли по появлению в среде инкубации протонов ( $\text{H}^+$ ), регистрируемых с помощью рН-метра рН 340 (с потенциометром КСП-4). АТФазную активность измеряли в забуференной среде (рН 8,0) следующего состава: 2 мМ АТФ и 2 или 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ . Скорость гидролиза АТФ исследовали в течение 30—60 с. Активность аниончувствительной АТФазы мембран эритроцитов крысы определяли в 50 мМ трис-сульфатном буфере (рН 8,0) с 2 мМ АТФ и 8 мМ  $\text{MgCl}_2$  в течение 20 мин. Активность  $\text{Na}$ ,  $\text{K}$ -АТФазы измеряли в 20 мМ гистидин-имидазольном буфере (рН 7,5), содержащем 120 мМ  $\text{NaCl}$ , 30 мМ  $\text{KCl}$ , 3 мМ АТФ и 30 мМ  $\text{MgCl}_2$ , активность глюкозо-6-фосфатазы — в 50 мМ трис-сульфатном буфере (рН 6,5), содержащем 5 мМ динатриевой соли глюкозо-6-фосфата. Активность всех ферментов определяли при 37 °С. Количество неорганического фосфата ( $\text{P}_i$ ) измеряли по [8]. Белок определяли по Лоури и соавт. [14]. Значения коэффициентов распределения ( $P$ ) соединений между октанолом и водой заимствовали из работы [10] или рассчитывали по описанному в этой работе методу.

### Результаты и обсуждение

Ранее нами было показано, что модифицирующее действие одноатомных



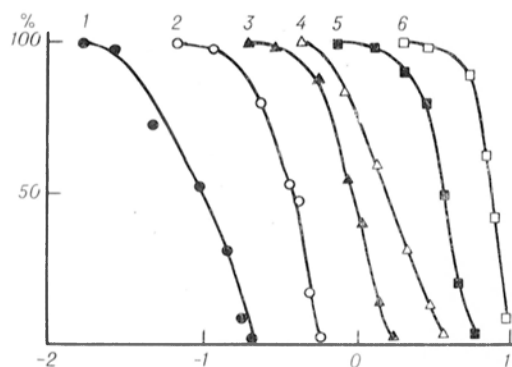


Рис. 1. Влияние пентанола (1), бутанола (2), пропанола (3), ацетона (4), этанола (5) и метанола (6) на АТФазную активность СМЧ печени крысы в среде, содержащей 2 мМ АТФ и 2 мМ  $MgCl_2$ ; за 100 % принята активность, равная 48 мкмоль  $\Phi_n$  в 1 ч на 1 мг белка. Здесь и на рис. 3 и 5 по оси абсцисс  $\lg$  молярной концентрации спиртов, по оси ординат — относительная скорость реакции.

спиртов на АТФазную активность растворимого сопрягающего фактора митохондрий ( $MF_1$ ) печени крысы обусловлено гидрофобными свойствами фермента [2]. Представлялось важным выяснить, каковы гидрофобные свойства  $MF_1$  в случае функционирования его в мембране, т. е. в СМЧ. При отношении концентраций магния и АТФ-компонентов истинного суб-

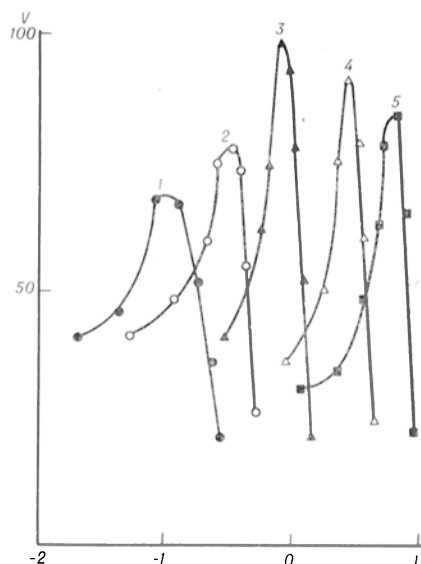


Рис. 2. Влияние пентанола (1), бутанола (2), пропанола (3), этанола (4), метанола (5) на АТФазную активность СМЧ в среде, содержащей 10 мМ магния и 2 мМ АТФ.

Здесь и на рис. 4 по оси ординат — скорость реакции (в мкмоль  $\Phi_n$  за 1 час на 1 мг белка).

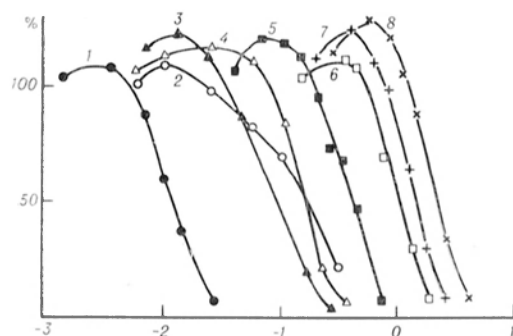


Рис. 3. Влияние гепанола (1), этилацетата (2), пентанола (3), бутанола (4), пропанола (5), ацетона (6), этанола (7) и метанола (8) на активность  $Na, K$ -АТФазы в среде, содержащей 30 мМ магния и 3 мМ АТФ; за 100 % принята активность, равная 142 мкмоль  $\Phi_n$  в 1 ч на 1 мг белка.

страта (комплекса  $Mg$ —АТФ), равном 2 мМ: 2 мМ, АТФазная активность СМЧ при определенных концентрациях спиртов снижалась (рис. 1). Между концентрациями, в которых спирты вызывали 50 % ингибирование активности АТФазы СМЧ, и гидрофобностью спиртов (коэффициентами распределения их в системе октанол — вода) существует определенная закономерность:

$$\lg 1/C_{50\%} = 1,0 \lg P - 0,30.$$

Как и в опытах с растворимым  $MF_1$ , увеличение концентрации магния в среде инкубации до 10 мМ приводит к тому, что при определенных концентрациях спирты вызывают сначала стимуляцию, а затем угнетение АТФазной активности СМЧ (рис. 2). Зависимость между концентрациями соединений, вызывающих максимальную стимуляцию ( $C_{max}$ ), и коэффициентами распределения спиртов в системе октанол — вода выражается уравнением:

$$\lg 1/C_{max} = 0,96 \lg P - 0,23.$$

Для растворимого  $MF_1$  в идентичных условиях получено уравнение:

$$\lg 1/C_{max} = 0,88 \lg P - 0,29.$$

Приведенные данные свидетельствуют, что гидрофобные свойства  $MF_1$  существенно не зависят от того, находится ли он в мембраносвязанном или растворимом состоянии. Кроме того, изменение соотношения магния и АТФ в среде инкубации приводит к

значительному изменению действия спиртов, т. е. ингибированию или стимуляции ими АТФазной активности  $MF_1$  (см. рис. 1 и 2).

Учитывая, что магний как компонент истинного субстрата Na, К-АТФазы регулирует ее активность, мы оценивали его действие на гидрофобные свойства Na, К-АТФазы. Показано, что при отношении концентраций магния и АТФ в среде инкубации, равном 1 мМ : 3 мМ, активность Na, К-АТФазы только угнетается спиртами. При отношении 30 мМ : 3 мМ наблюдается стимуляция (рис. 3), однако она проявляется намного слабее, чем с АТФазой СМЧ. Зависимость между активирующими ( $C_{max}$ ) и ингибирующими ( $C_{50\%}$ ) концентрациями соединений и их гидрофобностью выражается, соответственно, уравнениями:

$$\lg 1/C_{max} = 0,93 \lg P + 0,93 \text{ и } \lg 1/C_{50\%} = 0,80 \lg P + 0,10.$$

Последнее уравнение практически совпадает с уравнением, полученным для Na, К-АТФазы почек крысы [7]:

$$\lg 1/C_{50\%} = 0,78 \lg P + 0,10.$$

Результаты опытов с Na, К-АТФазой свидетельствуют, что гидрофобные свойства этой ферментной системы не зависят от источника и метода получения препарата и регулируются магнием.

Модифицирующее влияние магния на гидрофобные свойства фосфогидролаз выявлено нами и с аниончувствительной АТФазой эритроцитов. При

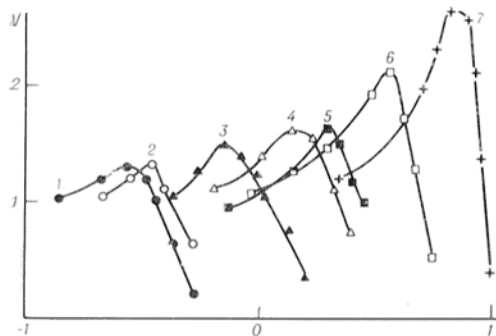


Рис. 4. Влияние бутанола (1), изо-бутанола (2), пропанола (3), изо-пропанола (4), этанола (5), метанола (6) и метанола (7) на активность аниончувствительной АТФазы мембран эритроцитов крысы в среде, содержащей 8 мМ магния и 2 мМ АТФ.

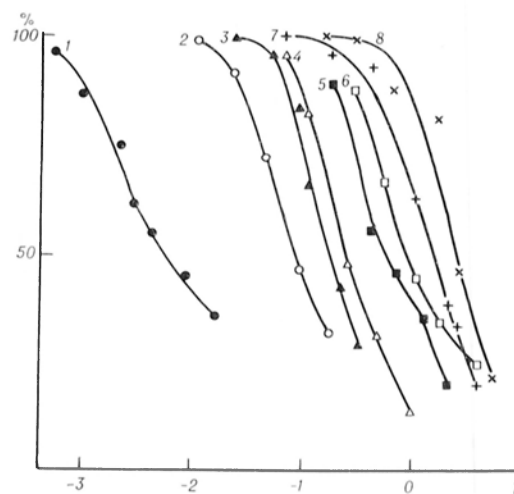


Рис. 5. Влияние гептанола (1), пентанола (2), бутанола (3), этилацетата (4), пропанола (5), ацетона (6), этанола (7) и метанола (8) на активность глюкозо-6-фосфатазы в среде, содержащей 5 мМ глюкозо-6-фосфата и 10 мМ магния; за 100 % принята активность, равная 47 мкмоль  $F_n$  в 1 ч на 1 мг белка.

наличии в среде 8 мМ магния и 2 мМ АТФ все испытанные соединения в соответствующих концентрациях вызывали активацию гидролиза АТФ ферментом (рис. 4). Между этими концентрациями и гидрофобностью соединений существует зависимость:

$$\lg 1/C_{max} = 0,94 \lg P - 0,16.$$

При отношении концентраций магния и АТФ в среде инкубации, равном 2 мМ : 2 мМ, наблюдалось стимулирующее действие только метанола и этанола [3]. Более высокомолекулярные спирты только угнетали активность аниончувствительной АТФазы эритроцитов. Таким образом, магнием можно регулировать гидрофобные свойства этой АТФазы.

Результаты действия спиртов на активность глюкозо-6-фосфатазы при изменении концентрации магния от 1 до 30 мМ показывают, что магний практически не влияет на гидрофобные свойства фермента. Типичное действие спиртов на активность глюкозо-6-фосфатазы представлено на рис. 5. Зависимость между концентрациями соединений, вызывающих 50 % ингибирование активности глюкозо-6-фосфатазы, и их гидрофобностью описывается уравнением:

$$\lg 1/C_{50\%} = 0,82 \lg P + 0,17.$$

Общим свойством действия спиртов на фосфогидролазы является обратимость их влияния, включая концентрации, при которых происходит ингибирование активности на 50 %. Гидрофобные участки фосфогидролаз, с которыми взаимодействуют спирты, по-видимому, находятся в области каталитического центра, как у других ферментов [5]. Относительная неизменность гидрофобных свойств MF<sub>I</sub> в мембраносвязанном и растворимом состоянии также свидетельствует об этом. Результаты настоящей работы показывают, что магний может в значительной степени изменять каталитические характеристики фосфогидролаз, у которых он является компонентом истинного субстрата, причем это действие магния вызвано модификацией гидрофобных свойств ферментов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Болдырев А. А., Лопина О. Д., Рубцов А. М., Свинухова И. А. Биохимия активного транспорта ионов и транспортные АТФазы. — М., 1983. — С. 28—29.
2. Джакелова Ш. А., Утеулин К. Р., Токсобеаева Г. А. и др. // Биохимия. — 1986. — Т. 51, № 4. — С. 562—566.
3. Иващенко А. Т., Ли Т., Бушинева И. А. // Вопр. мед. химии. — 1985. — № 1. — С. 117—120.
4. Иващенко А. Т., Ли Т., Утеулин К. Р. // Биофизика. — 1984. — Т. 29, № 1. — С. 83—87.
5. Полторак О. М., Чухрай Е. С. Физико-химические основы ферментативного катализа. — М., 1971.

6. Тропша А. Э., Нижний Г. В., Ягузинский Л. С. // Биоорг. химия. — 1985. — Т. 11, № 10. — С. 1391—1401.
7. Хэнч К. // Хим.-фарм. журн. — 1980. — № 10. — С. 15—30.
8. Deniges G. // C. R. Soc. Biol. (Paris). — 1921. — Vol. 84, N 4. — P. 875—879.
9. Grisham C. M., Barnett R. E. // Biochim. biophys. Acta. — 1973. — Vol. 311, N 3. — P. 417—422.
10. Hansch C., Quinlan J. E., Lawrence G. L. // J. organ. Chem. — 1968. — Vol. 33, N 1. — P. 347—350.
11. Hara K., Kasai M. // J. Biochem. (Tokyo). — 1977. — Vol. 82, N 4. — P. 1005—1017.
12. Hegyvary C. // Biochim. biophys. Acta. — 1973. — Vol. 311, N 1. — P. 272—291.
13. Kondo M., Kasai M. // Biochim. biophys. Acta. — 1973. — Vol. 311, N 3. — P. 391—399.
14. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.
15. Murataliev M. B., Vul'fon E. N. // Analyt. Biochem. — 1985. — Vol. 151, N 1. — P. 24—27.

Поступила 16.01.87

#### HYDROPHOBIC PROPERTIES OF SOME PHOSPHOHYDROLASES

K. R. Uteulin, Sh. A. Dzhaikelova, A. T. Ivashchenko, N. I. Kusaionova

S. M. Kirov Kazakh State University, Institute of Botany Academy of Sciences of the Kazakh SSR, Institute of Physical Culture, Alma-Ata

Monoatomic alcohols at definite concentration stimulated or inhibited activities of liver mitochondrial ATPase, anion-sensitive ATPase in erythrocyte membranes and Na,K-ATPase in rat brain depending on the ratio of concentrations of the natural substrate components — Mg<sup>2+</sup> complex and ATP. Interrelationships between the enzymes and alcohols hydrophobic properties were found.

УДК 616-008.935.862-02:616-008.931:577.152.199.1]-074

В. В. Честков, А. В. Лаптев, Ю. В. Щепкина

#### ИММУНОХИМИЧЕСКОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ ФЕНИЛАЛАНИНГИДРОКСИЛАЗЫ В ЭКСТРАКТАХ НЕКОТОРЫХ ОРГАНОВ ЧЕЛОВЕКА

Институт медицинской генетики АМН СССР, Москва

Представление о дифференциальной экспрессии генов в различных клетках и тканях возникло при анализе основных, наиболее выраженных функций отдельных клеток и органов организма. Однако изучение тонких механизмов регуляции генов, осуществляемое путем анализа конкретных генов или продуктов их экспрессии на разных уровнях, позволило обнаружить их функционирование в тканях,

где ранее оно не выявлялось. Таким образом обнаружена экспрессия гена трансферрина в клетках мозга [5] и сократительных белков в мышечных тканях [6]. Тем не менее количество подобных примеров пока невелико, и смена представлений о характере тканеспецифичности экспрессии генов только начинается. Необходимо отметить, что выявление транскрипции генов или трансляции их мРНК в пе-

специализированных тканях основывается на разработке и использовании все более чувствительных методов детекции белков и нуклеиновых кислот.

Изучение тканевого распределения фенилаланингидроксилазы (ФАГ) представляет особый интерес, поскольку эти данные необходимы для понимания патогенеза фенилкетонурии, распространенного наследственного заболевания, связанного с мутациями гена ФАГ. Путем определения активности ФАГ выявлялась только в печени и почках [10]. Детального иммунохимического анализа наличия антигена в различных тканях не проводилось, а о разработке высокочувствительных методов определения ФАГ до сих пор не сообщалось. Поскольку в геноме человека имеется только 1 ген ФАГ [15], анализ экспрессии этого гена можно провести путем поиска его белковых продуктов, что и явилось целью данной работы. Полученные нами ранее моноспецифические антитела к ФАГ человека и данные о стабильности ее структуры в течение первых часов после смерти [2] позволяли провести такое исследование на аутоптатах некоторых органов человека.

### Методика

В работе использованы трупные органы от 3 человек, умерших в результате острой сердечной недостаточности. Больной А — мужчина 45 лет (материал получен через 2 ч после смерти), больной Б — женщина 35 лет (материал получен через 3,5 ч после смерти), больной В — мужчина 65 лет (материал получен через 2,5 ч после смерти). Биопсию печени проводили при травме печени и для диагностических целей. Взятый материал перевозили и хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Полученные образцы органов измельчали и гомогенизировали в пожевом гомогенизаторе при 5000 об/мин в течение 3 мин в 4 объемах буфера, содержащего 0,2 М КСl и 0,03 М трис-НСl рН 7,25. Затем дополнительно гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера (тефлон — стекло) и гомогенат центрифугировали при 105 000 g в течение 1 ч. Полученную надосадочную жидкость отбирали и обозначали как экстракт соответствующего органа. Все операции осуществляли при  $+4^{\circ}\text{C}$ .

Активность ФАГ устанавливали по содержанию тирозина [13], концентрацию белка измеряли по оптической плотности [14]. Для количественного определения содержания антигенов в исследуемых образцах использовали метод ракетного иммуноэлектрофореза.

Электрофорез белков проводили по методу Лэммли [7] в 15 % ПААГ. ФАГ после электрофореза выявляли иммуноблоттингом с использованием IgG фракции антисывороток, по-

лученной путем их высаливания 40 % сульфатом аммония. Фракцию IgG конъюгировали с пероксидазой хрена в молярном отношении 1 : 2 [9]. Перенос белков на нитроцеллюлозный фильтр осуществляли в течение ночи при напряженности поля 9 В/см [11]. Затем фильтр споласкивали в дистиллированной воде и оставляли на 8 ч в 50 % кроличьей неиммунной антисыворотке с 1 % твином-80. После закрытия мест неспецифического связывания среду инкубации меняли на идентичную с добавлением конъюгата IgG с пероксидазой в концентрации 0,1 мг/мл IgG и инкубировали в течение ночи. Затем фильтр отмывали в буфере с 1 % твином-80, 0,14 М NaCl и 0,01 М Na-фосфатом рН 7,5 и после этого в 0,01 М Na-фосфатном буфере рН 7,5 с 1 М NaCl. Места локализации антигена выявляли инкубацией фильтра в растворе, содержащем 0,3 мг/мл 3,3'-диаминобензидина и 0,05 М трис-НСl рН 7,25 с 0,005 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### Результаты и обсуждение

Активность ФАГ в биоптатах печени составляла  $0,32 \pm 0,08$  нмоль тирозина на 1 мг белка в 1 мин ( $n=4$ ). Нормальный уровень активности ФАГ в экстрактах аутопатов печени выявлен в 1 случае (больной А — 0,52 нмоль в 1 мин на 1 мг белка), в 2 случаях активность была снижена (больные Б и В — 0,07 и 0,04 нмоль на 1 мг белка в 1 мин, соответственно). Это согласуется с данными о быстрой посмертной инактивации фермента [2, 8]. В экстрактах почек, тонкой кишки, селезенки, мышцы сердца, легких и мозга всех больных активность ФАГ не обнаружена, хотя, как свидетельствуют данные литературы, этот показатель в биоптатах почек составляет  $\sim 20\%$  от ее активности в печени [4].

Наличие белка, подобного ФАГ, в экстрактах анализированных органов выявлялось при иммуноэлектрофорезе. Идентичность антигенов различных органов показана при соиммуноэлектрофорезе их экстрактов и экстракта печени. Результаты такого эксперимента с экстрактом мозга и печени приведены на рис. 1, см. вклейку. Как видно, нанесенный в меньшем количестве антиген мозга образует линию левого плеча пика, полностью переходящего в линию преципитации антигена из печени человека.

Для количественного определения содержания антигена в экстрактах органов использован метод ракетного иммуноэлектрофореза с чувствительностью 1 мкг/мл. Ошибка метода не превышала 8 % (см. таблицу). Мак-

Содержание ФАГ (в мкг на 1 г ткани) и альбумина (мг/г ткани) в различных органах человека

Показатель	Больной	Тонкая кишка	Селезенка	Легкие	Сердце	Мозг	Почка	Печень
Содержание ФАГ	А	67,5	12,5	125,0	90,0	20,0	300,0	1560,0
	Б	45,0	0	37,5	105,0	37,5	360,0	1520,0
	В	62,5	10,0	52,5	85,0	27,5	575,0	1920,0
Содержание альбумина	А	12,4	10,0	12,8	12,0	0,8	15,6	—
	Б	13,8	16,8	16,2	11,0	0,9	12,4	—
	В	14,5	15,6	28,0	11,1	0,7	26,5	—

симальное содержание антигена обнаруживалось в печени и составляло  $1,7 \pm 0,2$  мг на 1 г ткани или  $1,9 \pm 0,1$  % от экстрагируемого белка. Содержание иммунореактивного белка в почках было примерно в 4 раза, а в легких, тонкой кишке и мышце сердца — в 30 раз меньше, чем в печени. Что касается содержания антигена в мозге, то оно было в 60 раз меньше, чем в печени, однако при расчете на экстрагируемые белки из-за их низкого содержания в мозге доля антигена была достаточно велика (0,04—0,1 %). Не обнаруживалось или обнаруживалось очень низкое, на пределе чувствительности метода, содержание антигена в экстракте селезенки (0—12 мкг на 1 г ткани).

До сих пор прямого анализа содержания ФАГ в печени человека не проводилось, но по косвенным оценкам ее количество в печени было примерно в 10 раз меньше [3], чем установленное в данной работе. Среди большого количества возможных причин этого расхождения основной из них, по нашему мнению, является использование определения ферментной активности для оценки полноты выделения фермента. Поскольку, по данным иммуноингибиторного анализа, ФАГ печени представлена двумя формами фермента, значительно различающимися по влиянию антител на их ферментную активность [2, 12], такое определение количества фермента могло быть не совсем корректно.

Поскольку антиген был выявлен в различных тканях в небольшом количестве, мы попытались исключить возможность его появления в экстрактах за счет примеси крови, в которой иногда обнаруживается низкая активность ФАГ [1]. С этой целью аналогичным методом ракетного электрофореза определено содержание

альбумина в анализированных экстрактах (см. таблицу). Распределение альбумина в экстрактах органов не коррелировало с содержанием антигена, взаимодействующего с антителами к ФАГ. Так как печень является органом, синтезирующим альбумин, количество этого белка в экстракте печени не определяли. На основании полученных данных можно утверждать, что обнаружение антигена, взаимодействующего с антителами против ФАГ печени, в экстрактах изученных тканей не связано с загрязнением препаратов кровью.

Для дальнейшей характеристики иммунореактивного белка оценивали его молекулярную массу при электрофорезе в денатурирующих условиях [7]. Антиген после электрофореза выявляли с помощью иммуноблоттинга. На рис. 2, см. вклейку приведена электрофореграмма частично очищенной ФАГ печени человека и экстракта печени человека. Как видно из электрофореграммы, выявить полосу ФАГ среди множества белков экстракта печени не представляется возможным. Однако с помощью иммуноблоттинга фенилаланингидроксилаза идентифицируется в экстракте печени достаточно определенно.

В отдельной серии экспериментов иммуноблоттинг был использован для анализа антигена в экстрактах аутопатов органов 3 человек. На рис. 3, см. вклейку в качестве примера приведены результаты, полученные на экстрактах органов от больного А. Как можно видеть, антиген, идентичный по электрофоретической подвижности ФАГ печени человека, обнаруживается в экстрактах почек, мозга, легких, мышцы сердца и тонкой кишки. В экстрактах селезенки соответствующей полосы не было выявлено. Молекулярная масса антигена, исхо-

для из его электрофоретической подвижности, составляет 55 000—57 000 Д, что соответствует молекулярной массе субъединицы ФАГ [2, 3].

Приведенные данные позволяют предполагать, что в исследованных органах (кроме селезенки) обнаруживается один и тот же белок, идентичный по молекулярной массе и иммунохимическим свойствам ФАГ печени. Вопрос о том, образует ли данный белок активный фермент, остается неясным. Отсутствие ферментативной активности в наших опытах в экстрактах аутопсатов, вероятно, можно объяснить посмертной инактивацией фермента. Содержание ФАГ в органах, в которых она ранее не выявлялась, значительно ниже, чем в печени и почках. Этим могут быть объяснены неудачные попытки выявления активности этого фермента в биоптатах некоторых тканей [10]. В то же время, по нашим данным, для выявления антигена в этих тканях требуются методы, предел чувствительности которых превышает 10 мкг ФАГ на 1 мл. Таким образом, расширение числа тканей, в которых выявлена ФАГ, не противоречит данным литературы и связано с использованием более чувствительных методов ее определения.

Если выявленный антиген обладает сходной ферментной активностью во всех тканях, полученные данные не изменяют сложившихся представлений о метаболизме фенилаланина в организме. В связи с высоким содержанием ФАГ в печени она остается ключевым органом метаболизма фенилаланина. В то же время представленные результаты могут привести к коррекции существующей концепции патогенеза фенилкетонурии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Анненков Г. А., Сафронова Е. Е. // *Вопр. мед. химии.* — 1981. — № 2. — С. 266—271.
2. Честков В. В., Лаптев А. В., Данилина Е. М., Шишкин С. С. // *Биохимия.* — 1986. — Т. 51, № 7. — С. 1210—1215.
3. Abila J.-P., Blandin-Savoja F., Rey F. // *Biochem. int.* — 1983. — Vol. 7. — P. 727—737.
4. Ayling J. E., Pirson W. D., Al-Janabi J. M.,

Heljand G. D. // *Biochemistry.* (Wash.). — 1974. — Vol. 13. — P. 78—85.

5. Bloch B., Popovici I., Levin M. J. et al. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.* — 1985. — Vol. 82. — P. 6706—6709.
6. Giometti G. S., Anderson N. L. // *J. molec. Biol.* — 1984. — Vol. 173. — P. 109—123.
7. Laemmli U. K. // *Nature.* — 1970. — Vol. 227. — P. 680—685.
8. Mitoma C., Auld R., Udenfriend S. // *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.).* — 1957. — Vol. 94. — P. 634—635.
9. Nakane P. K., Wawuoi A. // *J. Histochem. Cytochem.* — 1974. — Vol. 22. — P. 1084—1091.
10. Scriver C. R., Clow C. L. // *Ann. Rev. Genet.* — 1980. — Vol. 14. — P. 179—203.
11. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.* — 1979. — Vol. 76. — P. 4350—4354.
12. Tourian A., Treiman L., Abe K. // *Biochemistry (Wash.).* — 1975. — Vol. 14. — P. 4055—4060.
13. Waalkes T. P., Udenfriend S. // *J. Lab. clin. Med.* — 1957. — Vol. 50. — P. 733—736.
14. Whitaker J. R., Gramun P. E. // *Analyt. Biochem.* — 1980. — Vol. 109. — P. 156—159.
15. Woo S. L. C., Lidsky A. S., Guttler F., Chandra T. // *Nature.* — 1983. — Vol. 306. — P. 151—155.

Поступила 20.01.87

#### IMMUNOCHEMICAL IDENTIFICATION OF PHENYLALANINE HYDROXYLASE IN EXTRACTS OF SOME HUMAN TISSUES

V. V. Chestkov, A. V. Laptev, Yu. V. Schepkina

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

Phenylalanine hydroxylase was found in extracts from autopsates of human liver, kidney, myocardium, small intestine, lung and spleen. In all the tissues studied, except of spleen, the antigen was detected by immunoelectrophoresis with monospecific antiserum against human liver phenylalanine hydroxylase. As shown by immunoblotting carried out after electrophoresis under denaturing conditions, the antigen, observed in various tissues, exhibited similar electrophoretic mobility which was very close to that of the enzyme purified from human liver tissue. Molecular mass of revealed antigen was estimated 55-57 kDa. Coincidence of immunochemical and chemical properties of the protein suggested that the antigen, detected in the tissue extracts, was a product of phenylalanine hydroxylase gene expression. The antigen concentration did not correlate with the content of albumin in tissue extracts, thus demonstrating that the revealed antigen did not occur in these preparations with blood contaminations. Content of the antigen in the tissue extracts studied was (ug per g): liver — 1500-1900, kidney — 300-575, brain — 20-40, myocardium — 85-105, lung — 40-125, small intestine — 45-70, spleen — 0-12.



М. Э. Краковский, А. Х. Аширметов, А. С. Комарин, Д. Я. Файнгольд

## СОСТОЯНИЕ МИКРОСОМАЛЬНОЙ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ОСТРОЙ КИШЕЧНОЙ НЕПРОХОДИМОСТИ

ЦИНИЛ Ташкентского медицинского института

Несмотря на то что проблеме острой кишечной непроходимости (ОКН) посвящено значительное число работ, многие вопросы патогенеза этого тяжелого заболевания все еще далеки от своего разрешения [6]. В настоящее время установлено, что ведущими факторами патогенеза ОКН являются интоксикация организма и нарушение функций важнейших его органов и систем [2, 11, 20]. Интенсивность процессов детоксикации во многом определяется активностью микросомальной окислительной системы (МОС), наиболее выраженной в паренхиматозных клетках печени [3]. Вполне вероятно, что нарушение функций печени при ОКН может отразиться и на состоянии МОС гепатоцитов, однако в литературе этому вопросу не уделяется соответствующего внимания.

## Методика

Эксперименты выполнены на 63 белых крысах-самцах смешанной популяции массой 200—240 г, содержащихся в виварии на обычном лабораторном рационе. Для воспроизведения обтурационной ОКН у крыс под эфирным наркозом производили лапаротомию и на петлю кишечника накладывали металлическую скобу, суживающую просвет кишечника. Операционную рану ушивали послойно наглухо. При воспроизведении странгуляционной ОКН металлическую скобу накладывали на петлю кишечника совместно с прилегающей

брыжейкой. Контролем служили ложнооперированные животные. Для разрешения острой кишечной непроходимости у крыс под эфирным наркозом производили релапаротомию и снимали наложенные металлические скобы. У контрольных животных в аналогичных условиях также производили релапаротомию.

Для исследования активности МОС печени животных декапитировали в холодной комнате. Методом дифференциального центрифугирования на центрифуге ВАС-601 выделяли микросомальную фракцию печени, в которой определяли содержание цитохромов Р-450 и  $b_5$  [19], активность N-деметилазы амидопиринна [8] гидроксилазы анилина [1], NADPH цитохром-с-редуктазы [18], содержание микросомального белка [16]. Статистическую обработку результатов экспериментов производили на микрокалькуляторе БЗ-34 по специальной программе [14].

## Результаты и обсуждение

Результаты проведенных исследований показали, что у крыс с обтурационной ОКН через 24 ч после ее воспроизведения наблюдается отчетливое снижение цитохромов Р-450 и  $b_5$ , а также активности анилингидроксилазы на 140, 43 и 24 %. Активность N-деметилазы амидопиринна и NADPH цитохром-с-редуктазы при этом практически не отличалась от контрольного уровня. Через 48 ч обтурационной ОКН содержание цитохромов Р-450 и  $b_5$  было ниже контрольного уровня на 58 и 53 %, а активность N-деметилазы амидопиринна, гидроксилазы анилина и

Таблица 1

Содержание цитохромов и активность микросомальных ферментов у крыс с различными видами ОКН

Обследуемая группа	Цитохром Р-450, нмоль/мг	Цитохром $b_5$ , нмоль/мг	Активность N-деметилазы амидопиринна, нмоль ПСОП на 1 мг в 1 мин	Активность гидроксилазы анилина, нмоль п-аминофенола на 1 мг в 1 мин	Активность NADPH цитохром-с-редуктазы, нмоль на 1 мг в 1 мин
Контроль	1,798±0,063	0,545±0,049	0,607±0,04	2,18±0,118	120,61±4,78
ОКН, 24 ч обтурации	1,07±0,092 <0,01	0,312±0,015 <0,01	0,603±0,042 >0,1	1,66±0,13 <0,05	115,49±7,98 >0,05
ОКН, 24 ч странгуляции	0,932±0,066 <0,01	0,439±0,037 >0,05	0,574±0,03 >0,1	1,376±0,071 <0,05	81,46±9,0 <0,05
ОКН, 48 ч обтурации	0,754±0,13 <0,01	0,257±0,045 <0,01	0,500±0,027 <0,05	0,862±0,074 <0,001	65,68±7,6 <0,001

## Содержание цитохромов и активность микросомальных ферментов у крыс-самцов через 24 ч после оперативного разрешения ОКН

Обследуемая группа	Цитохром Р-450, нмоль/мг	Цитохром b <sub>5</sub> , нмоль/мг	N-деметилаза анидопиррина, нмоль НСОН на мг белка в 1 мин	Гидроксилаза анилина, нмоль п-аминофенола на 1 мг белка в 1 мин	NADPH цитохром-с-редуктаза, нмоль на 1 мг в 1 мин
Интактный контроль	0,831±0,029	0,639±0,020	0,807±0,0069	1,68±0,12	62,45±4,07
Ложная операция 24 ч, через сутки после релапаротомии <i>p</i> <sub>1</sub>	0,546±0,029 <0,001	0,369±0,021 <0,001	0,694±0,029 <0,01	1,114±0,040 <0,01	48,88±2,45 <0,05
Странгуляционная ОКН 24 ч, через сутки после разрешения <i>p</i> <sub>2</sub>	0,451±0,050 >0,05	0,242±0,033 <0,01	0,541±0,033 <0,01	0,897±0,043 <0,01	34,44±5,08 <0,05
Обтурационная ОКН 24 ч, через сутки после разрешения <i>p</i> <sub>2</sub>	0,517±0,040 >0,05	0,341±0,032 >0,1	0,621±0,015 >0,05	0,963±0,068 >0,05	41,40±1,47 <0,05
Ложная операция 48 ч, через сутки после релапаротомии <i>p</i> <sub>1</sub>	0,681±0,032 <0,01	0,410±0,039 <0,001	0,591±0,018 <0,001	1,312±0,053 <0,05	50,88±1,99 <0,05
Обтурационная ОКН 48 ч, через сутки после разрешения <i>p</i> <sub>2</sub>	0,338±0,042 <0,001	0,393±0,031 >0,1	0,580±0,032 >0,1	0,834±0,059 <0,001	53,83±1,97 >0,1

Пр и м е ч а н и е. *p*<sub>1</sub> — достоверность различий по сравнению с интактным контролем, *p*<sub>2</sub> — то же по сравнению с ложной операцией.

NADPH цитохром-с-редуктазы уменьшилась соответственно на 18, 60 и 45 % (табл. 1).

При странгуляционной ОКН через 24 ч также наблюдалось снижение содержания цитохрома Р-450, активности анилингидроксилазы и NADPH цитохром-с-редуктазы на 48, 37 и 32,5 % соответственно, причем эти изменения были более выражены по сравнению с аналогичным сроком обтурационной ОКН. Следовательно, независимо от вида ОКН сопровождается угнетением активности МОС печени, наиболее выраженной при 48-часовом сроке наблюдения. Сходные изменения в активности МОС в зависимости от сроков ОКН обнаружены и после ее оперативного разрешения. Так, через 24 ч после разрешения обтурационной ОКН наблюдали снижение активности NADPH цитохром-с-редуктазы на 15,3 %, а содержание цитохромов и активность остальных ферментов практически не отличалось от контрольного уровня (табл. 2). При разрешении обтурационной ОКН спустя 48 ч после ее воспроизведения содержание цитохрома Р-450 и активность анилингидроксилазы были сни-

жены по сравнению с контролем на 50,4 и 36,4 %. При разрешении странгуляционной острой кишечной непроходимости содержание цитохрома b<sub>5</sub> и активность N-деметилазы анидопиррина, гидроксилазы анилина и NADPH цитохром-с-редуктазы оставались ниже контрольного уровня на 34,4, 22, 19,5 и 29,7 % соответственно (см. табл. 2).

Следует отметить, что сама по себе релапаротомия приводит к отчетливому снижению содержания микросомальных цитохромов и активности ферментов, что согласуется с данными литературы об отрицательном влиянии факторов операции и послеоперационного периода на состояние МОС печени [13]. Обращает на себя внимание тот факт, что при странгуляционной ОКН изменения в активности МОС как до, так и после ее разрешения были более выражены, чем при обтурационном виде кишечной непроходимости. Известно, что уже в первые часы странгуляционной ОКН в организме развиваются выраженные гемодинамические нарушения [6]. Снижается интенсивность потребления тканями кислорода и развивается ги-

поксия, приводящая в конечном итоге к метаболическому ацидозу и интенсификации процессов перекисного окисления липидов в биомембранах [9, 20].

Гипоксия не может не влиять на активность МОС, поскольку последняя использует молекулярный кислород в процессе метаболизма ксенобиотиков [4]. Так, по данным ряда авторов, даже 30-минутная ишемия печени сопровождается снижением содержания цитохрома Р-450 почти вдвое, что обусловлено большой чувствительностью мембран эндоплазматической сети к недостатку кислорода по сравнению с другими субклеточными структурами [5, 7]. Поскольку ферменты МОС располагаются именно на этих мембранах, можно предположить, что в условиях их дестабилизации активность микросомальных ферментов будет существенно нарушаться.

При обтурационной ОКН гемодинамические изменения менее выражены, что, вероятно, способствует и меньшей интенсивности вышеописанных патологических реакций. Однако в поздние периоды острой кишечной непроходимости, когда на первый план выступает интоксикация организма с признаками эндотоксического шока [12], эти факторы, по-видимому, способствуют дальнейшему угнетению активности МОС, наблюдаемому в условиях наших опытов. Действительно, по данным ряда авторов, эндотоксины при их длительной циркуляции в организме способны связываться с цитохромом Р-450 и вызывать его инактивацию, а также изменять проницаемость биомембран гепатоцитов, поскольку эти вещества поглощаются и обезвреживаются в основном печенью [22, 23].

Так, при внутривенном введении эндотоксина *E. coli* экспериментальным животным наблюдается увеличение периода полужизни и снижение клиренса лекарственных препаратов вследствие подавления активности МОС гепатоцитов [15, 21]. Характерно, что оба вышеперечисленных фактора (гипоксия и эндотоксины) способны активизировать фосфоорилазу  $A_2$ , что, возможно, является основной причиной нарушения гидрофобных свойств мембран эндоплазматической сети гепатоцитов и снижения содержания цитохрома Р-450 [20]. При

этом, как свидетельствуют данные работы [17], снижение содержания последнего служит чувствительным показателем токсического поражения гепатоцитов.

Таким образом, при ОКН (независимо от ее вида) наблюдается существенное угнетение активности МОС печени. Причем эти изменения в состоянии МОС сохраняются и в ранние сроки оперативного разрешения кишечной непроходимости, особенно ее странгуляционной формы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Арчаков А. И., Карузина И. Н., Тверитинов В. И., Кокарева И. С. // Биохимия. — 1975. — Т. 40, № 1. — С. 32—39.
2. Даренский Д. И. // Хирургия. — 1977. — № 4. — С. 89—91.
3. Лакин К. М., Крылов Ю. Ф. Биотрансформация лекарственных веществ. — М., 1981.
4. Метелица Д. И. Активация кислорода ферментными системами. — М., 1982.
5. Островерхов Г. Е., Малюгин Э. Ф. // Экспериментальные основы лечения печеночной недостаточности. — М., 1975. — С. 7—19.
6. Патогенез острой непроходимости кишечника / Русаков В. И., Гульянц Э. С., Лукаш Н. А. и др. — Ростов-н/Д, 1985.
7. Покровский А. А., Арчаков А. И., Мухамбетова Л. Х. и др. // Митохондрии: Структура и функции в норме и патологии. — М., 1971. — С. 131—137.
8. Попов П. // Экспер. мед. морфол. (София). — 1973. — Т. 12, № 3. — С. 130—135.
9. Русаков В. И., Гульянц Э. С., Лукаш Н. А. и др. // Съезд хирургов УССР, 14-й: Тезисы докладов. — Донецк, 1980. — С. 138—139.
10. Сейфулла Р. Д., Онищенко Н. А., Артамонова С. Д. и др. // Фармакол. и токсикол. — 1979. — № 2. — С. 157—162.
11. Сулима С. Я. // Съезд хирургов УССР, 14-й: Тезисы докладов. — Донецк, 1980. — С. 148—149.
12. Теодореску Экзарку И. Общая хирургическая агрессология: Пер. с рум. — Бухарест, 1972.
13. Хакимов З. З., Карабанович А. К., Краковский М. Э. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 6. — С. 34—38.
14. Юрах Е. М., Зозуляк В. И., Пицык Р. Л., Герзанич И. И. // Врач. дело. — 1985. — № 11. — С. 114—117.
15. Abernathy C. O., Zimmerman H. I., Uttil R. // Path. Pharmacol. — 1980. — Vol. 29. — P. 193—196.

16. Lowry O. H., Rosebrough N. I., Farr A. L., Randall R. I. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
17. Matteis F., Laboukova Z., Seawright A. A. // Proc. Europ. Soc. Study Drug Toxicity, 1974. — Vol. 15. — P. 289—293.
18. Mazel P. // Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition. — Baltimore, 1971. — P. 546—590.
19. Omura T., Sato R. // J. biol. Chem. — 1964. — Vol. 239. — P. 2370—2370.
20. Poka L. // Acta chir. Acad. Sci. hung. — 1975. — Vol. 16. — P. 225—238.
21. Roskova H., Lapka R., Langmeierova M. et al. // National Toxins. — Oxford, 1980. — P. 369—376.
22. Sonawane B. R., Yaffe S. I. // Pediat. Res. — 1980. — Vol. 14. — P. 939—942.
23. Williams I. F., Lowitt S., Szentivanyi A. // Immunopharmacology. — 1980. — Vol. 2. — P. 285—291.

Поступила 20.01.87

## THE STATE OF RAT LIVER MICROSOMAL OXIDATIVE SYSTEM IN ACUTE INTESTINAL OBSTRUCTION

M. E. Krakovsky, A. Kh. Ashirmetov, A. S. Komarin, D. Ya. Faingold

Central Research Laboratory, Medical School, Tashkent

Content of cytochromes P-450 and  $b_5$  as well as activities of amidopyrine demethylase, aniline hydroxylase and NADPH cytochrome c reductase were studied in liver tissue of rats with occlusive and strangulational ileus. Distinct inhibition of main microsomal enzymes activity and decrease of cytochromes content in hepatocytes occurred independently on the type of acute intestinal obstruction. Within early periods after surgical operation of the acute intestinal obstruction all the alterations observed were maintained especially distinctly in the strangulational type of the disease.

УДК 617-001.17-092.9-07: [616-008.931:577.152.633 + 616-008.93:577.123.3

Э. Г. Давлетов, А. А. Карелин, Ф. Х. Камилов

## ИЗМЕНЕНИЯ В СИСТЕМЕ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОЖГОВОЙ БОЛЕЗНИ У НЕПОЛОВОЗРЕЛЫХ КРЫС

Башкирский медицинский институт, Уфа, Институт хирургии им. А. В. Вишневского АМН СССР, Москва

Термические ожоги приводят к выраженным нарушениям обмена веществ, приобретающим в целом организме генерализованный характер [11]. Одним из наиболее ранних проявлений метаболических расстройств при ожоговой болезни является резкое повышение катаболических процессов, связанное с усилением действия катехоламинов, глюкогона, биогенных аминов и других эффекторов метаболизма [11, 31].

Известно, что клеточными «мессенджерами» целого ряда таких эффекторов являются циклические нуклеотиды (ЦН) [18]. Однако до настоящего времени состояние системы циклических нуклеотидов при термических поражениях мало изучено. Имеющиеся данные крайне скудны, фрагментарны и подчас противоречивы [6, 9, 30].

Особый интерес представляет оценка возрастных особенностей реакции циклазной системы на термическую травму. Результаты ряда исследований свидетельствуют о своеобразии патохимических изменений при ожоговой болезни в детском возрасте [7]. Вместе с тем сведения о состоянии циклазной системы, этого важного ре-

гуляторного звена клеточного метаболизма, при термических ожогах в раннем возрасте практически отсутствуют и имеется лишь единственное сообщение об усилении экскреции цАМФ с мочой у обожженных детей [23].

Целью настоящей работы было исследование изменений системы ЦН в крови и тканях при термической травме у животных донубертатного возраста как экспериментальной модели ожоговой болезни у детей.

### Методика

Все реактивы, использованные в работе, были аналитической чистоты: их наборы для определения цАМФ и цГМФ были фирмы «Amersham» (Англия) и Института радиоизотопов (ЧССР), АТФ, креатинфосфат, змеиный яд Snake venom from Crotalus atrox — фирмы «Serva» (ФРГ), адреналин (L-эпинефрин), цАМФ — «Calbiochem» (США), креатинфосфокиназа — «Sigma» (США), дитиотреитол — «Fluka» (Швейцария), гистидин, трис — «Reanal» (Венгрия), ЭДТА — «Chemapol» (ЧССР), теофиллин (перекристаллизованный — фармакопейный препарат, остальные реактивы — фирм «Союзреактив» и «Реахим» (СССР) квалификация ос. ч. и х. ч.

Опыты выполнены на 160 беспородных крысах-самцах в возрасте 1 мес с массой тела 40—60 г, у которых под эфирным рауш-нар-

козом вызывали термический ожог кожи IIIa—IIIb степени площадью 23—25 % поверхности тела по методике, описанной ранее [8].

Исследования осуществляли через 6 ч, 1, 3, 7, 14 и 21 сут после термического воздействия. Животных декапитировали, кровь собирали в охлажденные центрифужные пробирки, содержащие 1 % (от объема крови) 0,5 М раствора ЭДТА pH 7,4, перемешивали и отделяли плазму центрифугированием. Ткани печени и почек крыс для определения ЦН быстро извлекали после декапитации и замораживали в жидком азоте. Замороженную ткань растирали в порошок и гомогенизировали в 0,05 трис-НСl-буфере pH 7,5, содержащем 4 мМ ЭДТА. Экстракцию ЦН проводили этанолом. Полученный экстракт выпаривали досуха при 55 °C в атмосфере азота. Сухой остаток растворяли в 0,05 М трис-НСl-буфере pH 7,5, содержащем 4 мМ ЭДТА, и использовали для определения ЦН методом радио-конкурентного связывания [26].

Для определения активности аденилатциклазы (АЦ; КФ 4.6.1.1) исследуемую ткань гомогенизировали в гомогенизаторе типа Потгера в 0,01 М трис-НСl-буфере pH 7,5, содержащем 1 мМ ЭДТА, и центрифугировали при 2000 g в течение 20 мин. Осадок дважды промывали и центрифугировали в тех же условиях. Полученный третий осадок суспендировали в среде инкубации (без АТФ и АТФ-регенерирующей системы). Выделенную таким образом грубую фракцию плазматических мембран использовали в качестве источника АЦ. Определение активности АЦ проводили по методу [19] в 150 мкл инкубационной среды следующего состава: 50 мМ трис-НСl pH 7,5, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ теофиллин, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ KCl, 1 мМ дитиотреитол, 1 мМ АТФ, 20 мМ креатинфосфат, 1 мг/мл креатинфосфокиназы. Реакцию начинали с внесения 50—100 мкг белка ферментного препарата. Инкубационная среда не содержала ГТФ, так как известно, что коммерческие препараты АТФ содержат в качестве примесей гуаниловые нуклеотиды в количествах, достаточных для проявления активирующего действия ряда гормонов [27]. Для определения стимулируемой активности АЦ в среду инкубации вносили 50 мкМ адреналина или 10 мМ фторида натрия. Пробу инкубировали при 37 °C в течение 15 мин. Ферментную реакцию останавливали помещением герметизированных проб в кипящую водяную баню на 2—3 мин, после чего пробирки центрифугировали для удаления денатурированного белка. Количество цАМФ определяли в надосадочной жидкости по методу [26].

Радиоактивность образцов подсчитывали на сцинтилляционном счетчике «Isocap-300» (СИПА) с использованием диоксанового сцинтиллятора [24] при работе с [<sup>3</sup>H]-цАМФ или на автоматическом сменщике проб NZ-322 фирмы «Гамма» (ВНР) — при использовании [<sup>125</sup>I]-цАМФ. Полученную информацию обрабатывали на ЭВМ «Наири-С».

Для определения активности цАМФ-фосфодиэстеразы (ФДЭ; КФ 3.1.4.17) ткань печени или почек гомогенизировали в 20 мМ трис-НСl-буфере pH 7,4, содержащем 20 мМ гистидина и 1 мМ MgCl<sub>2</sub>. Полученный гомогенат центрифугировали при охлаждении в течение 1 ч при 14 000 g и надосадок использовали в качестве источника ферментной активности. Активность фермента определяли по методу [25] в пробах объемом 0,5 мл, содержащих

25 мМ трис-НСl pH 8,0, 0,5 мМ цАМФ, 5 мМ MgCl<sub>2</sub> и 500 мкг белка ферментного препарата. Пробу инкубировали 15 мин при 37 °C. Реакцию останавливали нагреванием в течение 2 мин на кипящей водяной бане. Ферментную активность оценивали по накоплению неорганического фосфата из продукта ФДЭ-реакции — 5-АМФ в ходе сопряженной реакции, которую проводили в присутствии яда змеи в качестве источника 5-нуклеотидазной активности в течение 15 мин. Реакцию прекращали добавлением 0,1 мл 55 % раствора ТХУ и после удаления белков посредством центрифугирования в пробах определяли концентрацию неорганического фосфата [29]. Активность ферментов выражали в расчете на 1 мг белка. Белок определяли методом Лоури [28].

## Результаты и обсуждение

Полученные в контроле величины содержания ЦН и активности ферментов их метаболизма в изученных тканях удовлетворительно согласуются с литературными данными [10, 20].

Проведенные эксперименты показали значительное увеличение (более чем в 5 раз) уровня цАМФ в плазме крови неполовозрелых крыс на 1-е сутки после термического ожога по сравнению с контролем (табл. 1). В последующие сроки исследования происходило постепенное снижение уровня цАМФ в крови. Однако на 3-й и 7-е сутки экспериментальной ожоговой болезни концентрация цАМФ в плазме крови крысят достоверно превышала контрольный уровень и лишь на 14—21-е сутки возвращалась к норме. Уровень цГМФ в плазме крови обожженных крысят также повышался на 1-е сутки эксперимента, но в меньшей степени, чем уровень цАМФ, и оставался повышенным в течение 1-й недели после травмы. Коэффициент цАМФ/цГМФ в плазме крови обожженных животных достигал максимума на 1-е сутки эксперимента и сохранялся выше контрольного уровня до 7-го дня эксперимента. Выявленное увеличение концентрации ЦН в крови при ожоговой болезни может быть результатом усиленной экскреции ЦН в кровь из пораженного участка кожи, а также из других тканей за счет нарушения мембранной проницаемости [3].

Учитывая, что ткани печени и почек по результатам патогистологических и физиолого-биохимических исследований подвержены значительным изменениям при ожогах [12, 15], для оценки состояния обмена ЦН было проведено исследование содержания ЦН и

Влияние ожоговой травмы на содержание ЦН в плазме крови, печени и почках неполовозрелых крыс

Ткань	Срок исследования, сут	цАМФ	цГМФ	Коэффициент цАМФ/цГМФ
Плазма крови, нмоль на 1 мл плазмы	Контроль	15,7±3,2	6,6±0,9	2,4
	1	87,9±29,2*	12,5±1,8*	7,0
	3	36,1±8,8*	10,1±1,0*	3,5
	7	36,0±7,2*	9,7±1,8*	3,7
	14	13,8±2,3	6,6±0,7	2,3
	21	17,7±3,5	8,3±1,6	2,1
Печень, нмоль на 1 г ткани	Контроль	1283,3±35,3	186,7±15,7	6,8
	6 ч	1950,0±119,0*	250,0±15,8*	7,8
	1	2116,7±113,8*	255,6±23,0*	8,2
	3	2535,8±169,9*	327,1±12,8*	7,7
	7	1900,0±96,6*	395,0±17,9*	4,8
Почки, нмоль на 1 г ткани	Контроль	1254,5±45,4	111,7±6,8	11,2
	6 ч	1650,0±112,5*	137,5±15,6*	12,0
	1	1516,0±78,5*	143,3±7,4*	10,6
	3	1500,0±107,2*	193,1±12,4*	7,8
	7	1400,0±64,5	179,2±41,9*	7,8

Пр и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2 звездочкой отмечено  $p < 0,05$ .

активности ферментов биосинтеза и распада цАМФ в печени и почках обожженных крысят.

Из полученных данных видно, что содержание цАМФ и цГМФ в печени подопытных животных отчетливо повышается во все сроки исследования. Наибольший подъем уровня цАМФ наблюдается на 3-и сутки после ожога, а уровень цГМФ возрастает постепенно, достигая максимума на 7-е сутки исследования. Коэффициент цАМФ/цГМФ в ткани печени увеличивается в ранние сроки после ожога и заметно снижается по сравнению с контролем на 7-е сутки опыта.

Повышение уровня ЦН после ожога отмечается также в почках. Соотношение цАМФ/цГМФ при этом на протяжении 1-х суток термического поражения мало отличается от контроля, на 3-и и 7-е сутки исследования значительно понижается за счет выраженного подъема уровня цГМФ.

При анализе полученных результатов обращает на себя внимание значительное повышение уровня цГМФ в тканях печени и почек на 3-и и 7-е сутки экспериментальной ожоговой болезни, что согласуется с данными об активации гуанилатциклазы в ряде тканей в токсемическом периоде заболевания [13]. Активаторами гуанилатциклазы в этих условиях могут являться липоперекиси и свободные радикалы [2], усиленное образование

которых показано в токсемическом периоде ожоговой болезни [22].

Повышение уровня цАМФ в плазме крови и тканях крысят в остром периоде ожоговой болезни согласуется с клиническими данными об увеличении циклоаденилатурии у больных детей с термической травмой [23].

Между уровнями ЦН в крови и тканях печени и почек при экспериментальном термическом поражении строгого параллелизма не наблюдается, что, по-видимому, свидетельствует об определенной тканевой специфичности выявленных изменений. При этом следует учитывать и то обстоятельство, что для крови важным фактором, регулирующим уровень ЦН, является не только поступление их из различных тканей, но и экскреция во внеклеточные и экскретируемые биологические жидкости [21].

Результаты исследований активности ферментов метаболизма цАМФ у подопытных животных представлены в табл. 2.

Как видно, термическая травма приводит к повышению базальной активности АЦ в печени и почках крысят через 1 сут после термического воздействия. На 7-е сутки эксперимента отмечается понижение этого показателя по сравнению с контролем. Подобные фазовые изменения активности АЦ в тканях отмечены и при ряде других экстремальных состояний [5].



Влияние термического ожога на активность АЦ и ФДЭ в печени и почках неполовозрелых крыс

Ткань	Срок исследования, сут	Активность АЦ (в нмоль на 1 мг белка в 1 мин)					Активность ФДЭ, нмоль на 1 мг белка в 1 мин
		базальная	активируемая				
			адреналином		NaF		
			абсолютная величина	степень активации	абсолютная величина	степень активации	
Печень	Контроль	18,7±0,6	34,6±2,6	1,9	63,0±8,7	3,4	6,5±0,6
	6 ч	20,0±0,7	33,9±2,5	1,7	64,2±9,2	3,2	4,7±0,5*
	1	28,1±1,0*	46,1±3,0*	1,6	76,1±4,0	2,7	5,4±0,3
	3	19,2±0,9	25,9±2,9*	1,4	61,4±3,5	3,2	6,1±0,4
	7	14,6±0,7*	20,1±0,6*	1,4	36,3±2,2*	2,5	5,9±0,4
Почки	Контроль	14,1±0,8	29,6±1,2	2,1	46,2±5,5	3,3	10,1±0,8
	6 ч	16,0±0,8	29,6±6,3	1,9	52,2±16,8	3,3	11,8±0,3
	1	18,0±0,7*	37,5±2,5*	2,1	58,4±2,7	3,2	9,1±0,7
	3	13,8±0,6	21,7±3,7*	1,6	45,7±7,0	3,3	10,4±0,6
	7	11,0±0,7*	19,4±4,0*	1,8	30,2±5,5*	2,7	9,3±0,7

В присутствии адреналина абсолютная величина активности АЦ в тканях печени и почек крысят через 1 сут после ожога была достоверно выше, чем в контроле, однако степень активации по сравнению с базальным уровнем активности несколько снижалась в печени и оставалась неизменной в почках. На 3-и сутки эксперимента происходило заметное уменьшение как абсолютной величины стимулируемой адреналином активности АЦ в печени и почках, так и степени активации, что свидетельствует о десенситизации фермента [17] к длительной адренергической стимуляции после ожоговой травмы [11].

На 7-е сутки опыта наряду с угнетением базальной и адреналинзависимой активности АЦ происходит понижение и степени активации АЦ при добавлении NaF, что свидетельствует о более глубоких изменениях в самой молекуле фермента, поскольку фторид, как известно, действует на каталитическую субъединицу АЦ [2]. Полученные результаты согласуются с данными электронно-микроскопических исследований о выраженных деструктивных изменениях, разрыхлении и разволокнении плазматических мембран к концу 1-й недели после ожога [16]. Одним из вероятных факторов ингибирования АЦ в условиях ожоговой токсемии может быть действие низкомолекулярных пептидов [1], с которыми в последнее время связывают многие проявления ожоговой интоксикации.

Изменения активности ФДЭ в условиях эксперимента были менее выра-

жены. Лишь через 6 ч после ожога в печени крысят отмечено заметное понижение активности фермента. Одним из возможных механизмов угнетения ФДЭ может быть снижение после термической травмы в клетках и тканях концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  [14], необходимых для проявления активности ФДЭ [4].

Таким образом, результаты проведенных исследований выявили существенные изменения функциональной активности циклазной системы при экспериментальной термической травме у неполовозрелых животных, зависящие от периода ожоговой болезни. Полученные экспериментальные данные должны быть учтены в общей схеме патогенеза термических поражений и могут оказаться полезными для решения ряда вопросов рациональной фармакотерапии ожоговой болезни в детском возрасте.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Андреев В. И., Моренкова С. А., Карелин А. А. // Циклические нуклеотиды и система регуляции ферментативных реакций. — Рязань, 1985. — С. 32.
2. Бужурина И. М., Панов М. А. // Общие проблемы физико-химической биологии. — М., 1986. — Т. 3. — С. 3—258.
3. Гильманов А. Ж. // Патохимия термических поражений в детском возрасте. — Уфа, 1987. — С. 41—46.
4. Григорович Ю. А. // Успехи биол. химии. — 1976. — Т. 17. — С. 102—126.
5. Дорофеев Г. И., Кожемякин Л. А., Ивашкин В. Т. Циклические нуклеотиды и адаптация организма. — Л., 1978.
6. Заец Т. Л., Андреев В. И., Карелин А. А. // Вопр. мед. химии. — 1983. — № 5. — С. 73—75.



7. Камиллов Ф. Х. // Патохимия термических поражений в детском возрасте. — Уфа, 1987. — С. 74—80.
8. Камиллов Ф. Х., Давлетов Э. Г., Гильманов А. Ж. // Вопр. мед. химии. — 1982. — № 1. — С. 56—59.
9. Карелин А. А., Носова И. М., Коткина Т. И. // Всесоюзная конф. по проблеме «Глубокие и обширные ожоги», 2-я: Тезисы. — М., 1979. — С. 56—57.
10. Кисельгоф Е. И. // Радиобиология. — 1983. — № 6. — С. 796—798.
11. Кузин М. И., Заец Т. Л. // Хирургия. — 1981. — № 5. — С. 35—43.
12. Метаболические основы острой ожоговой токсемии. — Омск, 1977.
13. Носова И. М., Давлетов Э. Г., Карелин А. А. // Патохимия термических поражений в детском возрасте. — Уфа, 1987. — С. 61—63.
14. Рябинин В. Е. // Ожоговая токсемия. — Челябинск, 1986. — С. 27—34.
15. Саркисов Д. С., Каем Р. И., Втюрин Б. В. // Всесоюзная конф. по проблеме «Глубокие и обширные ожоги», 2-я: Тезисы. — М., 1979. — С. 18—21.
16. Сморчок С. А., Волков К. С., Тюрина В. Г. // Всесоюзный съезд анатомов, гистологов и эмбриологов, 9-й: Тезисы докладов. — Минск, 1981. — С. 357.
17. Ткачук В. А. // Всесоюзный биохимический съезд, 4-й: Тезисы симпозиальных докладов. — М., 1979. — С. 92—93.
18. Ткачук В. А. Введение в молекулярную эндокринологию. — М., 1983.
19. Ткачук В. А., Балденков Г. Н. // Биохимия. — 1978. — Т. 43. — С. 1097—1110.
20. Туракулов Я. Х., Халиков С. К., Саатов Т. С. // Там же. — 1980. — Т. 45. — С. 1196—1199.
21. Федоров Н. А. // Циклические нуклеотиды. — Минск, 1982. — С. 154—155.
22. Юханова А. Ш., Фархутдинов Р. Р. // Патохимия термических поражений в детском возрасте. — Уфа, 1987. — С. 46—52.
23. Barlow G. B., Wilkinson A. W. // Clin. chim. Acta. — 1973. — Vol. 46, N 2. — P. 197—199.
24. Bray G. A. // Analyt. Biochem. — 1960. — Vol. 1. — P. 279—285.
25. Butcher R. W., Sutherland E. W. // J. biol. Chem. — 1962. — Vol. 237. — P. 1244—1250.
26. Gilman A. G. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1970. — Vol. 67. — P. 305—312.
27. Levitzki A. // Crit. Rev. Biochem. — 1981. — Vol. 19. — P. 81—112.
28. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
29. Rathbun W. B., Betlach M. V. // Analyt. Biochem. — 1969. — Vol. 28. — P. 436—440.
30. Sabo K., Tulok I., Novak I. // Acta chir. plast. — 1981. — Vol. 23, N 4. — P. 226—232.
31. Vaughan G. M., Becker R. A., Unger R. H. et al. // Metabolism. — 1985. — Vol. 34, N 7. — P. 637—641.

Поступила 12.11.87

#### ALTERATIONS OF CYCLIC NUCLEOTIDES SYSTEM AFTER EXPERIMENTAL BURNS IN PREADOLESCENT RATS

E. G. Davletov, A. A. Karelin, F. Kh. Kamilov  
Bashkir Medical School, Ufa, Institute of Surgery, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Thermal trauma caused a distinct increase in content of cAMP and cGMP in blood as well as in liver and kidney tissues of one-month-old rats within the first week after burns. Alterations, which depend on the step of burn development, were found in basal and adrenaline, fluoride-stimulated activities of adenylate cyclase in liver and kidney tissues of experimental animals. Activity of phosphodiesterase was altered only slightly under similar experimental conditions while pronounced decrease in the enzymatic activity was observed in rat liver tissue within 6 hrs after burns.

УДК 612.621.015.2:547.96]-088.1:543.544

Г. А. Олефиренко, Д. Д. Петрунин, Ю. С. Татаринев, Л. А. Щербакова,  
В. А. Мурашов

#### ПРЕПАРАТИВНОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ $\alpha_2$ -МИКРОГЛОБУЛИНА ФЕРТИЛЬНОСТИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ИОНООБМЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Кафедра биохимии и Проблемная лаборатория по иммунохимии злокачественных и эмбриональных тканей ИММИ им. Н. И. Пирогова

Впервые  $\alpha_2$ -микроглобулин фертильности (АМГФ) был идентифицирован иммунохимически в качестве органоспецифического антигена плаценты, секретируемого в амниотическую жидкость [3]. Этот белок был охарактеризован физико-химически [4] и очищен с помощью комбинации методов ад-

сорбционной хроматографии на силикагеле и гидрофосфате алюминия [7]. Впоследствии АМГФ был также обнаружен в сперме, семенных пузырьках, менструальной крови и эпидеметрии в секреторной фазе менструального цикла [5], в связи с чем он и получил свое название [6].

Охарактеризован синтез АМГФ децидуальной тканью. На основе косвенных данных возникла гипотеза о ферментативной роли АМГФ (специфическая фосфолипаза  $A_2$ ) в синтезе простагландинов [5, 6, 8]. В пользу этого предположения свидетельствуют также данные о тромбаггрегирующем действии препарата АМГФ на кровяные пластинки [2].

Иммунологически идентичный АМГФ антиген был описан под названием «маточный  $\alpha$ -глобулин» [13] «прогестагензависимый эндометриальный протеин» [11] и «плацентарный протеин 14» [10]. Доказательства иммунологической идентичности перечисленных белков были получены в результате серии последовательных сопоставлений [10, 12, 14].

Ввиду низкого содержания в сыворотке крови АМГФ возникает необходимость в разработке высокочувствительных методов определения этого белка — радиоиммунологического и энзимоиммунологического. Эти методы требуют наличия высокоочищенных препаратов АМГФ; чистые препараты нативного АМГФ необходимы для выяснения его биологической активности. Очистка АМГФ с применением адсорбционной хроматографии на силикагеле не гарантирует сохранения нативных свойств этого белка [1, 8], поскольку на поверхности силикагеля в той или иной мере может происходить денатурация, степень которой непредсказуема из-за значительных вариаций конкретных промышленных партий этого реактива.

Целью настоящего исследования явилась разработка способа препаративного выделения АМГФ на основе наиболее адекватных «мягких» методов ионообменной хроматографии на сефадексах, позволяющих получить высокоочищенный препарат АМГФ с сохранением его нативных свойств.

### Методика

АМГФ выделяли из экстракта децидуальной ткани, полученной при прерывании беременности на ранних сроках. Ткань измельчали ножницами, добавляя трис-глицериновый буфер pH 8,3, содержащий детергенты (третон X-100 и твин-80 по 1 г на 1000 мл буфера), в объемном соотношении 1:1 и гомогенизировали со стеклянным порошком. Полученный гомогенизат троекратно замораживали и оттаивали с последующим центрифугированием при 8000 g в течение 10 мин.

Получение моноспецифических антисывороток к АМГФ описано ранее [3]. Содержание общего белка в процессе очистки определяли спектрофотометрически при 280 нм. Концентрацию АМГФ рассчитывали по результатам иммунодиффузионного титрования со стандартной тест-системой [9], чувствительность которой составляла около 2 мкг/мл. На основе этих исследований судили о чистоте полученных препаратов. Вспомогательными методами оценки чистоты служили иммунодиффузионный анализ с антисывороткой к нормальным белкам сыворотки крови человека и перекрестный иммуоэлектрофорез.

Ионообменные сефадексы (QAEA-50 и SPC-50, «Pharmacia», Швеция) применяли во влажном состоянии, избавляясь от избытка воды центрифугированием при 1000 g в течение 10 мин. pH экстракта децидуальной ткани доводили до 4,0—4,2 при помощи 1 н. раствора HCl. Затем экстракт смешивали с равным объемом влажного сефадекса SPC-50 и инкубировали при постоянном помешивании на магнитной мешалке в течение 1 ч. Сефадекс отделяли центрифугированием при 2000 g в течение 10 мин, а полученную в результате надосадочную жидкость вновь инкубировали с сефадексом SPC-50, который добавляли в объемном соотношении 3:1, постоянно помешивая в течение 30 мин. Надосадочную жидкость, полученную после центрифугирования с pH, доведенным до 5,5 при помощи 0,1 н. NaOH, смешивали с сефадексом QAEA-50 в объемном соотношении 2:1. После инкубации в течение 1 ч на магнитной мешалке сефадекс трижды отмывали дистиллированной водой и проводили элюцию АМГФ равным объемом 0,05 M ацетатного буфера pH 4,2. К элюату приливали равный объем 20 % раствора  $Na_2CO_3$ , а затем вносили влажный сефадекс QAEA-50 в объемном соотношении 3:1. После инкубации в течение 1 ч на магнитной мешалке надосадочную жидкость, содержащую АМГФ, отделяли центрифугированием, диализовали в течение 3 сут против дистиллированной воды и лиофилизировали.

### Результаты и обсуждение

АМГФ получали из экстракта децидуальной ткани по схеме, представленной в таблице. В качестве основного метода очистки была использована ионообменная хроматография, которая, обладая высокой разрешающей способностью, является в то же время щадящим по отношению к белковой молекуле способом. Кроме того, во-первых, использование «бесколоночного» варианта позволяет обходиться без дорогостоящего специального оборудования. Во-вторых, процедура выделения белка требует относительно небольшой затраты времени, поскольку как взаимодействие белков с сефадексом, так и элюция происходят в достаточно короткие промежутки времени. И, в-третьих, использование центрифужных пробирок вместо колонок

# Схема очистки АМГФ

Этап очистки	Выход, %	Чистота, %
Экстрагирование децидуальной ткани	100	2
Ионообменная хроматография на сефадексе SPC-50 в кислой среде (надосадочная жидкость)	95	8
Повторная ионообменная хроматография на сефадексе SPC-50 в кислой среде (надосадочная жидкость)	90	16
Ионообменная хроматография на сефадексе QAEА-50 в кислой среде (элюат)	50	55
Ионообменная хроматография на сефадексе QAEА-50 в щелочной среде (надосадочная жидкость)	30	95
Диализ	30	95
Лиофилизация	30	95

обеспечивает возможность работать с большими объемами и получать значительные количества препарата.

В ходе предварительных исследований было установлено, что АМГФ в кислой среде в отличие от значительной части примесей не связывается с катионообменным сефадексом SPC-50, а при рН выше изоэлектрической точки прочно удерживается анионообменным сефадексом QAEО-50, оставляя в надосадочной жидкости достаточно много примесей. В щелочной среде при определенной величине ионной силы раствора АМГФ перестает взаимодействовать с QAEА-50 и остается в надосадочной жидкости, тогда как примесные белки почти полностью связываются сефадексом. При подборе растворов в целях создания оптимального соотношения рН и ионной силы раствора был апробирован целый ряд соединений, таких, как  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  и др. Наиболее адекватные условия создаются при добавлении  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  с окончательной концентрацией в растворе 10 %.

В результате комбинации подобранных приемов ионообменной хроматографии на анионо- и катионообменном сефадексах удается получить препарат АМГФ с чистотой около 95 % и выходом 40 % (см. рисунок на вклейке).

Предлагаемая схема выделения АМГФ позволяет не только получить

высокоочищенный препарат с достаточно низкими потерями, но и обеспечивает полное сохранение нативных свойств белка, что является необходимым условием разработки высокочувствительных методов определения белка и изучения его биологической активности.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам: Пер. с англ. — М., 1982. — Т. 1.
2. Перлова Т. В. // Акуш. и гин. — 1986. — № 1. — С. 66—69.
3. Петрунин Д. Д., Грязнова И. М., Петрунина Ю. А., Татаринов Ю. С. // Бюл. экспер. биол. — 1976. — № 7. — С. 803—804.
4. Петрунин Д. Д., Грязнова И. М., Петрунина Ю. А., Татаринов Ю. С. // Там же. — 1978. — № 5. — С. 600—602.
5. Петрунин Д. Д., Козляева Г. А., Меснянкина Н. В., Шевченко О. П. // Акуш. и гин. — 1980. — № 3. — С. 22—23.
6. Петрунин Д. Д., Козляева Г. А., Татаринов Ю. С. и др. // Там же. — 1981. — № 6. — С. 16—17.
7. Петрунин Д. Д., Козляева Г. А., Татаринов Ю. С., Шевченко О. П. // Вопр. мед. химии. — 1980. — № 5. — С. 711—713.
8. Петрунин Д. Д., Олефиренко Г. А., Цагарева Т. М., Шевченко О. П. // Акуш. и гин. — 1982. — № 7. — С. 23—25.
9. Храмова Н. И., Абелев Г. И. // Бюл. экспер. биол. — 1961. — № 12. — С. 107—111.
10. Bohn H. // Ric. Clin. Lab. — 1982. — Vol. 12. — P. 221—230.
11. Joshi S. G., Ebert K. M., Swartz D. P. // J. Reprod. Fertil. — 1980. — Vol. 59. — P. 273—285.
12. Julkunen M., Raihar R. S., Joshi S. G. et al. // Hum. Reprod. — 1986. — Vol. 1. — P. 7—8.
13. Sutcliffe R. G., Brock D. J. H., Nicholson L. V. B., Dunn E. // J. Reprod. Fertil. — 1978. — Vol. 54. — P. 85—90.
14. Sutcliffe R. G., Joshi S. G., Paterson W. F., Bank J. F. // Ibid. — 1982. — Vol. 65. — P. 207—209.

Поступила 18.06.87

## PREPARATIVE ISOLATION OF HUMAN FERTILITY $\alpha_2$ -MICROGLOBULIN USING ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY

G. A. Olefirenko, D. D. Petrunina, Yu. S. Tatarinov, L. A. Scherbakova, V. A. Murashova  
II Medical School, Moscow

A preparation of fertility  $\alpha_2$ -microglobulin was isolated from an extract of decidual tissue with a purity about 95 % and complete maintaining of native properties using chromatography on anion and cation exchange Sephadexes.

## ИММУНОХИМИЧЕСКОЕ СРАВНЕНИЕ ЛАКТОФЕРРИНА ЖЕНСКОГО МОЛОКА И ЛАКТОФЕРРИНА НЕЙТРОФИЛОВ

Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П. А. Герцена

В начале 50-х годов из молока женщин был выделен и частично охарактеризован железосодержащий гликопротеид, названный лактоферрином (ЛФ<sub>м</sub>). В последующие годы появились работы, показавшие, что в клетках секреторного эпителия ряда органов [8] и продуктах их секреции (слезы, слюна, поджелудочный сок, сперма), а также в полиморфноядерных лейкоцитах (ПМЯЛ) [6] и плазме крови человека имеется вещество, которое можно обнаружить различными методами иммунохимии, применяя антисыворотки (Ас) антитела (Ат) к ЛФ<sub>м</sub>. Причем в зависимости от целей и задач исследования эти иммунологические реагенты используются для иммуноцитохимического, серологического выявления, а также для обнаружения его на срезах тканей человека. Однако в литературе имеются сведения об иммунохимической идентичности только ЛФ из секретов человека [2] и не содержится данных о прямом иммунохимическом сравнении ЛФ ПМЯЛ и ЛФ<sub>м</sub>.

Целью настоящей работы являлось выделение ЛФ из нейтрофилов человека (ЛФ<sub>н</sub>), получение к нему Ас иммунизацией кроликов и сравнение ЛФ<sub>н</sub> и ЛФ<sub>м</sub> иммунохимическими методами.

### Методика

ЛФ<sub>н</sub> человека получали путем элюции антигена с угольного адсорбента марки СКН-К для детоксикации крови вне организма после гемосорбции больных раком пищевода и дальнейшей ионообменной хроматографии полученного препарата на КМ-сефадексе по методу, аналогичному таковому выделения ЛФ<sub>м</sub> [5].

ЛФ<sub>м</sub> и Ас к нему получали описанными ранее методами [5].

Сравнение ЛФ<sub>н</sub> и ЛФ<sub>м</sub> по молекулярной массе и заряду проводили с помощью электрофореза в ПААГ [12] в присутствии и в отсутствие ДДС-Na [7, 12]. Молекулярную массу ЛФ<sub>н</sub> определяли ДДС-Na-электрофорезом, используя стандартные белки: фосфорилazu (мол. масса 94 000 Д), бычий сывороточный альбумин (мол. масса 67 000 Д), яичный альбумин (мол. масса 43 000 Д), карбоангидразу (мол. масса 30 000 Д), соевый ингибитор трип-

сина (мол. масса 20 100 Д),  $\alpha$ -лактальбумин (мол. масса 14 000 Д).

Антисыворотку к ЛФ<sub>н</sub> получали иммунизацией кроликов по следующей схеме: в 1-й день вводили 500 мкг препарата: 250 мкг внутривенно, 250 мкг в 6 точек спины внутрикожно. Через 21 день инъецировали еще 500 мкг препарата внутривенно и на 7-й день после второй иммунизации проводили кровопускание.

Стандартную тест-систему на ЛФ<sub>н</sub> в двойной радиальной иммунодиффузии по Оухтерлоу готовили по методу, опубликованному ранее [3]. Антитела из Ас к ЛФ<sub>н</sub> и ЛФ<sub>м</sub> получали аффинной хроматографией на ЛФ<sub>м</sub>, иммобилизованном на сефарозе 4В, по описанной ранее методике [5]. Ат кролика к ЛФ<sub>м</sub> конъюгировали с пероксидазой по методу [11]. Иммуноэлектрофорез проводили двойным перекрестным методом [1]. В нейтрофилах человека ЛФ выявляли на фиксированных мазках крови иммунопероксидазным методом: мазки периферической крови фиксировали 10 мин холодным метиловым спиртом с 0,33 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, затем фиксатор отмывали в забуференном физиологическом растворе (0,01 М Na-фосфатный буфер pH 7,6 с 0,15 М NaCl) в течение 10 мин при перемешивании буфера на магнитной мешалке. Все последующие отмывки проводили аналогичным образом. После отмывки с мазков удаляли избыток буфера и наносили Ат кролика к ЛФ<sub>м</sub>, конъюгированные с пероксидазой хрена так, чтобы весь мазок был покрыт жидкостью (50–100 мкл в концентрации 10 мкг/мл). Инкубировали в течение 1 ч во влажной камере при комнатной температуре. Выявление комплекса Ag—Ат—пероксидаза проводили 0,05 % раствором 3,3'-диаминобензидина в 0,1 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в течение 5 мин во влажной камере в темноте. Мазки докрашивали по Гимзе—Романовскому. Полученные препараты исследовали в системном микроскопе (ув. 90).

### Результаты и обсуждение

При разработке метода иммунохимического определения ЛФ в нейтрофилах человека на фиксированных мазках крови был замечен факт спонтанного выхода ЛФ из ПМЯЛ человека. Отмечено также, что это явление происходит настолько легко, что требуются особые предосторожности при приготовлении мазка. Основываясь на этом факте, мы предположили, что ЛФ может выходить из клетки при проведении гемосорбции у людей, т. е. даже кратковременный контакт с сорбентом должен быть достаточным для дегрануляции.

Иммунохимическое выявление ЛФ на мазках крови больных раком пищевода до гемосорбции и после этой процедуры подтвердило указанное предположение (рис. 1, см. вклейку). Интенсивность окраски на ЛФ в нейтрофилах человека после гемосорбции была существенно ниже, чем в ПМЯЛ, не контактировавших с сорбентом. Этот факт, а также то обстоятельство, что ЛФ чрезвычайно прочно сорбируется на различных поверхностях (полистероле, биологических мембранах [10], белках плазмы крови человека [11]), позволяли предположить, что ЛФ достаточно прочно связывается также с сорбентом при гемосорбции, откуда его можно извлечь, а затем выделить в очищенном состоянии.

Выделение ЛФ из нейтрофилов проводили из элюата, полученного при промывании 2 л отработанного гемосорбента 0,5 л 10 %  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , после диализа его против 4 л дистиллированной воды. ЛФ высаливали сульфатом аммония в области до 80 % насыщения. Осадок после растворения в минимальном объеме буфера диализовали против 4 л дистиллированной воды в течение 20 ч, а затем против 2 л 0,01 М Na-фосфатного буфера pH 7,0 еще 20 ч. Диализат смешали с 1 г сухого КМ ссфадекса С-50. Элюцию слабо сорбиовавшихся белков проводили буфером pH 7,0, промывая катионит до тех пор, пока величина поглощения при 280 нм в промывных водах не достигла 0,01 ОЕ/мл.

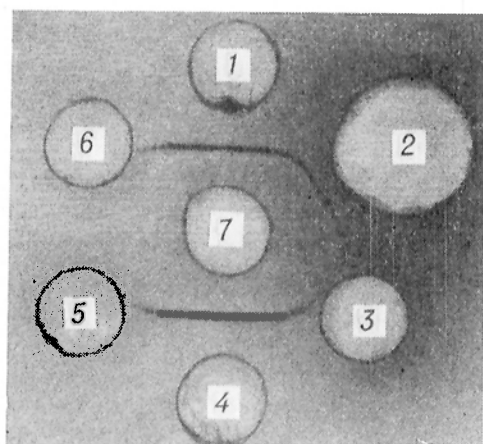


Рис. 2. Иммунодиффузионное сравнение ЛФII и ЛФМ.

1, 4 — ЛФМ, 2, 3, 5, 6 — ЛФII в различных концентрациях, 7 — Ас к ЛФМ.

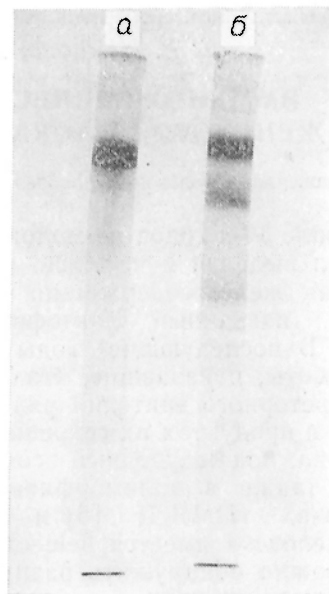


Рис. 3. Электрофорез ЛФ.  
а — ЛФМ, б — ЛФII больных раком пищевода.

ЛФ элюировали 0,1 М Na-фосфатным буфером pH 8,0 с 0,15 М NaCl.

В результате получена фракция, которая была проанализирована на наличие белка (спектрофотометрически), полипептидных компонентов (в нативном и ДДС-Na-электрофорезе в ПААГ) и присутствие ЛФ (в методе двойной радиальной иммунодиффузии по Оухтерлони с использованием Ас к ЛФМ). Антиген, содержащийся в этой фракции, при внесении ее в иммунодиффузную стандартную тест-систему на ЛФМ образовывал полосу преципитации, идентичную линии в тест-системе (рис. 2), что свидетельствует о наличии общих антигенных детерминант у выделенного белка и ЛФМ.

Сравнение этого антигена и ЛФМ в методах электрофореза в ПААГ в денатурирующих и неденатурирующих условиях показало их полную идентичность по молекулярной массе (75 000 Д) и электрофоретической подвижности в ПААГ (рис. 3).

Эти данные наряду с результатами реакции иммунодиффузии свидетельствуют о том, что выделенный антиген является ЛФII, который имеет сходство по физико-химическим и иммунологическим свойствам с ЛФМ.

Однако этих данных недостаточно для заключения о полном иммунологическом тождестве сравниваемых ан-

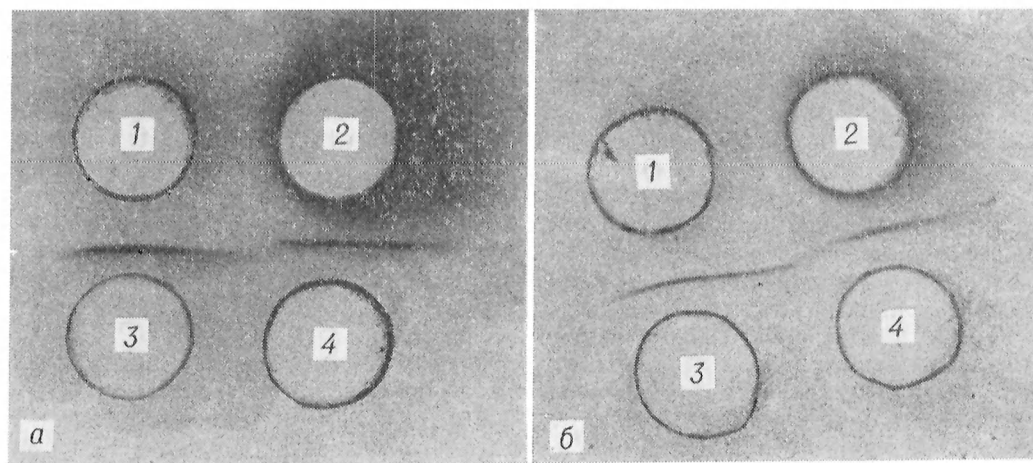


Рис. 4. Иммунодиффузионное сравнение тест-систем на ЛФ<sub>м</sub> и ЛФ<sub>н</sub>.  
 а — стандартная тест-система: 1 — Ас к ЛФ<sub>м</sub>, 2 — Ас к ЛФ<sub>н</sub>, 3 — ЛФ<sub>м</sub>, 4 — ЛФ<sub>н</sub>; б — сравнительный анализ тест-систем: 1 — Ас к ЛФ<sub>м</sub>, 2 — Ас к ЛФ<sub>н</sub>, 3 — ЛФ<sub>н</sub>, 4 — ЛФ<sub>м</sub>.

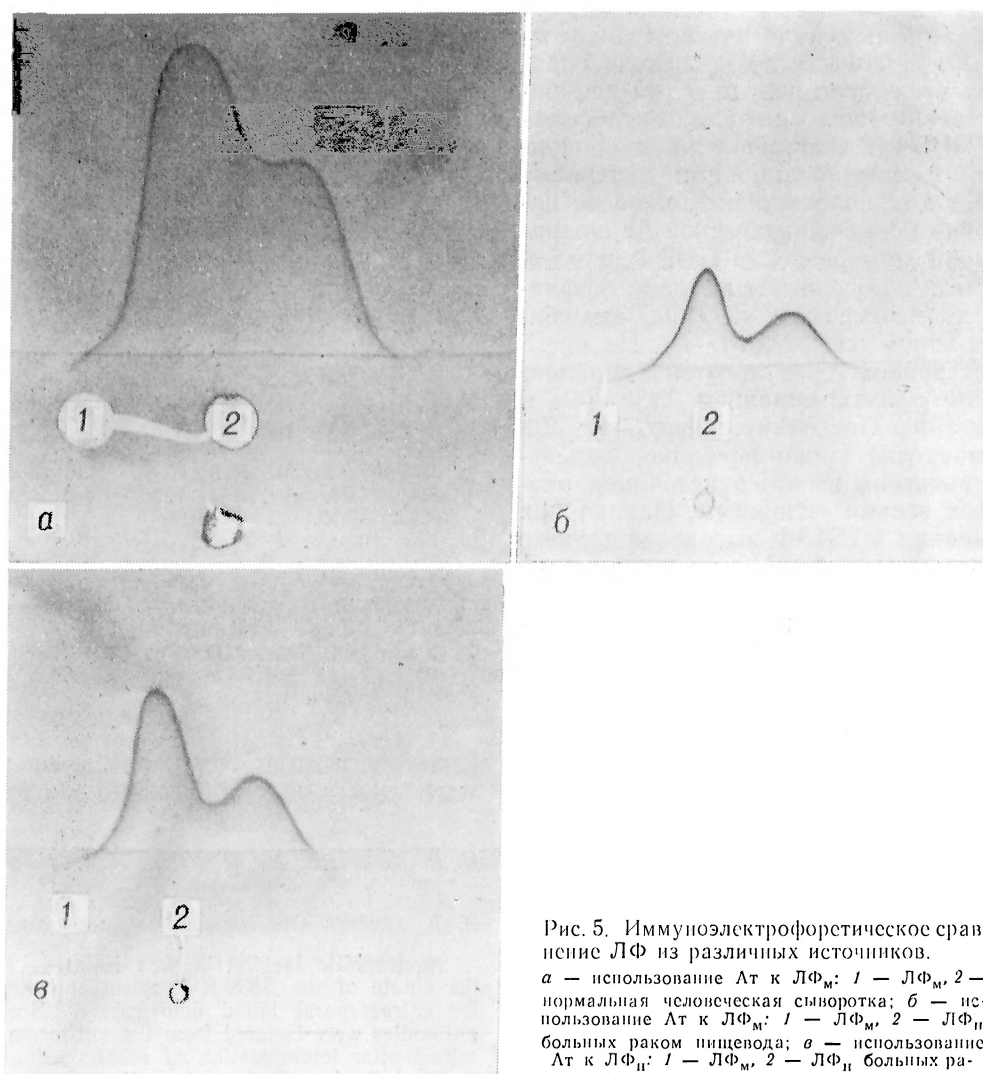


Рис. 5. Иммуноэлектрофоретическое сравнение ЛФ из различных источников.  
 а — использование Ат к ЛФ<sub>м</sub>: 1 — ЛФ<sub>м</sub>, 2 — нормальная человеческая синовиальная; б — использование Ат к ЛФ<sub>м</sub>: 1 — ЛФ<sub>м</sub>, 2 — ЛФ<sub>н</sub> больных раком пищевода; в — использование Ат к ЛФ<sub>н</sub>: 1 — ЛФ<sub>м</sub>, 2 — ЛФ<sub>н</sub> больных раком пищевода.



тигенов, так как наличие дополнительных детерминант в одной из молекул (в данном случае у ЛФ<sub>II</sub>) не может быть выявлено при взаимодействии с Ас к ЛФ<sub>M</sub>; необходимо сравнение Ас, полученных к обоим антигенам.

Хотя на рис. 3 видно, что ЛФ<sub>II</sub> не был получен в максимально очищенном состоянии, высокая степень иммуногенности этого антигена, а также небольшое количество примесей позволили нам не продолжать очистку белка и использовать полученный препарат ЛФ<sub>II</sub> для иммунизации животных. В результате цикла иммунизации от кроликов были получены Ас и приготовлена стандартная иммунодиффузионная тест-система. Сравнение иммунодиффузионных тест-систем на антиген молока и нейтрофилов показало их полную идентичность (рис. 4).

Для дальнейшего подтверждения вывода об иммунологическом тождестве ЛФ<sub>M</sub> и ЛФ<sub>II</sub> было проведено сравнение этих антигенов методом двойного перекрестного иммуноэлектрофореза (ПИЭФ). Поскольку наличие примесей в иммунизационном материале (ЛФ<sub>II</sub>) предполагало возможность получения полиспецифической Ас, непригодной для проведения ПИЭФ, из этой Ас были получены Ат методом аффинной хроматографии на ЛФ<sub>M</sub>, иммобилизованном на сефарозе 4В. На рис. 5 представлены результаты двойного ПИЭФ с использованием Ат к ЛФ<sub>M</sub> и Ат к ЛФ<sub>II</sub>. Поскольку содержание ЛФ в сыворотке крови невелико, выделение антигена из этого источника оказалось весьма сложным. Однако при сравнении в ПИЭФ высокоочищенного ЛФ<sub>M</sub> и нормальной сыворотки крови человека видна их полная иммунологическая идентичность. Характер кризых (см. рис. 5) подтверждает также полное иммунологическое тождество ЛФ<sub>II</sub> и ЛФ<sub>M</sub>.

Таким образом, разработанный метод выделения ЛФ<sub>II</sub> позволил получить Ас и Ат к ЛФ<sub>II</sub>, при помощи которых была доказана полная иммунологическая идентичность ЛФ<sub>M</sub>, ЛФ<sub>II</sub> нейтрофилов из нормальной сыворотки человека и ЛФ<sub>II</sub> нейтрофилов больных раком пищевода.

Эти данные согласуются с результатами работы [9], показавшими сходство ЛФ<sub>II</sub> и ЛФ<sub>M</sub> по молекулярной массе, рI, образованию железо-белкового комплекса и захвату печени. Однако

малые количества антигена не позволили авторам исследовать иммунологические свойства ЛФ<sub>II</sub>. Вопрос о полном тождестве ЛФ<sub>II</sub> и ЛФ<sub>M</sub> является весьма существенным, так как определение ЛФ<sub>II</sub> в плазме крови человека, иммуноцитохимическое и иммуногистохимическое определение ЛФ<sub>II</sub> с использованием Ас и Ат к ЛФ<sub>M</sub> без доказательства полного иммунохимического тождества не являются правомерными.

В результате данной работы доказана возможность использования ЛФ<sub>M</sub>, Ас и Ат к нему в качестве иммунологических реагентов при изучении ЛФ<sub>II</sub> различными методами.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Аксенсен И. // Руководство по количественному иммуноэлектрофорезу: Пер. с англ. — М., 1977. — С. 68—71.
2. Николаев А. А., Аншакова Н. И. // Вопр. мед. химии. — 1985. — № 3. — С. 128—131.
3. Храмова Н. И., Абелев Г. И. // Бюл. экспер. биол. — 1981. — № 12. — С. 107—109.
4. Якубовская Р. И., Коростелева М. Д., Александр С. К., Авдеев Г. И. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 5. — С. 36—40.
5. Якубовская Р. И., Немцова Е. Р., Коханова И. Д. и др. // Там же. — 1986. — № 6. — С. 75—85.
6. Baggiolini M., de Duve C., Masson P. L., Heremans J. F. // J. exp. Med. — 1970. — Vol. 131. — P. 559—570.
7. Davis B. J. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1964. — Vol. 121. — P. 404—410.
8. Masson P. L., Heremans J. F., Schonne F. // J. exp. Med. — 1969. — Vol. 130. — P. 643—658.
9. Moguilevsky N., Relegui L. A., Masson P. L. // Biochem. J. — 1985. — Vol. 229. — P. 353—359.
10. Van Munster P. J. O., Stoeltingd J. B. A., Poels-Zanders S. // Immunochemistry. — 1971. — Vol. 8. — P. 471—477.
11. Nakane P. K., Kawaoi A. // J. Histochem. — 1974. — Vol. 2. — P. 1084—1091.
12. Weber K., Osborn M. // J. biol. Chem. — 1969. — Vol. 244. — P. 4407—4412.

Поступила 25.08.87

## IMMUNOCHEMICAL ESTIMATION OF HUMAN MILK AND NEUTROPHILIC LACTOFERRINS

E. R. Nemtsova, M. M. Utkin, R. I. Yakubovskaya

P. A. Hertzen Oncological Institute, Moscow

Neutrophilic lactoferrin was isolated from the eluate of the SKN-K hemosorbent utilized for extracorporeal blood detoxication. Specific antibodies were isolated from the antiserum obtained after immunization of rabbits using the neutrophilic lactoferrin preparation. Immunolo-

gical identity of human milk lactoferrin, neutrophilic lactoferrin from blood serum of healthy persons and of the patients with esophagus cancer was exhibited by means of double radial immunodiffusion by Ouchterlony and by double

cross immunoelectrophoresis using the antibodies against milk and neutrophilic lactoferrins. Thus, milk lactoferrin, antiserum and antibodies against the enzyme might be used as immunoreagents in studies of neutrophilic lactoferrin.

*В. Е. Рябинин, Р. И. Лифшиц, Г. Х. Казарян*

## **ИНТЕНСИВНОСТЬ ОБРАЗОВАНИЯ БЕЛКОВ, НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ПЕПТИДОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОЖГОВОЙ ТОКСЕМИИ**

Кафедра биохимии Челябинского медицинского института

Одной из важных проблем современной комбустиологии является коррекция патохимических расстройств у обожженных. Решение ее зависит прежде всего от выяснения патогенетических механизмов развития метаболических нарушений, в частности изменений в обмене белков, пептидов и нуклеиновых кислот [5, 8, 13].

Изучение происхождения, места образования и механизма действия пептидов является важным направлением не только комбустиологии и медицины, но и современной биологии [2—4]. Нами установлено, что кровь обожженных собак в период острой токсемии содержит соединения пептидной природы, обладающие широким спектром биологической активности, и высказано предположение о том, что при ожоговой болезни может происходить накопление пептидов, реализующих свое кардио- и нейротоксическое действие и способных существенно нарушать процессы микроциркуляции и энергообмена [9, 10].

Известна генетически детерминированная резистентность разных популяций животных к термической травме [17]. Поэтому целью настоящей работы было исследование не только интенсивности образования белков, пептидов и нуклеиновых кислот в плазме, эритроцитах и печени крыс и мышей в период ожоговой токсемии, но и некоторых видовых особенностей в реакции животных на термический ожог.

### **Методика**

Термический ожог IIIa—IIIб степени (10—15 % поверхности тела) наносили беспородным белым крысам и мышам линии F<sub>1</sub> (СВАХ × С57В1) под эфирным наркозом с помощью кварцево-галогеновой лампы. Выделение РНК и ДНК проводили по методу [19], количество нуклеиновых кислот определяли спектрофо-

тометрическим методом [11], скорость синтеза нуклеиновых кислот — по включению <sup>14</sup>С-оротовой кислоты и <sup>3</sup>Н-глицина, которые вводили из расчета 1 мБк/100 г массы животных за 2 ч до декапитации. Содержание белка и пептидов определяли по методу Лоури [15].

Выделение и фракционирование белков и пептидов проводили из крови 120 крыс-самцов, которым за сутки до эксперимента внутривенно вводилась смесь 2,3-<sup>3</sup>Н-глутаминовой кислоты, 2,3-<sup>3</sup>Н-аланина и <sup>3</sup>Н-лизина в количестве 0,4 мБк/100 г. Выбор этих радиоактивных предшественников был продиктован наибольшей распространенностью этих аминокислот в составе основных из известных биологически активных пептидов [3]. Используемый нами метод введения радиоизотопов достаточно адекватен для решения поставленной задачи, заключающейся в исследовании не только уровня радиоактивности полипептидов разной молекулярной массы, но и изменений их соотношения в период ожогового шока. Измерение относительной удельной радиоактивности (ОУР) даст возможность обсуждать интенсивность образования среднемолекулярных пептидов независимо от того, являются ли они продуктами протеолиза белков-предшественников или синтезируются *de novo*. Известно, что при экстремальных воздействиях, изменяющих скорость синтеза полипептидной цепи, для определения относительных изменений времени синтеза полипептида нет необходимости в исследовании кинетики меченых растущих и завершенных полипептидов [7]. В опытах такого типа с параллельным введением контрольным и опытным группам животных радиоактивной метки можно произвольно выбирать время экспозиции животных с меченой аминокислотой, т. е. определять величину активности в «одной точке».

Кровь интактных и подопытных (через 24 ч после ожога) животных разделяли на плазму и форменные элементы. Последние подвергали «осмотическому шоку» при добавлении 10-кратного объема бидистиллированной воды, фильтровали через нейлон и фракционировали, как и плазму, методом последовательной ультрафильтрации на мембранных фильтрах УАМ-400, УАМ-150 и УАМ-50 («Владипор»). Ультрафильтрат, сконцентрированный на мембранах УАМ-50, наносили на колонку с сефадексом G-15 (5,6×50 см). Элюцию проводили дистиллированной водой со скоростью 80—90 мл/ч при помощи насоса «Варио Пернекс», оптическую плотность элюата регистрировали на «Увикорде» (ЛКВ, Швеция) при длине волны 206 нм с помощью одноканального самописца.

Радиоактивность измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике LS-1800 («Beckman»).

## Результаты и обсуждение

Результаты исследований показали, что термическое воздействие приводит к снижению общей концентрации белка и его ОУР в плазме обожженных животных через 1 сут после травмы по сравнению со здоровыми животными (рис. 1). Последовательная ультрафильтрация плазмы дала возможность сделать вывод о поддержании в плазме нормального уровня высокомолекулярных белков и снижении уровня средне- и низкомолекулярных компонентов белковой и пептидной природы. Интенсивность включения радиоактивных предшественников увеличилась на 157 % во фракции средних и низкомолекулярных белков, оставаясь практически неизменной в конечном фильтрате, и снижалась в остальных случаях.

Данные о понижении концентрации среднемолекулярных компонентов пептидной природы в плазме обожженных крыс противоречат результатам проведенных ранее экспериментов [9], в которых было обнаружено увеличение содержания этих соединений в плазме обожженных собак через 1 сут после травмы. Это противоречие свидетельствует о наличии видоспецифичных, т. е. генетически детерминированных, реакций разных групп животных на термическое повреждение. О значении генетических факторов говорит и различная резистентность к термическому ожогу некоторых популяций крыс, а

также более высокая чувствительность к травме крыс-самок [17].

Изучение содержания и ОУР белковых и пептидных компонентов гемолизата эритроцитов показало, что через сутки после ожоговой травмы происходит уменьшение концентрации высоко- и низкомолекулярных белков на 25 и 45 % соответственно и значительное изменение их ОУР по сравнению с контрольной группой животных. Материал, фильтрующийся через мембраны УАМ-50, содержал на 40 % меньше, чем в норме, радиоактивной метки.

Полученные данные свидетельствуют о значительных изменениях в обмене белков и пептидов в ранний период ожоговой токсемии. Если состояние гипопротенемии не вызывает сомнений и не требует детального обсуждения, так как подтверждено многочисленными экспериментальными исследованиями [5, 13, 16, 18], то для заключения о характере и причинах нарушения включения меченых аминокислот в белки и пептиды крови у обожженных животных требуется дополнительное исследование интенсивности биосинтеза нуклеиновых кислот. Так как большинство плазматических белков и полипептидов синтезируется в печени, то представляло интерес исследовать влияние термической травмы на содержание и биосинтез РНК и ДНК в печени.

Проведенные эксперименты показали, что в первые часы после ожоговой травмы происходит угнетение биосинтетических процессов в печени, тогда как в более поздний период (через 6 сут после ожога) интенсивность включения  $^{14}\text{C}$ -оротовой кислоты и  $^3\text{H}$ -глицина в РНК увеличивается на 117 и 45 % соответственно (см. таблицу). Эти изменения при используемой кратковременной экспозиции радиоактивной метки являются отражением процессов подавления, а затем и стимуляции биосинтеза метаболически лабильных фракций РНК. В исследованиях, проведенных ранее [5], отмечалось, что увеличение радиоактивности РНК в печени обожженных происходит в основном за счет ДНК-подобной и рРНК и в значительно меньшей степени за счет тРНК. При исследовании интенсивности включения  $^3\text{H}$ -глицина в белки печени было также констатировано достоверное угне-

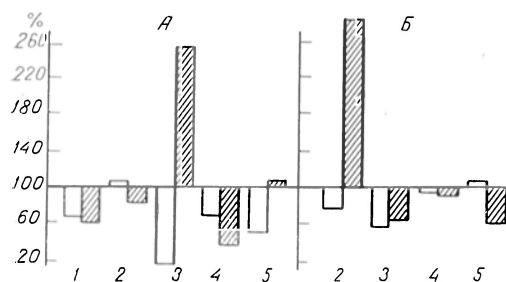


Рис. 1. Концентрация и ОУР фракционированного материала плазмы (А) и эритроцитов (Б) крыс через 1 сут после термического ожога (в % от контроля).

1, 2, 3, 4 и 5 — материал до фильтрации, после фильтрации на мембранах УАМ-400, УАМ-150, УАМ-50 и конечный фильтрат соответственно. Светлые столбики — концентрация лабильных веществ, темные — ОУР.

Содержание и ОУР РНК, ДНК и белка в печени мышей в ранний период ожоговой токсемии ( $n=6$ )

Срок после ожога, ч	РНК, мг/г ткани	ДНК, мг/г ткани	<sup>14</sup> C-оротовая кислота		<sup>3</sup> H-глицин		Белок, нмг/мин/мг
			РНК	ДНК	РНК	ДНК	
2	3,6±0,34	1,1±0,06	4 818±530**	540±103	7 375±782*	1750±212	54,6±4,1*
24	3,3±0,04*	1,1±0,03*	8 412±381	962±340	8 799±413	1857±248	59,1±3,9*
144	3,4±0,18*	1,2±0,08	17 753±971***	1154±295	13 863±748***	1927±202	65,7±3,6
Контроль	4,0±0,26	1,3±0,08	8169±537	714±161	9 511±728	1627±189	69,4±2,3

Примечание. Одна звездочка —  $p < 0,05$ , две —  $p < 0,01$ , три —  $p < 0,001$ .

тение скорости их биосинтеза в ранний период ожогового шока.

Концентрация и ОУР ДНК в печени у обожженных животных не претерпевают существенных изменений по сравнению с интактными, что может объясняться как ограниченной возможностью самого метода выделения ДНК из популяции гепатоцитов, находящихся на различных стадиях делесобностью ДНК.

Через 2 ч, 1 и 6 сут после термической травмы в ТХУ-надосадочной жидкости печени выявлено существенное понижение концентрации и ОУР белковых и пептидных компонентов (рис. 2). В то же время обнаружено значительное (достигающее 200 % нормы) усиление интенсивности включения <sup>3</sup>H-глицина. Как известно, при добавлении к гомогенату печени 10 % ТХУ происходит осаждение основной массы белков, однако в надосадке остаются кислые белки:  $\alpha_1$ -кислый гликопротеин, 4S $\alpha_2$ - $\beta_1$  гликопротеин [6] и пептиды. Сравнение результатов включения радиоактивных аминокислот в различные фракции плазмы и ТХУ-надосадки гомогената печени дает возможность сделать заключение о снижении в начальный период ожого-

вого шока общей концентрации средних и низкомолекулярных белков и пептидов и значительном усилении биосинтеза некоторых составляющих эти группы компонентов. Такой ответ на травматическое или стрессорное воздействие является типичным для эукариотов и наблюдается, например, при тепловом шоке на различных уровнях, начиная с эмбрионов морского ежа и дрозофилы до культуры клеток человека [12]. В. Я. Александров [1] пишет, что разнообразные клетки насекомых, птиц, млекопитающих способны отвечать на краткосрочное интенсивное нагревание активацией определенных генов и значительным усилением синтеза особых «шоковых» белков, при этом синтез обычных белков угнетается. Такое «перепрограммирование» генома может являться феноменом адаптивного значения, направленным на поддержание гомеостаза в условиях патологического воздействия. Отмеченное в наших опытах увеличение ОУР средне- и низкомолекулярных белков и пептидов в плазме и ТХУ-надосадках гомогената печени может быть результатом усиленного их синтеза в условиях ожоговой травмы, что, в частности, было показано для кислого  $\alpha_1$ -гликопротеина,  $\alpha_1$ -антитрипсина,  $\alpha_2$ -макроглобулина,  $\alpha_1$ -антихимотрипсина и других белков [13] или следствием усиленного распада полимеров-предшественников. Если в норме скорость распада полипептидов соответствует скорости их синтеза, то при патологических состояниях эти соотношения существенно меняются. Так, проведенные в нашей лаборатории эксперименты по исследованию периода полужизни белка (животным дважды с интервалом в 24 ч вводили <sup>35</sup>S-метионин) показали, что уже через сутки после ожоговой травмы период полужизни белков сыворотки крови и всех исследуемых тканей уменьшается в 1,5—2 раза. Ускорение обновления

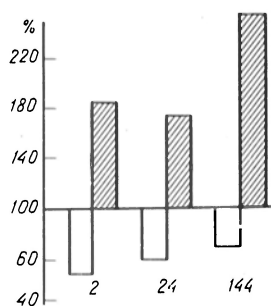


Рис. 2. Концентрация и ОУР лаурилоположительных веществ в ТХУ-надосадках гомогената печени обожженных мышей (в % от контроля). Светлые столбики — концентрация, темные — ОУР. По оси абсцисс — время после термической травмы (в ч).

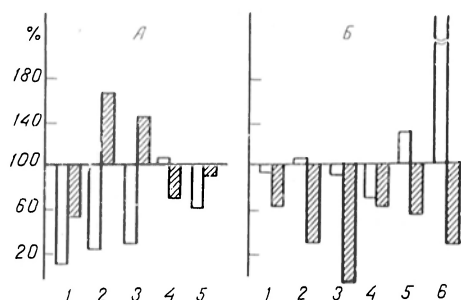


Рис. 3. Концентрация и ОУР среднемолекулярных пептидных компонентов плазмы (А) и эритроцитов (Б) крыс через 1 сут после термической травмы (в % от контроля). 1—5 — номера фракций. Светлые столбики — концентрация пептидных компонентов, темные — ОУР.

белка возможно при усилении как распада, так и синтеза белка. Однако уже в ранний период ожоговой болезни преобладают катаболические процессы [5].

Гель-фильтрация на сефадексе G-15 среднемолекулярных компонентов плазмы и гемолизата эритроцитов позволила получить от 5 до 7 фракций, обладающих высокой оптической плотностью при длине волны 206 нм. Сравнение кривых элюции показало принципиальное сходство элюируемых компонентов из плазмы и гемолизата эритроцитов, полученных от обожженных животных, по сравнению с интактными. В то же время анализ содержания и ОУР каждой фракции при расчете на 1 мл плазмы или гемолизата показал сложную картину — понижение в целом концентрации и ОУР белков и пептидов во фракциях крови обожженных животных, за исключением фракций 2 и 3, удельная радиоактивность которых значительно превосходит контрольную (рис. 3). ОУР фракций 2 и 3 и гемолизата эритроцитов, выходящих в таких же элюционных объемах, напротив, была существенно (на 70—90 %) ниже нормы. Эти данные наряду с относительным увеличением содержания лоуриположительных веществ в этих фракциях могут свидетельствовать об усилении протеолиза белков-предшественников и нарушении транспорта образующихся аминокислот и полипептидов из эритроцитов в плазму. Об этом же говорит увеличение содержания и уменьшение ОУР пептидных компонентов фракций 5 и 6 из эритроцитов по сравнению с плазмой.

Анализ концентрации каждой фракции пептидов показал, что в крови обожженных животных существенно нарушается соотношение содержания материала в пиках 1, 2 и 3 плазмы по сравнению с аналогичными пиками эритроцитов (рис. 4). Если в норме эти соотношения составляют 1,6 и 2,5, то в крови обожженных — лишь 0,34 и 0,75 соответственно. Это свидетельствует о том, что при термической травме может происходить перераспределение среднемолекулярных пептидов между плазмой и эритроцитами, обусловленное депонированием или протеолизом пептидов, оказывающих токсическое действие на организм. К таким же выводам приходят исследователи, показавшие, что у больных с хронической почечной недостаточностью уровень одних среднемолекулярных фракций в эритроцитах увеличивается, а других — уменьшается [14].

Таким образом, установлено существенное изменение метаболизма нуклеиновых кислот, белков и пептидов при экспериментальной ожоговой токсемии, что может являться отражением общей неспецифической реакции организма на повреждающее воздействие, сопровождающейся «перепрограммированием» генома и соответствующим усилением биосинтеза некоторых биополимеров, в частности так называемых «белков острой фазы». Выделение и фракционирование средне- и низкомолекулярных компонентов пептидной природы в плазме и эритроцитах обожженных животных свидетельствует о нарушении процессов, контролирующих уровень и скорость их образования, одни из которых связаны с синтезом этих соединений *de novo*, а другие являются отражением интенсивности реакций протеолиза и их

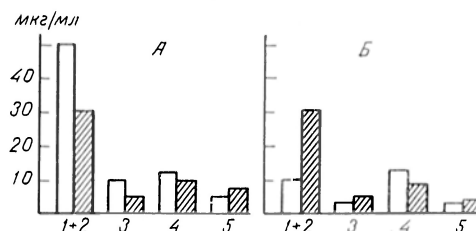


Рис. 4. Концентрация пептидных компонентов в плазме и эритроцитах интактных (а) и обожженных (б) крыс. 1—5 — номера фракций. Светлые столбики — фракции плазмы, темные — эритроцитов.

транспорта через мембрану эритроцитов. Обнаружена видовая специфичность в реакции крыс на термический ожог по сравнению с собаками, проявляющаяся в снижении концентрации среднемолекулярных пептидов плазмы в начальный период ожоговой токсемии. Дальнейшее изучение вопроса о механизме и месте образования средне- и низкомолекулярных соединений пептидной природы может приблизить нас к пониманию действия так называемых «регуляторных» пептидов, обладающих широким спектром биологического действия и способных регулировать метаболизм как в норме, так и при воздействии различных патологических факторов, включая и ожоговую травму.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Александров В. Я. Реактивность клеток и белки. — Л., 1985.
2. Ашмарин И. П., Обухова М. Ф. // Биохимия. — 1986. — Т. 51, № 4. — С. 531—535.
3. Галактионов С. Г., Цейтин В. М., Леонова В. И. и др. // Биоорг. химия. — 1984. — Т. 10, № 1. — С. 5—17.
4. Гомазков О. А. // Науч. докл. высш. школы: Биол. науки. — 1986. — № 2. — С. 13—23.
5. Камилов Ф. Х., Ефименко Г. П., Якушев В. С. и др. // Метаболические основы острой ожоговой токсемии. — Омск, 1977. — С. 57—99.
6. Кухта В. К., Олецкий Э. И., Стожаров А. П. Белки плазмы крови. — Минск, 1986. — С. 56—62.
7. Лейтин В. Л., Лерман М. И. // Современные методы в биохимии. — М., 1977. — С. 277—285.
8. Лифшиц Р. И. // Биохимия экстремальных состояний. — Челябинск, 1977. — С. 79.
9. Лифшиц Р. И., Рябинин В. Е., Пужевский А. С. и др. // Всесоюзный биохимический съезд, 5-й: Тезисы. — М., 1986. — Т. 2. — С. 280—281.
10. Рябинин В. Е., Лифшиц Р. И., Чарная Л. Ф. и др. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 3. — С. 113—116.
11. Спирин А. С. // Биохимия. — 1952. — Т. 17. — С. 565.
12. Ashburner M. // Heat Shock: From Bacteria to Man. — Cold Spring Harbor, 1982. — P. 1—9.
13. Batstone G. F. // Burns. — 1983. — Vol. 9, N 4. — P. 234—240.
14. Gajdos M., Spustova V., Gezykova M., Dzurik R. // Proc. Europ. Dialys. Transplant. Proc. — 1981. — Vol. 18. — P. 183—187.
15. Lowry O. H., Roserbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
16. Niedworok I., Fraszczak J., Sakiel S. // Zbl. Chir. — 1983. — Bd 108, N 1. — S. 26—32.
17. Rapaport F. T., Bachvaroff R. I., Grullon I. et al. // Curr. Surg. — 1983. — Vol. 40, N 1. — P. 85.
18. Sevaljevic L., Pantelic D., Stojanovic R. et al. // Comp. Biochem. Physiol. — 1983. — Vol. 76, N 2. — P. 227—233.
19. Schmidt G., Tannhauser S. // J. biol. Chem. — 1945. — Vol. 161. — P. 83.

Поступила 27.04.87

#### THE RATE OF SYNTHESIS OF PROTEINS, NUCLEIC ACIDS AND PEPTIDES IN EXPERIMENTAL BURNS TOXEMIA

V. E. Ryabinin, R. I. Lifshits, G. Kh. Kazaryan  
Chair of Biochemistry, Medical School, Chelyabinsk

After thermal burns total concentration of protein, RNA and peptides as well as their specific radioactivity were decreased during the period of early toxemia. At the same time, specific radioactivity of some middle weight proteins and peptides was increased after the burns in blood plasma of experimental animal. The reactions responsible for the rate and intensity of these substances metabolism in blood plasma, erythrocytes and liver tissue are discussed.



# МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 612.621.31+612.129:577.175.64]-06:612.766.1

В. И. Морозов, С. А. Прияткин, Т. И. Исакова, И. М. Лущицкая,  
В. А. Rogozкин

## МЕТОД РАДИОИММУННОГО АНАЛИЗА ЭСТРАДИОЛА-17 $\beta$ И ВЛИЯНИЕ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ НА ЕГО СОДЕРЖАНИЕ В КРОВИ ЛЮДЕЙ

НИИ физической культуры, Ленинград

Известно, что стероидные гормоны имеют большое значение в обеспечении нормального функционирования мышечной ткани [1, 5]. Хорошо изучены в этом плане кортикостероиды, меньше — половые стероиды, в частности эстрадиол ( $E_2$ ). Сведения о влиянии физических нагрузок (ФН) на содержание в крови  $E_2$  немногочисленны и противоречивы [9, 12]. Важное значение для эффективности исследований в этом направлении имеет развитие методов анализа  $E_2$ . Одним из наиболее современных методов анализа стероидов является радиоиммунный анализ (РИА). Описаны системы для РИА  $E_2$  [8, 10, 11], и некоторые зарубежные фирмы производят соответствующие наборы реактивов. Вместе с тем отечественных наборов для РИА  $E_2$  пока нет, что делает разработку систем для РИА  $E_2$  актуальной.

В настоящей работе предлагается РИА  $E_2$  на основе антисыворотки, полученной иммунизацией кроликов конъюгатом  $E_2$  с белком, и отечественного препарата  $^3H$ - $E_2$ , изучается влияние ФН на содержание в крови  $E_2$ .

### Методика

В работе использовали  $E_2$  («Sigma», США) и (2, 4, 6, 7- $^3H$ )- $E_2$  (ВО «Изотоп») с удельной активностью 104 Ки/мМ и другие реагенты, описанные ранее [4].  $^3H$ - $E_2$  подвергали хроматографической очистке на колонке (1×15 см) сефадекса LH-20 («Pharmacia», Швеция) в системе толуол—метанол (85:15). Этиловый эфир для экстракции  $E_2$  очищали на колонке с нейтральной оксью алюминия. При подготовке пробы к анализу экстракцию  $E_2$  проводили 3 мл эфира из 0,5—1 мл сыворотки крови. Две аликвоты (1 мл) эфирных экстрактов переносили в пробирки для РИА, эфир упаривали и сухой остаток солиобилизи-

ровали в 0,3 мл стандартного фосфатного буфера [4].

6-(О-карбоксиметил)-оксим  $E_2$  синтезировали по методу [16] и затем конъюгировали с бычьим сывороточным альбумином (БСА), используя водорастворимый карбодимид [14]. Полученный конъюгат  $E_2$ -БСА содержал 18 молекул стероида на молекулу белка по данным УФ-спектрофотометрии.

Иммунизацию 3 кроликов-самцов породы шиншилла массой 2—2,5 кг проводили конъюгатом  $E_2$ -БСА по описанной ранее схеме [3]. 0,5 мг конъюгата в смеси 0,5 мл полного адьюванта Фрейнда и 0,5 мл  $H_2O$  вводили подкожно в 4—5 точек спины животного. Цикл из 5 введений, выполненных с интервалом в 2 дня, повторяли 3 раза с перерывом в 3 нед. Разрешающие инъекции антигена (2,5 мг) проводили внутримышечно, через 7—9 дней собирали кровь из центральной ушной артерии и полученную сыворотку лиофилизировали. Титр антител (АТ) контролировали с помощью РИА. Выбор оптимальных параметров РИА проводили, как описано ранее [2]. Радиоактивность проб просчитывали на жидкостно-сцинтилляционном счетчике «Марк-3» («Tracor Energy», США) с эффективностью около 50 %. Данные РИА обрабатывали на калькуляторе HP-97 («Hewlett-Packard», США) [12]. Специфичность антисыворотки определяли согласно [7].

Изучение влияния ФН на содержание  $E_2$  в крови проводили на спортсменах-гребцах мужского пола в возрасте 17—21 года, имевших квалификацию I р — кмс. ФН представляла бег на тредбане модели 24—72 («Quinton Instruments», США). При этом скорость движения (6; 9 и 12 км/ч) и угол наклона (2,5; 5 и 7,5°) дорожки ступенчато увеличивали через 3 мин и поддерживали на максимальном уровне до отказа обследуемым продолжать бег. Кровь для анализа отбирали из концевой фаланги пальца до ФН ( $n=21$ ), во время ( $n=8$ ) и сразу после нее ( $n=21$ ), а также в процессе отдыха ( $n=8$ ). Сбор образцов крови во всех случаях проводили в 10—12 ч утра.

### Результаты и обсуждение

Иммунизация была начата на 3 кроликах, из которых после первой серии инъекций антигена были отобраны

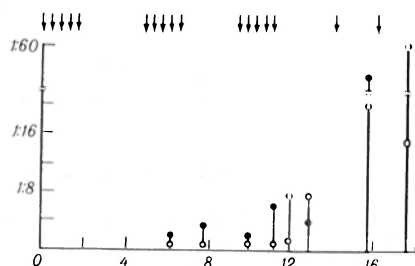


Рис. 1. Титр антител к  $E_2$  в сыворотке крови K5 (темные кружочки) и K23 (светлые кружочки) в процессе иммунизации конъюгатом  $E_2$ =БСА.

По оси абсцисс — продолжительность иммунизации (в нед.), по оси ординат — титр антител (в  $10^{-3}$ ). Стрелками обозначены дни введения антигена.

для дальнейшей работы 2 животных (K5 и K23). На рис. 1 приведены схема иммунизации и динамика титра АТ в крови этих кроликов. При первом тестировании, проведенном через 5 нед от начала эксперимента, у обоих животных были обнаружены АТ к  $E_2$  в невысоком титре — 1:2000 и 1:8000 соответственно. В дальнейшем у K5 имело место ступенчатое нарастание концентрации АТ с отчетливыми пиками после завершающей инъекции антигена в серии. Максимум титра АТ (1:60 000) был получен через 119 дней. У кролика K23 титр АТ оставался примерно на одном уровне вплоть до завершения третьей серии инъекций и лишь затем произошло резкое нарастание титра АТ с максимумом (1:20 000) через 108 дней. Вторая разрешающая инъекция конъюгата привела к дополнительной стимуляции АТ-образования у K5, но вызвала снижение титра АТ у K23.

Приведенная динамика титра АТ к  $E_2$  в целом соответствует описанной ранее для метиландростендиола и полученной при использовании иной схемы иммунизации [6]. В начале иммунизации в данном случае также имел место длительный период медленного нарастания титра АТ и лишь затем развивалась фаза интенсивного гуморального ответа.

Антисыворотки с наибольшим титром АТ (АС5 и АС23) были исследованы на специфичность с 22 природными и синтетическими стероидами. Более специфичной оказалась АС5, перекрестные реакции которой со стероидами-конкурентами  $^3H$ - $E_2$  приведены в табл. 1. Наиболее существенные пере-

Таблица 1

Специфичность АС5	
Стероид	Перекрестные реакции, %
Эстрадиол-17 $\beta$	100
Эстрон	5,22
Эстриол	1,22
Этинилэстрадиол-17 $\alpha$	1,54
Эстрадиол-17 $\alpha$	0,20
Андростендиол	0,03
19-Нортестостерон	0,02
Тестостерон	0,02
Норэтиндрел	0,02
5 $\alpha$ -Дигидротестостерон	0,01
Андростендион	0
Андростерон	0
Кортизол	0
Кортикостерон	0
11-Дезоксикортизол	0
Норэтиндрон	0
Прегненолон	0
Прогестерон	0
11 $\alpha$ -Гидроксипрегненолон	0
Линестренол	0
Этинилтестостерон	0
Этилэстренол	0

крестные реакции выявили для эстрола, этинилэстрадиола и эстриола. Дальнейшую работу проводили с использованием АС5.

Выбраны оптимальные величины основных параметров РИА  $E_2$ , которые составили Т: (общая радиоактивность в пробе) — 20 000—23 000 имп/мин;  $B_0/T$  (процент связывания  $^3H$ - $E_2$  в «нулевой» пробе) — 30—35 % при разведении антисыворотки 1:75 000; концентрация декстрана и угля в разделяющей смеси 0,1 и 1 % соответственно. При проведении РИА в пробу объемом 0,3 мл вносили 0,1 мл раствора  $^3H$ - $E_2$  и 0,1 мл антисыворотки в рабочем разведении 1:15 000, которые готовили на стандартном фосфатном буфере [4]. Оптимальным оказался режим инкубации 60 мин при 37°C и 60 мин в ледяной бане. При этом удается достичь максимального  $B_0$ . Константа сродства АТ в этих условиях была равна  $4 \cdot 10^9 M^{-1}$ . Последующие операции РИА, включающие в себя добавление разделяющей смеси декстран — уголь (0,5 мл), ее осаждение центрифугированием и подсчет радиоактивности описаны ранее [4].

Оценку точности метода проводили с помощью различных объемов интактной смеси сывороток доноров-мужчин 25—50 лет ( $n=23$ ) и ту же смесь, из которой эндогенные стероиды были

Характеристика точности РИА  $E_2$ 

Показатель	Количество добавленного $E_2$ , пг/мл					
	25	50	100	200	400	800
Количество определенного $E_2$ , пг/мл	$30 \pm 2$	$49 \pm 3$	$92 \pm 4$	$187 \pm 8$	$345 \pm 12$	$666 \pm 16$
Открываемость, %	120	98	92	94	86	83
Коэффициент вариации, %	18,1	13,6	13,2	11,7	9,2	6,3

Примечание. Представлены средние данные ( $\bar{X} \pm m_x$ ) 7—10 опытов.

удалены активированным углем и в аликвоты которой были добавлены различные количества  $E_2$ . Открываемость  $E_2$  в области физиологических концентраций была близка к 100 % (табл. 2). Зависимость между определяемой концентрацией  $E_2$  ( $y$ ) и объемом сыворотки ( $x=0,5; 0,75; 1$  мл), взятым для анализа, представляла прямую линию ( $y=50,7x+0,39$ ;  $r=0,99$ ), которая в координатах  $\log$ — $\log$  (рис. 2) была параллельна стандартной кривой (наклон кривой:  $-2,26 \pm 0,023$ ;  $n=19$ ). При использовании 1 мл смешанной сыворотки крови в РИА коэффициенты вариации между пробами одного опыта и между опытами составили 7,8 и 13 % соответственно. Уровень  $E_2$  в сыворотке, освобожденной от эндогенных стероидов, был равен  $8,3 \pm 0,6$  пг/мл ( $n=10$ ). Объем анализируемой сыворотки может быть уменьшен в 3 раза, если после экстракции водную фазу замораживать и далее весь эфир деkantировать в пробирки для РИА.

С использованием разработанного РИА  $E_2$  было исследовано влияние однократной интенсивной ФН на содержание  $E_2$  в сыворотке крови спортсменов. Бег на тредбане (средняя про-

должительность 17 мин) приводил к достоверному увеличению на 26 % ( $p < 0,01$ ) содержания  $E_2$  в сыворотке крови (рис. 3). Через 0,5 ч по завершении ФН концентрация  $E_2$  снижалась до исходного уровня и оставалась на этом уровне в течение 1 ч отдыха. Данная ФН вызывала возрастание гематокрита на 7—8 %, что позволяет отчасти объяснить наблюдаемое увеличение концентрации  $E_2$  под действием ФН снижением объема циркулирующей крови. Эффект гемоконцентрации, по мнению некоторых авторов, является решающей причиной, обуславливающей увеличение концентрации в крови половых стероидов (в том числе  $E_2$ ) под действием ФН [17]. В ряде других работ это увеличение рассматривается как истинное, обусловленное выбросом стероидов в кровоток в процессе ФН [9, 15], которое больше зависит от интенсивности, чем от длительности ФН [13]. Необходимо также принять во внимание снижение метаболического клиренса стероидных гормонов при ФН, который возникает за счет уменьшения кровотока через печень под влиянием ФН [17]. Полученные нами результаты позволяют

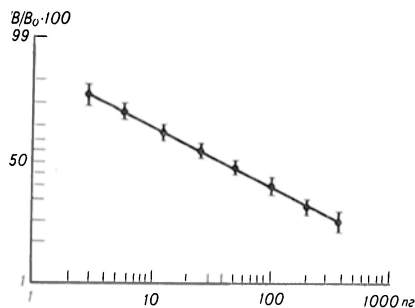


Рис. 2. Стандартная кривая в координатах  $\log$ — $\log$ .

По оси абсцисс — содержание  $E_2$  в пробах (в пг), по оси ординат — отношение радиоактивности проб, содержащих различные количества немеченого  $E_2$  к радиоактивности «нулевой» пробы.

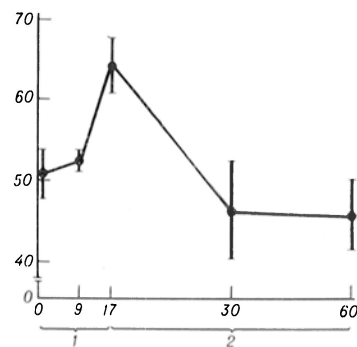


Рис. 3. Изменение содержания  $E_2$  в сыворотке крови спортсменов под влиянием ФН.

По оси абсцисс — время (в мин), по оси ординат — содержание  $E_2$  (в пг/мл). 1 — работа; 2 — отдых.

заклучить, что выявленное увеличение концентрации  $E_2$  в крови при данной ФН является в значительной степени истинным.

Таким образом, в результате проведенной работы обоснована возможность использования быстрого, специфического, чувствительного и точного метода РИА  $E_2$ , не уступающего по своим характеристикам существующим системам для РИА  $E_2$ . С помощью предложенного метода показано, что однократная интенсивная ФН приводит к увеличению содержания  $E_2$  в сыворотке крови людей. Авторы приносят глубокую благодарность ст. лаборанту отдела биохимии ИИИ физической культуры А. В. Конколович за оказание помощи при проведении работы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Виру А. А., Кырге П. К. Гормоны и спортивная работоспособность. — М., 1983.
2. Корнева И. А., Иванова Е. М. // Медицинский и допинговый контроль спортсменов. — Л., 1981. — С. 41.
3. Никифорова Г. П., Антонов А. С., Кривошеев О. Т., Исаченков В. А. // Пробл. эндокринол. — 1977. — № 1. — С. 74.
4. Rogozkin B. A., Morozov B. I., Chaykovskiy B. S. // Хим.-фарм. журн. — 1979. — № 4. — С. 98.
5. Rogozkin B. A., Felydkoren B. I. // Мышечная деятельность и гормоны. — Л., 1982. — С. 6.
6. Таджиев Ф. С., Морозов В. И., Rogozkin B. A. // Иммунология. — 1982. — № 2. — С. 89.
7. Abraham G. E., O'Dell W. D., Edwards R., Purdy J. M. // Acta endocr. — 1970. — Suppl. 147. — P. 332.
8. Aso T., Guerrero R., Cekan Z., Diszfalusy E. // Clin. Endocr. — 1975. — Vol. 4. — P. 173.
9. Brown W. J., McGinley R., Vining R. F., White S. W. // Proc. Aust. Physiol. Pharmacol. Soc. — 1980. — Vol. 11. — P. 131.
10. Edquist L.-E., Johansson E. D. B. // Acta endocr. (Kbh.). — 1972. — Vol. 71. — P. 716.
11. Franek M., Bursa J., Hruska K. // J. Steroid Biochem. — 1983. — Vol. 19. — P. 1371.
12. Kinderman W., Schnabel A., Schmitt W. // Europ. J. appl. Physiol. — 1982. — Vol. 49. — P. 389.
13. Kuoppasalmi K., Näveri H., Härkönen M., Adlercreutz H. // Scand. J. clin. Lab. Invest. — 1980. — Vol. 40. — P. 403.
14. Linder H. R., Rezel E., Fridlander A. et al. // Steroids. — 1972. — Vol. 219. — P. 357.
15. Métiévié G., Gauthier R., Chervotiere J. De La, Grymala D. // J. Sports Med. — 1980. — Vol. 20. — P. 235.
16. Walker C. S., Clark C. Y. // Steroids. — 1973. — Vol. 21. — P. 259.
17. Wilkerson J. E., Horvath S. M., Gutin B. // J. appl. Physiol. — 1980. — Vol. 49. — P. 249.

Поступила 27.04.87

#### RADIOIMMUNOASSAY FOR ESTRADIOL-17 $\beta$ AND EFFECT OF PHYSICAL EXERCISES ON ITS CONCENTRATION IN HUMAN BLOOD

V. I. Morozov, S. A. Priatkin, T. I. Isakova, I. M. Lischitskaya, V. A. Rogozkin

Institute of Physical Culture, Leningrad

Radioimmunoassay (RIA) for estradiol-17 $\beta$  ( $E_2$ ) in blood serum was developed. Antiserum against  $E_2$  was raised by means of rabbit immunization with 6-(O-carboxymethyl)oxime  $E_2$ -BSA. Cross reactions of antiserum were studied with 22 natural and synthetic steroids. Antiserum was used at final dilution 1:75,000. The sensitivity of RIA was 3 pg/tube, the detection efficiency was 83-120 %, when 25-800 pg/ml  $E_2$  was added. The variation coefficients were 7.8 % and 13 % (intraassay and interassay, respectively). As shown by the RIA the intensive physical exercises resulted in the increase of  $E_2$  concentration by 26 % in male athletes blood serum.

УДК 616.155.1-008.939.6-074:543.545

С. Ф. Захаров, П. С. Громов, С. С. Шишкин

#### ДВУМЕРНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ ЧЕЛОВЕКА В ПРИСУТСТВИИ ТРИТОНА X-305

Институт медицинской генетики АМН СССР, Москва

Высокоразрешающий метод фракционирования белков — двумерный электрофорез по О'Фарреллу широко используется в настоящее время при решении целого ряда биохимических и генетических проблем. Одно из центральных мест среди этих проблем за-

нимают построение каталогов белков человека, составляющих различные клетки и субклеточные структуры, а также поиск биохимических маркеров наследственных болезней [3, 14]. Значительный интерес в качестве объекта исследований представляют мембраны

эритроцитов, поскольку имеются многочисленные указания на их повреждение при ряде патологических состояний [5, 10]. Обнаружение достаточно прочно ассоциированных маркеров среди мембранных белков является перспективным для последующей разработки удобных диагностических тестов. Однако при разделении мембранных белков эритроцитов методом О'Фаррелла возникают определенные трудности, из которых наиболее сложно преодолимой оказалась агрегация белков при изоэлектрическом фокусировании (ИЭФ) [1, 12, 13]. Особенно выраженная агрегация происходит в стартовой зоне геля при ИЭФ, причины которой, по-видимому, обусловлены наличием в мембранных белках значительных гидрофобных доменов [7]. Предложены различные способы уменьшения этого явления: увеличение в образце концентрации неионных детергентов — тритона X-100, NP-40 [13], использование положительно заряженного детергента — цетавлона [4], цвиттерионных детергентов типа CHAPS [9], снижение электрического напряжения при ИЭФ [8]. В целях уменьшения агрегации и лучшей растворимости белков мембран в данной работе изучалась возможность замены неионного детергента тритона X-100 на более гидрофобный тритон X-305 в анализируемом образце и геле для ИЭФ.

### Методика

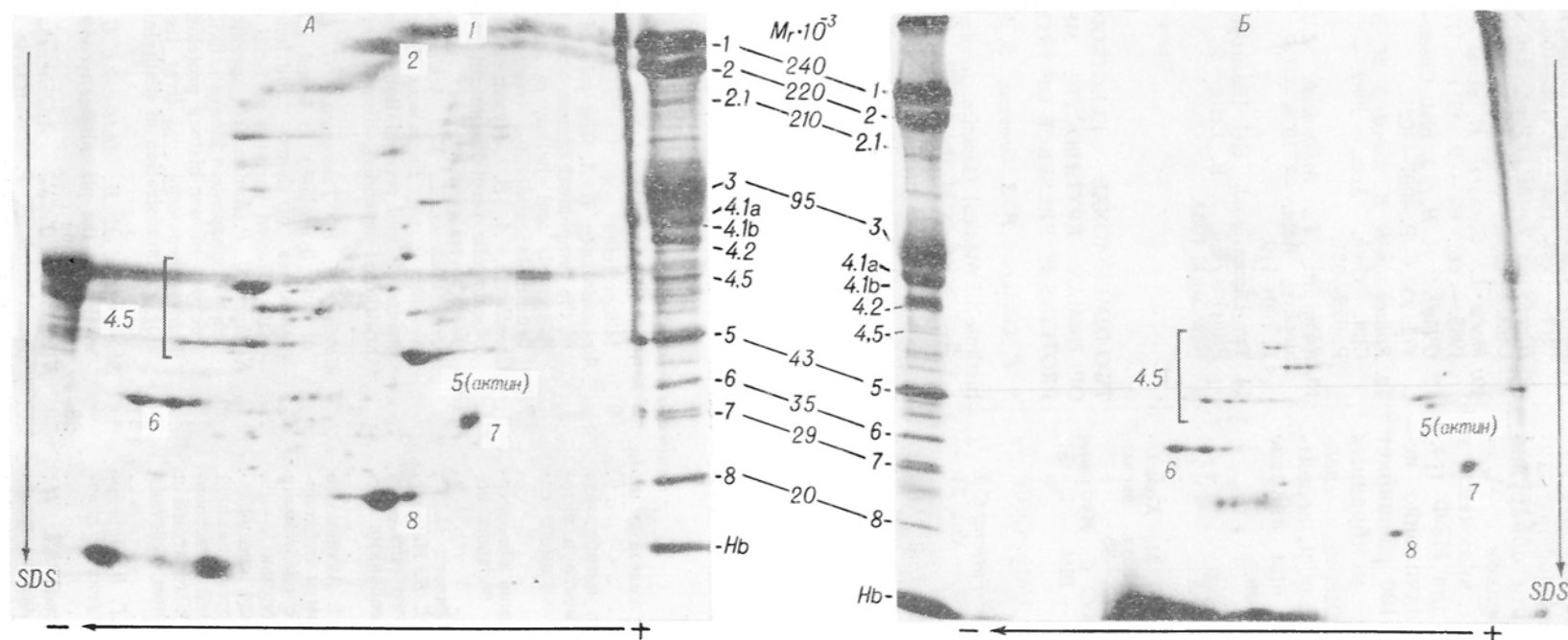
Эритроциты выделяли двухэтапной очисткой от лейкоцитов путем осаждения эритроцитов в 1,5 % растворе декстрана-500 с последующим пропусканием эритроцитарной массы через целлюлозу HBS. Мембраны получали лизисом эритроцитов в 10 mM Na-фосфатном буфере [6]. Лиофилизированные мембраны растворяли в концентрации 30 мг/мл в буфере, содержащем 10 M мочевины, 2,5 % тритон X-305, 0,12 % цетавлон, 5 % β-меркаптоэтанол, 0,2 % амфолины pH 3,0—10,0. Параллельно в аналогичном растворе, содержащем тритон X-100, готовили контрольные пробы. Двумерный электрофорез проводили методом О'Фаррелла [11] с модификациями, описанными ранее [1]. Опытные пробы фракционировали в первом направлении в присутствии тритона X-305, а контрольные — с тритоном X-100 в той же концентрации. Электрофореграммы окрашивали кумасси R-250 в модификации [1]. Величину  $M_r$  определяли по относительной электрофоретической подвижности с помощью белков-маркеров [2].

Более высокие по сравнению с тритоном X-100 гидрофобные свойства тритона X-305 обусловили определенную особенность в рабо-

те с растворами, содержащими указанный детергент. Поскольку тритон X-305 обладает значительно более длинной гидрофобной углеводородной цепью, для полного его растворения необходима повышенная температура. В целях предотвращения выпадения мочевины и детергента в осадок трубки с гелем перед ИЭФ прогревали при 40 °C в течение 30 мин, а сам процесс ИЭФ проводили при 30 °C. Кроме того, при уравнивании гелей с тритоном X-100 в буфере Леммли для проведения электрофореза во втором направлении замещение тритона X-100 на додецилсульфат натрия происходит за 20—30 мин [1]; при использовании тритона X-305 это время необходимо увеличить до 60 мин.

### Результаты и обсуждение

При сравнении электрофореграмм, полученных параллельно с использованием тритона X-305 и тритона X-100, обнаружились существенные различия в результатах фракционирования. Как видно из рисунка, на электрофореграммах, полученных с использованием тритона X-305, обнаруживается значительное количество белковых пятен с  $M_r = 240\,000$ — $70\,000$ , которые отличались электрофоретической подвижностью в первом направлении, что отражает различия в изоэлектрических точках. На электрофореграммах, полученных с применением тритона X-100, большинство этих фракций отсутствовало (см. рисунок) или при определенных условиях они выявлялись как набор пятен, расположенных одно под другим вследствие агрегации при ИЭФ [1]. Необходимо также отметить значительное улучшение качества разделения белков с  $M_r$  ниже 70 000: группы 4.5, группы 7 и других, в зоне которых выявляются дополнительные пептиды. Сравнение 20 электрофореграмм, полученных при фракционировании разных образцов, показало хорошую воспроизводимость как количества фракций, так и их относительного распределения. Появление дополнительных фракций, по-видимому, не связано с возможным ограниченным протеолизом или модификационными изменениями белков в условиях повышенной температуры, поскольку соответствующее увеличение температуры в экспериментах с тритоном X-100 не влияет на качество получаемых электрофореграмм. Исходя из величин  $M_r$ , мы оценили положение главных мембранных белков по классификации Стэка-Хеста [7] на электрофореграммах, полученных с трито-



Двумерные электрофореграммы мембранных белков эритроцитов, полученные в присутствии неионных детергентов тритона X-305 (А) и тритона X-100 (Б).

Стрелками показано направление ИЭФ (по горизонтали) и направление разделения белков по молекулярной массе в присутствии додецилсульфата натрия (по вертикали). Слева и справа по вертикали представлено одномерное разделение белков в системе Леммли. Обозначения белков даны согласно номенклатуре Стэка-Неста.



ном X-305. При этом не удалось выявить на двумерных электрофореграммах белка полосы 3, хотя обнаружился ряд минорных белков с  $M_r = 95\,000$ . Таким образом, включение в состав растворов и геля для ИЭФ тритона X-305 вместо традиционно используемого тритона X-100 расширяет возможности изучения мембранных белков эритроцитов двумерным электрофорезом по О'Фарреллу и, вероятно, окажется полезным при анализе других мембранных белков.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Громов П. С., Шандала А. М., Ковалев Л. И., Шишкин С. С. // Бюл. экспер. биол. — 1986. — № 7. — С. 28—30.
2. Ковалев Л. И., Шишкин С. С., Иволгина Г. Л. и др. // Биохимия. — 1986. — Т. 51, № 6. — С. 896—907.
3. Шишкин С. С. // Вестн. АМН СССР. — 1985. — № 1. — С. 78—84.
4. Copeland B. R., Todd S. A., Furlong C. E. // Amer. J. hum. Genet. — 1982. — Vol. 34. — P. 15—31.
5. Dhermy D., Leconte M. C. et al. // Pediat. Res. — 1984. — Vol. 18. — P. 1005—1012.
6. Dodge J. T., Mitchell C., Hanahau D. J. // Arch. Biochem. — 1963. — Vol. 100. — P. 119—130.
7. Haest C. W. M. // Biochim. biophys. Acta. — 1982. — Vol. 694. — P. 331—352.

8. Harrel D., Morrison M. // Arch. Biochem. — 1979. — Vol. 193. — P. 158—168.
9. Hjemeland L. M. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1980. — Vol. 77. — P. 6368—6370.
10. Morie L., Garharz M. et al. // Blood. — 1985. — Vol. 65. — P. 1511—1517.
11. O'Farrell P. H. // J. biol. Chem. — 1975. — Vol. 250. — P. 4007—4021.
12. Rosenblum B. B., Hansh S. M., Neel J. V. // Clin. chim. Acta. — 1982. — Vol. 28. — P. 925—931.
13. Rubin R. W., Milikowski C. // Biochem. biophys. Acta. — 1978. — Vol. 509. — P. 100—110.
14. Two-Dimensional Gel Electrophoresis of Proteins / Ed. J. E. Celis, R. Bravo. — New York, 1984.

Поступила 26.12.86

## TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS OF HUMAN ERYTHROCYTE MEMBRANE PROTEINS IN PRESENCE OF TRITON X-305

S. F. Zakharov, P. S. Gromov, S. S. Shishkin

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

Highly effective method of proteins fractionation—two-dimensional electrophoresis by O'Farrell is now widely used in biochemical and genetic studies. Membranes of erythrocytes are used for detection of firmly bound markers among their protein components for development of suitable diagnostic tests.

## СОДЕРЖАНИЕ

- Бугланов А. А. Метаболизм железа и металлопротеиды (обзор) . . . . . 2
- Александровский Я. А. Роль ингибиторов активации системы комплемента в патогенезе и терапии инсулинзависимого сахарного диабета (обзор) . . . . . 7
- Чесцевик А. Б. Гипоинсулинемия и биоэнергетические процессы в коре больших полушарий мозга крыс . . . . . 16
- Безрукавникова Л. М., Архипова О. Г., Нейфах Е. А., Бурлакова Е. Б. Нарушение контроля липоперекисного окисления у больных пылевыми заболеваниями легких . . . . . 18
- Гусина Н. Б., Цукерман Г. Л. Активности лизосомных гидролаз плазмы и лейкоцитов у гомо- и гетерозигот с различными вариантами I-клеточной болезни . . . . . 21
- Кушнер В. П. Аминокислотная специфичность собственной фосфопротеинкиназой активности некоторых фракций негистоновых белков хроматина почек, гепатомы и печени крыс при однократном действии диэтилнитрозамина . . . . . 25
- Шимонаева Е. Е., Андреевко Г. В. Определение содержания плазминогена в плазме крови крыс . . . . . 28
- Никифорова Т. Н., Апуховская Л. И., Ивашкевич С. П. Изучение белков мембран эритроцитов при экспериментальном D-гиповитаминозе . . . . . 30

## CONTENTS

- Buglanov, A. A. Metabolism of iron and metalloproteins . . . . . 2
- Alexandrovsky Y. A. The role of inhibitors of the complement system activation in pathogenesis and therapy of insulin dependent diabetes mellitus (review) . . . . . 7
- Cheschevik, A. B. Hypoinsulinemia and bioenergetic reactions in rat brain hemisphere cortex . . . . . 16
- Bezrukavnikova, L. M., Arkhipova, O. G., Neifakh, E. A., Burlakova, E. B. Impairments of lipid peroxidation in the patients with dust-dependent diseases of lungs . . . . . 18
- Gusina, N. B., Tsukerman, G. L. Activity of acid hydrolases in blood plasma and leukocytes of homo- and heterozygotes with different variants of I-cell disease . . . . . 21
- Kushner, V. P. Amino acid specificity of native phosphoprotein kinase activity in some fractions of non-histone proteins from rat kidney, hepatoma and liver tissues after single administration of diethylnitrosamine . . . . . 25
- Shimonaeva, E. E., Andreenko, G. V. Estimation of the plasminogen content in rat blood plasma . . . . . 28
- Nikiforova, T. N., Apukhovskaya, L. I., Ivashkevich, S. P. Erythrocyte membrane proteins in experimental D-hypovitaminosis . . . . . 30

- Магеровский Ю. В., Монастырский В. А., Гайда А. В., Бирка И. И., Вороняк М. И. Частичная очистка тканевого тромбопластина методом гель-проникающей хроматографии и воспроизведение с его помощью синдрома генерализованного декомпенсированного тромбоногеза . . .
- Дорошкевич Н. А., Мандрик К. А., Виноградов В. В. Пальмитил-КоА-дегидрогеназа надпочечников, печени и сердца кролика
- Гончаренко М. С., Кондакова А. К., Бродская О. М. Состояние кальциевого гомеостаза крови у больных псориазом в период усиленного эпидермопозеса . . .
- Лычко А. П., Пентюк А. А., Луцюк Н. Б. Метаболизм и токсичность некоторых ксенобиотиков при недостаточности витамина В<sub>1</sub> и введении тиамин-дифосфата
- Фроликс В. В., Кульчицкий О. К., Ясечко А. В. Концентрация циклических нуклеотидов, активность аденилатциклазы и мембранный потенциал волокон икроножной мышцы взрослых и старых крыс при денервации
- Творогова М. Г., Озерова И. Н., Нечаев А. С., Жолус Н. Н., Перова Н. В. Активность основных ферментативных реакций обмена липопротеидов в плазме крови у больных ишемической болезнью сердца
- Волкова З. И., Астахова Т. А., Трофимова Т. М., Мульдияров П. Я. Гликозаминогликаны и  $\beta$ -глюкуронидаза клеток периферической крови и биологических жидкостей при ревматоидном артрите
- Агаев Т. М., Курбанова Г. А. Влияние ранней зрительной депривации на синтез глутаминовой и аспарагиновой кислот в митохондриях центральных структур зрительного анализатора мозга собак
- Шугалей В. С., Ананян А. А., Козьмин В. В. Система микросомального окисления печени при гипоксии и гипероксии
- Лидер В. А. Влияние витамина К на активность ферментов гликолиза и пентозофосфатного цикла
- Тихонова Н. Е., Кучук Э. М. Влияние условий высокогорья на связывание инсулина эритроцитами при экспериментальном аллоксановом диабете
- Берштейн Л. М., Ковалева И. Г., Правосудов И. В. Усиление гетероответа аденилатциклазы в опухолях толстой кишки: связь с липидным составом ткани
- Вавилова Т. П., Ларионова Н. И., Петрович Ю. А. Ингибиторы трипсиноподобных протеиназ смешанной слюны человека
- Зорин Н. А. Парадоксальные реакции сульфатированных гликозаминогликанов с белками сыворотки крови человека
- Карасева Т. Л., Цапенко Ж. И., Головенко Н. Я., Тимофеева С. Э., Лукьяненко Н. Г. Обмен гамма-аминомасляной кислоты в головном мозге крыс в условиях введения им ноотропных средств
- Горшкова И. Н., Ноева Е. А., Полесский В. А., Перова Н. В., Рууге Э. К. Исследование термoinдуцированных изменений в липопротеидах высокой плотности
- Magerovsky, Yu. V., Monastirsky, V. A., Gaida, A. V., Birka, I. I., Voronyak, M. I. Partial purification of tissue thromboplastin by means of gel filtration and reproduction of the syndrome of generalized decompensated thrombinogenesis using the preparation obtained
- Doroshkevich, N. A., Mandrik, K. A., Vinogradov, V. V. Palmitoyl-CoA dehydrogenase from rabbit adrenal glands, liver and heart tissues
- Goncharenko, M. S., Kondakova, A. K., Brodskaya, O. M. The state of calcium homeostasis in blood cells of patients with psoriasis under conditions of intensive epidermopoiesis
- Lychko, A. P., Pentyuk, A. A., Lutsyuk, N. B. Metabolism and toxicity of some xenobiotics in deficiency of vitamin B<sub>1</sub> and after administration of thiamin and thiamin diphosphate
- Frolkis, V. V., Kulchitsky, O. K., Yasechko, A. V. Effect of denervation on cyclic nucleotide concentrations, on adenylate cyclase activity and on resting membrane potential in gastrocnemius muscle fibers of adult and old rats
- Tvorogova, M. G., Ozerova, I. N., Nechaev, A. S., Zholus, N. N., Perova, N. V. Activity of main enzymatic reactions responsible for lipoprotein metabolism in blood plasma of patients with heart ischemic disease
- Volkova, Z. I., Astakhova, T. A., Trofimova, T. M., Muldiyrov, P. Y. Glycosaminoglycans and  $\beta$ -glucuronidase activity in cells of peripheral blood and in biological fluids of patients with rheumatoid arthritis
- Agayev, T. M., Kurbanova, A. G. Effect of early visual deprivation on synthesis of glutamic and aspartic acids in mitochondria of dog visual analyzer central structures
- Shugaley, V. S., Ananyan, A. A., Kozmin, V. V. Liver tissue microsomal oxidative system in rats with hypoxia and hyperoxia
- Lider, V. A. On the mechanism of vitamin K effect on enzymatic activity in glycolysis and pentose phosphate cycles
- Tikhonova, N. E., Kuchuk, E. M. Effect of high altitude on binding of insulin with erythrocytes in alloxan diabetes
- Berstein, L. M. Amplification of adenylate cyclase response under conditions of colon tumors: relation to the tissue lipid composition
- Vavilova, T. P., Larionova, N. I., Petrovich, Ya. A. Inhibitors of trypsin-like proteinases in human mixed saliva
- Zorin, N. A. Paradoxical reactions of sulfated glycosaminoglycans with human blood serum proteins
- Karaseva, T. L., Tsapenko, Zh. N., Golovenko, N. Ya., Timofeeva, S. E., Lukyanenko, N. G. Metabolism of  $\gamma$ -aminobutyric acid in rat brain after administration of nootropic drugs
- Gorshkova, I. N., Noeva, E. A., Polessky, V. A., Perova, N. V., Ruuge, E. K. Thermo-induced changes in human high density lipoproteins in hypoalipolipoproteine-

- сти человека при гипоальбалинопротеинемии и ишемической болезни сердца методом спинных зондов
- 85 *Жудрышов Б. А., Ляпина Л. А., Шишкина М. А., Азиева Л. Д.* Характеристика белкового фактора селезенки, ингибирующего гепарин
- 90 *Телушкин П. К., Филиппов С. П.* Активность ферментов и содержание субстратов цикла Кребса в ткани головного мозга крыс при инсулиновой гипогликемии и в восстановительном периоде
- 94 *Зайденберг М. А., Андреев В. И.* Различия между коллагенами интерстициальных типов в их влиянии на биосинтез ДНК, РНК и активность некоторых ферментов в биоптатах тканей ран крыс
- 97 *Рахимов М. М., Алматов К. Т., Мирталипов Д. Т., Касимова Г. М., Ходжаева Н. И., Абдушукуров А. А., Горбатая О. Н.* Образование фосфатидилэтанола при алкогольной интоксикации
- 101 *Карсакевич А. С., Кинстлер О. Б., Даувурте А. Ж., Вина И. А.* Высокомолекулярные производные L-аспарагиназы на основе водорастворимой карбоксиметилцеллюлозы: биологические свойства
- 107 *Утеулин К. Р., Джакелова Ш. А., Иващенко А. Т., Кусяинова Н. И.* Гидрофобные свойства некоторых фосфолипаз
- 110 *Честков В. В., Лаптев А. В., Щепкина Ю. В.* Иммунохимическое выявление фенилаланингидроксилазы в экстрактах некоторых органов человека
- 113 *Краковский М. Э., Аширметов А. Х., Комарин А. С., Файнгольд Д. Я.* Состояние митохондриальной окислительной системы печени крыс при острой кишечной непроходимости
- 117 *Давлетов Э. Г., Карелин А. А., Камбаров Ф. Х.* Изменения в системе циклических нуклеотидов при экспериментальной ожоговой болезни у неполовозрелых крыс
- 120 *Олефиренко Г. А., Петрунин Д. Д., Татаринцев Ю. С., Щербакоева Л. А., Мурашов В. А.* Препаративное выделение  $\alpha_2$ -микроглобулина фертильности человека методом ионообменной хроматографии
- 124 *Немцова Е. Р., Уткин М. М., Якубовская Р. И.* Иммунохимическое сравнение лактоферрина женского молока и лактоферрина нейтрофилов
- 127 *Рябинин В. Е., Лифшиц Р. И., Казарян Г. Х.* Интенсивность образования белков, нуклеиновых кислот и пептидов при экспериментальной ожоговой токсемии
- 131 *Кудрышов, Б. А., Ляпина, Л. А., Шишкина, М. А., Азиева, Л. Д.* Characteristics of a protein factor isolated from spleen tissue
- 90 *Telushkin, P. K., Filippov, S. P.* Enzymatic activity and content of substrates involved in the Krebs cycle in rat brain under conditions of insulin-dependent hypoglycemia and during the restoration period
- 94 *Zaidenberg, M. A., Andreev, V. I.* Differences between collagens of the interstitial types and their effect on biosynthesis of DNA, RNA and activity of some enzymes in biopsic samples of rats wound tissues
- 97 *Rakhimov, M. M., Almatov, K. T., Mirtalipov, D. T., Kasimova, G. M., Khodzhaeva, N. I., Abdushukurov, A. A., Gorbataya, O. N.* Formation of phosphatidyl ethanol in alcohol intoxication
- 101 *Karsakevich, A. S., Kinstler, O. B., Dauvurte, A. Zh., Vina, I. A.* High molecular derivatives of L-asparaginase produced after immobilization of the enzyme on water-soluble carboxymethyl cellulose: biological properties
- 107 *Uteulin, K. R., Dzhakelova, Sh. A., Ivaschenko, A. T., Kusaionova, N. I.* Hydrophobic properties of some phosphohydrolases
- 110 *Chestkov, V. V., Laptev, A. V., Schepkina, Yu. V.* Immunochemical identification of phenylalanine hydroxylase in extracts of some human tissues
- 113 *Krakovsky, M. E., Ashirmetov, A. Kh., Komarin, A. S., Faingold, D. Yu.* The state of rat liver microsomal oxidative system in acute intestinal obstruction
- 117 *Davletov, E. G., Karelin, A. A., Kambarov, F. Kh.* Alterations of cyclic nucleotides system after experimental burns in preadolescent rats
- 120 *Olejirenko, G. A., Petrunina, D. D., Tatarinov, Yu. S., Scherbakova, L. A., Murashova, V. A.* Preparative isolation of human fertility  $\alpha_2$ -microglobulin using ion exchange chromatography
- 124 *Nemtsova, E. R., Utkin, M. M., Yakubovskaya, R. I.* Immunochemical estimation of human milk and neutrophilic lactoferrins
- 127 *Ryabinin, V. E., Lifshits, R. I., Kazaryan, G. Kh.* The rate of synthesis of proteins, nucleic acids and peptides in experimental burns toxemia
- 131

#### Методы биохимических исследований

#### Methods of Biochemical Investigations

Техн. редактор Н. К. Евстигнеева

Корректор Т. Л. Григорьева

Сдано в набор 25.03.88. Подписано в печать 21.04.88. Формат 70×108<sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Бумага тип. № 1. Гарнитура Литературная. Печать высокая. Печ. л. 9,00 + печ. л. вкл. 0,13. Усл. печ. л. 12,78. Усл. кр.-отт. 13,30. Уч.-изд. л. 14,91. Тираж 1592 экз. Цена 1 р. 30 к. Заказ 752.

Ордена Трудового Красного Знамени  
Издательство «Медицина», Москва 101000, Петроввергский пер., 6/8.  
Ордена Трудового Красного Знамени  
Чеховский полиграфический комбинат  
ВО «Союзполиграфпром» Государственного комитета СССР  
по делам издательства, полиграфии и книжной торговли  
142300 г. Чехов Московской области