

ТОМ XXXIV

ВЫПУСК 5

СЕНТЯБРЬ—ОКТАБРЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

ВОПРОСЫ
МЕДИЦИНСКОЙ
ХИМИИ



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1988



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

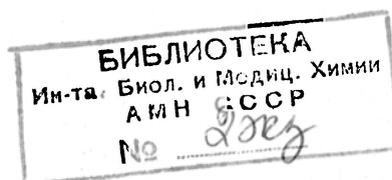
Главный редактор С. С. ДЕБОВ

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

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

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



О. Г. Оглоблина

БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ УЧАСТИЯ НЕЙТРОФИЛОВ В РЕАКЦИЯХ ОСТРОГО ВОСПАЛЕНИЯ (ОБЗОР)

Всесоюзный кардиологический научный центр АМН СССР

Воспалительный процесс, возникающий в ответ на повреждение или инфекцию, включает в себя активацию гуморальных систем плазмы крови (свертывающей, фибринолиза, компонента, калликреин-кининовой) и клеточных систем, в первую очередь нейтрофилов и других фагоцитов, тучных клеток, лимфоцитов [1, 5, 6, 15]. Потенциальными стимуляторами нейтрофилов являются гуморальные факторы и, наоборот, эффекторы из этих клеток активируют некоторые гуморальные системы. Другими словами, нейтрофилы входят в систему гуморально-клеточной кооперации тканей. В норме лизосомные ферменты и окислительные агенты нейтрофилов, продуцированные при запуске фагоцитоза, осуществляют внутриклеточный катаболизм белков и других макромолекул, деградацию интра- и экстрацеллюлярных эндогенных субстратов, а также деградацию фагоцитированных вирусов и бактерий. При патологических состояниях функции этих клеток усиливаются. Происходит интенсивное генерирование и высвобождение медиаторов воспаления в межклеточное пространство. Связанная с этим процессом инициация каскадных протеолитических реакций и продукция биологически активных пептидов приводит к развитию воспаления.

Нейтрофилы представляют собой универсальную регулируемую клеточную систему, с помощью которой различные популяции клеток (лимфоциты, эозинофилы, тромбоциты, макрофаги, фибробласты, опухолевые клетки) могут усиливать или уменьшать свою активность через механизм модуляции их поверхностных рецепторных структур [1].

1. Медиаторы воспаления, продуцируемые нейтрофилами

Секреция активированными нейтрофилами, аккумулированными в очаге воспаления, компонентов гранул, в том числе протеиназ, является принципиальным механизмом генерирования медиаторов сосудистого воспаления, регулируемым простагландинами через повышение уровня внутриклеточного циклического АМФ [23]. Исследования последних 10 лет показали, что нейтрофилы продуцируют многие другие медиаторы воспаления, способствующие повреждению эндотелия сосудов, такие как токсические метаболиты кислорода, продукты метаболизма липидов, фактор активации тромбоцитов [14, 16, 18].

Токсические метаболиты кислорода. Активированные различными агентами нейтрофилы генерируют такие сверхактивные токсические метаболиты кислорода, как супероксиданион, перекись водорода, гидроксильный радикал, хлорноватистая кислота. При этом в клетке, поглощающей очень большие количества кислорода, происходит так называемый респираторный взрыв. Глюкоза служит донором электронов, которые переносятся на кислород по цепи, включающей пикотинадениннуклеотидфосфат (НАДФ \times Н), флавопротеид и цитохром *b*. Гексозомонофосфатный шунт также активируется для обеспечения функционирования НАДФ \cdot Н [31].

Метаболиты кислорода, выделяемые нейтрофилами внутрь фагосомы или во внеклеточную среду, изменяют топографию мембраны фагоцитированных микроорганизмов (антимикробная функция) или объектов, недоступных

фагоцитозу, и деструктурируют основные внутриклеточные компоненты, как бы подготавливая их к гидролизу под действием протеиназ и других гидролаз нейтрофилов [17, 31]. Важное противовоспалительное свойство кислородных метаболитов нейтрофилов, продемонстрированное *in vivo*, — это разрушение эндотелиальных клеток при их контакте с нейтрофилами, что ведет к повышению сосудистой проницаемости [16, 17].

Следует подчеркнуть, что на клеточном уровне концентрация окислительных метаболитов кислорода служит контрольным механизмом синтеза простагландинов (ПГ) за счет стимуляции или ингибирования метаболизма арахидоновой кислоты [23].

Продукты действия фосфолипаз. Продукты действия лизосомных фосфолипаз (фосфолипаза А, диацилглицероллипаза и др.) делают существенный вклад в сосудистые изменения при остром воспалении. Например, продукты липоксигеназного пути — лейкотриены D₄ и L₄ — стимулируют синтез простагландина ПГ₂ и фактора активации тромбоцитов эндотелиальных клетками сосудов, а также повышают их адгезивность по отношению к нейтрофилам [16]. Лейкотриены B₄, C₄ и D₄ увеличивают сосудистую проницаемость [23]. Лейкотриен B₄ поднимает уровень циклического ГМФ в нейтрофилах, что приводит к высвобождению лизосомных ферментов из клетки [23].

Активированные нейтрофилы, не являясь источниками простагландинов, стимулируют их продукцию эндотелием сосудов. В этот процесс вовлечены как метаболиты кислорода, так и лейкотриены из нейтрофилов. Известно, что простагландины группы E, вызывают сокращение сосудов, боль, отек. Простагландин ПГ₂ обеспечивает гиперальгезию [23]. Простагландины ПГЕ₁, ПГЕ₂, ПГ₂ связываются с клеточными рецепторами и повышают уровень циклического АМФ, что приводит к ингибированию функций, имеющих отношение к воспалению, таких как стимуляция лимфоцитов, медируемая клетками цитотоксичность, продуцирование антител и лимфокинов, секреция медиаторов воспаления, таких как гистамин и лизосомные факторы, включающие деструктивные лизосомные гидролазы [23].

Катионные белки и протеиназы нейтрофилов. Важная роль в сосудистом звене воспалительной реакции отводится компонентам гранул нейтрофилов, в том числе катионным белкам, о которых известно, что они повышают сосудистую проницаемость *in vivo*, по-видимому, посредством высвобождения гистамина из тучных клеток и других механизмов [16].

Существенная роль в развитии реакции сосудистого воспаления принадлежит протеиназам нейтрофилов, в частности сериновым протеиназам, функции которых изучены в большей степени [4—6]. В нейтрофилах человека обнаружены следующие сравнительно изученные сериновые протеиназы [6]: эластаза (КФ 3.4.21.37), катепсин G (КФ 3.4.21.20), локализованные в азурофильных гранулах; коллагеназа (КФ 3.4.21), локализованная в специфических гранулах [1, 4]; кининогеназа, выполняющая также функции активатора плазминогена [8], кининаза, локализованные в С-частицах; химотрипсиноподобная мембранно-связанная протеиназа [20]. Протеиназы нейтрофилов, локализованные в гранулах и других структурных компонентах клетки, оказывают лизирующее действие на базальную мембрану сосудов, на клетки эндотелия сосудов, субэндотелиальный матрикс, участвуют в клеточном ответе на стимулирующие факторы, ответственны за различные функции нейтрофилов, осуществляемые ими в процессе активации.

Недавно была обнаружена ранее не известная мембранно-связанная протеиназа нейтрофилов человека, энзиматически и иммунологически родственная химотрипсину [20]. Установлено, что эта протеиназа вовлечена в клеточный ответ на ряд активирующих факторов и влияет на регуляцию двух функций — генерирования супероксиданиона и накопления циклического АМФ [20].

Стимулированные хемотаксическими факторами нейтрофилы повреждают культивируемые эндотелиальные клетки микрососудов человека и разрушают субэндотелиальный матрикс при непосредственном участии собственной эластазы. Эффект на 63 % снижался при введении в среду специфического пептидилхлорметилкетонного ингибитора эластазы нейтрофилов, в то время как вещества, инактивирующие

токсические метаболиты кислорода, не оказывали влияния на этот процесс [28].

На других видах эндотелиальных клеток, под воздействием других стимуляторов нейтрофилов наблюдали зависимость от кислородных радикалов деструкцию клеток. Эти факты свидетельствуют о наличии различных механизмов участия нейтрофилов в повреждении эндотелия сосудов. Продемонстрирован иницирующий эффект эластазы нейтрофилов на продуцирование адениннуклеотидов эндотелиальными клетками аорты свиньи. Причем эффект объяснялся не протеолитической функцией эластазы, а выраженными катионными свойствами ее молекулы [22].

Получены данные, позволяющие предполагать участие эластазы нейтрофилов в модуляции превращения метионил-энкефалина в конечную активную форму, являющуюся анальгетиком, действующим через центральную нервную систему, и участвующую в иммунорегуляторных процессах в плазме крови посредством связывания со специфическими рецепторами на иммунокомпетентных клетках [34].

Сериновые протеиназы нейтрофилов человека делают большой вклад в регуляцию протеолитических каскадных реакций в плазме крови, имеющих непосредственное отношение к сосудистому звену воспалительной реакции. Их участие в процессах свертывания крови и фибринолиза [11], в генерировании кининов [8], активации системы комплемента [6] и ангиотензин-рениновой системы [35], по-видимому, происходит за счет различных механизмов: инактивации ключевого фермента, протеолиза его субстрата или инактивации его ингибиторов, циркулирующих в плазме крови.

Возможность участия протеиназ нейтрофилов в деструкции соединительной ткани и в осуществлении перечисленных выше процессов была неоднократно продемонстрирована в течение последних 10—15 лет [1, 4—6]. Так, известно, что физиологическими субстратами сериновых протеиназ нейтрофилов могут являться структурные элементы эластина, коллаген, протеогликан и такие гуморальные факторы, как плазминоген, фибриноген, кининоген, иммуноглобулины, компоненты системы комплемента (C1, C3, C4,

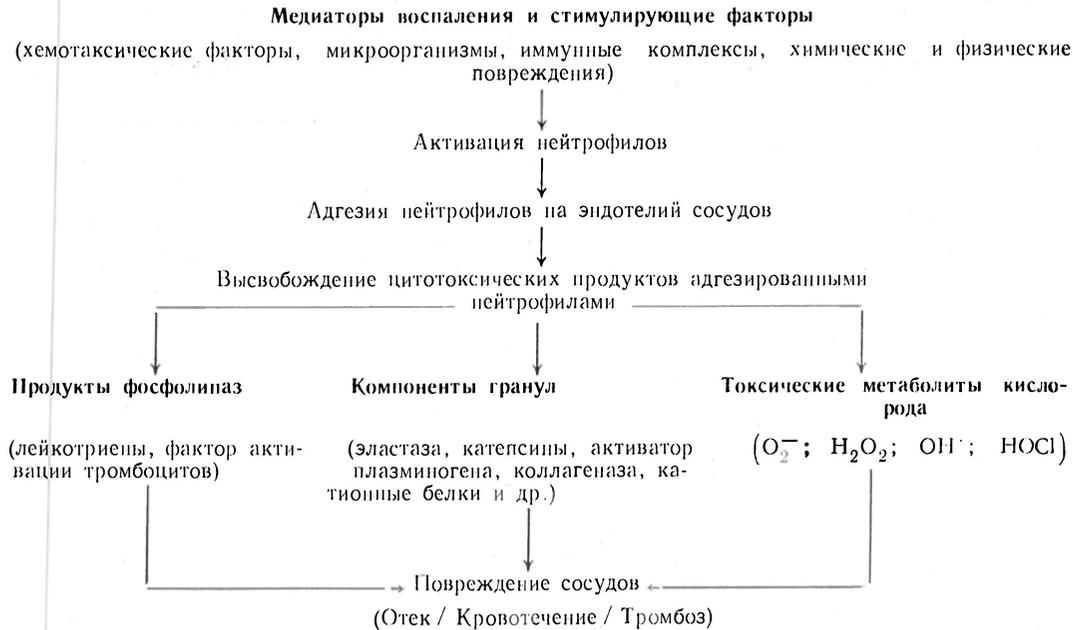
C3a, C5a), кинины, лейкокинины [6, 15]. Несколько позднее было установлено действие сериновых протеиназ нейтрофилов на ангиотензиноген [35], фибропектин [32], ингибиторы протеиназ плазмы крови, такие как α_1 -протеиназный ингибитор [29], интер- α -ингибитор трипсиногена [6], антитромбин III [19], α_2 -антиплазмин и C1-инактиватор [10] и на транспортные белки (трансферрин, преальбумин) [15]. Существенно, что эффект эластазы нейтрофилов на тот или иной субстрат может потенцироваться другими протеиназами нейтрофилов, например катепсином G [27].

Помимо того что эластаза нейтрофилов гидролизует фибрин и фибриноген, образуя биологически активные полипептиды, эластаза нейтрофилов протеолизует α -тромбин, причем модифицированный эластазой тромбин проявляет лишь 32 % свертывающей активности α -тромбина [11].

О тесной взаимосвязи протеолитических каскадных систем плазмы крови с функционированием нейтрофилов свидетельствует следующий факт. Калликреин плазмы крови, стимулирующий хемотаксис, агрегацию нейтрофилов и поглощение ими кислорода, причастен к высвобождению эластазы из нейтрофилов на ранних этапах процесса свертывания крови [33].

2. Схема участия нейтрофилов в сосудистом звене воспалительной реакции

Перечисленные выше механизмы участия нейтрофилов в сосудистом воспалении представлены на схеме. В соответствии с представлениями, сформировавшимися за последние 10 лет, это участие представляет собой цепь последовательных событий [16, 18]. Наиболее ранним этапом является появление в интерстициальном пространстве хемотаксических факторов (C5a, продукты деградации компонентов системы свертывания крови), а также подобных факторов из микроорганизмов. Эти факторы способствуют адгезии нейтрофилов на эндотелии посткапиллярных венул и иницируют эмиграцию клеток. Адгезия нейтрофилов вызывает усиление кровотока, по-видимому, медируемое простагландинами [18], что приводит к эритеме и повышению температуры. Как видно из схемы, активация нейтрофилов осу-



ществляется не только медиаторами воспаления (хемотаксическими факторами и др.), но и под влиянием таких факторов, как микроорганизмы, иммунные комплексы, химическое и физическое повреждение.

Во время адгезии и эмиграции нейтрофилов отмечается повышение сосудистой проницаемости, приводящее к экссудации белка и образованию отека. Предполагается, что медиатором усиления сосудистой проницаемости является продуцируемый нейтрофилами гипотензивный фактор активации тромбоцитов (1-алкил-2-ацетил-sn-глицеро-3-фосфохолин) [16].

Степень инфильтрации очага воспаления нейтрофилами представляет собой существенный фактор при необратимом повреждении сосудов (геморрагическом и тромбозе) и находится в прямой зависимости от изменений сосудистой проницаемости и кровотока в целом [18].

Выше рассмотрено участие токсических продуктов адгезированных нейтрофилов в повреждении сосудов посредством повышения сосудистой проницаемости, неспецифической деструкции сосудистой стенки, селективной активации каскадных систем крови.

3. Эндогенные противовоспалительные факторы

В приведенной схеме перечислены продукты нейтрофилов, участвующие в

развитии сосудистого воспаления. Вполне очевидно, что в роли эндогенных противовоспалительных факторов в организме человека, по-видимому, выступают белки-ингибиторы фосфолипаз, — соединения, служащие для нейтрализации токсических метаболитов протеиназ.

Ингибиторы фосфолипаз, антиоксиданты, простагландины. Известно, что ингибирующим действием относительно фосфолипазы A_2 обладают глюкокортикоидзависимые внутриклеточные белки нейтрофилов и макрофагов — липомодулин (M_r 125 000) и его низкомолекулярное производное макрокортин (M_r 15 000) [23]. Наиболее эффективным поглотителем супероксиданиона является церулоплазмин — острофазный белок плазмы крови [23]. Каталаза и глутатион удаляют H_2O_2 через систему глутатион — пероксидаза — глутатионредуктаза, использующую НАДФ·Н в качестве кофактора [23]. Маннитол удаляет гидроксильный радикал. К числу эндогенных поглотителей кислородных метаболитов принадлежат супероксиддисмутазы, нейтрализующие супероксиданион. Внутриклеточной супероксиддисмутазой является оротеин — белок из печени быка, успешно применяемый в клиниках за рубежом в виде сшитой с полимером пролонгированной формы [23].

Характеристика основных ингибиторов протеиназ плазмы крови человека

Ингибитор	Концентрация в плазме крови, мкМ	M _r	Природа реактивного центра (P ₁)	Специфичность
α_1 -Протеиназный ингибитор	53,7	54 000	Met	Трипсин, химотрипсин, протеиназы нейтрофилов и бактерий
α_1 -Антихимотрипсин	7,0	69 000	—	Химотрипсин, катенсин G
Антитромбин III	3,6	65 000	Arg	Тромбин, XIIa, XIa, IXa, C1 _s
C1-инактиватор	2,2	104 000	Lys	C1 _s , C1 _r , XIIa, калликреин плазмы крови
α_2 -Антиплазмин	1,0	68 000	Leu	Плазмин
Интер- α -ингибитор трипсина	3,1	180 000	Arg и Leu	Трипсин, в меньшей степени химотрипсин, эластаза нейтрофилов
α_1 -, α_2 -Ингибиторы тиоловых протеиназ (высоко- и низкомолекулярные кининогены)	1,0	60 000—100 000	—	Катенсины B, H, L, папаин, фицин, Ca ⁺⁺ -зависимая протеиназа мышц
β_1 -Антиколлагеназы	1,0	30 500	—	Коллагеназа гранулоцитов, фибробластов
α_2 -Макроглобулин	3,6	725 000	—	Широкая специфичность

В эксперименте продемонстрировано, что внутривенное введение каталазы блокирует развитие пневмонии и других воспалительных заболеваний [14]. У собак, получавших препараты супероксиддисмутазы, каталазы и маннитола непосредственно после создания модели инфаркта миокарда, площадь зоны повреждения была существенно меньше, чем у нелеченых животных [14]. Некоторыми авторами высказывается мнение, что терапевтическое вмешательство при лечении воспалительных заболеваний целесообразно направлять на торможение процесса образования кислородных метаболитов, а не на улавливание уже готовых радикалов, так как в последнем случае можно снизить антимикробную функцию фагоцитарных кислородных метаболитов [17].

Роль эндогенных противовоспалительных агентов выполняют также простагландины, повышающие внутриклеточный уровень циклического АМФ и тем самым предотвращающие высвобождение ферментов нейтрофилов и ингибирующие многие их функции, перечисленные выше.

Ингибиторы протеиназ. Несколько большее внимание в рамках данного обзора уделяется другой группе эндогенных противовоспалительных факторов, а именно ингибиторам протеиназ. Они присутствуют во всех клетках и биологических жидкостях живых организмов и являются регулято-

рами гомеостаза в межклеточном и внутриклеточном пространстве. В плазме крови человека обнаружен целый ряд антипротеиназ: α_1 -протеиназный ингибитор, α_1 -антихимотрипсин, интер- α -ингибитор трипсина, α_2 -антиплазмин, антитромбин III, C1-инактиватор, ингибиторы тиоловых протеиназ, β_1 -антиколлагеназа и α_2 -макроглобулин [29] (см. таблицу). Из интер- α -ингибитора трипсина в результате ограниченного протеолиза *in vivo* образуется кислотостабильный ингибитор протеиназ (M_r 34 000—67 000), экскретируемый в мочу и ингибирующий эластазу и кининогеназу, выполняющую также функцию активатора плазминогена нейтрофилов [6, 8]; для этого кислотостабильного ингибитора также предполагается независимый биосинтез [26]. Кислотостабильный ингибитор, благодаря низкой M_r и гликопротеидной природе, легко преодолевает гистогематические барьеры и может играть существенную роль как противовоспалительный фактор вне кровяного русла, в органах и тканях [6].

Не являющийся, по последним данным, острофазным белком [15], α_2 -макроглобулин, действуя по принципу «ловушки протеиназ», связывает протеолитические ферменты всех типов в необратимые комплексы, быстро выводящиеся из кровотока через ретикулоэндотелиальную систему (время полужизни комплексов 1—2 мин). Про-

теиназы в этих комплексах гидролизуют низкомолекулярные субстраты и не активны по отношению к белкам. Для эластазы нейтрофилов характерно медленное высвобождение из комплексов с деградируемым ею α_2 -макроглобулином с восстановлением свойства гидролизовать высокомолекулярные субстраты [24]. Таким образом, в зависимости от скорости клиренса комплекс эластазы нейтрофилов с α_2 -макроглобулином может удерживаться соединительной тканью и делать дополнительный вклад в деструкцию тканей за счет высвобождения эластазы [24].

α_1 -Протеиназный ингибитор и α_1 -антихимотрипсин, будучи острофазными белками — ингибиторами сериновых протеиназ, являются мощными ингибиторами эластазы и катепсина G нейтрофилов соответственно [29]. С1-ингибитор и α_2 -макроглобулин — основные ингибиторы калликреина плазмы крови. α_2 -Антиплазмин — самый быстродействующий ингибитор протеиназ белковой природы — инактивирует плазмин. Антитромбин III — основной ингибитор тромбина; его ингибирующее действие зависит от концентрации гепарина. α_1 -Протеиназный ингибитор, в реактивном центре которого расположен остаток метионина, может окисляться кислородными радикалами и является их своеобразным поглотителем. После окисления он частично утрачивает свойство инактивировать эластазу нейтрофилов [24]. Сравнительно недавно было продемонстрировано, что в результате сорбции эластазы нейтрофилов компонентами соединительной ткани образуются зоны, в которые затруднен доступ α_1 -протеиназного ингибитора, и эластаза оказывается лишеной контроля [12, 24]. Эластаза, секретлируемая активированными нейтрофилами, весьма активна в присутствии избытка α_1 -протеиназного ингибитора [24].

Все эти факты указывают на возможность деструкции тканей при участии эластазы нейтрофилов даже при наличии избытка ее ингибиторов. Тем не менее, модулируя адгезию нейтрофилов на эндотелий сосудов, по-видимому, можно частично предотвратить сосудистое воспаление, так как при близком контакте нейтрофилов с эндотелием снижается эффективность

не только α_1 -протеиназного ингибитора, но и антиоксидантов [16, 17].

Ингибиторы протеиназ плазмы крови и кислотостабильный ингибитор (производное интер- α -ингибитора трипсина?) оказывает воздействие на функции лимфоцитов, снижая синтез ДНК в стимулированных митогенами клетках [6, 23]. α_1 -Протеиназный ингибитор и α_2 -макроглобулин синтезируются не только в печени, но и в лимфоцитах и макрофагах. По-видимому, они являются регуляторами взаимодействия лимфоцитов и макрофагов [23], и их инактивация может иметь значительные патофизиологические последствия.

Недавно была установлена идентичность α_1 - и α_2 -ингибиторов тиоловых протеиназ плазмы крови соответственно высоко- и низкомолекулярному кининогену человека [9]. Структурные исследования показали, что реактивные центры для связывания этих протеиназ локализованы в структурно идентичных тяжелых цепях низко- и высокомолекулярного кининогена [9, 25]. Предполагается, что при воспалении низко- и высокомолекулярные кининогены, выполнив функцию источников кининов, а высокомолекулярный кининоген, лишившись также и гистидинбогатого участка под действием калликреина и других протеиназ, превращаются в мощные ингибиторы тиоловых протеиназ, поступающих в очаг воспаления из нейтрофилов и поврежденных тканей (катепсины В, Н, L) [9]. Для α_1 - и α_2 -ингибиторов тиоловых протеиназ [25], так же как для интер- α -ингибитора трипсина [26], на основании экспериментов *in vitro* и *in vivo* предполагается тразиторная функция переноса протеиназ в виде комплексов на α_2 -макроглобулин и α_1 -протеиназный ингибитор.

Заместительная противовоспалительная терапия препаратами ингибиторов протеиназ. При воспалительных заболеваниях лечение ингибиторами протеиназ применяется с целью повышения защитного потенциала организма. Давно и успешно в клинике используют препараты основного ингибитора протеиназ из органов крупного рогатого скота (тразилол, гордокс, контрикал и др.) [6]. Так как этот ингибитор является слабым антагонистом эластазы нейтрофилов, его порой необходимо применять в больших до-

зах, что повышает стоимость курса лечения. В нашей стране разработаны его пролонгированные формы и создан гемосорбент на его основе [3]. В настоящее время в ФРГ ведутся разработки так называемой «полусинтетической инженерии» гомологов тразилола, в реактивный центр которых (положение P₁) химическими методами встраиваются аминокислотные остатки норвалина, валина, изолейцина и др. [30]. Создание подобных гомологов тразилола, являющихся мощными ингибиторами эластазы нейтрофилов ($K_i \sim 10^{-10}$ М), открывает перспективы промышленного генно-инженерного производства мутантов тразилола как лекарственных препаратов.

Метод использования рекомбинантной ДНК позволил создать микробиологический способ производства не подверженных окислительной инактивации мутантов α_1 -протеиназного ингибитора [13].

Разработан отечественный противовоспалительный препарат на основе белков-ингибиторов протеиназ из подчелюстной и околоушной желез собак и кошек (триэлин), внедренный в производство [6]. Успешно проходят клинические испытания при лечении воспалительных заболеваний плазмы и гемосорбенты на основе кислотостабильного ингибитора протеиназ (производного интер- α -ингибитора трипси-на?) из мочи человека и утиного овомукоида, полученные в нашей стране [2, 7]; в настоящее время налаживается их полупромышленное производство.

Среди синтетических низкомолекулярных ингибиторов эластазы нейтрофилов следует отметить перспективность некоторых нетоксических пептидхлорметилкетонов (хлорметилкетон N-ацетил-L-аланил-L-аланил-L-пролил-L-аланина и др.) [21].

Несмотря на подтвержденную в эксперименте, а порой и в клинике эффективность различных перечисленных выше отдельных противовоспалительных препаратов, многообразие функций производных нейтрофилов в продуцировании сосудистого воспаления (см. схему) указывает на целесообразность комплексного использования препаратов различного типа: антипротеиназ, антиоксидантов, погло- тителей катионных белков, например

гепарина, при лечении воспалительных заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бахов Н. И., Александрова Л. З., Титов В. П. и др. // Успехи совр. биол. — 1987. — Т. 104, вып. 2 (5). — С. 281—296.
2. Валуева Т. А., Маклакова И. А., Синани В. А. и др. // Всесоюзный симпозиум по инженерной энзимологии, 5-й: Тезисы докладов. — Олайнс, 1985. — С. 348.
3. Ларионова Н. И., Митюшина Г. В., Журавлев А. Г. и др. // Там же. — С. 125.
4. Локшина Л. А., Соловьева П. И., Орехович В. Н. // Вопр. мед. химии. — 1987. — № 5. — С. 38—43.
5. Маянский А. П., Маянский Д. П. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. — Новосибирск, 1983.
6. Оглоблина О. Г. // Биохимия. — 1982. — Т. 47, № 10. — С. 1587—1600.
7. Оглоблина О. Г., Белова Л. А., Малахов В. П., Парфенкова Г. А. // Бюл. Всесоюз. кардиол. науч. центра. — 1987. — № 1. — С. 40—44.
8. Оглоблина О. Г., Платонова Л. В., Пасхуна Т. С. // Докл. АН СССР. — 1982. — Т. 265, № 4. — С. 982—985.
9. Higashiyama S., Ohkubo I., Ishiguro H. et al. // Biochemistry (Wash.). — 1986. — Vol. 25, N 7. — P. 1669—1675.
10. Brower M. S., Harpel P. C. // J. biol. Chem. — 1982. — Vol. 257, N 16. — P. 9849—9865.
11. Brower M. S., Walz D. A., Garry K. E., Fenton J. W. // Blood. — 1987. — Vol. 69, N 3. — P. 813—819.
12. Campbell E. J., Senior R. M., McDonald J. A., Cox D. I. // J. clin. Invest. — 1982. — Vol. 70, N 4. — P. 845—852.
13. Courtney M., Jallat S., Tessier L. H. et al. // Nature. — 1985. — Vol. 313, N 10. — P. 149—151.
14. Fantone J. C., Ward P. A. // Hum. Path. — 1985. — Vol. 16, N 10. — P. 973—978.
15. Fritz H., Jochum M., Duswald K. H. et al. // Proteinases in Inflammation and Tumor Invasion. — Berlin, 1986. — P. 1—23.
16. Harlan J. M. // Acta med. scand. — 1987. — Suppl. 715. — P. 123—129.
17. Henson P. M., Johnston R. B. // J. clin. Invest. — 1987. — Vol. 79, N 3. — P. 669—674.
18. Issekutz A. C., Killam I. W. // Lab. Invest. — 1984. — Vol. 50, N 6. — P. 605—607.
19. Jochum M., Lander S., Heimburger N., Fritz H. // Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. — 1981. — Bd 362, N 2. — S. 103—112.
20. King C. H., Goralnik C. H., Kleinhenz P. J. et al. // J. clin. Invest. — 1987. — Vol. 79, N 4. — P. 1091—1098.
21. Kleinerman J., Ranga V., Rynbrandt D. et al. // Amer. Rev. resp. Dis. — 1980. — Vol. 121, N 2. — P. 381—387.
22. Le Roy E. C., Ager A., Gordon J. L. // J. clin. Invest. — 1984. — Vol. 74, N 3. — P. 1003—1010.
23. Lewis D. A. // Biochem. Pharmacol. — 1984. — Vol. 33, N 11. — P. 1705—1714.
24. Ossanna P. J., Test S. T., Matheson N. R. et al. // J. clin. Invest. — 1986. — Vol. 77, N 6. — P. 1939—1951.

25. Pagano M., Engler R. // Cystein Proteinases and Their Inhibitors. — Berlin, 1986. — P. 31—42.
26. Pratt C. W., Pizzo S. V. // Arch. Biochem. — 1986. — Vol. 248, N 2. — P. 587—596.
27. Reilly C. F., Fukunaga Y., Powers J. C., Travis J. // Hoppe-Seyleyler's Z. physiol. Chem. — 1984. — Bd 365, N 9. — S. 1131—1135.
28. Smedly L. A., Tonnesen M. G., Sandhaus R. A. et al. // J. clin. Invest. — 1986. — Vol. 77, N 4. — P. 1233—1243.
29. Travis J., Salvesen G. S. // Ann. Rev. Biochem. — 1983. — Vol. 52. — P. 655—709.
30. Tschesche H., Beckmann J., Mehlich A. et al. // Biochim. biophys. Acta. — 1987. — Vol. 913, N 1. — P. 97—101.
31. Van der Valk P., Herman C. J. // J. clin. Invest. — 1987. — Vol. 56, N 2. — P. 127—137.
32. Vartio T. // Europ. J. Biochem. — 1982. — Vol. 123, N 2. — P. 223—233.
33. Wachtfogel Y. T., Kucich U., James H. L. et al. // J. clin. Invest. — 1983. — Vol. 72, N 5. — P. 1672—1677.
34. Watorek W., Travis J. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1987. — Vol. 147, N 1. — P. 416—421.
35. Wintroub B. U., Klickstein H. B., Dzan V. J., Watt K. W. // Biochemistry (Wash.). — 1984. — Vol. 23, N 2. — P. 227—232.

Поступила 14.10.87

УДК 612.112.94:612.61.015.6:577.161.2

К. Д. Плещитый

АКТИВНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ ВИТАМИНА D КАК РЕГУЛЯТОРЫ ПРОЦЕССОВ КЛЕТочНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ. СООБЩЕНИЕ I. ЛИМФОЦИТЫ

Институт общей патологии и патологической физиологии АМН СССР, Москва

Последнее десятилетие характеризовалось исключительно интенсивным расширением наших представлений о биологических свойствах и механизме действия регулятора фосфорно-кальциевого обмена витамина D. К настоящему времени разработана убедительная концепция о гормональной системе витамина D, в соответствии с которой биологические эффекты витамина опосредуются его активными метаболитами. Для последних в тканях-мишенях имеются специфические рецепторы, которым присущи низкая емкость в отношении лиганда и высокое сродство к нему [5, 8, 9]. После взаимодействия гормона со своим лигандом образовавшийся комплекс обнаруживается в клетке связанным с хроматином. При этом происходит избирательная стимуляция процесса транскрипции ДНК, следствием чего являются биосинтез новых молекул мРНК и трансляция соответствующих белков, участвующих в гормональном ответе [13, 15].

С учетом данных о биологической роли витамина D наиболее интенсивно изучались механизм его действия, наличие и свойства клеточных рецепторов, влияние активных метаболитов на функциональные свойства клеток преимущественно с использованием клеток тонкой кишки, почек и костной ткани. Основной целью проводимых

исследований было изучение механизмов реализации ведущего свойства метаболитов витамина D — способности регулировать обмен кальция в организме. Однако в последнее время стали появляться работы, непосредственно не касающиеся изучения влияния метаболитов витамина D на кальциевый обмен. Так, начаты интенсивные исследования влияния метаболитов витамина D на процессы пролиферации и дифференцировки клеток моноцитарно-макрофагального ряда, лимфоцитов, лейкозных и опухолевых клеток. В частности, большой интерес представляют накопившиеся в последние годы данные о влиянии метаболитов витамина D на клетки, опосредующие различные иммунологические феномены. Начало подобных исследований датируется 1984 г., когда появились первые сообщения о влиянии активного метаболита витамина D — 1,25-дигидроксивитамина D₃ [1,25(OH)₂D₃] на пролиферацию лимфоцитов [7, 32, 34, 40]. До этого данные о влиянии метаболитов витамина D на иммунокомпетентные клетки в литературе отсутствовали, хотя имелись сведения о влиянии самого витамина D на иммунный ответ. Было показано, что витамин D тормозит пролиферацию T-лимфоцитов при их митогенной стимуляции, подавляет иммунный ответ на тимуснезависимые и особенно на

тенсивно — на тимусзависимые антигены, вызывает атрофию тимуса и тормозит развитие экспериментального заболевания аутоиммунной природы — адьювантного артрита [2, 4]. Позднее были представлены данные о том, что витамин D вызывает Т-лимфоцитопению, снижает активность естественных киллеров и замедляет процесс отторжения аллотрансплантата [3]. Витамин D оказался также активным иммунорегулятором при использовании в клинике (например, при таком аутоиммунном заболевании, как миастения [1]). Эти данные позволяют предположить, что активным метаболитам витамина D также присущи иммунорегуляторные свойства.

К настоящему времени изучено действие на иммунокомпетентные клетки целого ряда активных метаболитов витамина D, в результате чего установлено, что наиболее мощной иммунорегуляторной активностью обладает $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Первые сообщения о роли метаболитов витамина D появились, как уже отмечалось, в 1984 г., причем практически в одно и то же время из 4 различных лабораторий. Одна группа исследователей показала, что $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ *in vitro* тормозит пролиферацию Т-лимфоцитов человека, индуцированную митогеном фитогемагглютинином (ФГА); при этом $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ подавляет продукцию Т-клеток интерлейкина-2 (ИЛ-2), цитокина, играющего исключительно важную роль в процессе развития Т-лимфоцитов [37]. Другие метаболиты оказывают значительно менее выраженное действие на пролиферацию стимулированных лимфоцитов и продукцию ими ИЛ-2 [40]. Аналогичные результаты также с использованием человеческих Т-клеток, стимулированных ФГА, были получены Ригби и соавт. [34]. В этих исследованиях добавление к культуре клеток экзогенного ИЛ-2 частично (но не полностью) восстанавливало пролиферативный ответ Т-лимфоцитов, подавленный $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Другими авторами было показано, что $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ тормозит пролиферацию клеток мозгового вещества тимуса мышей, но не влияет на blastogenesis незрелых клеток коркового вещества [20, 32]. И, наконец, данные о подавлении пролиферации Т-клеток и продукции ими ИЛ-2 под влиянием $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

были получены в условиях смешанной культуры лимфоцитов с использованием клеточных Т-гибридом [7]. В дальнейшем было показано, что $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ также тормозит продукцию ИЛ-2 и митогенный ответ на ФГА человеческих лимфоцитов, выделенных из миндалин [30].

В свете всех этих данных естественно возник вопрос, влияет ли $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ на всю популяцию Т-клеток или же избирательно на какую-либо из субпопуляций. Вначале появились сведения о том, что $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ тормозит только пролиферацию Т-хелперов [23] и снижает показатель соотношения клеток с фенотипом $\text{OKT4}^+/\text{OKT8}^+$ [27]; последнее обстоятельство свидетельствовало о воздействии метаболита витамина D на Т-хелперы. Однако в последнее время было показано, что $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ не оказывает какого-либо избирательного действия, а в равной степени выражено ингибирует пролиферацию разных субпопуляций стимулированных Т-лимфоцитов [35]. По мнению этих авторов, полученные ранее данные [23] о торможении под влиянием $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ blastogenesis только Т-хелперов являются следствием методической ошибки, в частности игнорирования того обстоятельства, что у разных субпопуляций Т-лимфоцитов имеются различия в кинетике пролиферации. В то же время сам факт подавления $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ трансформированных Т-хелперов не вызывает сомнения, что недавно было подтверждено экспериментально [22]. Авторы использовали чистый мышинный Т-хелперный клон без примесей других клеток. В этих опытах $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ в условиях отсутствия в культуре обычно продуцируемого макрофагами цитокина ИЛ-1 потенцировал митогенный ответ клеток-хелперов при их стимуляции конканавалином А и экспрессию рецепторов ИЛ-2. При адекватном уровне ИЛ-1 в среде имело место ингибирующее действие $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ на процессы клеточной пролиферации.

Параллельно изучению действия $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ на Т-лимфоциты проводились аналогичные исследования в отношении В-клеток. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, но не другие метаболиты витамина D, выражено тормозит про-

лиферацию В-клеток и секрецию ими иммуноглобулинов при стимуляции клеток митогеном лаконоса [16, 24, 39], вирусом Эпштейна — Барр [31] или золотистым стафилококком [17]. В этих экспериментах использовали либо нефракционированные человеческие лимфоциты, либо очищенную фракцию В-клеток.

Приведенные выше данные однозначно свидетельствуют, что $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ *in vitro* дает депрессивный эффект в отношении трансформации активированных Т- и В-лимфоцитов. Для понимания механизмов этого явления необходимо коснуться вопроса о клеточном рецепторе $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Известно, что в клетках тканей, являющихся мишенями $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (кишечник, костная ткань, кожа, почки, клетки макрофагально-моноцитарного ряда и др.), имеется специфический рецептор, в результате взаимодействия с которым $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ осуществляет свое биологическое действие [5, 9, 15]. У находящихся в состоянии покоя (неактивированных) Т- и В-лимфоцитов подобный рецептор отсутствует. Однако при активации клеток, вызываемой самыми разными причинами (митогены, антигены, цитокины, инфекционные агенты), наблюдается быстрая экспрессия рецептора $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [25]. При этом клетки, экспрессирующие рецепторы, приобретают чувствительность к $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Эти результаты полностью соответствуют данным о том, что неактивированные лимфоциты [т. е. не имеющие рецептора $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$] никак не реагируют на действие этого активного метаболита [22, 39]. Сходные закономерности были выявлены в экспериментах [32], когда $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ тормозил пролиферацию клеток мозгового вещества тимуса, имеющих гормональный рецептор, но не действовал на незрелые клетки коркового вещества, не имеющие рецептора.

Здесь же уместно обратиться к многочисленным данным о том, что другие метаболиты витамина D, помимо $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, либо вовсе не обладают иммунорегуляторной активностью, либо проявляют ее в концентрации, на несколько порядков превышающей таковую для $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [23, 31, 40]. Все это объясняется низким сродством других метаболитов ви-

тамина D к рецептору $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ и находится в полном соответствии с имеющимися данными о том, что способность аналогов $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ замещать лиганд в рецепторе соответствуют их биологической активности [10].

Важным является вопрос о том, на какой стадии клеточного цикла осуществляется воздействие $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Во всех имеющихся работах подчеркивается, что $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ оказывает ингибирующее действие при внесении в культуру одновременно с митогеном или на несколько часов позже, тогда как предварительная обработка им неактивированных клеток или его внесение на поздней стадии процесса бластогенеза является неэффективным. В специальных исследованиях было показано, что $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ блокирует клеточный цикл на стадии перехода от G_{1A} к G_{1B} [33, 35].

Недавно появились сведения, позволяющие составить более точное представление о механизме иммунорегуляторного действия $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Матсуи и соавт. [18], подтвердив факты об ингибирующем действии этого метаболита витамина D на митогенез Т-клеток и секрецию ИЛ-2 и интерферона, наряду с этим отметили, что $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ в активированных лимфоцитах тормозит экспрессию информационной РНК ИЛ-2 и γ -интерферона, а также препятствует продукции информационной РНК рецептора ИЛ-2 и с-туса протоонкогена, результатом ранней экспрессии которого, как известно, является активация Т-клеток [18]. Таким образом, впервые доказано, что $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ регулирует деятельность генов, ответственных за активацию Т-клеток, на уровне мРНК.

Необходимо, однако, отметить, что выявление *in vitro* путей иммунорегуляторного воздействия $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ не означает, что *in vivo* будет наблюдаться совершенно идентичный ход событий. Во-первых, известно [4], что при введении животным витамина D у них имеет место усиленный выброс обладающих иммуносупрессивными свойствами гормонов коры надпочечников. Есть все основания предполагать, что главному переносчику биологических свойств витамина D — $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ — также присущи подобные эффекты. Во-вторых, необходимо учитывать роль простагландинов,

в частности простагландина E_2 . Его иммуносупрессивные свойства широко известны [12]. $1,25(OH)_2D_3$ сам по себе стимулирует продукцию простагландина E_2 макрофагами; при этом иммуносупрессивные эффекты обоих веществ потенцируются [21], тогда как ингибитор простагландинсинтазы индометацин частично ослабляет иммунодепрессивные эффекты $1,25(OH)_2D_3$ [21, 33]. Удаление из среды макрофагов также частично подавляет ингибирующее действие $1,25(OH)_2D_3$ на стимулированные лимфоциты [41].

При изучении имеющихся в литературе материалов создается впечатление, что гормональная система витамина D выполняет наряду с другими функцию надзора за деятельностью иммунной системы. Нельзя однозначно утверждать, что $1,25(OH)_2D_3$ является только иммунодепрессантом. Его биологические функции в плане воздействия на иммунокомпетентные клетки, видимо, значительно шире. Так, в опытах Хаверти и соавт. [14], проведенных на культуре клеток Т-клеточной лимфомы, секретирующей ИЛ-2 и имеющей рецептор $1,25(OH)_2D_3$, отсутствие в среде витамина D и его метаболитов вызывало подавление секреции ИЛ-2, тогда как внесение $1,25(OH)_2D_3$ в дозе 10^{-15} — 10^{-11} M стимулировало продукцию ИЛ-2, а при увеличении концентрации до 10^{-7} M подавляло секрецию ИЛ-2. У лиц с возрастным остеопорозом нарушены соотношения между уровнем Т-хелперов и Т-супрессоров в периферической крови, назначение $1,25(OH)_2D_3$ приводило к нормализации этого показателя [11]. Наконец, как следует из приведенных выше данных, в отсутствие ИЛ-1 $1,25(OH)_2D_3$ не только не подавляет, но, напротив, стимулирует митогенез Т-лимфоцитов [22]. Таким образом, правомочно говорить о системе витамина D как системе иммунорегуляторной, довольно жестко запрограммированной, при функционировании которой отклонения иммунного гомеостаза корректируются с помощью $1,25(OH)_2D_3$. Жесткость этой системы лишней раз подтверждается тем обстоятельством, что в отношении активированных лимфоцитов эффект $1,25(OH)_2D_3$ проявляется даже при его концентрации 10^{-10} M [17, 24, 34],

что соответствует нормальному содержанию в крови.

При анализе имеющихся данных отчетливо видно, насколько важна роль $1,25(OH)_2D_3$ в контроле за аутоиммунными процессами. Об этом свидетельствует его избирательный депрессивный эффект в отношении находящихся в покое, а активированных лимфоцитов. Иными словами, любая активация лимфоцитов, без которой невозможно развитие аутоиммунных процессов, немедленно «включает» иммунорегуляторное действие $1,25(OH)_2D_3$, направленное на подавление пролиферации лимфоцитов. В этом плане представляет интерес установленный недавно факт, что лимфоциты большинства больных ревматоидным артритом в отличие от лимфоцитов здоровых людей имеют рецептор $1,25(OH)_2D_3$ [26]. Прямо подтверждают гипотезу о роли $1,25(OH)_2D_3$ в аутоиммунитете и наши данные о лечебном и иммунокорректирующем действии витамина D при экспериментальном аутоиммунном артрите и в клинике при миастении [1, 4].

Представляют также интерес данные о том, что при саркоидозе макрофаги легких приобретают способность продуцировать $1,25(OH)_2D_3$ [6], хотя считается, что продукция этого метаболита происходит в почках [5, 9]. Предполагается, что при саркоидозе активированные легочные Т-хелперы секретируют интерферон, который, как это было показано [19], стимулирует продукцию $1,25(OH)_2D_3$ макрофагами. Можно думать, что местное выделение $1,25(OH)_2D_3$ также направлено на нормализацию иммунопатологического процесса. Другой пример касается патологии почек. Известно, что клетки моноцитарной системы играют определенную защитную роль при гломерулонефрите, проявляя свою фагоцитарную активность в просвете капилляров и в мезангиуме, участвуя в очищении клубочков [38]. С учетом имеющихся данных [36] можно предположить, что эти клетки параллельно продуцируют $1,25(OH)_2D_3$, который оказывает ингибирующее влияние на развитие аутоиммунного процесса в почках. Таким образом, в определенных условиях иммунорегуляторное действие витамина D, реализуемое через его активные метаболиты, может

носить не системный, а местный характер. Подтверждают подобное предположение результаты недавних исследований [29], свидетельствующие о выраженном клиническом эффекте при аппликации 1,25 (ОН)₂D₃ на кожу больных псориазом.

Другой важной областью применения 1,25 (ОН)₂D₃, помимо клиники аутоиммунных заболеваний, может явиться трансплантология. Показано, что витамин D замедляет отторжение аллотрансплантата [3]. В связи с этим применение в тех же целях 1,25 (ОН)₂D₃ представляется весьма перспективным.

Следует признать, что 1,25 (ОН)₂D₃, но не другие метаболиты витамина D играет бесспорную регуляторную роль в процессе пролиферации лимфоцитов, тогда как роль метаболитов витамина D в дифференцировке этих клеток изучена мало в отличие от клеток моноцитарно-макрофагальной системы. Данные о влиянии метаболитов витамина D на пролиферацию моноцитов/макрофагов, а также лейкозных и опухолевых клеток будут представлены в следующем сообщении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Евсеев В. А., Плецитый К. Д., Гехт Б. М. и др. // Иммунология. — 1986. — № 5. — С. 29—33.
2. Плецитый К. Д., Евсеев В. А., Газдарова И. Н., Спиричев В. Б. // Там же. — 1982. — № 2. — С. 47—50.
3. Плецитый К. Д., Сухих Г. Т., Давыдова Т. В. и др. // Бюл. экспер. биол. — 1987. — № 8. — С. 203—204.
4. Плецитый К. Д., Шатерникова И. П. // Пат. физиол. — 1984. — № 4. — С. 40—44.
5. Спиричев В. Б. // Вестн. АМН СССР. — 1986. — № 11. — С. 84—90.
6. Adams J. S., Sharma O. P., Gacad M. A. et al. // J. clin. Invest. — 1983. — Vol. 72. — P. 1856—1860.
7. Bhalla A. K., Amento E. P., Serog B. et al. // J. Immunol. — 1984. — Vol. 133. — P. 1748—1754.
8. Braidman I. P., Anderson D. C. // Clin. Endocr. — 1985. — Vol. 23. — P. 445—460.
9. DeLuca H. F. // Monogr. Endocr. — 1979. — Vol. 13. — P. 1—80.
10. Francesch R. T., Simpson R. U., DeLuca H. F. // Arch. Biochem. — 1981. — Vol. 210. — P. 1—13.
11. Fujita T., Matsui T., Nakao Y. et al. // Mineral Electrolyte Metab. — 1984. — Vol. 10. — P. 375—378.
12. Goodwin J. S., Ceuppens P. // J. clin. Immunol. — 1983. — Vol. 3. — P. 295—315.
13. Haussler M. R. // Ann. Rev. Nutr. — 1986. — Vol. 6. — P. 527—562.
14. Haverly T., Haddad J. G., Neilson E. G. // J. Leukocyte Biol. — 1987. — Vol. 41. — P. 177—182.
15. Henry H. L., Norman A. W. // Ann. Rev. Nutr. — 1984. — Vol. 4. — P. 493—520.
16. Hoshino T., Iho S., Kura F. // Meth. Find. exp. clin. Pharmacol. — 1986. — Vol. 8. — P. 167—173.
17. Iho S., Takahashi T., Kura F. et al. // J. Immunol. — 1986. — Vol. 136. — P. 4427—4431.
18. Kelly K., Cochran B., Stiles C. et al. // Cell. — 1983. — Vol. 35. — P. 603—610.
19. Koeffler H. P., Reichel H., Bishop J. E. et al. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1985. — Vol. 127. — P. 596—603.
20. Koizumi T., Nakao Y., Matsui T. et al. // Cell. Immunol. — 1985. — Vol. 96. — P. 455—461.
21. Koren R., Ravid A., Roletm C. et al. // FEBS Lett. — 1986. — Vol. 205. — P. 113—116.
22. Lacey D. L., Axelrod J., Chappel J. C. et al. // J. Immunol. — 1987. — Vol. 138. — P. 1680—1686.
23. Lemire J. M., Adams J. S., Kermani-Arab V. et al. // Ibid. — 1985. — Vol. 134. — P. 3032—3035.
24. Lemire J. M., Adams J. S., Sakai E. et al. // J. clin. Invest. — 1984. — Vol. 74. — P. 657—661.
25. Manolagas S. C., Provedini D. M., Tsoukas C. D. // Molec. Cell. Endocr. — 1985. — Vol. 43. — P. 113—122.
26. Manolagas S. C., Wernitz D. A., Tsoukas C. D. et al. // J. lab. clin. Med. — 1986. — Vol. 108. — P. 596—600.
27. Matsui T., Nakao Y., Koizumi T. et al. // Life Sci. — 1985. — Vol. 37. — P. 95—101.
28. Matsui T., Takahashi R., Nakao Y. et al. // Cancer Res. — 1986. — Vol. 46. — P. 5827—5831.
29. Morimoto S., Onishi T., Imanaga S. et al. // Calcif. Tissue Int. — 1986. — Vol. 38. — P. 119—122.
30. Nunn J. D., Katz D. R., Barker S. et al. // Immunology. — 1986. — Vol. 59. — P. 479—484.
31. Provedini D. M., Tsoukas C. D., Deflos L. J. et al. // J. Immunol. — 1986. — Vol. 136. — P. 2734—2740.
32. Ravid A., Koren R., Novogrodsky A. et al. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1984. — Vol. 123. — P. 163—169.
33. Rigby W. F. C., Noelle R. J., Krause K. et al. // J. Immunol. — 1985. — Vol. 135. — P. 2279—2286.
34. Rigby W. F. C., Stacy T., Fanger M. W. // J. clin. Invest. — 1984. — Vol. 74. — P. 1451—1455.
35. Rigby W. F. C., Yirinec B., Oldershaw R. L. et al. // Europ. J. Immunol. — 1987. — Vol. 17. — P. 563—566.
36. Rook G. A. W., Steele J., Fraher L. et al. // Immunology. — 1986. — Vol. 57. — P. 159—163.
37. Rosenstreich D. L., Yost S. L., Tu J. H. et al. // Einstein Quart. J. Biol. Med. — 1987. — Vol. 5. — P. 10—18.
38. Shigematsu H. // Exp. Path. — 1987. — Vol. 31. — P. 75—76.
39. Shiozawa K., Shiozawa S., Shinizu S. et al. // Immunology. — 1985. — Vol. 56. — P. 161—167.

УДК 612.354.2:547.391.3]:612.353:547.281.1

Ю. В. Котловский, А. Ю. Гришанова, В. М. Мишин, Г. И. Бачманова

РОЛЬ МИКРОСОМ ПЕЧЕНИ КРЫС В МЕТАБОЛИЗМЕ МЕТИЛМЕТАКРИЛАТА ДО ФОРМАЛЬДЕГИДА

Красноярский медицинский институт, Институт клинической и экспериментальной медицины СО АМН СССР, Новосибирск, И ММИ им. Н. И. Пирогова

Метилметакрилат (ММА) широко распространен в производстве акриловых резин, красителей, автомобильной промышленности, в ортопедии и стоматологии [9]. Имеются сведения о гематотоксическом эффекте мономера в эксперименте [20], а также среди рабочих в условиях производства оргстекла, где употребляется этот мономер [3].

Интоксикация, возникающая при отравлениях ММА, сопровождается изменением каталитической активности ферментов системы микросомальных монооксигеназ [8], играющей ключевую роль в метаболизме низкомолекулярных соединений [1]. Природа метаболитов, образующихся при микросомальном окислении ММА, не установлена. Целью данной работы явилось изучение роли микросом печени крыс в метаболизме ММА.

Методика

Работу выполняли на крысах Вистар массой 100—200 г. Фенobarбитал (ФБ, 80 мг/кг), метилхолантрен (МХ, 40 мг/кг) вводили внутривенно 1 раз в день на протяжении 3 дней. Хлористый кобальт инъецировали подкожно (23 мг/кг) 1 раз в день в течение 3 дней. Животных деканитировали через 24 ч после введения ксенобиотиков.

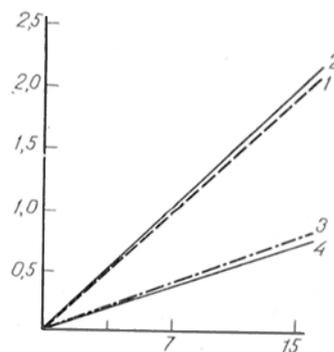
Микросомальную фракцию получали по методу [2]. Общее содержание цитохрома P-450 определяли по СО-нику в дифференциальном спектре поглощения восстановленного гемопротенина [17]. Определение содержания спиртов проводили после инкубации 36 мМ метилакрилата (МА), ММА, бутилакрилата (БА) и бутилметакрилата (БМА) в 0,1 М трис-НСI-буфере рН 7,4, содержащем 1 мМ ЭДТА, 3 мМ MgSO₄, 2 мг микросомального белка на 1 мл инкубационной среды. После проведения инкубации белок осаждали добавлением 2,0 мл 50 % раствора ТХУ (соотношение ТХУ с объемом инкубационной среды 1:1). В качестве внутреннего стандарта использовали 0,5 мл 4 % пропанола, после чего добавляли 1,0 мл 30 % смеси нитрита натрия.

После интенсивного перемешивания паробразную смесь, содержащую метилнитрит или бутилнитрит, вводили в колонку газового хроматографа ЛХМ 8 МД (СССР), содержащую насадку белого огнеупорного кирпича с 15 % винилом, при температуре колонки 75 °С с расходом гелия 3,6 л/ч.

Содержание формальдегида в надосадочной жидкости устанавливали после инкубации акрилатов с микросомами печени крыс с помощью реактива НАШЕ [15]. Белок определяли по методу Лоури [13]. В табл. 1, 2 и рисунке приведены средние данные от 6—10 животных.

Результаты и обсуждение

При инкубации МА, ММА, БА и БМА с микросомами печени контрольных крыс регистрировали появление спиртов, нарастание которых было линейным в течение 15 мин инкубации. Вид спирта определяли типом акрилата. Так, при инкубации МА и ММА образовывался метанол, а при внесении БА и БМА в инкубационной среде отмечалось появление бутанола. При этом скорость образования бутанола при инкубации БА и БМА составляла



Скорость образования бутанола при гидролизе БА (1), БМА (2) и метанола при гидролизе МА (3), ММА (4) микросомами печени интактных крыс.

По оси абсцисс — время инкубации (в мин); по оси ординат — содержание спиртов (в ммоль).

Т а б л и ц а 1
Скорость образования формальдегида при инкубации ММА, МА, БМА и МАК с микросомами печени контрольных крыс

Условия опыта	Скорость образования формальдегида, нмоль/мин на 1 мг белка
МК + НАДФ·Н-г. с.	0,0
МК + ММА	0,54
МК + НАДФ·Н-г. с. + ММА	1,19
МК + НАДФ·Н-г. с. + МА	1,07
МК + НАДФ·Н-г. с. + БМА	0,23
МК + НАДФ·Н-г. с. + МАК	0,27

соответственно 50 ± 12 и 55 ± 11 нмоль бутанола на 1 мг белка в 1 мин, а интенсивность генерации метанола при внесении в инкубационную среду МА и ММА была значительно меньше ($12 \pm 0,5$ и $11 \pm 0,5$ нмоль метанола на 1 мг белка в 1 мин соответственно). Ферментативный характер реакции образования спиртов подтверждался тем, что предварительная инкубация микросом печени крыс при 100°C в течение 3 мин предотвращала появление бутанола. Сходная скорость гидролиза МА и ММА, а также БА и БМА свидетельствует о том, что метильные группы, имеющиеся у производных метакриловых кислот ММА и БМА, не влияют на этот процесс. Полученные данные дают основание считать, что по скорости генерации спиртов, определяемой типом акрилата, можно судить об активности карбоксилэстераз в микросомах печени крыс [11, 16].

В опытах, проводимых с добавлением в инкубационную среду микросом печени контрольных крыс и НАДФ·Н-

Т а б л и ц а 2
Скорость образования формальдегида при инкубации ММА с микросомами печени крыс на фоне введения ФБ, МХ и хлористого кобальта

Условия опыта	Содержание Р-450, Р-448, нмоль на 1 мг белка	Скорость образования формальдегида, нмоль на 1 мг белка в 1 мин
Контроль	0,89 (Р-450)	1,19
ФБ	2,5 (Р-450)	6,48
МХ	1,48 (Р-448)	2,5
Хлористый кобальт	0,40 (Р-450)	0,28

генерирующей системы (НАДФ·Н-г.с.), не отмечалось появления спиртов, так же как не регистрировалось образования формальдегида (табл. 1). При инкубации же микросом печени контрольных крыс с ММА без НАДФ·Н-г.с. отмечалось появление формальдегида. Скорость генерации его резко (более чем в 2 раза) возрастала при добавлении к этой смеси НАДФ·Н-г.с. Увеличение содержания формальдегида было линейным в течение 30 мин инкубации и при содержании 30 мМ ММА. Результаты этих исследований показали, что генерация формальдегида зависела от присутствия НАДФ·Н и наличия в инкубационной среде метанола. Образование формальдегида из метанола подтверждается результатами, свидетельствующими об одинаковой интенсивности образования формальдегида при инкубации микросом с МА и ММА и очень низком уровне его образования при инкубации микросом с БМА и метакриловой кислотой (МАК).

На важную роль цитохрома Р-450 в образовании формальдегида указывают опыты с микросомами крыс, которым предварительно вводили фенобарбитал — классический индуктор цитохрома Р-450 и МК, вызывающий увеличение в микросомах печени крыс содержания другого микросомального гемопroteина — цитохрома Р-448 [4]. В экспериментах, проводимых при наличии в инкубационной среде акрилатов, микросом и НАДФ·Н-г.с., скорость образования формальдегида зависела от содержания цитохрома Р-450. Так, при внесении в инкубационную среду микросом печени крыс, индуцированных фенобарбиталом, содержащих в 2,5 раза больше цитохрома Р-450 по сравнению с контролем, отмечалась в 5 раз большая интенсивность генерации формальдегида (табл. 2). Повышение скорости образования формальдегида, но в значительно меньшей степени отмечалось и при использовании микросом от животных, индуцированных МХ.

Использование микросом животных, предварительно получавших хлористый кобальт, содержащих в 2 раза меньшее количество цитохрома Р-450 по сравнению с контролем, приводило к снижению скорости образования формальдегида (см. табл. 2). Предварительное продувание инкубационной

среды, содержащей ММК и микросомы печени контрольных крыс, окисью углерода, ингибирующей каталитическую активность цитохрома Р-450 [1], также приводило к снижению скорости образования формальдегида с 7,0 до 1,8 нмоль на 1 г микросомального белка в 1 мин.

Таким образом, совокупность указанных опытов свидетельствует о ключевой роли цитохрома Р-450 в генерации формальдегида при метаболизме ММА в микросомах печени крыс.

Внесение азида натрия (0,05 мМ) в инкубационную среду, содержащую 30 мМ ММА, НАДФ·Н-г. с. и микросомы печени крыс, предварительно индуцированных ФБ, вызывало резкое уменьшение скорости образования формальдегида с 7,0 до 1,0 нмоль на 1 мг белка в 1 мин. Ввиду того что азид натрия даже в больших концентрациях (до 1,0 мМ) не влияет на каталитическую активность системы микросомальных монооксигеназ [12], нельзя связать этот ингибирующий эффект с подавлением скорости микросомального окисления. Известно, что азид натрия является ингибитором каталазы [10], фермента, в значительном количестве присутствующего во фракции микросом печени [21]. Ингибирование каталазы, принимающей участие в метаболизме метанола [14], очевидно, и является результатом резкого ингибирования образования альдегида в микросомах печени крыс из метанола, образующегося в процессе микросомального гидролиза ММА.

Таким образом, можно сделать вывод, что для образования формальдегида из ММА необходимо наличие метанола, НАДФ·Н-г. с., цитохрома Р-450 и каталазы. Хорошо известно, что система микросомальных монооксигеназ может генерировать перекись водорода, связывающуюся с каталазой. Образующийся при этом комплекс окисляет этанол до ацетальдегида [10—12]. Подобный процесс, очевидно, лежит и в основе образования формальдегида из ММА. Метанол, образующийся в процессе карбоксилэстеразного гидролиза ММА в микросомах печени крыс, окисляется до формальдегида как каталазой, так и цитохромом Р-450.

Авторы выражают благодарность члену-корреспонденту АМН СССР проф. А. И. Арчакову и проф. В. В. Ляховичу за помощь, оказанную в работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. — М., 1975.
2. Арчаков А. И., Девиченский В. М. и др. // Биохимия. — 1968. — Т. 33. — С. 479—485.
3. Ломонова Г. В. // Гигиена, промышленная токсикология и профпатология в производстве полиакрилатов и сырья для них / Под ред. В. М. Благодатина. — М., 1984. — С. 48—56.
4. Мишин В. М., Ляхович В. В. Множественные формы цитохрома Р-450. — Новосибирск, 1985.
5. Метелица Д. И. Активация кислорода ферментными системами. — М., 1982. — С. 168.
6. Alcohol and Health, New Knowledge / Ed. M. E. Chafetz. — Washington, 1974.
7. Dillingham E. O., Lawrence W. H., Autian J. // J. Biomed. Mat. Res. — 1983. — Vol. 17. — P. 945—957.
8. Elovaara E., Kivistö H., Vainio H. // Arch. Toxikol. — 1983, Bd. 53, S. 109—121.
9. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. — Lyon, 1979. — Vol. 19. — P. 187—212.
10. Kladlubar F. F., Morton K. C., Ziegler D. M. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1973. — Vol. 54. — P. 1255—1261.
11. Krisch K. // The Enzymes / Ed. P. D. Boyer. — New York, 1971. — Vol. 5. — P. 43—69.
12. Lu A. Y. H., West S. // Molec. Pharmacol. — 1972. — Vol. 8. — P. 490—500.
13. Lowry O., Rosebrough N., Farz A., Randall R. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
14. Mannerling G. J., Harken V., Makar A. B. et al. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1969. — Vol. 168. — P. 265.
15. Nash T. // Biochem. J. — 1953. — Vol. 55. — P. 416—421.
16. Nousiainen U., Hanninen O. // Acta Pharmacol. (Kbh.) — 1981. — Vol. 49. — P. 77—80.
17. Omura T., Sato R. // J. biol. Chem. — 1964. — Vol. 239. — P. 2370—2378.
18. Teschke R., Hasumura Y., Lieber C. S. // Ibid. — 1975. — Vol. 250. — P. 7397—7404.
19. Thurman R. G., Kenna W. R., Caffey T. B. // Molec. Pharmacol. — 1976. — Vol. 12. — P. 156.
20. Tansy M. F., Hohenleitner F. J., White D. K. et al. // Environ. Res. — 1980. — Vol. 21. — P. 117—125.
21. Thurman R. G. // Molec. Pharmacol. — 1973. — Vol. 9. — P. 670—675.

ROLE OF RAT LIVER MICROSOMAL FRACTION IN METABOLISM OF METHYL METHACRYLATE TO FORMALDEHYDE

Yu. V. Kollosky, A. Yu. Grishanova, V. M. Mishin, G. I. Bachmanova

Medical School, Krasnoyarsk, Institute of Clinical and Experimental Medicine, Siberian Branch of the Academy of Medical Sciences of the USSR, Novosibirsk, II Medical School, Moscow

Rat liver microsomal carboxylesterase catalyzed hydrolysis of butyl methacrylate (BMA), butyl acrylate (BA), methyl acrylate (MA) and methyl methacrylate (MMA). The rate of butanol formation from BA and BMA was 4-fold higher as compared with methanol production

from MA and MMA. Methanol was oxidized to formaldehyde at the next step of microsomal metabolism. The rate of methanol oxidation was increased 2.2-fold after addition of the NADPH-generating system into the incubation medium. In the mixture containing MMA, NADPH-generating system and liver microsomes, preinduced with phenobarbital or methyl cholanthrene, the rate of formaldehyde generation was increased 7- and 2-fold, respectively, as compared with the analogous experiments involving liver microsomes of control rats. Production of methanol and generation of formaldehyde were not detected after incubation of MMA with inactivated microsomes. The microsomal MMA-methanol oxidizing system was inhibited by CO or after addition of microsomes from rats pretreated with CoCl_2 . Sodium azide (0.05 mM) decreased 8-fold the rate of formaldehyde generation.

УДК 616.441-089.87-07:616.36-008.939.6-02:615.357.453

А. Г. Минченко

ОСОБЕННОСТИ ДЕЙСТВИЯ ГИДРОКОРТИЗОНА
НА БИОСИНТЕЗ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ БЕЛКОВ В ПЕЧЕНИ
ТИРЕОИДЭКТОМИРОВАННЫХ КРЫС

НИИ эндокринологии и обмена веществ, Киев

Глюкокортикоидные и тиреоидные гормоны играют важную роль в регуляции биосинтеза РНК и белков в клетках человека и животных, причем они контролируют процессы транскрипции и трансляции не только соответственно в ядре и цитоплазме, но и в митохондриях [3, 5—8, 17, 23, 24, 29, 31]. Кроме того, эти гормоны могут избирательно изменять экспрессию и ядерных, и митохондриальных генов [6, 8—12], непосредственно воздействовать на процессы транскрипции в ядрах и митохондриях, проникая в эти субклеточные структуры в виде комплексов гормон — рецепторов. При этом для многих генов показано взаимодействие таких комплексов с определенными сайтами регуляторных участков генов [4, 14, 16, 18, 19, 26, 34—37]. Действие как глюкокортикоидов, так и тиреоидных гормонов на биосинтез белков многогранно. С одной стороны, эти гормоны изменяют уровень транскрибуемых мРНК и количество компонентов белоксинтезирующей системы, а с другой — непосредственно влияют на аппарат трансляции, изменяя его функциональную активность [1—3, 5, 21, 22, 27, 28, 33], причем это справедливо и для митохондрий [3, 7]. Исследованиями многих авторов установлено, что экспрессия ряда генов контро-

лируется одновременно как глюкокортикоидами, так и тиреоидными гормонами, и поэтому выраженность действия одного из этих гормонов на экспрессию генов зависит от уровня другого гормона, что установлено в экспериментах как *in vivo*, так и на изолированных клетках [3, 13, 16, 17, 25, 32]. Однако до настоящего времени вопрос о зависимости действия глюкокортикоидных гормонов на биосинтез митохондриальных белков, осуществляющийся не только в митохондриях, но и в цитоплазме [3], от уровня других гормонов, в частности тиреоидных, оставался недостаточно изученным. В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение особенностей биосинтеза различных групп митохондриальных белков в клетках печени интактных и тиреоидэктомированных крыс при воздействии гидрокортизона в зависимости от времени его действия.

Методика

Исследования проведены на интактных и тиреоидэктомированных крысах-самцах линии Вистар массой 160—180 г. Тиреоидэктомированных животных брали в эксперимент через 3 нед после операции. Крысам после тотальной тиреоидэктомии давали пить вместо воды 0,2 % раствор хлорида кальция. Интактным и тиреоидэктомированным животным за 15, 30 и 180 мин до декапитации внутривенно

вводили гидрокортизона ацетат (20 мг/кг). Всем крысам за 10 мин до декапитации внутривенно инъецировали ^3H -лейцин (147 Ки/ммоль, «New England Nuclear», Англия) в количестве 50 мкКи на 100 г массы тела. Об интенсивности биосинтеза белков судили по включению меченого лейцина в отдельные фракции белков. Из печени интактных и тиреоидэктомированных крыс выделяли митохондрии, как описано ранее [25]. Митопласты и фракцию наружных мембран, содержащую также межмембранные белки, получали дигитониновым методом [14, 30]. Для получения выделения фракции внутренних мембран и матрикса митохондрий полученные ранее митопласты лизировали 0,6 % раствором дезоксихолата натрия, содержащего 10 мМ NaCl и 10 мМ трис-HCl (рН 7,6), и центрифугировали при 200 000 g в течение 1 ч (ротор Ti-50, центрифуга «Spinco» L2-65B). Митохондриальные белки разделяли также на две фракции по их генетическому происхождению: белки, кодируемые митохондриальной ДНК и синтезируемые в митохондриях, и белки, кодируемые ядерной ДНК и синтезируемые в цитоплазме [20]. Количество белка определяли по Лоури. Для определения радиоактивности полученных фракций белков аликвоты этих фракций наносили на полоски бумаги Ватман 3 ММ, 3 раза отмывали 5 % раствором трихлоруксусной кислоты: 1 раз при 90 °С, 2 раза этанолом и 1 раз эфиром. Фильтры высушивали и просчитывали радиоактивность в толуоловой сцинтилляционной жидкости ЖС-107 с помощью сцинтилляционного спектрометра («Mark III», «Searle Analyt. Inc.», Англия). Результаты, полученные для митохондриальных фракций белков, сопоставляли с таковыми для белков цитоплазмы (20 000 g, надосадочная жидкость). О величине цитоплазматического пула меченого лейцина судили по величине кислоторастворимой радиоактивности в постмитохондриальной (20 000 g) надосадочной жидкости. Результаты обрабатывали статистически.

Результаты и обсуждение

Под влиянием гидрокортизона интенсивность включения меченого лейцина в белки митохондрий печени интактных крыс существенно увеличивается в первые 15 мин действия глюкокортикоидного гормона (рис. 1). Эти изменения в интенсивности биосинтеза митохондриальных белков аналогичны отмечаемым в цитоплазме. Усиление включения меченого лейцина в белки митохондрий и цитоплазмы печени интактных крыс, отмечаемое на 15-й минуте действия гидрокортизона, снижается через 30 мин после введения этого гормона животным практически до исходного уровня. Через 3 ч после введения глюкокортикоидного гормона интактным животным включение ^3H -лейцина в белки митохондрий и цитоплазмы существенно не изменяется по сравнению с таковым у контрольных жи-

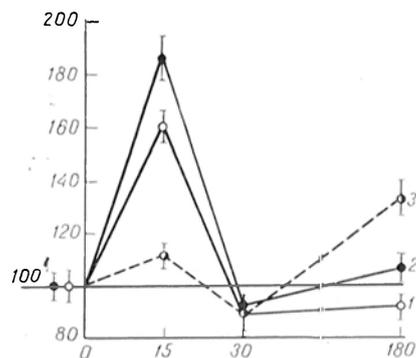


Рис. 1. Включение ^3H -лейцина в митохондриальные (1) и цитоплазматические (2) белки, а также в цитоплазматический кислоторастворимый пул (3) в клетках печени интактных крыс.

Здесь и на рис. 2—6: по оси абсцисс — время действия гидрокортизона (в мин), по оси ординат — включение ^3H -лейцина в белки и пул (% за 100% принято включение ^3H -лейцина у крыс, которым гидрокортизон не вводили); приведены средние данные 3 независимых экспериментов.

вотных, не получавших гормон. Следует отметить, что величина цитоплазматического пула меченого лейцина в печени интактных крыс существенно не изменялась в первые 30 мин действия гидрокортизона, но была заметно увеличенной через 3 ч после введения гормона интактным животным (см. рис. 1). В то же время у адrenaлэктомированных животных интенсивность биосинтеза митохондриальных и цитоплазматических белков печени усиливается после введения гидрокортизона не только через 15 мин, но и через 3 ч, т. е. двухфазно [9, 10]. Пул меченого лейцина в цитоплазме клеток печени как адrenaлэктомированных, так и интактных животных увеличивается только через 3 ч после введения глюкокортикоидного гормона. Таким образом, у интакт-

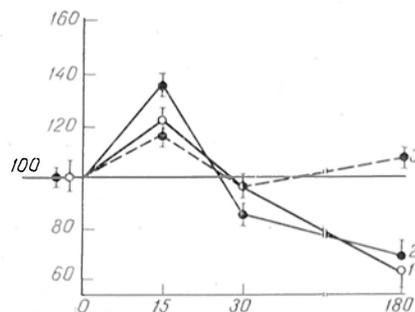


Рис. 2. Включение ^3H -лейцина в митохондриальные (1) и цитоплазматические (2) белки, а также в цитоплазматический кислоторастворимый пул (3) в клетках печени тиреоидэктомированных крыс.

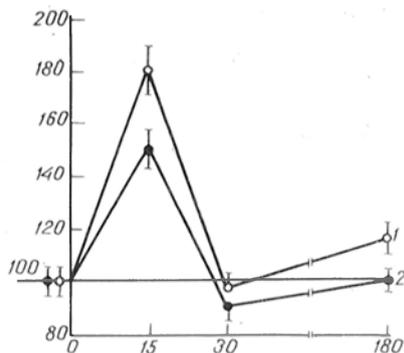


Рис. 3. Включение ³H-лейцина в митохондриальные белки митохондриального (1) и ядерного (2) кодирования в клетках печени интактных крыс.

ных животных интенсивность биосинтеза митохондриальных и цитоплазматических белков усиливается через 15 мин после введения гидрокортизона при отсутствии изменений в величине цитоплазматического пула меченого лейцина, а через 3 ч после введения глюкокортикоидного гормона интенсивность биосинтеза митохондриальных и цитоплазматических белков не увеличивается, несмотря на повышение пула меченых предшественников в цитозоле клеток печени.

Изучение влияния гидрокортизона на биосинтез митохондриальных белков в печени тиреоидэктомированных крыс показало, что у этих животных включение меченого лейцина в белки митохондрий также усиливается на 15-й минуте действия глюкокортикоидного гормона, но эти изменения выражены в меньшей степени, чем у интактных животных (рис. 2). Через 3 ч после введения тиреоидэктомированным крысам гидрокортизона интенсивность биосинтеза митохондриальных белков оказывается существенно сниженной

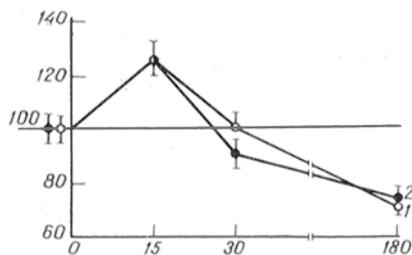


Рис. 4. Включение ³H-лейцина в митохондриальные белки митохондриального (1) и ядерного (2) кодирования в клетках печени тиреоидэктомированных крыс.

(см. рис. 2). Цитоплазматический пул меченого лейцина в печени тиреоидэктомированных крыс несколько увеличивается в первые 15 мин действия гидрокортизона, а затем снижается, и через 30 мин и 3 ч после введения гормона его величина существенно не отличается от величины у не получавших гидрокортизон тиреоидэктомированных животных. Под влиянием гидрокортизона интенсивность биосинтеза цитоплазматических белков в печени тиреоидэктомированных крыс изменяется таким же образом, как и биосинтез митохондриальных белков (см. рис. 2). Таким образом, из данных, приведенных на рис. 1 и 2, следует, что у тиреоидэктомированных животных снижается первичная реакция трансляционного аппарата в клетках печени на воздействие глюкокортикоидного гормона, что выражается в интенсификации биосинтеза цитоплазматических и митохондриальных белков, а в более отдаленные сроки действия гидрокортизона (через 3 ч) интенсивность биосинтеза митохондриальных и цитоплазматических белков подавляется только у тиреоидэктомированных животных.

Для более детального выяснения особенностей действия глюкокортикоидных гормонов на биосинтез митохондриальных белков при гипотиреозе были проведены исследования на отдельных фракциях митохондриальных белков. Известно, что митохондрии состоят из двух групп белков, различающихся по происхождению. Синтез большей части митохондриальных белков кодируется ядерным геномом и осуществляется на цитоплазматических полисомах, а около 10% митохондриальных белков синтезируется внутри органелл на митохондриальных полисомах за счет информации, закодированной в ДНК митохондрий [3, 9]. Разделение митохондриальных белков на эти две группы показало, что интенсивность их биосинтеза изменяется по-разному при воздействии гидрокортизоном на интактных и тиреоидэктомированных крыс (рис. 3 и 4). Так, включение меченого лейцина в митохондриальные белки, синтезируемые в цитоплазме клеток печени, усиливается под влиянием гидрокортизона как у интактных, так и у тиреоидэктомированных крыс на 15-й минуте действия гормона, но у тиреоидэктомированных животных эффект глюкокортикоидного

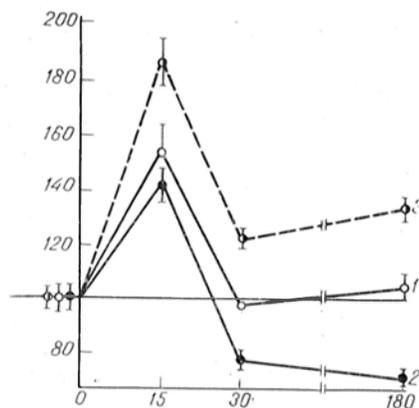


Рис. 5. Включение ^3H -лейцина в белки матрикса (1), наружных (2) и внутренних (3) мембран митохондрий печени intactных крыс.

гормона выражен в значительно меньшей степени: у intactных крыс включение ^3H -лейцина увеличивается на 50 %, а у гипотиреоидных — на 26 %. В последующие 15 мин действия гидрокортизона интенсивность биосинтеза этой группы митохондриальных белков снижается до исходного уровня, а через 3 ч после введения животным глюкокортикоидного гормона данный показатель существенно не изменяется у intactных крыс и понижается на 26 % у тиреоидэктомированных животных. Биосинтез митохондриальных белков митохондриального кодирования в печени intactных и тиреоидэктомированных крыс увеличивается под влиянием гидрокортизона на 15-й минуте действия гормона, но и в данном случае эффект глюкокортикоидов выражен в значительно большей степени у intactных животных. Следует также отметить, что у intactных крыс через 15 мин после введения гидрокортизона включение меченого лейцина в митохондриальные белки митохондриального кодирования увеличивается в большей степени, чем в митохондриальные белки ядерного кодирования, в то время как у тиреоидэктомированных крыс эффект гидрокортизона на биосинтез этих двух групп митохондриальных белков выражен практически в равной мере. Имеются отличия и в направленности изменений биосинтеза митохондриальных белков ядерного и митохондриального кодирования у intactных и тиреоидэктомированных крыс под влиянием гидрокортизона, которые выявляются через 3 ч после введения гор-

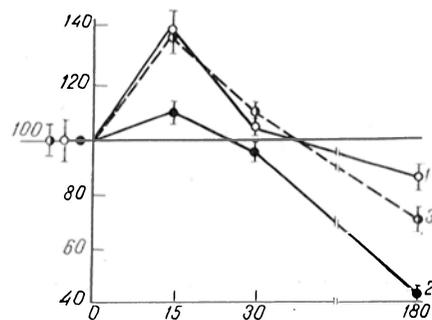


Рис. 6. Включение ^3H -лейцина в белки матрикса (1), наружных (2) и внутренних (3) мембран митохондрий печени тиреоидэктомированных крыс.

мона: у тиреоидэктомированных животных включение ^3H -лейцина в митохондриальные белки обеих групп снижается, у intactных же крыс включение меченого лейцина в белки, кодируемые митохондриальным геномом, увеличивается, а включение в белки, синтезируемые в цитоплазме для митохондрий, не изменяется. В то же время у адреналэктомированных животных, как было показано ранее [3, 9], интенсивность биосинтеза митохондриальных белков митохондриального и ядерного кодирования изменяется под влиянием гидрокортизона двукратно, синхронно и однонаправленно, причем максимальное повышение интенсивности биосинтеза митохондриальных белков отмечается на 15-й минуте и 3-м часу действия глюкокортикоидного гормона.

Учитывая различную функциональную роль митохондриальных белков, локализованных в матриксе, наружной и внутренней мембранах органелл, представляло существенный интерес исследовать особенности влияния гидрокортизона на биосинтез этих групп митохондриальных белков у intactных и тиреоидэктомированных крыс. Ранее было показано [9, 10], что у адреналэктомированных животных интенсивность биосинтеза белков матрикса, наружной и внутренней мембран митохондрий усиливается под действием гидрокортизона дважды: на 15-й минуте и 3-м часу действия гормона, причем изменения в интенсивности биосинтеза всех этих групп митохондриальных белков происходят синхронно и однонаправленно. Как видно на рис. 5, интенсивность биосинтеза белков матрикса, наружной и внутренней мембран

митохондрий печени интактных крыс усиливается на 15-й минуте действия глюкокортикоидного гормона, причем в наибольшей степени изменяется биосинтез белков внутренней мембраны органелл. Интенсивность биосинтеза белков матрикса и наружной мембраны митохондрий в клетках печени интактных крыс изменяется под влиянием гидрокортизона в значительно меньшей степени.

Тот факт, что под действием гидрокортизона в большей мере усиливается биосинтез белков внутренней мембраны митохондрий по сравнению с другими белками органелл, согласуется с данными, приведенными на рис. 3, где показано более выраженное действие глюкокортикоидного гормона на биосинтез тех митохондриальных белков, которые кодируются митохондриальным геномом. Обусловлено это тем, что основная масса синтезируемых в митохондриях белков сосредоточена именно во внутренней мембране органелл [8].

На рис. 5 также видно, что выраженное индуцирующее действие гидрокортизона на биосинтез митохондриальных белков в печени интактных крыс является кратковременным и что через 30 мин после введения гормона животным включение ^3H -лейцина в белки матрикса, наружной и внутренней мембран митохондрий значительно понижается по сравнению с таковым на 15-й минуте действия гормона и сохраняется на этом уровне и через 3 ч после введения глюкокортикоидного гормона.

На рис. 6 видно, что у тиреоидэктомированных крыс стимулирующее действие гидрокортизона на биосинтез белков матрикса, внутренней и наружной мембран митохондрий печени выражено в значительно меньшей степени, чем у интактных животных, причем включение меченого лейцина в белки матрикса и внутренних мембран митохондрий печени тиреоидэктомированных крыс увеличивается под влиянием гидрокортизона практически в равной степени, а у интактных крыс — в большей мере в белки внутренней мембраны. У тиреоидэктомированных крыс на 3-м часу действия гидрокортизона отмечается резкое снижение интенсивности биосинтеза белков наружной мембраны митохондрий и в меньшей мере

белков внутренней мембраны и матрикса митохондрий печени.

Полученные данные указывают на то, что выраженность и направленность изменений интенсивности биосинтеза митохондриальных белков в клетках печени при воздействии глюкокортикоидного гормона в значительной степени определяется уровнем тиреоидных гормонов в организме. Во-первых, при недостатке тиреоидных гормонов в организме значительно снижается выраженность индуцирующего действия глюкокортикоидного гормона на биосинтез различных групп митохондриальных белков, синтезируемых как в митохондриях, так и в цитоплазме. Во-вторых, у тиреоидэктомированных крыс под влиянием глюкокортикоидных гормонов интенсивность биосинтеза различных групп митохондриальных белков снижается через 3 ч после введения гормона в значительно большей степени, чем у интактных крыс. В-третьих, степень выраженности изменений интенсивности биосинтеза отдельных групп митохондриальных белков в клетках печени под влиянием глюкокортикоидных гормонов существенно различается у интактных и тиреоидэктомированных животных.

Ранее было показано [12], что у тиреоидэктомированных крыс под влиянием гидрокортизона интенсивность биосинтеза митохондриальных и цитоплазматических РНК изменяется в меньшей степени, чем у интактных животных, причем через 3 ч после введения животным гормона включение меченого предшественника в митохондриальные РНК было выше, а в цитоплазматические РНК — ниже, чем у крыс, не получавших гормон. Это согласуется с представленными в данной работе результатами об увеличении под влиянием гидрокортизона биосинтеза белков митохондриального кодирования на 3-м часу действия гормона и снижении в это же время биосинтеза белков наружной мембраны митохондрий.

Таким образом, гидрокортизон влияет на биосинтез митохондриальных белков в клетках печени крыс, но выраженность и направленность его действия изменяются во времени и существенно зависят от уровня тиреоидных гормонов в организме.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адылова А. Т., Гарафутдинова Е. А., Петрова О. С., Абдукаримов А. // Пробл. эндокринологии. — 1986. — № 2. — С. 74—76.
2. Верецагина Г. В., Трапкова А. А. // Успехи совр. биол. — 1984. — Т. 97, № 3. — С. 447—457.
3. Комиссаренко В. П., Минченко А. Г., Тронько П. Д. Молекулярные механизмы действия стероидных гормонов. — Киев, 1986.
4. Меркулова Т. И., Соловьев В. В., Колчанов И. А. и др. // Биополимеры и клетка. — 1986. — Т. 2, № 2. — С. 93—101.
5. Мертвцов И. П. Гормональная регуляция экспрессии генов. — Новосибирск, 1986.
6. Минченко А. Г. // Пробл. эндокринологии. — 1981. — № 6. — С. 74—79.
7. Минченко А. Г. // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической эндокринологии. — Киев, 1982. — С. 61—62.
8. Минченко А. Г. // Успехи совр. биол. — 1983. — Т. 96, № 1 (4). — С. 54—68.
9. Минченко А. Г. // Пробл. эндокринологии. — 1984. — № 6. — С. 46—49.
10. Минченко А. Г. // Биохимические механизмы регуляции генетической активности. — Киев, 1984. — С. 78—79.
11. Минченко А. Г. // Структура и функции клеточного ядра. — Пуццано, 1984. — С. 219—220.
12. Минченко А. Г. // Пробл. эндокринологии. — 1987. — № 1. — С. 48—51.
13. Минченко А. Г. // Фармакол. и токсикол. — 1987. — № 2. — С. 71—73.
14. Abraham A. K., Vedeler A., Reistad R., Pihl A. // Exp. Cell. Res. — 1981. — Vol. 132. — P. 265—272.
15. Anselmetti A., Bismuth J., Torresani J. // Biochim. biophys. Acta. — 1983. — Vol. 739. — P. 291—300.
16. Diamond D. J., Goodman H. M. // J. molec. Biol. — 1985. — Vol. 181. — P. 31—62.
17. Groot C. J. de, Zonneveld D., de Laaf R. T. M. et al. // Biochim. biophys. Acta. — 1986. — Vol. 866. — P. 61—67.
18. Gustafsson J.-A., Carlstedt-Duke J., Okret S. et al. // J. Steroid Biochem. — 1984. — Vol. 20. — P. 1—4.
19. Hutchison J. S., Winberry L., Nakayama R. et al. // Biochim. biophys. Acta. — 1984. — Vol. 781. — P. 30—38.
20. Kitagawa Y., Sugimoto E. // J. Biochem. (Tokyo). — 1980. — Vol. 88. — P. 689—693.
21. Kulkarni S. B., Netrawali M. S., Pradhan D. S., Sreenivasan A. // Molec. cell. Endocr. — 1976. — Vol. 4. — P. 195—203.
22. Lan N. C., Karin M., Nguyen T. et al. // J. Steroid Biochem. — 1984. — Vol. 20. — P. 77—88.
23. Magnuson M. A., Dozin B., Nikodem V. M. // J. biol. Chem. — 1985. — Vol. 260. — P. 5906—5912.
24. Minchenko A. G., Germanyuk Ya. I. // Endocr. exp. — 1984. — Vol. 18. — P. 3—18.
25. Meisner H., Loose D. S., Hanson R. W. // Biochemistry (Wash.). — 1985. — Vol. 24. — P. 421—425.
26. Mooradian A. D., Schwartz H. L., Mariash C. N., Oppenheimer J. H. // Endocrinology. — 1985. — Vol. 117. — P. 2449—2456.
27. Moshage H. J., Haard H. J. W. de, Princen H. M. G., Yap S. H. // Biochim. biophys. Acta. — 1985. — Vol. 824. — P. 27—33.
28. Mueckler M. M., Moran S., Pitot H. C. // J. biol. Chem. — 1984. — Vol. 259. — P. 2302—2305.
29. Nelson B. D., Mutvei A., Joste V. // Arch. Biochem. — 1984. — Vol. 228. — P. 41—48.
30. Niranjani B. G., Avadhani N. G. // J. biol. Chem. — 1980. — Vol. 255. — P. 6575—6578.
31. Oppenheimer J. H. // Ann. intern. Med. — 1985. — Vol. 102. — P. 374—384.
32. Recupero A. R., Coleoni A. H., Cherubini O., Oviedo A. // Acta endocr. (Kbh.). — 1983. — Vol. 104. — P. 485—489.
33. Rousseau G. G. // Biochem. J. — 1984. — Vol. 224. — P. 1—12.
34. Shupnik M. A., Ardisson L. J., Meskell M. J. et al. // Endocrinology. — 1986. — Vol. 118. — P. 367—371.
35. Sterling K., Campbell G. A., Brenner M. A. // Acta endocr. (Kbh.). — 1984. — Vol. 105. — P. 391—397.
36. Tata J. R. // Nature. — 1982. — Vol. 298. — P. 707—708.
37. Tsawdaroglou N. H., Tzavaras T., Sekeris C. E. // J. Steroid Biochem. — 1984. — Vol. 20. — P. 295—300.

Поступила 04.10.87

EFFECT OF HYDROCORTISONE ON BIOSYNTHESIS OF MITOCHONDRIAL PROTEINS IN LIVER TISSUE OF THYROIDECTOMIZED RATS

A. G. Minchenko

Institute of Endocrinology and Metabolism,
Kiev

Biosynthesis of different groups of mitochondrial proteins was studied in liver cells of control and thyroidectomized rats after hydrocortisone administration. The hormone augmented protein biosynthesis in liver mitochondria within 15 min but the effect was less distinct in thyroidectomized rats. After hydrocortisone administration into intact rats the rate of liver mitochondrial proteins biosynthesis, coded by mitochondrial genes, was considerably higher as compared with those effects of nuclear genes, while biosynthesis of mitochondrial proteins was similarly increased in thyroidectomized rats. Hydrocortisone stimulated protein biosynthesis in matrix, inner and outer mitochondrial membranes of intact and thyroidectomized rats, whereas the biosynthesis was altered less distinctly in outer membranes. These data suggest that the effect of hydrocortisone on biosynthesis of proteins in mitochondria depended on content of thyroid hormones.

Л. А. Щербакова, Ю. С. Татаринев, В. В. Калашиников, В. А. Мурашов,
Г. О. Олефиренко, Д. Д. Петрунин

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ α_2 -МИКРОГЛОБУЛИНА ФЕРТИЛЬНОСТИ У ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И ПРИ ОНКОГИНЕКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

И ММИ им. Н. И. Пирогова

α_2 -Микроглобулин фертильности (АМГФ) — индивидуальный протеин, специфичный для репродуктивной системы как мужчин, так и женщин. АМГФ был идентифицирован в качестве органоспецифического антигена плаценты, секретируемого в амниотическую жидкость [3]. Этот белок был охарактеризован физико-химически и выделен в чистом виде [6], а позднее дополнительно обнаружен в сперме, семенных пузырьках, менструальной крови и эндометрии в секреторной фазе менструального цикла [4], в связи с чем он и получил свое название [5, 8].

Установлен синтез АМГФ децидуальной тканью, и на основе косвенных данных высказано предположение о ферментативной роли АМГФ (специфическая фосфолипаза A_2) в синтезе простагландинов [4, 5, 7]. В пользу этого предположения свидетельствуют также результаты опытов, в которых было обнаружено выраженное тромбагрегирующее действие препарата АМГФ на кровяные пластинки [2].

Иммунохимически идентичный АМГФ антиген был описан под названиями «маточный α -глобулин» [13], «прогестеронзависимый эндометриальный протеин» [11] и «плацентарный протеин 14» [9]. Доказательства иммунологической идентичности перечисленных белков были получены в результате серии последовательных сопоставлений [9, 12, 14].

В связи с низким содержанием АМГФ в сыворотке крови возникает необходимость разработки для определения этого белка высокочувствительных методов анализа — радиоиммунологического и иммуноферментного (ИФМ). Радиоиммунологические методы определения этого белка были разработаны [10, 12], однако не все они обладали достаточной чувствительностью для выявления АМГФ в

сыворотке крови мужчин и небеременных женщин [10].

Целью настоящей работы явились разработка высокочувствительного ИФМ определения АМГФ и сравнительные исследования его уровня в сыворотке крови доноров и некоторых групп больных. Основное внимание уделялось содержанию АМГФ у страдающих онкогинекологическими заболеваниями.

Методика

В разработке ИФМ можно выделить 3 основных момента: получение моноспецифической антисыворотки и выделение антител; приготовление конъюгата антител с ферментом; отработка метода. Антисыворотку к АМГФ готовили путем иммунизации кроликов препаратом АМГФ, выделенным из экстракта децидуальной ткани, получаемой при абортax. Методика очистки АМГФ адсорбционной хроматографией на силикагеле в комбинации с солевым осаждением описана ранее [6]. Антитела к АМГФ выделяли из моноспецифической антисыворотки с помощью антигенного иммуносорбента, полученного путем иммобилизации препарата АМГФ на цианбромированной сефарозе. Выделенные антитела (элюированные с иммуносорбента глицин-сернистым буфером, рН 2,4) использовали для иммобилизации на твердой фазе (плашки из полистирола для культуры ткани 3040-11™, «Falcon», США) и для приготовления конъюгата антител с ферментом (пероксидаза хрена тип 6, «Sigma», США). Детально методика проведения ИФМ описана ранее [1].

Результаты и обсуждение

Предел чувствительности разработанного ИФМ определения АМГФ составил в наших условиях 4 нг антигена в 1 мл сыворотки. Как видно из таблицы, концентрация АМГФ в сыворотке крови у всех обследованных здоровых мужчин-доноров составляла 8—20 нг/мл, в связи с чем указанную величину можно принять за норму. Верхняя граница нормального уровня в сыворотке крови АМГФ у женщин выше — до 40 нг/мл, причем у всех

Иммуноферментное определение АМГФ в сыворотке крови

Диагноз	n	Содержание АМГФ, нг/мл					
		4—8	8—20	20—40	40—80	80—160	160—320
Рак яичников	18	0	10	5	1	0	2
Рак матки	48	0	35	6	7	0	0
Миома матки	15	0	14	1	0	0	0
Рак молочной железы	4	0	4	0	0	0	0
Рак мочевого пузыря	8	0	8	0	0	0	0
Рак почки	28	0	27	1	0	0	0
Рак желудка	24	0	24	0	0	0	0
Рак легкого	16	0	16	0	0	0	0
Рак печени	15	0	15	0	0	0	0
Рак толстой кишки	34	0	34	0	0	0	0
Цирроз печени	13	0	13	0	0	0	0
Псориаз	34	0	33	1	0	0	0
Рассеянный склероз	26	0	21	5	0	0	0
Доноры-мужчины (контроль)	151	0	151	0	0	0	0
Доноры-женщины (контроль)	130	0	112	18	0	0	0

Примечание. Указано число обследованных.

женщин с содержанием АМГФ 20—40 нг/мл была секреторная фаза менструального цикла.

Повышение уровня сывороточного АМГФ во вторую фазу менструального цикла коррелирует с динамикой содержания этого белка в ткани эндометрия [4, 10]. В пролиферативной фазе уровень АМГФ соответствует таковому у мужчин. Установленные границы нормального содержания АМГФ в сыворотке крови (8—20 нг/мл у мужчин и 8—40 нг/мл у женщин) могут служить в качестве контроля при оценке диагностического значения теста на этот белок при различных патологических состояниях.

Как видно из таблицы, из 18 женщин, страдающих раком яичников, превышение верхней границы нормы зарегистрировано у 3 (15%), причем у 2 женщин содержание АМГФ в сыворотке крови было увеличено в 15 раз по сравнению со средним уровнем у здоровых женщин. Кроме того, повышенный уровень АМГФ в сыворотке крови выявлен также у 7 (15%) женщин, страдающих раком матки.

В то же время отмечен нормальный уровень АМГФ в сыворотке крови у всех больных раком почки, желудка, мочевого пузыря, молочной железы, толстой кишки, легкого и печени, так же как и у обследованных неонкологических больных (см. таблицу).

Особо следует указать, что, начиная с уровня 8 нг/мл, АМГФ выявлялся у всех обследованных, как здоровых (281 донор), так и больных (387).

Не совсем ясно, синтезируется ли АМГФ дополнительно тканями самой опухоли в случаях, когда уровень этого белка повышен (рак яичников, матки) или же его высокая концентрация в сыворотке крови обусловлена какими-то общими гормональными сдвигами, вызванными развитием опухоли. В предшествующей работе, определяя АМГФ с помощью ИФМ в экстрактах опухолевой ткани различного происхождения, мы выявили АМГФ при хориоэпителиоме, раке яичника и матки [15]. Представляется весьма вероятным, что источником повышения уровня АМГФ в сыворотке крови являются те опухоли, которые сами синтезируют этот белок.

Для выяснения возможности использования теста на АМГФ при дифференциальной диагностике онкогинекологических заболеваний необходимо проведение дальнейшего изучения динамики концентраций этого белка в сыворотке крови больных в процессе их лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Калашников В. В., Фалалеева Д. М., Тагарин Ю. С. // Экспер. онкол. — 1982. — № 5. — С. 47—50.
2. Первова Т. В. // Акуш. и гин. — 1986. — № 1. — С. 66—69.

3. Петрунин Д. Д., Грязнова И. М., Петрунина Ю. А., Татаринцов Ю. С. // Бюл. экскпер. биол. — 1976. — № 7. — С. 803—804.
4. Петрунин Д. Д., Козляева Г. А., Меснякина И. В., Шевченко О. П. // Акуш. и гин. — 1980. — № 3. — С. 22—23.
5. Петрунин Д. Д., Козляева Г. А., Татаринцов Ю. С. и др. // Там же. — 1981. — № 6. — С. 16—17.
6. Петрунин Д. Д., Козляева Г. А., Татаринцов Ю. С., Шевченко О. П. // Вопр. мед. химии. — 1980. — № 5. — С. 711—713.
7. Петрунин Д. Д., Олефиренко Г. А., Цыгарева Т. М., Шевченко О. П. // Акуш. и гин. — 1982. — № 7. — С. 23—25.
8. Татаринцов Ю. С., Олефиренко Г. А., Петрунин Д. Д. // Успехи совр. биол. — 1985. — № 6. — С. 465—472.
9. Bohn H. // Ric. clin. lab. — 1982. — Vol. 12. — P. 221—230.
10. Joshi S. G., Bank J. F., Szarowski D. H. // J. clin. Endocr. — 1981. — Vol. 52. — P. 1185—1192.
11. Joshi S. G., Ebert K. M., Swartz D. P. // J. Reprod. Fertil. — 1980. — Vol. 59. — P. 273—285.
12. Julkunen M., Bohn H., Seppala M. // International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine: Annual Meeting, 13th. — Paris, 1985. — P. 101.
13. Sulcliffe R. G., Brock D. G. H., Nicholson L. V. B., Dunn E. J. // J. Reprod. Fertil. — 1978. — Vol. 54. — P. 85—90.
14. Sulcliffe R. G., Joshi S. G., Paterson W. P., Bank J. F. // Ibid. — 1982. — Vol. 65. — P. 207—209.
15. Tatarinov Y. S., Kozljaeva G. A., Petrunin D. D., Petrunina Y. A. // The Human Placenta / Ed. A. Klopffer et al. — London, 1980. — P. 35.

Поступила 08.09.87

IMMUNOENZYMATIC ANALYSIS OF THE FERTILITY α_2 -MICROGLOBULIN IN VARIOUS DOSEASES AND UNDER NORMAL STATE

L. A. Scherbakova, Yu. S. Tatarinov, V. V. Kalashnikov, V. A. Murashov, G. A. Olefirenko, D. D. Petrunin

II Medical School, Moscow

Immunoenzymatic procedure is developed for estimation of fertility α_2 -microglobulin. Content of the protein was increased in blood serum of patients with carcinoma of ovary and uterus as well as with chorionepithelioma. The immunoenzymatic analysis of fertility α_2 -microglobulin might be used as an additive test in diagnosis of these diseases.

УДК 616.1-008.64-07:616.453-008.6:577.175.539

Л. И. Надольник, Э. А. Галицкий, В. В. Белуга, В. В. Виноградов

ВЫДЕЛЕНИЕ И СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСКОРТИНА КРЫСЫ В НОРМЕ И ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ КРОВООБРАЩЕНИЯ

Институт биохимии АН БССР, Гродно

Важнейшим фактором в формировании адаптационно-приспособительных реакций организма наряду с функциональным состоянием коры надпочечников является связывающая способность белков крови по отношению к стероидным гормонам.

Специфическое связывание кортикостероидных гормонов в плазме крови человека и позвоночных обусловлено присутствием в ней кортикостероидсвязывающего глобулина (КСГ) [15, 24], который, образуя с глюкокортикоидами прочные и обратимые комплексы, временно выключает их из сферы метаболизма [9, 20]. Белковосвязанные кортикостероиды создают лабильный гормональный резерв, который при экстремальных состояниях организма может быть использован для реализации биологического эффекта.

Поэтому вопрос о гормон-белковых взаимодействиях при физиологических

и патологических состояниях требует детального изучения и занимает важное место в современных исследованиях стресса [4, 22] и адаптивных реакций, сопровождающих развитие патологических процессов [6, 10].

Проведенные нами ранее исследования [5] показали, что у больных гипертензивной болезнью и ишемической болезнью сердца в динамике развития недостаточности кровообращения нарушается комплексообразование 11-оксикортикостероидов с транскортином в опытах *in vitro*. Сходные данные получены и другими авторами при исследовании больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями [6, 7, 10].

В данной работе проведено сравнительное исследование структурно-функциональных свойств транскортина, выделенного в гомогенном состоянии из плазмы интактных крыс и животных с экспериментальной недоста-

точностью кровообращения в целях выявления причин аномальной связывающей способности КСГ при данном заболевании.

Методика

Опыты проводили на белых беспородных крысах-самках массой 110—140 г. Недостаточность кровообращения моделировали коарктацией брюшной аорты. Для выделения транскортина использовали гепаринизированную плазму, которую получали декапитацией животных через 13 нед после операции.

В работе применяли кортизол, активированный уголь «Norit А», 2-меркаптоэтанол, додецилсульфат натрия, диализные трубки «Visking» («Serva», ФРГ); 1,2,6,7-³H-кортизол («Amersham», Великобритания); трис-(оксиметил)аминометан, набор реактивов для электрофореза в ПААГ («Reanal», ВПР); сефарозу CL 4B («Pharmacia», Швеция); набор стандартных белков для определения молекулярной массы («Boehringer», ФРГ).

Для выделения и очистки транскортина использовали биоспецифическую хроматографию на кортизол-сефарозе, синтезированной по ранее описанному способу [1]. 350—400 мл плазмы крови, не содержащей стероидов, инкубировали с 15—20 мл кортизол-сефарозы при 4 °С в течение 10—12 ч. Балластные белки удаляли промыванием сорбента при 2 °С 0,05 М натрий-фосфатным буфером рН 6,8, содержащим 0,2 М NaCl и элюировали адсорбированные белки тем же буфером, содержащим 12 мг/мл кортизола. Элюат концентрировали до объема 5—7 мл ультрафильтрацией, диализовали против 0,001 М натрий-фосфатного буфера рН 6,8 и хроматографировали на гидроксиланатите со скоростью 24 мл/ч.

Для определения кажущейся молекулярной массы (M_r) транскортина использовали электрофорез в 10 % ПААГ с додецилсульфатом натрия в присутствии 2-меркаптоэтанола [27], в качестве маркеров использовали альбумин человека, лактатдегидрогеназу, пируваткиназу, тринсин. Белки фиксировали в 10 % ТХУ и окрашивали 0,04 % кумасси бриллиантовым голубым в 3,5 % HClO₄. Электрофорез нативного КСГ проводили в 7,5 % ПААГ при рН 8,3. Для определения активности перед электрофорезом белковые пробы предварительно инкубировали со следовыми количествами ³H-кортизола. После электрофореза трубки геля разрезали на зоны толщиной 2 мм, измеряли их радиоактивность и соотносили с окрашенными

белковыми зонами на неразрезанных трубках. Изоэлектрическое фокусирование проводили в полиол-боратной системе в градиенте рН 4,0—8,0 [11].

Параметры связывания изучали методом равновесного диализа и твердофазной адсорбции на угле в 0,05 М трис-буфере рН 7,5, содержащем 10 мМ дитиотрейтол. В диализные мешочки вносили по 0,5 мл белкового раствора. Мешочки помещали во флаконы, содержащие 12 мл буфера. Во внешний раствор добавляли 0,25 мкКи ³H-кортизола и возрастающие количества нерадиоактивного стероида (0,5—1280 нг). Диализную систему выдерживали при 4 °С в течение 72 ч. Затем отбирали 0,2 мл из внутреннего и 1,0 мл из внешнего растворов и измеряли радиоактивность. Расчет основных параметров производили по формулам [25].

Твердофазную адсорбцию свободного стероида 0,5 % углем, покрытым декстраном, проводили после уравнивания следовых количеств радиоактивного стероида в растворе (1 мл) эквимольного комплекса транскортин — кортизол в стандартном буфере [12].

Измерение радиоактивности образцов проводили в диоксановом сцинтиляторе Брея [13] на жидкостном сцинтиляционном спектрометре Magk-11 («Nuclear Chicago», США) с эффективностью счета по тритию около 29 %. Расчет константы ассоциации с кортизолом (K_a) и количество связывающих мест (n, в молях кортизола на 1 моль белка) проводили в координатах Скэтчарда [23]. Зависимость связывания от рН изучали методом равновесного диализа в 0,05 М трис-буфере, рН доводили HCl.

Гидроксиланатит готовили по методу А. Тиэлиуса и соавт. [26]. Концентрацию белка определяли по Лоури [18].

Спектры кругового дихроизма регистрировали в спектрополяриметре «Jasco J-20». Молярную эллиптичность (θ) рассчитывали по молярной концентрации белка в 0,005 М натрийфосфатном буфере рН 6,8.

Результаты и обсуждение

Из плазмы крови интактных крыс и животных с выраженной недостаточностью кровообращения выделяли КСГ по методу, описанному ранее для транскортина человека [2], включающему в себя две стадии: 1) биоспецифическую хроматографию на корти-

Таблица 1

Выделение транскортина из плазмы интактных крыс

Стадия очистки	Общий белок, мг	Кортизол, связанный белком, пмоль	Выход на каждой стадии, %	Удельная активность, пмоль кортизола на 1 мг белка	Степень очистки
Плазма (I)	35 342	692,3	100	1,835 · 10 ⁻³	1,0
Аффинная хроматография (II)	7,599	10,16	2,29 · 10 ⁻²	0,736	401,08
Хроматография на гидроксиланатите (III)	0,7537	7,4	66,37	9,818	5350,4

Примечание. Здесь и в табл. 2 выход белка на III стадии рассчитан по отношению ко 2-й.

Выделение транскортина из плазмы крыс с недостаточностью кровообращения

Стадия очистки	Общий белок, мг	Кортизол, связанный белком, нмоль	Выход на каждой стадии, %	Удельная активность, нмоль кортизола на 1 мг белка	Степень очистки
Плазма	25 770	470,5	100	$1,661 \cdot 10^{-3}$	1,0
Аффинная хроматография	10,51	2,029	$4,862 \cdot 10^{-3}$	0,193	153,79
Хроматография на гидроксиланатите	0,6464	1,46	73,60	2,260	301,20

зол-сефарозе и 2) хроматографию на гидроксиланатите.

Транскортин получали в виде комплекса с кортизолом, поскольку, по данным ряда авторов [2, 19], при потере стероида белок агрегирует с утратой специфической активности уже в течение первых суток, причем особой склонностью к полимеризации характеризуется транскортин крысы [14].

Данные по выделению КСГ представлены в табл. 1 и 2. Белок, выделенный из плазмы интактных животных, очищен в 5350 раз, удельная активность его составляет 9,8 нмоль кортизола на 1 мг белка. Удельная активность КСГ, выделенного из плазмы жи-

вотных с недостаточностью кровообращения, оказалась в 4,3 раза ниже.

Полученные белковые препараты давали одну полосу на электрофореграммах при электрофорезе в 7,5 % ПААГ, рН 8,3 (рис. 1) в зоне α -глобулинов. После электрофореза сравниваемые белки сохраняли свою активность, белковый максимум и максимум активности совпадали (рис. 1). Электрофорез очищенного КСГ, восстановленного 2-меркаптоэтанолом в 10 % ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия, также выявил одну белковую полосу у обоих белков. Вычисленная с помощью данного метода M_r транскортина составила 58 000—62 500 Д. Для расчетов

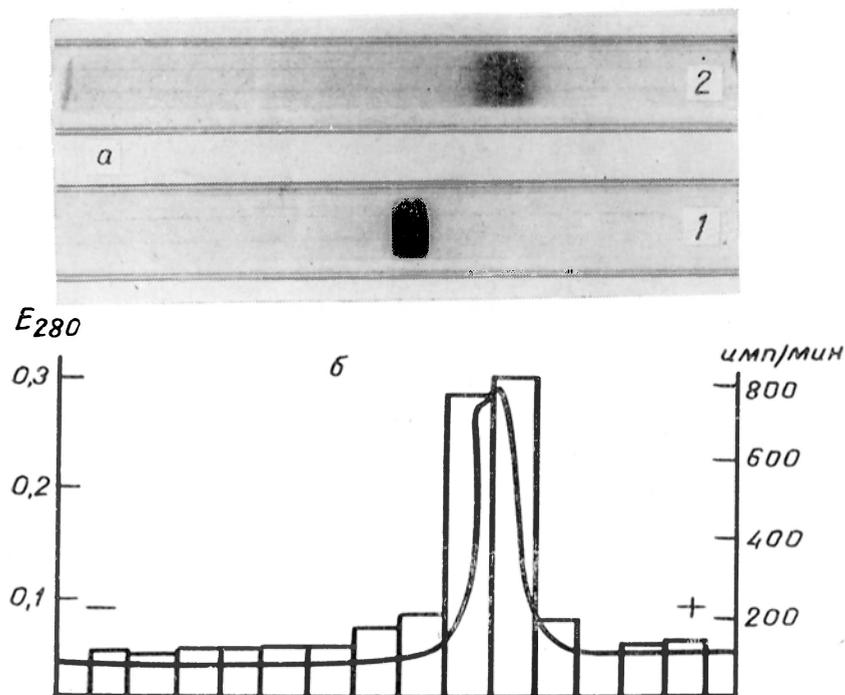


Рис. 1. Электрофорез белковых препаратов в 7,5 % ПААГ (а) и денситограмма геля с белком из плазмы животных с недостаточностью кровообращения (б).

Здесь и на рис. 2—4: 1 — транскортин из плазмы интактных крыс, 2 — то же животных с недостаточностью кровообращения. На диаграмме — активность белка по ^{31}H -кортизолу.

Таблица 3

Физико-химические и комплексообразующие свойства КСГ

Параметр	Белок	
	интактные животные	животные с недостаточностью кровообращения
M_r	60 000	60 000
pH максимального связывания	7,80	8,20
Изоэлектрическая точка КСГ	6,12—7,80	5,13—7,18
Изоэлектрическая точка эквимольного комплекса КСГ — кортизол	6,23	6,95
Равновесный диализ:		
$K_a \times 10^8 \text{ M}^{-1}$	$2,79 \pm 0,50$	$9,84 \pm 1,20$
n	$0,98 \pm 0,05$	$0,39 \pm 0,08$
Твердофазная адсорбция:		
$K_a \times 10^8 \text{ M}^{-1}$	$0,61 \pm 0,06$	$0,96 \pm 0,10$
n	$0,80 \pm 0,05$	$0,43 \pm 0,04$

использовали молекулярную массу 60 000 Д.

При изоэлектрическом фокусировании комплекса КСГ — кортизол в полиол-боратной системе в градиенте pH 4—8 белок концентрировался в виде одной диффузной полосы в области pH 6,23 и 6,95 (табл. 3) соответственно для белка интактных крыс и животных с недостаточностью кровообращения. Однако изоэлектрическое фокусирование транскортина, не содержащего стероида, выявило несколько полос в области pH 6,12—7,80 для белка нормальных животных и в области pH 5,13—7,18 для белка животных с патологией кровообращения.

Для определения параметров связывания использовали препараты КСГ,

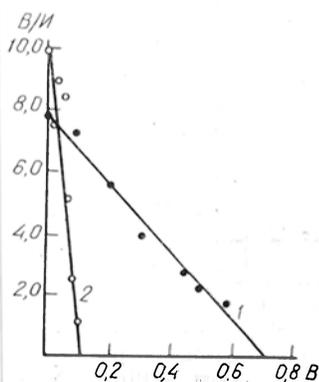


Рис. 2

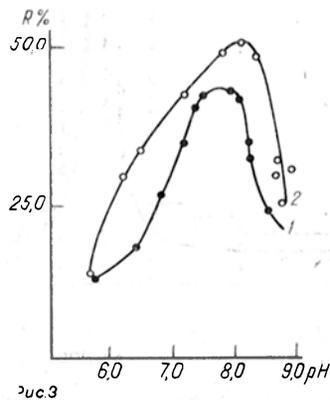


Рис. 2. Графики Скэтчарда, полученные методом равновесного диализа.

Концентрация белка 1 — $4,28 \cdot 10^{-8}$ М; 2 — $2,81 \cdot 10^{-8}$ М. В — связанный кортизол, U — свободный кортизол.

Рис. 3. Зависимость связывания от pH буферного раствора (0,05 М трис-буфер).

R — процент связанного стероида.

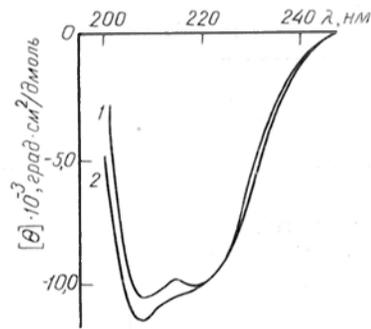


Рис. 4. Спектры КД комплекса транскортин — кортизол.

которые предварительно обрабатывали активированным углем, в целях удаления эндогенных стероидов [2]. По данным метода равновесного диализа, который является наиболее надежным для изучения комплексообразования стероида с белком в состоянии термодинамического равновесия [16], транскортин, выделенный из плазмы животных с недостаточностью кровообращения, характеризуется значительно большим сродством к кортизолу ($K_a > 3,5$ раза), чем белок интактных животных. Однако КСГ, выделенный из плазмы нормальных животных, связывает эквимольное количество кортизола, что согласуется с литературными данными [19]. В тех же условиях транскортина, выделенный из плазмы животных с недостаточностью кровообращения, связывает кортизол в отношении 1 : 0,3.

Анализ графика Скэтчарда (рис. 2) свидетельствует о наличии только одного типа центров связывания у белка как у нормальных, так и патологических животных.

Достоверность полученных различий в параметрах связывания белков в норме и при недостаточности кровообращения была подтверждена и методом твердофазной адсорбции.

Таким образом, развитие патологического состояния (недостаточность кровообращения) в организме крыс характеризуется изменением комплексообразующих и некоторых физико-химических свойств КСГ.

Интересные данные получены при исследовании зависимости связывающей активности транскортина от рН среды (рис. 3). Максимум связывания кортизола белком, выделенным из плазмы крыс с недостаточностью кровообращения, сдвинут в более щелочную область. Кривые зависимости связывания от рН различаются по положению максимума и форме, что, очевидно, свидетельствует об изменении структурной организации активного центра белка.

На следующем этапе изучили спектральные эффекты связывания стероидов КСГ, проявляющиеся в круговом дихроизме (КД). На рис. 4 представлены спектры КД выделенных комплексов КСГ — кортизол в коротковолновой области 200—250 нм, при этом θ белка в этой области обусловлена КД амидного хромофора, т. е. характеризует конформацию полипептидной цепи.

Спектр КД транскортина интактных животных имеет минимумы при 208 и 218 нм. Спектр КД белка животных при патологии кровообращения характеризуется более отрицательной θ в области 208 нм и сглаживанием минимума при 218 нм. Факт обнаружения различий в спектрах КД сравниваемых препаратов обычно расценивается как показатель наличия конформационных сдвигов [2, 17], что объясняют связыванием лиганда в активном центре макромолекулы.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что у крыс при выраженной недостаточности кровообращения, характеризующейся нарушением функциональной активности надпочечников и метаболизма глюкокортикоидов [3, 8], явно нарушается взаимодействие стероидов с транскортином. Согласно полученным результатам, можно допустить, что это нарушение обусловлено в определенной мере изменением свойств специфического бел-

ка. Появление в крови животных транскортина, отличного по своим характеристикам от нормы, может определяться рядом причин.

Наиболее вероятной представляется возможность ассоциации «патологического» транскортина с определенными соединениями (скорее всего с метаболитами стероидных гормонов, присутствующих в крови при недостаточности кровообращения), что приводит, очевидно, к конформационным сдвигам и, следовательно, к снижению связывающей емкости белка.

Необратимое ингибирование транскортина выявлено Розенталем и соавт. при длительном хранении плазмы [21] и вызвано, по мнению авторов, ковалентным связыванием с белком менее полярных высокореактивных метаболитов кортизола, которые появляются в плазме. Кроме того, нельзя полностью исключить возможности нарушения в белоксинтезирующем аппарате печени в условиях глубокой гипоксии и ацидоза, характеризующих выраженную недостаточность кровообращения. Для выяснения механизмов изменения свойств КСГ белка требуются дополнительные исследования процессов его синтеза и комплексообразования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ахрем А. А., Аввакумов Г. В., Кукушкина И. И. и др. // Изв. АН СССР, сер. хим. наук. — 1977. — № 6. — С. 111—115.
2. Ахрем А. А., Вашкевич И. И., Аввакумов Г. В. и др. // Биохимия. — 1979. — Т. 44, № 1. — С. 142—153.
3. Басс Ж. Ж. Обмен стероидных гормонов у больных с хронической недостаточностью кровообращения: Автореф. дис. ... канд. биол. наук — М., 1971.
4. Биохимические критерии дефицита кровообращения (Метод. рекомендации) / Виноградов В. В. и др. — М., 1984.
5. Богдарин Ю. А., Аратский В. П. // Пат. физиол. — 1979. — № 5. — С. 41—44.
6. Голиков А. П., Бобков А. И. // Кардиология. — 1973. — № 5. — С. 15—20.
7. Корочкин И. М., Пархимович Р. М., Матвеева И. В., Рубин М. П. // Там же. — № 7. — С. 63—68.
8. Кукес В. Г. Функциональное состояние некоторых нейроэндокринных систем у больных с хронической недостаточностью кровообращения: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1970.
9. Розен В. Б. // Физиология человека и животных. — М., 1973. — Т. 11. — С. 49—107.
10. Степура О. Б. // Кардиология. — 1981. — № 12. — С. 49—55.
11. Троицкий Т. В., Ажицкий Г. Ю., Малыш К. Д. // Вопр. мед. химии. — 1976. — № 2. — С. 282—286.

12. *Baxter J. D., Tomkins G. M.* // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1971. — Vol. 68. — P. 932—937.
13. *Bray J. A.* // Analyt. Biochem. — 1960. — Vol. 1. — P. 279—285.
14. *Chader G. J., Westpahl U.* // Biochemistry (Wash.). — 1968. — Vol. 7. — P. 4272—4282.
15. *Daughaday W. H.* // J. clin. Invest. — 1958. — Vol. 37. — P. 519—523.
16. *Lea O. A.* // Biochim. biophys. Acta. — 1973. — Vol. 223. — P. 68—74.
17. *Le Gaillard F., Aubert J. R., Dautrevaux M.* et al. // FEBS Lett. — 1976. — Vol. 64. — P. 278—284.
18. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
19. *Mueller U. W., Portler J. M.* // Biochem. J. — 1981. — Vol. 197. — P. 647—653.
20. *Muldoon T., Westphal U.* // J. biol. Chem. — 1967. — Vol. 242. — P. 5636—5643.
21. *Rosental H. E., Albert M., Ludwig G.* et al. // J. Steroid. Biochem. — 1982. — Vol. 16. — P. 639—641.
22. *Savu L., Lombart C., Nuner E.* // FEBS Lett. — 1980. — Vol. 113. — P. 102—106.
23. *Scatchard G.* // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1949. — Vol. 51. — P. 660—672.
24. *Slaunwhite W., Sandberg A.* // J. clin. Invest. — 1959. — Vol. 38. — P. 384—391.
25. *Smith J. B., Jubus W. A.* // Steroids. — 1980. — Vol. 36. — P. 393—404.
26. *Tiselius A., Hjerten S., Levin O.* // Arch. Biochem. — 1956. — Vol. 65. — P. 132—155.
27. *Weber K., Osborn M.* // J. biol. Chem. — 1969. — Vol. 244. — P. 4406—4412.

Поступила 18.06.87

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF TRANSCORTIN FROM HEALTHY RATS AND THE ANIMALS WITH EXPERIMENTAL CIRCULATORY INSUFFICIENCY

L. I. Nadol'nik, E. A. Galitsky, V. B. Beluga, V. V. Vinogradov

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

Corticosteroid binding protein, transcortin, was isolated using biospecific and hydroxyapatite chromatographic procedures. M_r -60,000 of transcortin was evaluated by means of electrophoresis; isoelectric points of the protein and of its complexes were detected. The association constants of transcortin with cortisol at 4° constituted $2.8 \cdot 10^8 M^{-1}/mol$ of protein from intact animals containing one binding site and $9.8 \cdot 10^8 M^{-1}/mol$ of protein from impaired rates containing 0.39 binding site per a molecule. The maximal cortisol-binding activity of transcortin was shifted towards more alkaline pH value under the pathological conditions. Circular dichroism spectra of the transcortin-cortisol equimolar complexes were studied. The proteins studied were dissimilar in their main physicochemical properties and patterns of the steroid binding.

УДК 616.127-008.932.95-39-02:616.127-005.4-06:616.127-008.93:577.164.18]-085.356:577.164.18

Б. З. Симхович, Д. В. Мейрена, Ж. В. Шутенко, Х. Б. Хаги, Я. Л. Бриеде, И. Я. Калвиньш, Э. Я. Лукевиц

ВЛИЯНИЕ DL-КАРНИТИНА И ИНГИБИТОРА γ -БУТИРОБЕТАИНГИДРОКСИЛАЗЫ 3-(2,2,2-ТРИМЕТИЛГИДРАЗИНИИ) ПРОПИОНАТА (ТГП) НА ВЫЗЫВАЕМЫЕ ИЗОПРОТЕРЕНОЛОМ ИЗМЕНЕНИЯ В МЕТАБОЛИЗМЕ МИОКАРДА КРЫС

Институт органического синтеза АН Латвийской ССР, Рига

В условиях ишемических и адрепергических воздействий в миокарде отмечается накопление продуктов метаболической активации жирных кислот — ацил-КоА и ацилкарнитина [12, 29, 31]. Эти метаболиты, обладая свойствами детергентов, оказывают неспецифическое повреждающее действие на клеточные мембраны и являются аритмогенными факторами [7, 8]. Кроме того, ацил-КоА ингибирует окислительное фосфорилирование, аденинуклеотид-транслоказу и способствует увеличению концентрации ионизированного кальция в цитоплазме

клеток. Ацилкарнитин угнетает активность Na^+ , K^+ -АТФазы в саркоплазматическом ретикулуме кардиомиоцитов [23, 25, 26, 28].

Накопление ацил-КоА и ацилкарнитина может быть причиной возникающего в условиях ишемии миокарда дефицита макроэргов и повреждений плазматической и митохондриальной мембран [8, 30]. Ацил-КоА в основном локализован в митохондриальном матриксе, а ацилкарнитин — в цитоплазме клетки [6, 10, 22].

Одним из патогенетически оправданных способов метаболической коррек-

ции ишемизированного миокарда является снижение в кардиомиоцитах концентрации этих детергентных метаболитов. С учетом возникающего в условиях ишемии дефицита эндогенного карнитина [29] предлагается введение этого метаболита. L-карнитин и в меньшей мере DL-карнитин предотвращают накопление ацил-КоА в митохондриях миокарда и в миокарде в целом и способствуют сохранению сократительной способности сердца у собак и свиней в условиях его ишемического повреждения [13, 15, 17, 18]. Также была продемонстрирована способность L-карнитина в определенных условиях предотвращать накопление ацилкарнитина в ишемизированном миокарде [30, 32].

Другим подходом к нормализации липидного обмена при ишемии миокарда может служить угнетение β -окисления жирных кислот на стадии образования ацилкарнитина. Используемые с этой целью ингибиторы карнитинпальмитойлтрансферазы 1-оксифенилпиримидин-4-гидроксибензилглицин] и 2-{5-(4-хлорфенил) пентил}-оксиран-2-карбоновая кислота оказывают кардиопротекторное действие [14, 27].

Способность ограничивать зону инфаркта миокарда у крыс была обнаружена у ингибитора β -окисления 3-(2,2,2-триметилгидразиний)пропионата (ТГП). Действие ТГП реализуется путем снижения внутриклеточной концентрации свободного карнитина [1, 3].

В данной работе проведено изучение механизмов действия ТГП и DL-карнитина и сравнение их кардиопротекторной активности у крыс при хроническом введении.

Методика

В работе использовали реактивы и изотопы L-карнитин, DL-карнитин, γ -бутиробетанин, НЕРЕС, ЭГТА («Sigma», США); α -кетоглутарат, моновалентную соль («Serva», ФРГ); окисленный глутатион («Reanal», ВНР); аскорбат, моновалентную соль («Serva»); пальмитиновую кислоту («Sigma»); дитиобиснитробензойную кислоту («Gee Lawson Chem», Англия); ацетил-КоА («Sigma»); наборы для определения АТФ, АДФ, АМФ («Boehringer», ФРГ); дауэкс 2×8, Cl⁻-форма, 200–400 меш («Serva»); карнитинацетилтрансферазу («Sigma», удельная активность 100 ед/мг); каталазу («Reaxhim», СССР); соли марки ч. д. а., I-¹⁴C-ацетил-КоА (удельная активность 55,6 мКи/мм; NEN, США).

При изучении влияния ТГП на активность γ -бутиробетанингидроксилазы выделение, очист-

ку и определение активности фермента проводили по ранее описанным методам [21]. ТГП и DL-карнитин вводили внутри белым крысам-самцам массой 180–200 г, полученным из питомника Института органического синтеза, в дозах соответственно 100 и 200 мг/кг в течение 10 дней. На 10-й день через 1 ч после последнего введения ТГП животным подкожно вводили изопротеренол в дозе 50 мг/кг. Через 1 ч после инъекции изопротеренола крыс деканитировали, быстро извлеченные сердца замораживали в жидком азоте, растирали и гомогенизировали в 0,6 н. HClO₄. В нейтрализованной надосадочной жидкости определяли содержание свободного карнитина [19], АТФ, АДФ и АМФ [5, 11]. В осадке гомогената определяли длинноцепочечный ацилкарнитин [24]. В отдельной навеске миокарда и в сыворотке крови животных выявляли содержание свободных жирных кислот (СЖК) [2]. Для статистической обработки результатов использовали непараметрический критерий V Вилкоксона — Манна — Уитни.

Результаты и обсуждение

ТГП является неконкурентным ингибитором γ -бутиробетанингидроксилазы (рис. 1). Угнетением активности этого фермента можно объяснить обнаруженное ранее падение концентрации свободного карнитина в миокарде при курсовом введении ТГП внутрь в дозах от 50 до 150 мг/кг [3].

Кардиопротекторный эффект соединений изучали на модели повреждения миокарда изопротеренолом. Адренергические воздействия вызывают резкое увеличение концентрации длинноцепочечного ацилкарнитина на фоне снижения содержания свободного карнитина (рис. 2). Изменения концентрации этих метаболитов под влиянием изопротеренола протекают аналогично

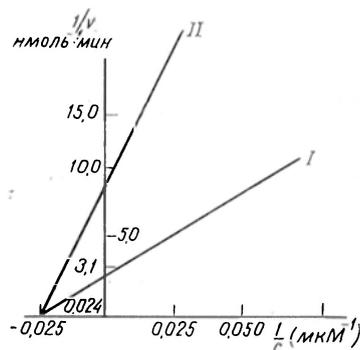


Рис. 1. Ингибирующее влияние ТГП на активность γ -бутиробетанингидроксилазы.

I — контроль, II — ТГП. Каждая проба содержала 1,54 мЕд γ -бутиробетанингидроксилазы. Концентрации γ -бутиробетанина составляли: 4, 8, 12 и 16 мкМ; концентрация ТГП — 4 мкМ. При данных условиях скорость реакции линейно зависит от концентрации субстрата и не достигает максимального значения.

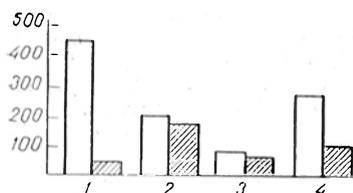


Рис. 2. Содержание (в нмоль/г) свободного и длинноцепочечного ацилкарнитина в миокарде крыс.

1 — контроль; 2 — изопротеренол; 3 — ТГП+изопротеренол; 4 — DL-карнитин+изопротеренол. Незаштрихованные столбики — свободный карнитин, заштрихованные — длинноцепочечный ацилкарнитин. Схемы введения и дозы изопротеренола и ТГП приведены в тексте.

их изменениям в условиях ишемии миокарда [12, 29].

ТГП при курсовом введении в дозе 100 мг/кг вызывает еще более выраженное снижение концентрации свободного карнитина, но в значительной степени предотвращает аккумуляцию ацилкарнитина (см. рис. 2). В основе этого эффекта ТГП лежит опосредованное ингибированием γ -бутиробстаингидроксилазы падение концентрации свободного карнитина. При этом скорость образования ацилкарнитина может снижаться, чем и объясняется накопление СЖК в сыворотке крови (табл. 1). Предотвращение накопления ацилкарнитина под влиянием ТГП способствует сохранению макроэргов в миокарде и поддержанию энергетического заряда в условиях повреждающего действия изопротеренола (табл. 2).

DL-карнитин также предохраняет миокард от опосредуемого изопротеренолом накопления ацилкарнитина и на 52% компенсирует снижение содержания свободного карнитина. Данные литературы о влиянии экзогенного карнитина на содержание ацилкарнитина в миокарде противоречивы. У свиней

в условиях ишемии DL-карнитин вызывает повышение содержания ацилкарнитина в миокарде, что объясняется угнетающим влиянием D-изомера на транспорт ацилкарнитина в митохондрии [16]. У собак с лигатурой коронарной артерии L-карнитин уменьшает аккумуляцию ацилкарнитина в ишемической зоне, что может быть связано с усилением его транспорта в митохондрии, катализируемого карнитин-ацилкарнитинтрансферазой [13, 30]. В качестве механизма снижения концентрации ацилкарнитина в миокарде обсуждается также возможность транспорта СЖК из цитоплазмы в кровь в виде ацилкарнитина [17]. У крыс L- или DL-карнитин не улучшает функциональные показатели ишемизированного миокарда и не влияет на концентрацию ацил-КоА и ацилкарнитина в условиях ишемии. Отсутствие эффективности в этом случае объясняется низкой скоростью транспорта карнитина в клетки миокарда крыс [20].

Все эти результаты с различными изомерами карнитина были получены при их разовом применении при введении в перфузат. Наши результаты, полученные в условиях хронического введения DL-карнитина, свидетельствуют о том, что экзогенный карнитин способен компенсировать возникающий при введении изопротеренола дефицит эндогенного карнитина у крыс.

Предотвращение накопления ацилкарнитина можно объяснить стимуляцией его транспорта в митохондрии, т. е. вовлечением СЖК в процессы метаболизма. В пользу этого свидетельствует снижение аккумуляции СЖК в сыворотке крови (см. табл. 1). Возможно также угнетающее влияние карнитина на липолиз, опосредуемое

Таблица 1

Влияние ТГП и DL-карнитина на вызываемые изопротеренолом изменения содержания СЖК в миокарде и сыворотке крови крыс

Группа животных	Условия опыта	СЖК	
		миокард, мкмоль/г	сыворотка, мкмоль/мл
1-я	Контроль	12,7 (10,4—15,0)	0,3 (0,2—0,5)
2-я	Изопротеренол	13,2 (10,0—15,1)	1,6 (1,4—1,8)*
3-я	ТГП + изопротеренол	9,6 (7,4—13,0)**	2,1 (1,2—2,7)*
4-я	DL-карнитин + изопротеренол	9,2 (6,9—11,2)**	0,9 (0,3—1,4)*

Примечание. Одна звездочка — $p < 0,05$ по сравнению с 1, 2 и 3-й группами; две звездочки — $p < 0,05$ по сравнению со 2-й группой. Здесь и в табл. 2 в скобках — пределы колебаний.

Влияние ТГП и DL-карнитина на вызываемые изопротеренолом изменения содержания АТФ, АДФ и АМФ (в мкмоль/г) и величины энергетического заряда в миокарде крыс

Группа животных	Условия опыта	АТФ	АДФ	АМФ	Энергетический заряд
1-я	Контроль	2,9 (2,3—3,4)	1,1 (0,8—1,5)	0,7 (0,4—0,9)	0,77 (0,72—0,85)
2-я	Изопротеренол	1,4 (0,6—1,9)*	1,1 (0,9—1,4)	1,0 (0,7—1,3)*	0,58 (0,39—0,77)*
3-я	ТГП + изопротеренол	2,2 (1,2—2,7)*, **	1,0 (0,7—1,6)	0,6 (0,4—0,8)**	0,70 (0,60—0,79)**
4-я	DL-карнитин + изопротеренол	1,5 (0,8—1,7)*	0,8 (0,4—1,2)*	0,7 (0,4—1,3)	0,60 (0,48—0,80)*

Примечание. Одна звездочка — $p < 0,05$ по сравнению с 1-й группой, две — $p < 0,05$ по сравнению со 2-й и 4-й группами.

путем образования ацилкарнитина. Аргументом против осуществления такого механизма действия служит необходимость использования в экспериментах высоких концентраций карнитина — 5 мМ [9].

В целом на основании полученных результатов нельзя постулировать однозначный механизм снижения концентрации ацилкарнитина под влиянием DL-карнитина у крыс. Однако в отличие от предыдущих данных показано, что при хроническом введении DL-карнитина влияет на метаболизм ацилкарнитина (см. рис. 2 и табл. 1). Несмотря на это, введение DL-карнитина не способствует улучшению энергетического метаболизма миокарда в условиях адренергического воздействия (см. табл. 2).

Отсутствие защитного эффекта у DL-карнитина может быть объяснено усилением под его влиянием метаболизма СЖК при вызываемой изопротеренолом ишемии миокарда у крыс. Ранее было показано снижение образования АТФ в миокарде крыс, получавших внутрь экзогенный карнитин в дозе 200 мг/кг в течение 10 дней на фоне богатого жирами рациона [4].

Сопоставляя данные литературы с полученными нами результатами, нельзя не обратить внимания на то, что в основе влияния экзогенного карнитина на миокард в условиях ишемии у собак, свиней и крыс лежат различные механизмы.

Проведенные исследования указывают на возможность регуляции метаболизма жирных кислот в миокарде крыс ингибитором карнитинзависимого окисления — ТГП и DL-карнитина.

Применение ТГП в отличие от действия DL-карнитина сопровождается кардиопротекторным эффектом в условиях адренергического повреждения миокарда у крыс.

ЛИТЕРАТУРА

1. Веверис М. М., Кименис А. А. // Актуальные вопросы фармакологии и токсикологии нейротропных средств. — Рига, 1986. — С. 118.
2. Прохоров М. Ю., Тиунов М. П., Шакалис Д. А. // Лаб. дело. — 1977. — № 9. — С. 535.
3. Симхович Б. Э., Мейрена Д. В., Хаги Х. Б. и др. // Проблемы современной биотехнологии (8-й объединенный симпозиум биохимических обществ СССР — ГДР). — Рига, 1985. — С. 135.
4. Симхович Б. Э., Мейрена Д. В., Хаги Х. Б. и др. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 4. — С. 72.
5. Adams H. // Methods of Enzymatic Analysis / Ed. H. U. Bergmeyer. — New York, 1963. — P. 533.
6. Brecher P. // Molec. cell. Biochem. — 1983. — Vol. 57. — P. 3.
7. Corr P. B., Snyder D. W., Cain M. E. et al. // Circulat. Res. — 1981. — Vol. 49. — P. 354.
8. Corr P. B., Gross R. W., Sobel B. E. // Ibid. — 1984. — Vol. 55. — P. 135.
9. Hülsmann W. C., Stam H., Maccari F. // Biochim. biophys. Acta. — 1982. — Vol. 713. — P. 39.
10. Idell-Wenger J. A., Grotjohann I. W., Neely J. R. // J. biol. Chem. — 1978. — Vol. 253. — P. 4310.
11. Jaworec D. W., Gruber W., Bergmeyer H. U. // Methods of Enzymatic Analysis / Ed. H. U. Bergmeyer. — Weinheim, 1974. — P. 2127.
12. Katz A. M., Messineo F. C. // Circulat. Res. — 1981. — Vol. 48. — P. 1.
13. Kobayashi A., Suzuki Y., Katikawa T. et al. // Jap. Circulat. J. — 1983. — Vol. 47. — P. 536.
14. Korb H., Hoefl A., Hunneman D. H. et al. // Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmakol. — 1984. — Bd 327. — S. 70.

15. Kotaka K., Miyazaki Y., Ogawa K. et al. // J. appl. Biochem. — 1981. — Vol. 3. — P. 292.
16. Liedtke A. J., Nellis S. H. // J. clin. Invest. — 1979. — Vol. 64. — P. 440.
17. Liedtke A. J., Nellis S. H., Whitesell L. F. // Circulat. Res. — 1981. — Vol. 48. — P. 859.
18. Liedtke A. J., Nellis S. H., Whitesell L. F., Mahar C. O. // Amer. J. Physiol. — 1982. — Vol. 243. — P. 691.
19. Marquis N. R., Fritz I. B. // J. Lipid. Res. — 1964. — Vol. 5. — P. 184.
20. Neely J. R., Garber D., McDonough K., Idell-Wenger J. // Ischemic Myocardium and Antianginal Drugs / Eds. M. M. Winbury, Y. Abūko. — New York, 1979. — P. 225.
21. Noel H., Parvin R., Pande Sh. // Biochem. J. — 1984. — Vol. 220. — P. 701.
22. Oram J. F., Wenger J. I., Neely J. R. // J. biol. Chem. — 1975. — Vol. 250. — P. 73.
23. Pande S. V., Blanchaer M. C. // Ibid. — 1971. — Vol. 246. — P. 402.
24. Pearson D. J., Chase J. F. A., Tubbs D. K. // Meth. Enzymol. — 1969. — Vol. 14. — P. 612.
25. Pitts B. J. R., Tale C. A., Van Winkle B. et al. // Life Sci. — 1978. — Vol. 23. — P. 391.
26. Pitts B. J. R., Okhuysen C. H. // Amer. J. Physiol. — 1984. — Vol. 247. — P. H-840.
27. Sherrat M. S. A., Galley S. J., De Grado T. R. et al. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1983. — Vol. 117. — P. 653.
28. Shrago E., Shug A. L., Sul H. et al. // Circulat. Res. — 1976. — Vol. 35, Suppl. 1. — P. 75.
29. Shug A. L., Thomsen J. H., Folts P. D. et al. // Arch. Biochem. — 1978. — Vol. 187. — P. 25.
30. Suzuki Y., Kamikawa T., Kobayashi A. et al. // Jap. Circulat. J. — 1981. — Vol. 45. — P. 687.
31. Whilmer J. T., Idell-Wenger J. A., Rovetto M. J., Neely J. R. // J. biol. Chem. — 1978. — Vol. 253. — P. 4305.
32. Yamazaki N., Suzuki Y., Kobayashi A. et al. // Regulation of Cardiac Function / Ed. H. Abe et al. — Tokyo, 1984. — P. 179.

Поступила 04.04.87

EFFECTS OF D,L-CARNITINE AND 3-(2,2,2-TRIMETHYL HYDRAZINIUM) PROPIONATE AS INHIBITOR OF γ -BUTYROBETAINE HYDROXYLASE ON ISOPROTERENOL-INDUCED ALTERATIONS IN MYOCARDIUM METABOLISM

B. Z. Simkhovich, D. V. Meirena, Zh. V. Shutenko, H. B. Hagi, Ya. L. Briede, I. Ya. Kalvinsh, E. Ya. Lukevics

Institute of Organic Synthesis, Academy of Sciences of the Latvian SSR, Riga

3-(2,2,2-trimethyl hydrazinium) propionate (THP) is known as an inhibitor of γ -butyrobetaine hydroxylase in rat liver tissue. At the same time, THP, administered per os at a dose of 100 mg/kg within 10 days, prevented the isoproterenol-induced (subcutaneous, 50 mg/kg) acylcarnitine accumulation. This effect of THP, accompanied by a distinct decrease of free carnitine in rat myocardium, occurred due to inhibition of carnitine biosynthesis from γ -butyrobetaine. THP protected the myocardium energetics against isoproterenol action as the drug prevented the acylcarnitine accumulation. Although D,L-carnitine (200 mg/kg, per os, 10 days) inhibited also the isoproterenol-stimulated acylcarnitine accumulation in rat myocardium and fatty acids of blood serum, it did not exhibit any favourable effect on myocardium bioenergetics. Unefficiency of D,L-carnitine as cardioprotective drug may be a result of intensification of fatty acids metabolism occurring simultaneously with isoproterenol-mediated myocardium ischemia. Use of inhibitors of carnitine-dependent oxidation of fatty acids oxidation (as exemplified by THP) in order to correct myocardium metabolism is of importance especially in relation to impairing effects caused by catecholamines.

УДК 616-006-07:616.155.1-008.939.797.33-074

И. Ф. Гуринович, Л. А. Грубина, С. Ф. Некрашевич, Р. М. Ремизова,
С. И. Шишпоренок

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ И КАЧЕСТВЕННЫЙ СОСТАВ ПОРФИРИНОВ В ЭРИТРОЦИТАХ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Институт физики АН БССР, Минск, Минский городской онкологический диспансер

Рост злокачественных новообразований приводит к существенному изменению характера биохимических процессов, протекающих в организме, из которых наименее изученным является биосинтез порфиринов. Вопросы взаимосвязи его с опухолевым ростом в литературе освещены недостаточно и нуждаются в дальнейшей конкретиза-

ции. Наши предыдущие исследования показали, что развитие злокачественных новообразований сопровождается изменением количественного содержания копропорфирина в моче [1]. Данная работа посвящена изучению количественного и качественного состава порфиринов в крови.

Методика

Для обнаружения порфиринов в крови использовали упрощенную нами методику [3]. У больного или донора брали 10 мл крови в пробирку с 1 мл антикоагулянта. Пробу крови центрифугировали в течение 30 мин на центрифуге ОПМ-3 и отделяли плазму от эритроцитов, которые затем растирали в ступке пестиком, постепенно добавляя смесь этилацетата с ледяной уксусной кислотой в соотношении 4:1. Для полноты экстракции полученную смесь выдерживали в холодильнике в течение 18—20 ч, после чего ее фильтровали. Фильтрат помещали в делительную воронку, а осадок на фильтре многократно промывали смесью этилацетата с уксусной кислотой (4:1). Промывные воды добавляли к основному фильтрату и затем промывали дважды в 25 мл 5% раствора ацетата натрия, предварительно добавив туда одну каплю 10% раствора йода для окисления порфириногенов. Заключительным этапом была экстракция порфиринов 3 н. соляной кислотой. Полноту экстракции порфиринов контролировали по люминесценции раствора. Количественный и качественный состав экстрагированных порфиринов определяли с помощью машинной обработки спектров флуоресценции смеси путем сравнения их со спектрами эталонов. Чувствительность метода соответствовала 1,5 мкг/л.

Содержание копро- и протопорфиринов исследовали в эритроцитах 92 человек, из которых 40 были здоровыми, а 52 — больными с опухолями в области женской половой сферы, госпитализированными в онкологический диспансер. Для обследования выбирали больных, не подвергавшихся ранее хирургическому, лучевому или химиотерапевтическому лечению. Диагноз ставили после гистологического исследования опухолей. Сведения о нормальном содержании порфиринов в эритроцитах были получены на основании обследования здоровых людей. Кровь от 40 доноров получали в Белорусском НИИ переливания крови.

Результаты и обсуждение

Сведения о содержании порфиринов в крови малочисленны и часто несопоставимы. В ряде случаев у здоровых людей соответствующие параметры отличаются на несколько порядков. Вместе с тем считается достоверно установленной неизменность количественного содержания копро-, прото- и уропорфиринов в эритроцитах здоровых людей в разные сезоны года независимо от пола и возраста, а также наличие их в следовых количествах или полное отсутствие в плазме крови [2, 3]. Повышение уровня эритроцитарных порфиринов наблюдается при многих заболеваниях (порфирии, свинцовые интоксикации, заболевания печени и т. д.). Отмечается повышенное содержание порфиринов в крови больных анемией, а также животных с привитыми опухолями.

Наши данные о содержании копро-

Содержание порфиринов в эритроцитах (в мкг/л) у здоровых и больных со злокачественными и доброкачественными опухолями

Группа обследованных	Характеристика обследованных	Число наблюдений	Протопорфирин (ПП)				Копропорфирин (КП)				ШХ/ШЦХ						
			$\bar{X} \pm S_x$	σ	$\bar{X} \pm \sigma$	ρ_{1-2}	ρ_{1-3}	ρ_{2-3}	$\bar{X} \pm S_x$	σ		$\bar{X} \pm \sigma$	ρ_{1-2}	ρ_{1-3}	ρ_{2-3}		
1-я	Доноры	40	57 ± 5	34	25—90	—	—	—	—	9 ± 1	5	5—15	—	—	—	6	
2-я	Больные раком: шейки матки тела матки яичников вульвы	40	200 ± 20	126	70—320	<0,001	—	<0,001	—	22 ± 3	19	5—40	<0,001	—	—	—	
		9	150 ± 20	60	110—210	—	—	—	—	19 ± 8	24	0—40	—	—	—	—	8
		18	217 ± 38	163	55—380	—	—	—	—	27 ± 4	17	10—45	—	—	—	—	8
3-я	Больные с доброкачественными опухолями	3	217 ± 34	108	110—325	—	—	—	—	20 ± 6	19	1—40	—	—	—	—	11
		12	156 ± 12	22	45—170	—	—	—	—	12 ± 4	7	5—15	—	>0,1	—	—	13
			108 ± 18	63	45—170	<0,01	—	—	—	10 ± 2	5	5—15	—	—	—	10	

Примечание. \bar{X} — среднее значение; S_x — среднее квадратичное отклонение; σ — стандартное отклонение.

и протопорфиринов в эритроцитах здоровых и больных людей приведены в таблице. Анализ стандартных отклонений показывает, что оба показателя изменяются в широких пределах как у доноров, так и у больных. Вместе с тем выявляется определенная закономерность. Так, в контрольной группе при колебании крайних значений от 12 до 140 мкг/л и от 0 до 20 мкг/л для концентраций соответственно прото- и копропорфиринов можно выделить достаточно узкие интервалы наиболее вероятных величин ($\bar{X} \pm \sigma$), которые встречаются более чем у 70 % обследованных. В эти интервалы попадают и средние значения содержания в эритроцитах обоих порфиринов. Обращает на себя внимание и такое характерное свойство, как заметное превышение уровня протопорфирина над уровнем копропорфирина. Для большинства доноров их отношение равно приблизительно 6.

Изучение результатов обследования больных раком показывает, что пределы изменения крайних значений концентраций обоих порфиринов расширяются по сравнению с контролем: для протопорфирина 36—660 мкг/л, для копропорфирина 0—75 мкг/л. Однако и в этом случае легко найти средние величины и интервалы наиболее вероятных значений содержания в эритроцитах каждого порфирина. Как видно из таблицы, они существенно отличаются от аналогичных параметров у здоровых людей. Для большинства больных со злокачественными опухолями характерно повышение уровня обоих порфиринов по сравнению с контролем примерно в 2—4 раза (в единичных случаях отмечается еще более значительное повышение). Наиболее высокие концентрации протопорфирина наблюдаются у больных раком тела матки и раком яичников. Содержание копропорфирина в меньшей степени зависит от вида опухоли.

Такой же, как у здоровых людей, уровень в эритроцитах копропорфирина регистрируется у больных с доброкачественными опухолями (фибромиомы, полипы, дисплазии). Содержание протопорфирина в этих случаях повышается.

Сравнение всех рассмотренных характеристик для различных обследованных групп позволяет выявить определенную тенденцию. Как интервалы

наиболее вероятных значений, так и среднестатистические значения содержания прото- и копропорфиринов в 1 л эритроцитов у здоровых лиц и у больных с опухолями существенно различаются. Так, достоверность различия средних значений (P) содержания протопорфирина у доноров и больных со злокачественными и доброкачественными новообразованиями составляет соответственно 0,001 и 0,01. Менее чувствительным показателем является уровень копропорфирина, по содержанию последнего в крови различаются только 1-я и 2-я группы ($p < 0,001$); 2-я и 3-я группы четко различаются по обоим параметрам ($p < 0,001$). У больных с доброкачественными опухолями отмечается близкий по сравнению с контролем показатель содержания копропорфирина и повышенный уровень протопорфирина. У больных с злокачественными новообразованиями оба параметра заметно возрастают. Соотношение между уровнями прото- и копропорфиринов в крови больных выше, чем у здоровых людей. Приведенные результаты свидетельствуют об изменении порфиринового метаболизма при наличии новообразований и позволяют предположить, что происходит снижение активности ряда ферментов в цепи биосинтеза гема. Вероятно, самым слабым звеном в этой цепи является гемсинтаза — фермент, регулирующий превращение протопорфирина в его комплекс с железом. Изменение его активности имеет место при любых опухолевых процессах, однако при злокачественных опухолях оно выражено в большей степени. Повышенный уровень копропорфирина свидетельствует об изменении активности двух ферментов — косинтазы и дезаминазы, что наблюдается только вследствие роста злокачественных опухолей.

О специфичности отмеченных закономерностей для рассмотренной патологии можно будет судить лишь в совокупности с данными биосинтеза порфиринов при других заболеваниях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гуринович Г. П., Гуринович И. Ф., Грубина Л. А. и др. // Докл. АН БССР. — 1983. — Т. 27. — С. 565—567.
2. Писанец М. П., Джермакян А. В. // Пробл. гематол. — 1980. — № 6. — С. 44—46.
3. Порфирии / Кузнецова Н. П., Панков Б. С., Чубарова А. С. и др. — М., 1981.

4. *Eales L.* // The Porphyrins / Ed. D. Dolphin.— New York, 1979.— Vol. 6, Pt A.— P. 779—780.

Поступила 07.06.87

QUANTITATIVE AND QUALITATIVE COMPOSITION OF PORPHYRINS IN ERYTHROCYTES OF ONCOLOGIC PATIENTS

I. F. Gurinovich, L. A. Grubina, S. F. Nekrashevich, R. M. Remizova, S. I. Shishporenok

Institute of Physics, Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Sity Oncodispensary, Minsk

Content of copro- and protoporphyrins was studied in erythrocytes of women with tumor of genitals. Distinct increase in content of these porphyrins, especially of protoporphyrin, was detected in erythrocytes of the patients with malignant tumors as compared with the patterns of healthy persons.

УДК 616.61-008.64-036.11-07:616.61-008.939.6-074

Н. Г. Жизневская, В. С. Макаренко

ОБМЕН БЕЛКОВ В ПОЧКАХ ПРИ ОСТРОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Витебский медицинский институт

Острая почечная недостаточность (ОПН) — тяжелый патологический процесс, приводящий к значительным и многообразным нарушениям в организме и представляющий серьезную угрозу для жизни [4, 5]. Для выяснения патогенеза ОПН, разработки методов терапии существенное значение имеет изучение метаболических изменений в почках при данной форме патологии.

Известно, что белки играют важную роль в деятельности почек и, в частности, в транспортной функции клеток канальцев [3].

Целью настоящей работы явилось изучение обмена белков в почках при ОПН.

При проведении исследований использовали глицериновую модель ОПН, воспроизводимую на белых беспородных крысах, которая по характеру морфологических и функциональных изменений близка к соответствующему патологическому процессу, наблюдаемому в клинике, и поэтому нашла широкое применение в различных лабораториях [7, 9, 12].

Методика

Опыты проведены на белых беспородных крысах массой 200—250 г. ОПН воспроизводили введением под эфирным наркозом внутримышечно 50 % раствора глицерина [11]. Контрольным животным вводили физиологический раствор.

Исследовали скорость синтеза и распада белков, их содержание в почках. Об интенсивности синтеза белков судили по скорости включения в них ^{14}C -валина, который вводили внутривенно в дозе 9 мкКи на 100 г массы тела. Через 4 ч животных декапитировали,

почки гомогенизировали в 5 % растворе трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Гомогенат центрифугировали. Осадок 5-кратно промывали этим же раствором, а затем — спиртом и эфиром и растворяли его в 1 М NaOH при нагревании до 70—80 °С. Определяли общую и удельную радиоактивность (соответственно ОР и УР) белков с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика на аппарате СБС-2. ОР в целой почке рассчитывали на 100 г массы тела, УР — на 1 мг белка. Содержание белков определяли по методике [10]. Общее количество белков в целой почке и ее массу рассчитывали на 100 г массы тела, концентрацию белков — на 1 г почечной ткани. Об интенсивности распада белков судили по скорости выведения из них радиоактивной метки [2, 8]. Для этого определяли динамику изменений ОР белков в целой почке. Крысам двукратно (с интервалом 24 ч) внутривенно вводили ^{14}C -валин из расчета 18 мкКи на 100 г массы тела. Для уменьшения реутилизации ^{14}C -валина через 1 сут после второго его введения и в последующем ежедневно животным подкожно вивизируют ^{12}C -валин из расчета 30 мг на 100 г массы тела [8].

Через 48 ч после повторного введения радиоактивного валина часть животных декапитировали и исследовали у них исходную радиоактивность белков. Остальных животных разделили на 2 группы: опытную и контрольную. У животных опытной группы вызывали ОПН внутримышечным введением глицерина, крысам контрольной группы вводили физиологический раствор. Через различные сроки после воспроизведения ОПН (на 3, 7, 13 и 20-й день) у подопытных и контрольных животных исследовали радиоактивность белков почек. На всех этапах эксперимента определяли радиоактивность кислоторастворимого фонда свободных аминокислот.

Вычисляли период полураспада белков ($T_{1/2}$), время их кругооборота (t) и процент замещения [2, 6].

Для оценки выраженности ОПН в крови исследовали содержание креатинина.

Полученные результаты обработаны статистически с использованием критериев t и U .

Основные показатели обмена белков в нормальной почке и при ОПН ($M \pm m$)

Показатель	Условия эксперимента	День после воспроизведения ОПН				
		1-й	3-й	7-й	14-й	30-й
УР белков, имп/100 с/мг	Опыт	646±37*	504±21*	592±22*	478±16	443±25
	Контроль	499±8	432±11	449±23	460±18	496±22
ОР белков, имп·10 ³ /100 с/100 г	Опыт	46±2*	45±3*	53±5*	34±2*	30±1
	Контроль	31±2	30±1	28±2	28±2	28±1
Масса почки, мг/100 г	Опыт	426±14*	575±19*	644±57*	459±4*	360±1*
	Контроль	344±12	350±13	366±15	339±2	314±2
Общее содержание белков, мг/100 г	Опыт	74±3*	89±6*	89±6*	71±4*	70±1*
	Контроль	63±4	70±3	64±4	60±2	59±2
Концентрация белков, мг/1 г	Опыт	171±6	156±9*	144±5*	160±7*	190±8
	Контроль	182±7	202±7	181±10	178±7	186±8
Число животных	Опыт	17	13	16	20	18
	Контроль	10	10	8	11	10

Примечание. Звездочка — величины, достоверно отличающиеся от контрольных.

Результаты и обсуждение

Внутримышечное введение глицерина вызывает возникновение выраженной ОПН. У подопытных животных отмечали значительное нарастание в крови содержания креатинина, свидетельствующее о развитии азотемии. На следующий день концентрация креатинина превысила контрольный уровень в 2,8 раза, а на 3-й день — в 8,6 раза. В почках при этом выявлялись изменения дистрофического и некротического характера. Около 20 % животных погибли при явлениях уремии. Вместе с тем у остальных животных ОПН носила обратимый характер. С 7-го дня содержание креатинина в крови у них начало снижаться, а к 30-му оно нормализовалось.

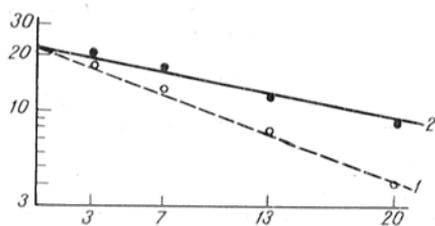
В почках при ОПН выявляются заметные изменения белкового метаболизма. Характер изменений в обеих почках был одинаковым. В работе приведены результаты исследований правой почки.

Как видно из таблицы, при ОПН повышается интенсивность синтеза почечных белков, о чем свидетельствует увеличение скорости включения в них меченой аминокислоты.

В 1-й день развития ОПН величины УР и ОР белков были выше контрольного уровня соответственно на 29 и 48 %. Увеличение УР сохранялось в течение 1-й недели, ОР — на протяжении 14 дней. В последующем эти показатели нормализовались. Повышение скорости белкового синтеза сопровождалось увеличением массы почки и со-

держания в ней белков (см. таблицу). В 1-й день развития ОПН указанные параметры были повышены на 24 и 17 %. Наиболее выраженное их увеличение отмечено на 7-й день. В этот срок они составляли соответственно 176 и 139 % от контрольных величин. В последующем масса почки и содержание в ней белков постепенно снижались, однако на 30-й день они были заметно выше контрольных величин.

Обращает на себя внимание тот факт, что на фоне увеличения общего содержания белков в целой почке концентрация их в почечной ткани при ОПН снижается, наиболее заметно — на 3-й и 7-й дни. Последнее, как показали проведенные нами исследования, обусловлено развитием отека почек, увеличением содержания в них воды. Восстановление концентрации белков в почках происходит к 30-му дню. Повышение при ОПН интенсивности синтеза белков сопровождается уменьшением скорости их распада. Как видно на рисунке, у животных опытной группы ОР белков в почке снижается медленнее, чем у контрольных крыс. У контрольных животных радиоактивность белков на 3, 7, 13 и 20-й дни была ниже исходной величины соответственно на 21,2, 39,2, 63,2 и 77,8 %. У подопытных животных на 3-й день радиоактивность белков существенно не изменилась, а на 7, 13 и 20-й дни она уменьшилась соответственно на 21,2, 43,9 и 58,5 %. При ОПН имело место увеличение периода полураспада и повышение времени кругооборота белков соответственно с 9 и 13 до 16



Динамика распада белков почки в норме и при ОПН.

По оси абсцисс — время (в сут), по оси ординат (в полулогарифмической шкале) — ОР в целой почке (в имп · 10⁴/100 с). 1 — контроль, 2 — опыт. Исследования проведены на 90 крысах. Различия между опытом и контролем на всех сроках достоверны.

и 23 сут, а также уменьшение процента их замещения с 7,7 до 4,3 в сутки.

Из приведенных данных следует, что в механизме увеличения содержания белков в почках при ОПН играет роль как интенсификация их синтеза, так и ограничение распада.

Можно полагать, что указанные изменения белкового метаболизма имеют адаптивное значение. Повреждение почек при ОПН сопровождается нарушением структуры и функции их белков. В частности, как показали проведенные ранее исследования, при данном патологическом процессе существенно снижается активность АТФаз, играющих важную роль в транспортной функции почечных канальцев [1].

Увеличение в этих условиях интенсивности синтеза белков в сочетании с уменьшением скорости их распада, по-видимому, можно рассматривать как один из механизмов саиогенеза, который направлен на увеличение в почках содержания функционально активных белковых молекул (ферментов, переносчиков и др.), что имеет существенное значение для активации репаративных процессов и восстановления почечной деятельности.

УДК 616-008.939.22-092.9-02:615.917:547.262

Г. Х. Божко, П. В. Волошин, В. С. Чурсина

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ И СВЯЗЫВАНИЯ ХОЛЕСТЕРИНА В ТКАНЯХ МОРСКИХ СВИНОК ПРИ ЭТАНОЛОВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ И ХОЛЕСТЕРИНОЗЕ

НИИ неврологии и психиатрии, Харьков

Известно, что этанол способен индуцировать или значительно обострять течение сердечно-сосудистых заболева-

ний, связанных с атеросклерозом [7, 9]. Однако широкое распространение получило представление об антиате-

ЛИТЕРАТУРА

1. Жизневская Н. Г. // Механизмы адаптации и компенсации, методы их тренировки, контроля и стимуляции. — Минск, 1985. — С. 21—22.
2. Меерсон Ф. З., Явич М. П., Лерман М. И., Лаптева Р. И. // Вопр. мед. химии. — 1974. — № 1. — С. 9—14.
3. Наточин Ю. В. Основы физиологии почки. — Л., 1982.
4. Рябов С. И. Болезни почек. — Л., 1982.
5. Тареев Е. М., Ермоленко В. М. // Клиническая нефрология. — М., 1983. — Т. 1. — С. 207—230.
6. Явич М. П. // Современные методы в биохимии. — М., 1977. — С. 322—326.
7. Bidani A. K., Churchill P. C. // Amer. J. Physiol. — 1981. — Vol. 10, N 1. — P. F34—F38.
8. Carter W. J., Van Der Wiejden Benjamin W. S., Faas F. H. // Metabol. clin. exp. — 1980. — Vol. 29, N 10. — P. 910—915.
9. Cuchner H. M., Barnens J. L., Stein J. H., Reineck H. J. // Amer. J. Physiol. — 1986. — Vol. 19, N 2. — P. F315—F321.
10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.
11. Reineck H. J., O'Connor G. J., Lifschitz M. D., Stein J. H. // J. Lab. clin. Med. — 1980. — Vol. 96, N 2. — P. 356—362.
12. Triefillis A. L., Kahng M. W., Trump B. F. // Exp. molec. Path. — 1981. — Vol. 35, N 1. — P. 1—13.

Поступила 25.09.87

METABOLISM OF PROTEINS IN KIDNEY WITH ACUTE INSUFFICIENCY

N. G. Zhiznevskaya, V. S. Makarenko

Medical School, Vitebsk

Acute kidney insufficiency was simulated in rats by means of intramuscular administration of glycerol. Intensity of protein biosynthesis and content of proteins were increased, while their catabolism was decreased in kidney under these conditions. At the same time, half-life and a period of the proteins turnover were elongated, whereas the rate of their substitution was decreased.

рогенном действии алкоголя [8]. Многочисленные гипотезы атерогенеза так или иначе учитывают значение гиперхолестеринемии (ГХС); согласно одной из гипотез, атеросклероз рассматривается как осложненный холестериноз. Подразумевается, что главная причина атеросклероза — накопление холестерина (ХС) в тканях. Доля ХС крови составляет около 8% от его общего содержания в организме и, следовательно, может не отражать изменение его уровня в тканях [5]. В связи с этим мы исследовали содержание ХС и величину его связывания различными тканями при избытке ХС в пище, этаноловой интоксикации и сочетанном действии этих факторов.

Методика

Подопытными животными служили самцы морских свинок 5—8-месячного возраста, массой 400—500 г. Животных разделяли на 4 группы по 4—9 особей в каждой: контрольные, ежедневно получавшие ХС (0,5 г/кг), этанол (4 г/кг), подвергавшиеся сочетанному действию указанных факторов. Подопытные и контрольные животные в течение всего времени экспериментов находились в условиях лабораторного вивария и получали одинаковый в качественном и количественном отношении рацион (овощи, сено, хлеб, молоко). Применяли дозы этанола средней токсичности, которые наиболее часто используют при исследовании экспериментального алкоголизма. 30% раствор этанола вводили вертикально удерживаемым животным по одной капле *per os* при помощи шприца с насадкой из полихлорвиниловой трубки. Суспензию ХС в молоке вводили таким же способом перед кормлением.

Концентрацию ХС определяли по ранее описанному методу в сыворотке крови, печени, сердце, почках, надпочечниках и ткани головного мозга через 30, 60 и 90 сут после воздействия перечисленных факторов [2]. Сыворотку собирали после центрифугирования крови при 2000 об/мин в течение 10 мин при температуре 4°C. Печень и сердце перфузировали, а другие ткани ополаскивали охлажденным физиологическим раствором, удаляли крупные сосуды и гомогенизировали. Гомогенат обрабатывали при кратковременном кипячении смесью спирт — эфир (3:1), охлаждали и фильтровали. Экстракт выпаривали и полученный осадок растворяли в хлороформе. Часть раствора использовали для определения концентрации ХС [4]. 4 мл полученного раствора вносили в счетные флаконы, выпаривали и к осадку добавляли толуоловый сцинтиллятор. Неопределенно меченый [³H]-холестерин («Изотоп», СССР) удельной активности 14 МБк на 1 мг ХС вводили внутривентриально за 2 ч до начала эксперимента в количестве 8 МБк на 100 г массы тела. Радиоактивность измеряли на счетчике СБС-2 с 33% эффективностью и рассчитывали удельную радиоактивность в распадах в минуту на 1 мг ХС.

Содержание ЛПНП и ЛПВП определяли после дифференциального осаждения полиэти-

ленгликолем и электрофореза в линейном градиенте концентрации ПААГ.

Использовали реактивы отечественного производства марки х.ч. или ос.ч.

Статистический анализ полученных результатов проводили по методу Фишера — Стьюдента [6]. Различия между сравниваемыми группами считали статистически значимым (достоверным), если вероятность его случайного происхождения не превышала 5% ($p < 0,05$). При значении p в области 0,1—0,05 делали вывод о наличии тенденции.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования распределения ХС в тканях интактных морских свинок, представленные в табл. 1, согласуются с данными литературы. Длительное поступление стероида с пищей приводило, как это обычно наблюдается, к значительному увеличению его количества в сыворотке крови [5]. В этих условиях в печени ХС накапливался по сравнению с начальным уровнем примерно с такой же интенсивностью, как в крови. Величина отношения ХС печени/ХС крови у подопытных животных была больше на 37%, чем у контрольных [однако в динамике экспериментов она практически не изменялась (табл. 3)]. Таким образом, при холестеринозе по крайней мере в течение 90 сут сохраняется равновесие между концентрацией ХС в печени и сыворотке крови. В мозге через 30 сут после начала опытов содержание ХС было ниже, чем в контроле (см. табл. 1). Это могло быть обусловлено угнетением синтеза стероида на фоне избыточного поступления с пищей, однако удельная активность [³H]-холестерина в тех же условиях не изменялась (табл. 2). В других исследованных тканях не удалось обнаружить существенных изменений.

Хроническая этаноловая интоксикация сопровождалась увеличением содержания ХС в мозге, почках и сердце. В надпочечниках, напротив, значение этого параметра через 30 сут после начала экспериментов уменьшалось. В сыворотке крови не удалось обнаружить изменений по сравнению с контролем (см. табл. 1).

Анализ результатов совместного действия изучаемых факторов позволяет сделать заключение о том, что уровень ХС повышался во всех исследованных тканях, за исключением надпочечников. Важно подчеркнуть, что в

Таблица 1

Изменение концентрации ХС в сыворотке крови (в мг/мл) и тканях (в мг на 1 г сырой ткани) морских свинок при ГХС, этаноловой интоксикации и сочетании их действия ($\bar{x} \pm S_x$)

Время исследования, сутки	Число опытов	Концентрация ХС					в сыворотке крови	Отношение ЛПНП/ЛПВП
		в печени	в надпочечниках	в почках	в мозге	в сердце		
Контроль								
	8	3,2±0,2	61,7±10,2	4,2±0,9	28,0±2,4	1,8±0,2	0,4±0,08	2,0±0,1
ГХС								
30-е	4	12,8±3,0*	78,6±6,3	3,6±0,4	20,1±0,1*	1,7±0,3	1,1±0,08*	4,4±1,2*
60-е	4	15,6±3,2*	87,1±7,5	3,3±0,3	21,3±1,6	1,9±0,3	1,4±0,10*	4,6±0,6*
90-е	5	21,0±2,5*	98,0±12,0	4,2±0,2	22,9±2,4	3,0±0,3*	1,9±0,07*	4,3±0,8*
Этаноловая интоксикация								
30-е	8	3,9±0,2	37,0±5,0*	6,3±0,2*	35,3±1,7*	2,1±0,1	0,4±0,03	2,5±0,4
60-е	7	7,9±0,2*	70,8±2,2	10,4±0,9*	57,2±3,4*	6,7±1,2*	0,5±0,04	3,5±0,4*
90-е	7	4,1±0,6	54,8±5,4	6,3±0,3*	39,4±3,4*	2,6±0,2*	0,5±0,05	2,5±0,5
Сочетание ГХС и этаноловой интоксикации								
30-е	8	15,6±1,4*	68,2±4,5	5,2±0,5	32,2±4,7	2,8±0,2*	0,8±0,03*	3,4±0,7
60-е	8	22,8±2,3*	90,7±5,9	8,0±0,4*	44,9±3,8*	3,6±0,4*	1,2±0,10*	5,1±0,9*
90-е	9	29,2±4,7*	74,0±0,7	9,1±0,9*	44,3±1,6*	5,1±0,7*	1,7±0,18*	4,8±0,5*

Примечание. Здесь и в табл. 2: звездочка — изменение статистически значимо по сравнению с контролем, \bar{x} — среднее арифметическое, S_x — среднеквадратичная ошибка среднего арифметического.

сердце через 30 сут изолированное действие обоих факторов не давало эффекта, в то время как при сочетании — концентрация ХС увеличивалась. В печени при этой постановке экспериментов за первые 60 сут на-

блюдали своеобразную аддитивность: количество ХС суммировалось при совместном действии обоих факторов. Однако через 90 сут прирост ХС превышал эффекты изолированного воздействия. Отношение ХС печени/ХС

Таблица 2

Изменения удельной радиоактивности (в расп/мин на 1 мг ХС·10⁻³) [³H]-холестерина тканей животных при ГХС, этаноловой интоксикации и сочетании их действия ($\bar{x} \pm S_x$)

Время исследования, сутки	Число опытов	Удельная радиоактивность, расп/мин на 1 мг ХС·10 ⁻³					сыворотка крови
		печень	надпочечники	почки	мозг	сердце	
Контроль							
	8	7,7±1,5	1,5±0,2	10,1±0,3	1,1±0,05	8,2±1,5	1,5±0,9
ГХС							
30-е	4	3,2±0,7*	0,8±0,30	9,5±4,1	1,0±0,1	9,9±1,6	0,7±0,3
60-е	4	2,3±0,6*	0,3±0,06*	8,0±4,1	1,4±0,6	9,9±1,3	0,6±0,1
90-е	5	1,5±0,5*	2,0±0,80	14,2±4,6	1,3±0,4	4,5±1,0	0,4±0,1
Этаноловая интоксикация							
30-е	8	3,2±0,5*	0,5±0,03*	1,4±0,4*	0,2±0,01*	3,4±0,6*	6,7±1,5
60-е	7	3,5±0,3*	0,7±0,01*	1,2±0,1*	0,4±0,08*	2,6±0,9*	3,1±0,8
90-е	7	6,5±3,0	0,7±0,02*	3,3±0,9*	0,5±0,19*	3,9±0,6	2,5±0,3
Сочетание ГХС и этаноловой интоксикации							
30-е	8	1,1±0,07*	1,0±0,09	2,0±0,2*	0,6±0,1*	5,3±0,6	1,1±0,1
60-е	8	1,3±0,43*	1,3±0,14	2,8±0,4*	0,7±0,2	5,1±0,9	1,2±0,1
90-е	9	1,8±0,60*	1,0±0,12	3,8±1,1	0,7±0,2	4,4±1,8	1,0±0,1

Т а б л и ц а 3
Величина отношения ХС ткани/ХС крови в динамике гиперхолестеринемии (ГХС) ($\bar{x} \pm S\bar{x}$)

Условия опытов	Время исследования, сутки		
	30-е	60-е	90-е
Печень			
ГХС	11,6±0,2	11,1±0,2	11,0±0,2
Сочетание ГХС и этаноловой интоксикации	19,5±0,3	19,0±0,3	17,1±0,3
Сердце			
ГХС	1,5±0,04	1,4±0,04	1,6±0,05
Сочетание ГХС и этаноловой интоксикации	3,5±0,06	3,0±0,06	3,0±0,06

крови при сочетанном действии возрастало почти на одну и ту же величину за каждый исследованный период времени по сравнению с изолированным влиянием избытка стероида в пище (табл. 3). Полученные результаты дают основание полагать, что в этом случае также устанавливалось равновесие между концентрацией ХС печени и сыворотки крови, однако происходил сдвиг в направлении кровь — печень. Подобное изменение величины отношения ХС ткани/ХС крови наблюдали и в сердце.

Как видно из табл. 2, в печени удельная активность [^3H]-холестерина при избытке стероида в пище за все исследованные периоды была меньше, чем в контроле. На основании полученных данных можно предположить, что в условиях холестериноза обновление ХС в печени снижалось. Через 60 сут после начала исследования это удалось отметить также в надпочечниках.

Хроническая этаноловая интоксикация приводила к значительному уменьшению удельной активности [^3H]-холестерина во всех исследованных тканях в течение практически всего изученного интервала времени экспериментов. Лишь в печени и сердце в конце исследования наблюдали тенденцию к восстановлению.

На основании результатов исследования совместного применения изучаемых факторов можно судить о том, что в печени этанол по крайней мере

не препятствовал снижению удельной активности [^3H]-холестерина на фоне ГХС. В отличие от этого в надпочечниках, сердце, почках и мозге эффект этанола ослаблен по сравнению с изолированным его влиянием.

В условиях холестериноза в сыворотке крови наблюдалось увеличение отношения ЛПНП/ЛПВП (см. табл. 1). Под влиянием этанола величина этого отношения увеличивалась лишь через 60 сут (после чего имела место нормализация). В результате совместного воздействия избытка ХС в пище и этанола через 30 сут после начала исследования отношение ЛПНП/ЛПВП не изменялось, однако в дальнейшем возрастало. На основании полученных результатов можно заключить, что этанол на фоне ГХС через 30 сут препятствовал относительному увеличению доли атерогенных липопротеинов, однако через 60 и 90 сут этот эффект отсутствовал [1].

Согласно концепции холестериноза, патогенная значимость избытка ХС заключается в конденсации липидного слоя плазматических мембран клеток, что влечет за собой структурно-функциональные нарушения регуляторных молекул, локализованных в наружных мембранах [5]. Полученные результаты свидетельствуют, что хроническая алкоголизация способствует развитию холестериноза. Во многих тканях наряду с возрастанием содержания ХС замедлялось его обновление. Поскольку известно, что значительная доля ХС клеток сосредоточена в плазматических мембранах, можно предположить, что накопление его в тканях сопровождается увеличением содержания ХС в этих клеточных структурах. Нарушение структуры и функции мембран, обусловленное изменением содержания ХС, рассматривают как один из факторов патогенеза алкоголизма [2]. Таким образом, полученные результаты согласуются с представлением о неблагоприятной роли этаноловой интоксикации в развитии холестериноза и связанных с ним патологических состояний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Божко Г. Х., Волошин П. В., Костюковская Л. С., Кулабухов В. М. // Укр. биохим. журн. — 1983. — Т. 55, № 3. — С. 318—324.

2. Буров Ю. В., Ведерникова Н. Н. Нейрохимия и фармакология алкоголизма. — М., 1985.
3. Клоб В. Г., Камышников В. С. Клиническая биохимия. — Минск, 1976.
4. Лопухин Ю. М., Арчаков А. И., Владимиров Ю. А., Коган Э. М. Холестериноз. — М., 1983.
5. Методы биохимических исследований / Под ред. М. И. Прохоровой. — Л., 1982. — С. 69—72.
6. Фишер Л. А. Статистические методы для исследований: Пер. с англ. — М., 1958.
7. Fraser G. E., Anderson J. T., Foster N. et al. // *Atherosclerosis*. — 1983. — Vol. 46, № 3. — P. 275—286.
8. Friedman H. S. // *Primary Cardiol.* — 1984. — Vol. 10, № 12. — P. 44—48.
9. Jacqueson A., Richard J. L., Ducimetiere P. et al. // *Atherosclerosis*. — 1983. — Vol. 48, № 2. — P. 131—138.
10. Mandybur T. I., Mendenhall Ch. L. // *Alcoholism* — 1983. — Vol. 7, № 4. — P. 357—361.

Поступила 25.08.87

УДК 616.155.25-008.1-02:616.152.7?

В. А. Кузнецов, П. И. Мордвинцев, Е. Х. Данк, В. А. Юркив,
А. Ф. Ванш

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ И БЕЛКОВЫЕ ДИНИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ НЕГЕМООВОГО ЖЕЛЕЗА КАК ИНГИБИТОРЫ АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ

Институт химической физики АН СССР, Институт эпидемиологии АМН СССР, Москва

Установлено [2], что динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) с различными анионными лигандами (тиосульфатом, цистеином, фосфатом) способны предотвращать агрегацию тромбоцитов, индуцируемую различными агентами (АДФ, адреналином, коллагеном). Эта активность объясняется наличием у ДНКЖ окиси азота, являющейся мощным активатором одного из ключевых внутриклеточных регуляторных ферментов — гуанилатциклазы (ГЦ) [4, 6, 7]. Активация ГЦ в тромбоцитах, приводящая к накоплению в них циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ), ослабляет образование диацилглицерида — активатора протеинкиназы С, что и является непосредственной причиной подавления способности тромбоцитов к агрегации [7, 10].

CHANGES IN CONTENT AND THE RATE OF CHOLESTEROL BINDING IN TISSUES OF GUINEA PIGS WITH ETHANOL INTOXICA- TION AND CHOLESTEROSIS

G. Kh. Bozhko, P. V. Voloshin, V. S. Tchursina
Institute of Neurology and Psychiatry, Kharkov

Content of cholesterol and binding of its labelled analogue was studied in guinea pigs tissues after hypercholesterolemia, ethanol intoxication and their combined action within 30, 60 and 90 days. Long-term consumption of cholesterol and chronic alcoholization caused accumulation of the steroid but in abundance of exogenous cholesterol its concentration was increased mainly in liver tissue and blood serum, while in ethanol intoxication—in brain and kidney tissues. Chronic alcoholization contributed to cholesterosis development; the increase in cholesterol content was accompanied by a decrease in its renovation, especially distinct in liver and heart tissues. Combined effect of cholesterol and ethanol on liver tissue was detected within 60 days; at the same time, simultaneous effect of cholesterol and ethanol caused more pronounced impairments in liver tissue within 90 days as compared with the individual action of these drugs. Concentration of cholesterol was not altered in heart muscle after administration either cholesterol or ethanol, while its content was increased after the drugs simultaneous effect.

Настоящая работа — продолжение исследования ингибирующего действия ДНКЖ на агрегацию тромбоцитов. В работе [2] опыты проводили на тромбоцитах, находившихся в плазме крови. Для исключения возможного влияния компонентов последнего на механизм действия ДНКЖ в настоящей работе эксперименты проводили на тромбоцитах, суспендированных в синтетической небелковой среде (среда хранения). Определяли влияние ДНКЖ на агрегацию тромбоцитов, индуцированную тромбином и ионофором Ca^{2+} — А23187, а также изменение при этом содержания цГМФ в тромбоцитах.

Методика

Тромбоциты выделяли из свежей донорской крови по методу [5], суспендировали в среде хранения, содержащей 136 мМ NaCl, 5,4 мМ KCl, 0,44 мМ KH_2PO_4 , 0,34 мМ Na_2HPO_4 , 11,2 мМ глюкозы, 10 мМ HEPES pH 7,4; содержание клеток $2 \cdot 10^8$ на 1 мл. Ряд опытов проведен на тромбоцитарной плазме при том же содержании тромбоцитов. Кинетику агрегации тромбоцитов регистрировали по увеличению светопропускания суспензии при длине волны 600 нм в агрегометре, собранном на основе спектрофотометра («Spectronic», США), в термостатируемой кювете вместимостью 0,5 мл. Спектры электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) снимали на радиоспектрометре ER-200D («Bruker», ФРГ). ДНКЖ с тиосульфатом или восстановленным глутатионом синтезировали по методике, описанной в работе [1]. Комплексы в объеме 0,01 мл вводили в суспензию тромбоцитов за 2—3 мин до введения индуктора агрегации — тромбина или ионофора A23187. Конечная концентрация этих индукторов в суспензии тромбоцитов составляла соответственно 0,1 и 1 мкМ.

Экстракцию цГМФ проводили этиловым спиртом. Содержание цГМФ определяли радиоиммунологическим методом с использованием наборов реактивов («Amersham», Англия).

Результаты и обсуждение

Выделенные из крови человека тромбоциты, суспендированные в среде хранения, обладали высокой агрегирующей активностью, индуцируемой тромбином или ионофором A23187 (рис. 1). ДНКЖ с тиосульфатом или глутатионом в равной мере ингибировали эту агрегацию, причем их активность была выше аналогичной ингибирующей активности нитропруссидата натрия — наиболее эффективного из известных в настоящее время ингибиторов агрегации тромбоцитов [6—9].

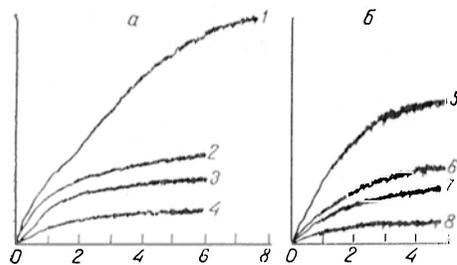


Рис. 1. Влияние ДНКЖ с тиосульфатом на агрегацию тромбоцитов в среде хранения. *а* — агрегацию индуцировали тромбином (0,1 мкМ), *б* — ионофором A23187 (1 мкМ). 1, 5 — контрольная запись в отсутствие ингибитора агрегации, 2—4 — в присутствии соответственно $7 \cdot 10^{-8}$, $1,5 \cdot 10^{-7}$, $7 \cdot 10^{-7}$ моль/мл, 6—8 — в присутствии соответственно $6 \cdot 10^{-9}$, $1,4 \cdot 10^{-8}$ и $2,8 \cdot 10^{-8}$ моль/мл ДНКЖ с тиосульфатом. Здесь и на рис. 2 и 3 по оси абсцисс — время (в мин), по оси ординат — пропускание.

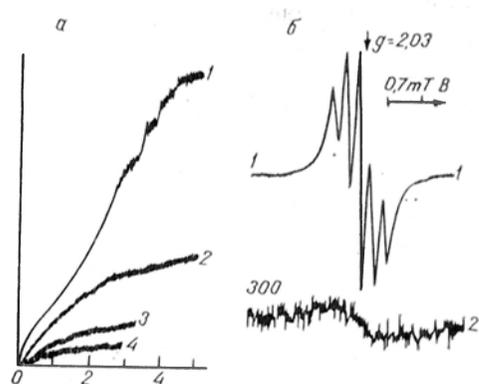


Рис. 2. Влияние ДНКЖ с тиосульфатом ($3 \cdot 10^{-7}$ моль/мл) на агрегацию тромбоцитов, индуцированную тромбином (0,1 мкМ).

а: 1 — агрегация в отсутствие ДНКЖ (контроль); 4 — в присутствии ДНКЖ; 2, 3 — препарат 4, отмывтый от ДНКЖ, суспендированный затем в свежей среде хранения и через 40 мин (2) и 20 мин (3) подвергнутый действию тромбина. *б*: 1 — сигнал ЭПР препарата тромбоцитов, обозначенного на *а* как 4; 2 — сигнал ЭПР препаратов, обозначенных на *а* как 2 и 3. Запись сигналов при 290 К, относительное усиление радиоспектрометра соответственно 1 и 300.

Агрегация тромбоцитов, вызванная ионофором A23187, подавлялась более низкими дозами ДНКЖ, чем в случае индукции агрегации тромбином.

Для проверки токсического действия ДНКЖ на тромбоциты были проведены следующие опыты. Тромбоциты, суспендированные в среде хранения или в плазме, выдерживали в течение 10—15 мин в присутствии ДНКЖ, затем отмывали от этих комплексов, суспендировали в среде хранения и определяли их агрегационную активность. О наличии в среде и тромбоцитах ДНКЖ судили по сигналу

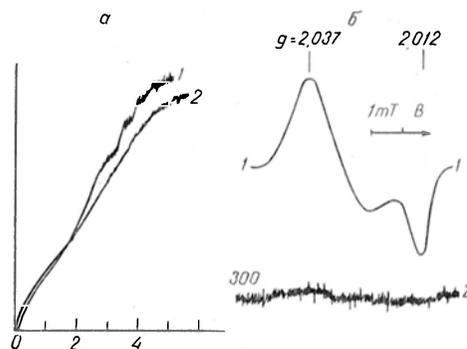


Рис. 3. Индуцированная тромбином (0,1 мкМ) агрегация тромбоцитов.

а: 1 — тромбоциты, выделенные из нитратной плазмы; 2 — из плазмы, содержащей ДНКЖ с тиосульфатом ($3 \cdot 10^{-7}$ моль/мл). *б*: 1 — сигнал ЭПР препарата, обозначенного на *а* как 2, перед выделением из плазмы, 2 — после суспендирования в среде хранения. Запись сигналов при 290 К, относительное усиление радиоспектрометра соответственно 1 и 300.

ЭПР. После введения низкомолекулярных ДНКЖ с тиосульфатом в суспензию тромбоцитов в среде хранения или в тромбоцитарную плазму в этих комплексах при комнатной температуре наблюдали соответственно либо симметричный узкий сигнал ЭПР с квинтетной сверхтонкой структурой (СТС) при $g=2,03$ (рис. 2), либо широкий анизотропный сигнал с $g_{\perp}=2,037$, $g_{\parallel}=2,012$ (рис. 3). Судя по параметрам первого сигнала, он был обусловлен самим ДНКЖ с тиосульфатом, второй — ДНКЖ с парными тиоловыми группами белков плазмы [3]. Образование белковых ДНКЖ, так называемых «комплексов 2,03» [1], было обусловлено переносом $Fe(NO)_2$ -групп из вводимых низкомолекулярных ДНКЖ с тиосульфатом на парные RS-группы белков [1]. Низкая подвижность последних при комнатной температуре не была достаточной для усреднения анизотропии g -фактора и СТС комплексов 2,03, что имело место в случае низкомолекулярных ДНКЖ (см. рис. 2 и 3). ДНКЖ не связывались с тромбоцитами. После центрифугирования их суспензии низкомолекулярные ДНКЖ или комплексы 2,03 обнаруживали только в надосадочной жидкости (см. рис. 2 и 3). Таким образом, эта процедура приводила к полному отделению ДНКЖ от тромбоцитов, что и позволило нам выяснить, оказывают ли эти комплексы токсическое влияние на тромбоциты. Эксперименты показали, что после отделения последних от плазмы, содержащей комплексы 2,03, и суспендирования их в среде хранения тромбоциты сразу же проявляли исходную способность к агрегации (см. рис. 3). У тромбоцитов, отделенных от среды хранения, содержавшей низкомолекулярные ДНКЖ, эта активность восстанавливалась не сразу, а постепенно, по мере выдерживания тромбоцитов в этой среде (см. рис. 2). Причина такой задержки неясна, но тем не менее можно говорить, что результаты поставленных опытов позволяют предполагать отсутствие токсического действия ДНКЖ на тромбоциты. Такой же вывод был сделан и в работе [2].

Содержание цГМФ в тромбоцитах, суспендированных в среде хранения, резко увеличивалось под действием ДНКЖ. Уровень цГМФ зависел от

времени инкубирования тромбоцитов с ДНКЖ. Через 1 мин после добавления ДНКЖ с тиосульфатом (0,7 мМ) в суспензию тромбоцитов при 37°C содержание цГМФ возрастало в 20—25 раз, через 5 мин инкубирования с ДНКЖ уровень цГМФ был на порядок выше исходного. К 10-й минуте инкубирования уровень цГМФ был ниже, но все еще превышал исходное значение в 3—4 раза. Таким образом, накопление цГМФ в тромбоцитах коррелировало с резким ослаблением их способности к агрегации, в связи с этим можно согласиться с авторами, которые полагают [6—8], что именно этот циклический нуклеотид является медиатором ингибирующего влияния ДНКЖ на агрегацию тромбоцитов. Имеющиеся в литературе данные [4, 6—8] позволяют думать, что активным началом в ДНКЖ является окись азота, высвобождающаяся из этих комплексов — низкомолекулярных или связанных с белками. Поскольку в самих тромбоцитах образования таких комплексов не наблюдалось, окись азота могла поступать в эти клетки только из ДНКЖ, локализованных в среде.

В заключение остановимся на факте ингибирующего действия ДНКЖ на агрегацию тромбоцитов, индуцированную ионофором А23187. Этот агент резко повышает содержание свободного кальция в тромбоцитах, что и приводит к агрегации последних [8]. Поскольку ДНКЖ нейтрализует возникающую при этом агрегацию, можно думать, что агрегирующее действие кальция на тромбоциты, как и в случае других индукторов — АДФ, тромбина и др., в основном обусловлено распадом фосфолипидов, приводящим к образованию диацилглицерида, подавляемого цГМФ. Этот вывод справедлив, если цГМФ влияет на агрегацию только на этой стадии метаболических процессов. Следует отметить, что ингибирующее влияние окиси азота на агрегацию тромбоцитов, индуцированную ионофором А23187, отмечалось и в работе [7], однако этот факт в ней не обсуждается.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ванин А. Ф. Нитрозильные комплексы гемового железа в тканях животных и микроорганизмах: Дис. ... д-ра биол. наук.— М., 1979.

2. Мордвинцев П. И., Руднева В. Г., Ванин А. Ф. и др. // Биохимия. — 1986. — Т. 51, № 11. — С. 1851.
3. Мордвинцев П. И., Клещев А. Л., Ванин А. Ф. // Биофизика. — 1986. — Т. 30, № 5. — С. 877—881.
4. Arnold W. P., Mittal C. K., Katsuki S., Murad F. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1977. — Vol. 74. — P. 3203.
5. Gerrard J. M. // Meth. Enzymol. — 1982. — Vol. 86. — P. 642.
6. Mellion B. T., Ignarro L. J., Ohlstein E. H. et al. // Blood. — 1981. — Vol. 57, N 5. — P. 946.
7. Nishikawa M., Kawamori M., Hidaka H. // J. Pharmacol. exp. Ther. — 1982. — Vol. 220, N 1. — P. 183.
8. Nishizuka Y. // Nature. — 1984. — Vol. 308. — P. 693.
9. Saxon A., Kattlove H. E. // Blood. — 1976. — Vol. 47, N 5. — P. 957.
10. Takai Y., Kaibachi K., Sato K., Nishizuka Y. // J. Biochem. (Tokyo). — 1982. — Vol. 91, N 2. — P. 403.

Поступила 11.04.87

LOW MOLECULAR AND PROTEIN DINITROSYL COMPLEXES OF NON-HEM FERRUM AS INHIBITORS OF THROMBOCYTES AGGREGATION

V. A. Kuznetsov, P. I. Mordvintsev, E. Kh. Dank, V. A. Yurkiv, A. F. Vanin

Institute of Chemical Physics, Academy of Sciences of the USSR, Institute of Epidemiology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Dinitrosyl complexes of ferrum with thiosulfate or reduced glutathione were found to inhibit completely aggregation of human thrombocytes, suspended in artificial protein-free medium. The inhibitory effect appears to occur as a result of activating action of nitrogen oxide derived from the complexes and affecting the thrombocyte guanylate cyclase.

УДК 615.385.1.015.2:577.152.311].07

Е. А. Селиванов, М. М. Вязьменская, И. М. Быстрова

О СОСТАВЕ И НЕКОТОРЫХ СВОЙСТВАХ ПРЕПАРАТА АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

НИИ гематологии и переливания крови, Ленинград

В последние годы обсуждается вопрос о необходимости создания лечебной формы препарата фермента ацетилхолинэстеразы (АХЭ), эффективность которого выявлена в экспериментах на животных [1, 2]. Особый интерес представляет аллогенный препарат АХЭ эритроцитов человека (препарат АХЭЧ) как наиболее физиологичный для организма больного. Имеются достаточные ресурсы сырья для получения препарата АХЭЧ — нереализованная эритроцитная масса донорской крови, остающаяся после отделения и использования плазмы.

Выпускаемый предприятием Пермского НИИ вакцин и сывороток (ПермНИИВС) препарат АХЭЧ имеет удельную активность 1—4 Е/мг, содержит до 12 % гемоглобина, большое количество групповых изоагглютиногенов А и В [3] и не пригоден для медицинских целей.

В настоящее время на базе Ленинградского НИИ вакцин и сывороток (ЛенНИИВС) в производственных условиях получены совместно с В. Ф. Борейко, К. В. Лапицким, В. А. Самокишем, О. И. Смирновым, Е. Е. Соколиной опытные партии нового препа-

рата АХЭЧ, который в перспективе предполагается использовать в лечебной практике.

В данной работе приведены результаты исследований электрофоретического разделения и ионообменной хроматографии препарата АХЭЧ, изготовленного в ЛенНИИВС. Определено содержание в препарате гемоглобина, групповых изоагглютиногенов А и В и тромбопластических веществ. Проведен также анализ состава нового препарата в сравнении с выпускаемым ранее.

Методика

Исследованы образцы препарата АХЭЧ с удельной активностью 26 Е/мг. Активность АХЭ в пробах определяли при 25 °С методом потенциометрического титрования [10] с автоматической регистрацией скорости гидролиза ацетилхолина на установке, состоящей из рН-метра 121 и потенциометра КСП-4. Содержание белка определяли по Lowry [13].

Диск-электрофорез в ПААГ проводили по методу [7] на приборе ПЭФА-1 (завода «Физприбор», г. Фрунзе) с использованием реактивов фирмы «Reanal» (ВНР). Полосы АХЭ-активности проявляли по методу [12]. Окрашенные гели сканировали на денситометре ДМ-1 (объединение «Красногвардеец», Ленинград).

Ионообменную хроматографию раствора препарата осуществляли на колонках 3×25 см ДЕАЕ-сефадексом А-50 при скорости элюции 12—15 мл/ч. Емкость геля составляла $200 \text{ E}/\text{см}^3$. В качестве основного раствора использовали $0,05 \text{ M}$ буфер трис-НСI pH 8,3, содержащий $0,03 \text{ M}$ хлорида магния. Десорбцию белков с геля осуществляли хлоридом магния в градиенте концентраций. Содержание гемоглобина в препарате определяли ацетон-цианид-риновым методом [4].

Наличие в препарате АХЭ веществ, обладающих тромбопластической активностью, определяли по изменению времени рекальцификации и тромбоинового времени [3]. Оценку изоантигенных свойств препарата проводили с помощью истощения групповых сывороток [5] с агглютинацией последних эритроцитами групп А(II) и В(III). Дозу АХЭ на $1,0 \text{ мл}$ плазмы рассчитывали, исходя из АХЭ-активности $1,0 \text{ мл}$ эритроцитов человека, что составляло $10 \text{ E}/\text{мл}$.

Полученные данные выражали как $M \pm m$ и определяли достоверность различий с использованием непараметрических критериев [2].

Результаты и обсуждение

Из рис. 1 видно, что препарат при электрофорезе в ПААГ дает четкую картину разделения. Белковый спектр препарата состоит из 5 полос, 2 из которых (полосы 1 и 2) совпадают с полосами ферментной активности. В препарате с удельной активностью фермента $26 \text{ E}/\text{мг}$ наряду с АХЭ содержатся и другие эритроцитные белки, которым соответствуют полосы 3, 4 и 5.

Сравнивая полученные результаты с картиной электрофоретического разделения препарата АХЭ производств-

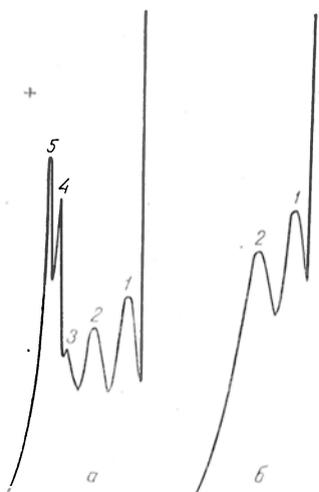


Рис. 1. Денситограммы гелей при электрофорезе в ПААГ препарата АХЭ.
а — окраска на белок, б — окраска на холинэстеразную активность.

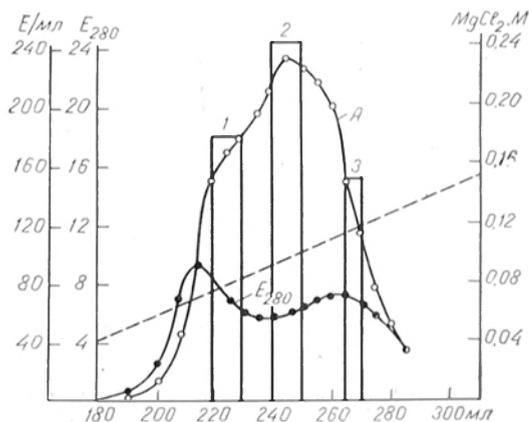


Рис. 2. Профиль градиентной элюции препарата АХЭ при ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-сефадексе А-50.

1, 2, 3 — фракции взятые для рехроматографии (см. рис. 3). А — активность АХЭ, $\text{E}/\text{мл}$. Здесь и на рис. 3 — прерывистая линия — градиент концентраций MgCl_2 ; по оси абсцисс — объем элюата, мл.

ва Пермского НИИ вакцин и сывороток [6], необходимо отметить, что в последнем содержится значительно больше балластных примесей (11—12 белковых полос), чем в препарате АХЭ, полученном в ЛенНИИВС.

Известно, что АХЭ, выделенная в водорастворимом виде, имеет несколько изоэнзимных форм [11, 14]. В наших экспериментах наличие изоформ у АХЭ было выявлено при ионообменной хроматографии раствора препарата на ДЕАЕ-сефадексе $A=50$ (рис. 2). Представленные данные показывают, что белок элюировался с геля двумя неоднородными фракциями: при концентрации хлорида магния $0,05—0,08 \text{ M}$ наблюдалась десорбция белка с максимальной экстинкцией при 280 nm $9,2$. При концентрации соли $0,1—0,13 \text{ M}$ происходила элюция белка с максимальной экстинкцией

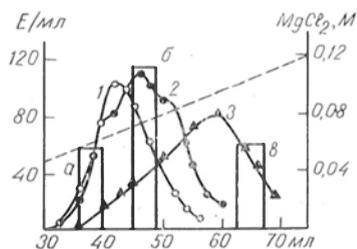


Рис. 3. Профиль градиентной элюции фракций АХЭ (1, 2, 3) при ионообменной рехроматографии на ДЕАЕ-сефадексе А-50.
а, б, в — фракции, взятые для электрофореза (см. рис. 4).

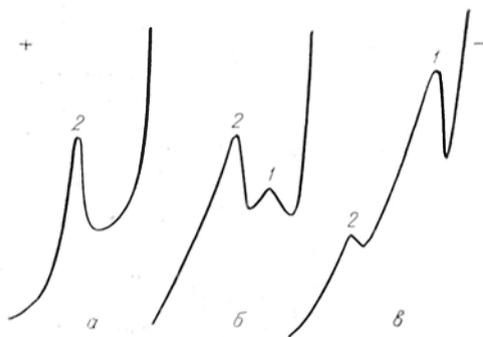


Рис. 4. Денситограммы гелей при электрофорезе в ПААГ фракций *а*, *б*, *в*, полученных при ионообменной хроматографии фермента АХЭ на ДЕАЕ-сефадексе А-50.

при 280 нм 7,1. Все белковые фракции содержали АХЭ, однако пик ферментативной активности не совпадал ни с одним из белковых пиков, и наибольшая активность определялась во фракциях с наименьшим количеством белка.

Судя по растянутой элюции фермента с геля и форме кривой активности АХЭ, отличающейся от кривой распределения индивидуального вещества, можно предположить, что в препарате имеется несколько изоэнзимных форм. Это подтверждается и результатами исследований фракций 1, 2 и 3, отмеченных на рис. 2, в одних и тех же условиях (рис. 3). Профили кривых активностей на рис. 3 не совпадают между собой. Кривая 1 в отличие от других имеет форму, близкую к гауссовскому распределению. Кривая 2 показывает, что во фракции 2 присутствуют все 3 изоформы АХЭ. Так, левое плечо кривой 2 полностью повторяет левое плечо кривой 1, вершина ее не совпадает с вершинами других пиков, а правое плечо расширяется от вершины в сторону пика 3. Вершина пика 3, в свою очередь, значительно удалена от вершин других пиков активности АХЭ, однако растянутость левого плеча кривой 3 также свидетельствует о наличии в этой фракции других изоэнзимных форм.

На рис. 4 представлены результаты диск-электрофореза в ПААГ фракций *а*, *б*, *в* (см. рис. 3), денситограммы гелей которых окрашены на холинэстеразную активность. Фракция *а* при электрофорезе давала только одну полосу ферментной активности, по подвижности совпадающую с полосами 2

Результаты определения тромбопластических свойств препарата АХЭЧ ($M \pm m$)

Проба	Время рекальцификации, с	Тромбиновое время, с
Контроль ($n=5$)	$87,8 \pm 1,6$	$29,8 \pm 0,7$
Опыт ($n=5$)	$90,1 \pm 1,1$	$32,0 \pm 1,2$

гелей *б* и *в*, которые имели по 2 ферментные полосы. Однако соотношение этих полос в гелях фракций *б* и *в* было различно: на денситограмме *б* преобладала полоса 2, а на денситограмме *в* — полоса 1.

Поскольку при ионообменной хроматографии фракции 2 (см. рис. 3) выявилось наличие 3 изоформ АХЭ, можно было ожидать, что при электрофорезе фракции *б* будут также получены 3 изоэнзимные полосы. В действительности этого не наблюдалось. Вероятно, это можно объяснить тем, что третья изоформа АХЭ по электрофоретической подвижности не отличается от проявляемых ферментных полос 1 и 2.

Выделенные из эритроцитов крови препараты АХЭ зачастую содержат гемоглобин или его дериваты [1, 15]: В этой связи в образцах нового препарата АХЭЧ определяли содержание гемоглобина ацетон-циангидриновым методом. Результаты определения показали, что гемоглобин в препарате АХЭЧ не содержится.

В препарате, получаемом из эритроцитной массы всех групп донорской крови, могут присутствовать изоагглютиногены А и В, представляющие собой высокомолекулярные гликопротеиды. Чтобы определить наличие изоагглютиногенов А и В в препарате АХЭЧ, последним истощали контрольные сыворотки, после чего проводили агглютинацию с эритроцитами А(II) и В(III). Титры агглютининов α и β контрольной сыворотки после растворения в ней препарата АХЭЧ не изменились, что свидетельствовало об отсутствии в препарате изоагглютиногенов А и В.

Предназначенный для медицинских целей препарат не должен содержать и тромбопластических веществ, всегда имеющихся в нативных эритроцитах крови. В таблице представлены результаты определения времени рекальцификации и тромбинового времени контрольной плазмы и плазмы с раст-

воренным в ней препаратом АХЭЧ.

Как видно из полученных данных, показатели свертывающей системы крови в контрольных и опытных пробах практически не различаются, что доказывает отсутствие тромбопластических веществ в препарате.

Таким образом, препарат АХЭЧ полностью лишен гемоглобина, тромбопластических и изоантигенных веществ, что является необходимым условием для дальнейшего использования его в медицинских целях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бресткин А. П., Вязьменская М. М., Дембо М. А. и др. // *Вопр. мед. химии.* — 1978. — № 5. — С. 608—612.
2. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. — Л., 1973.
3. Исследование факторов свертывания крови: Метод. указания. — Л., 1971.
4. Коржуев П. А. Гемоглобин. — М., 1964.
5. Лабораторные методы исследования в неинфекционной иммунологии / Под ред. О. Е. Вязова. — М., 1967. — С. 87.
6. Майзель Е. Б., Вязьменская М. М. // *Прикладная биохим.* — 1978. — № 1. — С. 78—84.
7. Маурер Г. Диск-электрофорез: Пер. с нем. — М., 1971.
8. Савина Л. С., Москалева Г. П. // *НИИ гематологии и переливания крови им. Г. М. Мухадзе. Сессия, посвящ. 100-летию со дня рождения акад. Г. М. Мухадзе: Материалы.* — Тбилиси, 1979. — С. 258—259.

9. Савина Л. С., Москалева Г. П., Альперович В. В. и др. // *Пат. физиол.* 1980. — № 6. — С. 50—52.
10. Яковлев В. А. Кинетика ферментативного катализа. — М., 1965.
11. Das P. K., Lo E. H. M. // *Enzyme.* — 1976. — Vol. 21, N 4. — P. 304—316.
12. Karnovsky M. J., Roots L. // *J. Histochem. Cytochem.* — 1964. — Vol. 12, N 3. — P. 219—221.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // *J. biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
14. Shafiq T., Cortner J. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1971. — Vol. 250. — P. 117—120.
15. Sihotang K. // *Ibid.* — 1974. — Vol. 370, N 2. — P. 468—476.

Поступила 17.11.87

ON THE COMPOSITION AND SOME PROPERTIES OF ACETYLCHOLINESTERASE FROM HUMAN ERYTHROCYTES

E. A. Selivanov, M. M. Vyaz'menskaya, I. M. Bystrova

Institute of Hematology and Blood Transfusion, Leningrad

Composition and some properties of human erythrocyte acetylcholinesterase prepared for use in medical practice were studied. After electrophoresis 5 protein bands, two of which exhibited the enzymatic activity, were detected in the preparation. Three isoenzyme forms of acetylcholinesterase, dissimilar in their electrophoretic mobility, were detected in the preparation by ion exchange chromatography on DEAE Sephadex A-50. The preparation did not contain hemoglobin, thromboplastic substances and group isoagglutinogens A and B.

УДК 612.352.2.014.46:615.31:547.262+616.36-008.939.22-02:615.31:547.262

М. И. Селевич

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ЭТАНОЛА И ОБМЕН ЛИПИДОВ В ПЕЧЕНИ КРЫС

Институт биохимии АН БССР, Гродно

Несмотря на многочисленные работы, посвященные метаболическим нарушениям при алкогольном отравлении, многие стороны патогенеза его до сих пор не выяснены. Известно, что хроническое потребление животными 5% раствора алкоголя в качестве единственного источника жидкости в течение 3, 6 и 9 мес приводит к нарушению метаболизма жирных кислот в печени [1]. Введение алкоголя человеку и экспериментальным животным вызывает увеличение триацилглицеринов в печени и плазме крови [14, 16], изменяет фосфолипидный состав в печеночной ткани [6].

Известно, что активность в печени α -глицерофосфатдегидрогеназы и глицеролкиназы (ферментов, участвующих в образовании α -глицерофосфата — непосредственного предшественника синтеза триацилглицеринов и фосфолипидных фракций) при 40- и 80-дневном алкогольном отравлении повышается. В этих условиях 40-дневная алкогольная интоксикация приводит к увеличению, 80-дневная — к снижению содержания α -глицерофосфата в печени [4].

Показано, что скорость синтеза триацилглицеринов в печени лимитирована содержанием в ней α -глицерофос-

фата [9] и длинноцепочечных жирных кислот [11]. Являясь связующим звеном между углеводным и липидным обменом в тканях, α -глицерофосфат выступает в роли регулятора процессов липогенеза и глюконеогенеза [17].

В абсолютном большинстве работ метаболическое действие этанола на биосинтез липидов в печени изучалось в основном только по включению меченых предшественников в суммарные фракции липидов (общие фосфолипиды, триацилглицерины и др.). В литературе встречаются лишь единичные сообщения [8] о влиянии алкоголя на биосинтез отдельных компонентов, входящих в состав сложных липидов (жирные кислоты, глицерин, азотистые основания).

Нами исследовано влияние алкогольной интоксикации не только на содержание липидных фракций и включение в них $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата, но и на биосинтез отдельных фрагментов тех липидов, у которых различия между двумя экспериментальными группами были достоверно значимы.

Методика

В опытах использовали белых крыс-самок массой 160—180 г. Животным внутривенно вводили 25 % раствор этанола в дозе 2 г на 1 кг массы тела на протяжении 7 дней, контрольным — 0,9 % раствор хлорида натрия. В каждую группу включено по 8 крыс. Животных содержали на обычном рационе вивария. За сутки до декапитации их лишали пищи, оставляя доступ к воде. $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетат вводили подкожно в дозе 0,2 мкКи на 1 г массы за 3 ч.

Получение липидного экстракта и его очистку проводили по методу [10]. Содержание общих липидов, холестерина, общих фосфолипидов и триацилглицеринов определяли по общепринятым методикам [7], α -глицерофосфат — по [4].

Нейтральные липиды разделяли в тонком слое силикагеля в системе растворителей гексан — диэтиловый эфир — ледяная уксусная кислота (73 : 25 : 2), фосфолипидные фракции — используя систему хлороформ — метанол — вода (65 : 25 : 4). Для определения удельной радиоактивности гидрофобной и гидрофильной частей липидных фракций проводили кислотное деацелирование [5].

Удельную радиоактивность фракций липидов (общие фосфолипиды, холестерин, диацилглицерины, триацилглицерины, эфиры холестерина) измеряли с помощью автоматического жидкостно-сцинтилляционного счетчика Mark-II («Nuclear Chicago»).

Результаты и обсуждение

При 7-дневной алкогольной интоксикации отмечено увеличение в печени

Т а б л и ц а 1

Содержание общих липидов, холестерина, общих фосфолипидов, триацилглицеринов (в мг%), фосфолипидный спектр (в %) печени крыс при алкогольной интоксикации ($M \pm m$)

Исследуемый показатель	Контроль	Опыт	<i>p</i>
Общие липиды	7626 ± 399	10 209 ± 1008	<0,02
Холестерин	297 ± 8	361 ± 9	<0,001
Триацилглицерины	1717 ± 197	3492 ± 424	<0,001
Общие фосфолипиды	3231 ± 192	3565 ± 513	>0,5
Лизофосфатидилхолин	8,0 ± 0,6	9,8 ± 0,8	<0,05
Сфингомиелин	14,1 ± 0,9	12,5 ± 1,0	>0,2
Фосфатидилхолин	42,5 ± 1,3	35,4 ± 1,5	<0,01
Фосфатидилэтаноламин	26,1 ± 1,3	28,9 ± 1,0	>0,1
Кардиолипид	8,7 ± 0,4	10,9 ± 1,1	<0,05

содержания общих липидов, в основном за счет повышения уровня холестерина и триацилглицеринов (табл. 1). Повышение содержания холестерина происходит, по-видимому, за счет избыточного накопления ацетил-КоА, образовавшегося из этанола, и за счет индукции ферментов эндоплазматической сети, участвующих в биосинтезе данного липида [12].

Накопление триацилглицеринов в печени при алкогольной интоксикации связывают с увеличением синтеза жирных кислот в условиях накопления в

Т а б л и ц а 2

Удельная радиоактивность липидов (в имп/мг за 1 мин), фосфолипидных фракций (в имп/мин на 1 г-атом $P\text{-}10^3$) печени крыс при алкогольной интоксикации ($M \pm m$)

Исследуемый показатель	Контроль	Опыт	<i>p</i>
Общие фосфолипиды	204 ± 16	255 ± 14	<0,02
Холестерин	366 ± 46	264 ± 42	>0,2
Диацилглицерины	41 ± 7	55 ± 14	>0,2
Триацилглицерины	366 ± 32	154 ± 24	<0,001
Эфиры холестерина	174 ± 9	66 ± 9	<0,001
Лизофосфатидилхолин	78 ± 16	72 ± 14	>0,5
Сфингомиелин	117 ± 14	87 ± 11	>0,2
Фосфатидилхолин	209 ± 18	138 ± 14	<0,01
Фосфатидилэтаноламин	203 ± 21	110 ± 5	<0,001
Кардиолипид	35 ± 8	28 ± 5	>0,5

Удельная радиоактивность отдельных частей триацилглицерина (в имп/мг за 1 мин), фосфатидилхолина и фосфатидилэтанолamina (в имп/мин на 1 г-атом P-10³) печени крыс при алкогольной интоксикации

Фракция	Гидрофобная часть			Гидрофильная часть		
	контроль	опыт	p	контроль	опыт	p
Триацилглицерин	160±10	48±8	<0,001	137±6	129±4	>0,2
Фосфатидилхолин	24±3	15±2	<0,02	212±23	181±10	>0,2
Фосфатидилэтанолamin	62±7	32±5	<0,01	381±24	325±46	>0,2

цитоплазме гепатоцитов ацетил-КоА и НАДФН и мобилизации их из жировых тканей, а также со снижением окисления жирных кислот, повышением уровня α -глицерофосфата, нарушением образования и катаболизма липопротеидов очень низкой плотности, ответственных за перенос триацилглицерина из ткани печени в кровь [13].

Исходя из того, что уровень α -глицерофосфата как фактора, лимитирующего скорость синтеза триацилглицерина в печени [9], у экспериментальных крыс не отличается от контрольного ($1,831 \pm 0,313$ и $1,828 \pm 0,152$ мкмоль на 1 г ткани, $p > 0,5$), следует считать, что в данной ситуации этот факт не является ведущим звеном в возникновении гипертриацилглицеридемии. Одним из факторов повышения концентрации триацилглицерина является, по-видимому, замедленный выход их из ткани печени в кровь. Это подтверждается литературными данными, указывающими на то, что этанол в дозе 2 г/кг тормозит выведение данной фракции липида из ткани [19].

Увеличенное содержание триацилглицерина в печени может происходить из-за усиленного периферического липолиза в результате выброса под влиянием алкоголя катехоламинов, что приводит к усилению поступления жирных кислот в печень. И действительно, активность (липопротеидлипазы) жировой ткани после приема этанола увеличена в несколько раз, в то время как синтез жирных кислот в ней замедлен [15].

Включение $1-^{14}\text{C}$ -ацетата в триацилглицерин печени алкоголизованных животных достоверно ниже, чем в контроле (табл. 2), причем снижение удельной радиоактивности происходит в основном за счет жирно-кислотного компонента, а не глицеринового фрагмента (табл. 3). Таким об-

разом, происходит снижение под действием алкоголя синтеза из ацетата жирных кислот, входящих в состав триацилглицерина, причем увеличение содержания триацилглицериновой фракции при одновременном уменьшении ее удельной радиоактивности свидетельствует об угнетении их катаболизма этанолом.

Алкогольная интоксикация приводит к снижению в печени относительного уровня фосфатидилхолина, увеличению концентрации лизофосфатидилхолина и кардиолипина (см. табл. 1). Эти результаты вполне согласуются с данными других авторов [6]. Содержание фосфатидилхолина может снизиться в связи с его деацилированием в лизофосфатидилхолин, количество которого в экспериментальной группе достоверно выше (см. табл. 1).

Прием этанола сопровождается снижением включения $1-^{14}\text{C}$ -ацетата в фосфатидилхолин и фосфатидилэтанолamin печени (см. табл. 2). При проведении кислотного гидролиза установлено, что уменьшение удельной радиоактивности фосфатидилхолина и фосфатидилэтанолamina происходит главным образом за счет жирно-кислотной части (см. табл. 3).

Понижение относительного уровня фосфатидилхолина с одновременным снижением включения меченого ацетата в данный фосфолипид свидетельствует о том, что под влиянием этанола происходит замедление его синтеза. Это соответствует данным других исследователей об угнетающем действии алкоголя на биосинтез фосфолипидных фракций печени [3].

Уменьшение удельной радиоактивности фосфатидилэтанолamina и его жирно-кислотной части свидетельствует об ингибировании этанолом синтеза жирных кислот из-за дефицита субстратов для их образования, т. е. аце-

тил-КоА, так как известно, что при острой (4 г/кг) [2] и хронической [15] алкогольной интоксикации снижается активность как ацетил-КоА-синтетазы, так и АТФ-цитратлиазы.

Несколько противоречивым кажется то положение, что при снижении удельной радиоактивности фосфатидилхолина и фосфатидилэтанолamina, составляющих 70—80% суммы всех фосфолипидов, включение $1-^{14}\text{C}$ -ацетата в общую фосфолипидную фракцию, наоборот, возрастает (см. табл. 2). Это несоответствие, по-видимому, объясняется тем, что мы не изучали наиболее быстро обменивающиеся фракции фосфолипидов моно-, ди- и трифосфоинозитидов. Некоторые авторы указывают, что алкоголь приводит к увеличению включения *in vivo* меченого ацетата в общие фосфолипиды печени [18].

Снижение включения $1-^{14}\text{C}$ -ацетата в триацилглицерина, эфиры холестерина, фосфатидилхолин и фосфатидилэтанолamina печени экспериментальных животных, получавших этанол, могло произойти вследствие разведения $1-^{14}\text{C}$ -ацетата меченым ацетатом, образующимся после катаболизма алкоголя.

Анализ представленных данных свидетельствует о существенных различиях в метаболизме липидов при алкогольной интоксикации, выражающихся в уменьшении включения $1-^{14}\text{C}$ -ацетата в жирно-кислотные компоненты сложных липидов (фосфатидилхолин, фосфатидилэтанолamina, триацилглицерина). Эти изменения, по-видимому, обусловлены тем, что этанол ингибирует синтез жирных кислот на уровне ферментных систем, ответственных за биосинтез ацетил-КоА, в частности ацетил-КоА-синтетазы и АТФ-цитратлиазы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Буко В. У. // *Вопр. мед. химии.* — 1986. — № 2. — С. 89—92.
2. Буко В. У., Селевич М. И., Горенштейн Б. И., Островский Ю. М. // *Фармакол. и токсикол.* — 1984. — № 6. — С. 67—70.
3. Карагезян К. Г., Амирханян Л. Т., Амирханян О. М., Александрян Д. В. // *Вопр. мед. химии.* — 1976. — № 1. — С. 30—33.

4. Карагезян К. Г., Қазарян П. А., Амирханян Л. Т., Амирханян О. М. // *Там же.* — 1976. — № 1. — С. 33—37.
5. Кейтс М. *Техника липидологии: Пер. с англ.* — М., 1975.
6. Ортенберг Э. А., Жихарева А. И., Былиевский А. Ш. // *Вопр. мед. химии.* — 1985. — № 6. — С. 24—27.
7. Прохорова М. И., Тупикова Э. Н. *Большой практикум по углеводному и липидному обмену.* — Л., 1965.
8. Титов В. Н., Пицун Д. Г. // *Вопр. мед. химии.* — 1986. — № 1. — С. 49—55.
9. Declero P. E., Debeer L. J., Monnaerts G. P. // *Biochem. J.* — 1982. — Vol. 202. — P. 803—806.
10. Folch J. B., Lees M., Stanley G. H. // *J. biol. Chem.* — 1957. — Vol. 226. — P. 497—499.
11. Greenspan M. D., Schroeder E. A., Yudkevitz J. B. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1982. — Vol. 710. — P. 15—22.
12. Lieber C. S., Spritz N., DeCarli L. M. // *J. clin. Invest.* — 1966. — Vol. 45. — P. 51.
13. March A. R., Fraser H. S. // *Clin. Sci.* — 1977. — Vol. 52, N 2. — P. 219—223.
14. Mistilis S. P., Barr G. D. // *Med. J. Aust.* — 1981. — Vol. 1. — P. 616—624.
15. Reitz R. C. // *Progr. Lipid Res.* — 1979. — Vol. 18. — P. 87—115.
16. Rodriguez R. J. J., Fuego R. R., Brago F. S. et al. // *Med. Clin.* — 1985. — Vol. 84. — P. 682—684.
17. Smith S. B., Prior R. L. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1982. — Vol. 712. — P. 640—645.
18. Vasdev S. C., Subrahmanyam D., Chakravarli R. N. et al. // *Ibid.* — 1974. — Vol. 369. — P. 323—330.
19. William A., Cooper C. // *Biochem. Pharmacol.* — 1974. — Vol. 23. — P. 2063—2068.

Поступила 17.10.87

METABOLIC EFFECTS OF ETHANOL AND LIPID METABOLISM IN RAT LIVER TISSUE

M. I. Selevich

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

Effect of ethanol intoxication of lipid metabolism in rat liver tissue was studied after daily intraperitoneal administration of 2g ethanol per kg of body mass within a week. Administration of ethanol led to an increase in content of total lipids, cholesterol and triacylglycerides in liver tissue as well as to elevation of relative content of lysophosphatidyl choline and cardiolipine and to a decrease of phosphatidyl choline. Under conditions of the intoxication incorporation of $1-^{14}\text{C}$ -acetate into triacylglycerides, phosphatidyl choline and phosphatidyl ethanolamine was decreased mainly as a result of a decrease in specific radioactivity of fatty acids of these lipids.

Н. А. Зорин

КОМПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ УГЛЕВОДНЫХ КОМПОНЕНТОВ АССОЦИИРОВАННОГО С БЕРЕМЕННОСТЬЮ α_2 -ГЛИКОПРОТЕИНА

Новокузнецкий институт усовершенствования врачей

Изучение углеводного состава гликопротеинов и иных полимеров подобной природы до сих пор является довольно трудной задачей, так как для этих целей необходимо полностью очистить от примесей указанные соединения. В процессе очистки неизбежны потери некоторых минорных компонентов и частичная денатурация гликопротеинов. Новый подход к решению этой задачи связан с использованием аффиноиммуоэлектрофореза, который не требует очистки углеводсодержащих соединений [2—5, 7]. Однако данный метод позволяет дать лишь ориентировочную оценку содержания углеводов. Целью настоящей работы было сочетание применения аналитических методов и аффиноиммуоэлектрофореза для изучения углеводных компонентов ассоциированного с беременностью α_2 -гликопротеина (АБГ), обладающего выраженной иммунорегуляторной активностью и сходного по составу с α -макроглобулином [13, 16].

Методика

Для изучения АБГ и его выделения использовали сыворотку крови беременных женщин (III триместр беременности). В последнем случае ее подвергали дробному осаждению сульфатом аммония гельхроматографии на колонке TSK-геля Toyopearl HW-55S («Toyo Soda», Япония) в рециклическом режиме на хроматографе UltroRack (LKB, Швеция) и негативной аффинной хроматографии на колонке цианбромированной сефарозы 4B («Pharmacia», Швеция), к которой были присоединены ослиные антитела против сывороточных белков человека [1]. Очищенный АБГ удовлетворял основным требованиям к гомогенности: индуцировал у кроликов выработку моноспецифических антител при длительной иммунизации, образовывал одну полосу при электрофорезе в полиакриламидном геле в неденатурирующих и денатурирующих условиях, а также одну полосу преципитации при реакции с козьей поливалентностью антисывороткой против сывороточных белков человека [1]. Очищенный АБГ использовали для получения моноспецифической антисыворотки путем внутрикожной иммунизации кроликов [1, 6]. Содержание гексоз в составе препаратов АБГ оценивали при помощи антронового метода [17]. Концентрацию

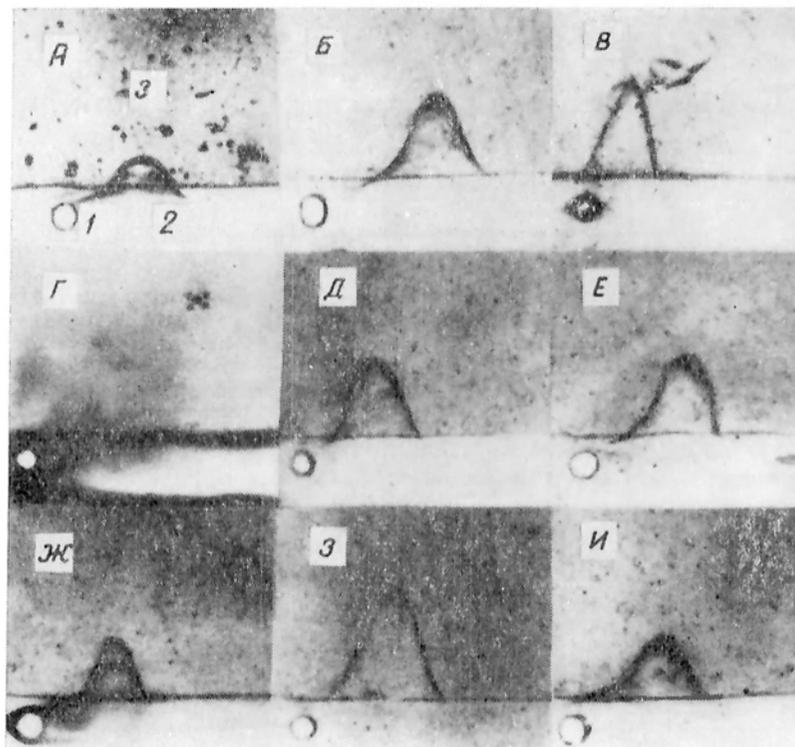
ацетиламиногексоз определяли после трехчасового гидролиза в 3М растворе соляной кислоты [12]. Содержание сиаловых кислот изучали при помощи тиобарбитурового метода [18]. Концентрацию фукозы устанавливали на основе ее реакции с гидрохлоридом цистеина [8]. Общее содержание белка в препаратах АБГ оценивали по методу Лоури [9].

Углеводные радикалы АБГ изучали также при помощи перекрестного аффиноиммуоэлектрофореза [7]. Отличия от перекрестного иммуоэлектрофореза состояли в том, что в гель первого направления электрофореза вводили лектины — белки, способные избирательно реагировать с определенными углеводами [6]. Для этих целей использовали коммерческие препараты конканавалина А («Pharmacia», Швеция) и фитогемагглютинина Р («Биолар», СССР). Лектины семян гороха (*Pisum sativum*) и бобов (*Vicia faba*) выделяли при помощи аффинной хроматографии на сефадексе G-200 («Pharmacia», Швеция) [5]. Галактозо-специфические лектины арахиса (*Arachis hypogaea*) и фукозоспецифичный лектин икры окунии (*Perca fluviatilis*) очищали при помощи аффинной хроматографии соответственно на галактозил-эпокси- и фукозилэпоксикрахмале [10]. Лектины картофеля (*Solanum tuberosum*) и ячменя (*Hordeum vulgare*) выделяли посредством сочетания ионообменной и гельхроматографии [5, 11]. Полученные препараты лектинов дополнительно характеризовали по углеводной специфичности с помощью реакции угнетения агглютинации эритроцитов человека [5]. Для проведения аффиноиммуоэлектрофореза лектина вводили в 1% агарозный гель (Calbiochem, США) до конечных концентраций 0,1—2 мг/мл. Обработку готовых иммуоэлектрофорезов проводили по общепринятым рекомендациям [6, 7]. Реакции АБГ с лектинами считали достоверными при изменении формы, площади и степени окрашивания преципитатов.

В работе использованы следующие реактивы: DEAE — Toyopearl 650S, CM — Toyopearl 650S («Toyo Soda», Япония), DEAE-сефадекс А-50, QAE-сефадекс А-50, сефадекс G-25 («Pharmacia», Швеция), N-ацетил-D-глюкозамин, N-ацетил-D-галактозамин, N-ацетилсалициловая кислота, L-фукоза, манноза, галактоза («Merck», ФРГ). Остальные реактивы были отечественного производства.

Результаты и обсуждение

Общее содержание углеводов в очищенном препарате АБГ составило 10,9% (гексозы — 6,8%, аминоксахара — 1,7%, сиаловые кислоты — 2,1%, фукоза — около 0,3%). Это достаточно хорошо согласуется с данными литературы [14—16].



Реакции АБГ с лектинами.

а — контрольная иммуноэлектрофорграмма; *б* — реакция с лектином бобов; *в* — реакция с лектином гороха; *г* — реакция с конканавалином А; *д* — реакция с лектином арахиса; *е* — реакция с лектином картофеля; *ж* — реакция с фитогемагглютинином Р; *з* — реакция с лектином ячменя; *и* — реакция с лектином икры окуня. 1 — лунка для внесения образца; 2 — гель первого направления иммуноэлектрофореза; 3 — гель второго направления иммуноэлектрофореза, содержащий 2% антисыворотки против АБГ. Условия иммуноэлектрофореза: электрофорез в первом направлении в течение 1 ч при градиенте потенциала 10 В/см; электрофорез во втором направлении в течение 16 ч при градиенте потенциала 2 В/см. Анод вверху.

При реакции с лектином бобов площадь преципитата АБГ резко возросла, а сам преципитат сместился к катоду (см. рисунок). Лектин гороха способствовал смещению преципитата гликопротеина в противоположную сторону, а также резкому снижению четкости его контуров и увеличению его площади. В ходе реакции с конканавалином А преципитат АБГ исчезал, но у лунки формировался темно-окрашенный аффинный преципитат. Лектин арахиса способствовал лишь увеличению площади преципитата АБГ. Лектин картофеля вызывал как увеличение площади преципитата, так и катодную его асимметрию. При реакции с фитогемагглютинином Р у лунки формировался катодно ориентированный аффинный преципитат, тогда как преципитат АБГ сместился в площадь геля второго направления иммуноэлектрофореза, хотя и не изменял площади. Лектин ячменя способствовал максимальному увеличению пло-

щади преципитата АБГ и максимально снижал его четкость. Лектин икры окуня вызывал наиболее выраженную катодную асимметрию преципитата изучаемого гликопротеина (см. рисунок).

Конканавалин А, лектины бобов и гороха имеют идентичную углеводную специфичность — они реагируют в порядке убывания аффинитета с маннозой, глюкозой и ацетилглюкозамином [5]. Лектин ячменя реагирует с аминокислотами, а лектин картофеля — с олигомерами ацетиламиносахаров [5]. Лектины арахиса и фитогемагглютинин Р относятся к галактозоспецифичным, а лектин икры окуня — к фукозоспецифичным [5]. Таким образом, на основе данных аффиноиммуноэлектрофореза легко установить, что АБГ содержит гексозы, аминокислоты и фукозу. Это полностью соответствует результатам химического анализа состава этого белка. Однако аффиноиммуноэлектрофорез открывает дополни-

тельные возможности анализа глицидных компонентов АБГ. Так, увеличение площади преципитатов АБГ свидетельствует о блокировании его антигенных детерминант при реакции с лектинами. В этом случае аффинитет моноспецифической антисыворотки к нему снижается и происходит реакция, сходная с реакцией частичной антигенной идентичности [3, 6, 7]. Следовательно, антигенность АБГ во многом определяется его глицидными компонентами.

Большая часть использованных лектинов реагирует с АБГ подобно моноклональным антителам и не образует «решетки», необходимой для формирования аффинных преципитатов. Следовательно, их рецепторы представлены в молекуле гликопротеина пространственно разбиченными единичными углеводными звеньями [3, 4, 7]. Катодная асимметрия преципитатов АБГ при реакции с лектинами картофеля и икры окуня может свидетельствовать лишь о гетерогенности этого белка. Действительно, результаты химического анализа АБГ в плазме крови как убедительно демонстрируют наличие полимеров этого белка, так и предполагают их образование при связывании протеолитических ферментов [13]. В то же время микрорегенность АБГ может быть связана и с конформационными изменениями, в результате которых глицидные компоненты могут не только маскироваться, но и высвободиться.

Проведенное нами исследование показало, что сочетание химического анализа углеводов гликопротеинов с аффинноиммуноэлектрофорезом дает более полную информацию, чем каждый из этих методов в отдельности. Аффинноиммуноэлектрофорез позволяет работать с неочищенным материалом и дает возможность установить «топографию» углеводов в структуре макромолекул. Этот метод позволяет подобрать оптимальные лектины для создания сорбентов, пригодных для эффективной очистки гликопротеинов от примесей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зорин Н. А. // Вопр. мед. химии. — 1983. — № 5. — С. 41—43.
2. Зорин Н. А. // Журн. микробиол. — 1983. — № 3. — С. 98—99.
3. Зорин Н. А., Кривоносов С. К., Зорина Р. М. и др. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 6. — С. 96—98.
4. Кривоносов С. К., Зорин Н. А., Ионова Н. К. и др. // Бюл. экспер. биол. — 1985. — № 5. — С. 568—571.
5. Луцки М. Д., Луцки А. Д., Панасюк Е. П. Лектины. — Львов, 1981.
6. Руководство по количественному иммуноэлектрофорезу: Методы и применение / Под ред. П. Аксельсена и др.; Пер. с англ. — М., 1977.
7. Bøg-Hansen T. C., Hau J. // Acta histochem. — 1982. — Vol. 71. — P. 47—57.
8. Dische L., Shettles L. // J. biol. Chem. — 1948. — Vol. 172. — P. 595—603.
9. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
10. Matsumoto I., Osawa T. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1972. — Vol. 46. — P. 1810—1815.
11. Partridge J., Shannon L., Gumpf D. // Biochim. biophys. Acta. — 1976. — Vol. 454. — P. 470—483.
12. Reisig J. L., Strominger J. L., Leboir L. F. // J. biol. Chem. — 1955. — Vol. 217. — P. 959—966.
13. Sand O., Folkersen J., Westergaard J. G. et al. // Ibid. — 1985. — Vol. 260. — P. 15723—15735.
14. Schoultz B. V., Stigbrand T. // Biochim. biophys. Acta. — 1974. — Vol. 359. — P. 303—310.
15. Stimson W. H., Eubank-Scott L. // FEBS Lett. — 1972. — Vol. 23. — P. 298—302.
16. Thomson A. W., Horne C. H. W. // Invest. Cell. Path. — 1980. — Vol. 3. — P. 295—309.
17. Trevelyan W. R., Harrison J. S. // Biochem. J. — 1952. — Vol. 50. — P. 298—311.
18. Warren L. // J. biol. Chem. — 1959. — Vol. 234. — P. 1971—1975.

Поступила 17.10.87

COMPLEX ANALYSIS OF CARBOHYDRATE COMPONENTS IN ALPHA₂-GLYCOPROTEIN, RELATED TO PREGNANCY

N. A. Zorin

Institute for Postgraduate Training of Physicians, Novokuznetsk

Content and distribution of carbohydrates in structure of alpha₂-glycoprotein, related to pregnancy, were studied by means of chemical analysis and affinity immunoelectrophoresis. The data obtained using both these procedures correlated well. Affinity immunoelectrophoresis could be used in studies of the carbohydrate components in crude preparations of glycoproteins, whereas chemical analysis was more effective for highly purified preparations.

Л. Е. Панин, Л. М. Поляков, А. А. Розуменко, Н. Г. Биушкина

ТРАНСПОРТ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ ЛИПОПРОТЕИДАМИ СЫВОРОТКИ КРОВИ

Институт клинической и экспериментальной медицины СО АМН СССР, Новосибирск

Основная функциональная роль липопротеидов (ЛП) сыворотки крови состоит в транспорте липидов. Кроме того, ЛП могут связывать и транспортировать ксенобиотики [5, 16], жирорастворимые витамины [8, 14] и, возможно, тиреоидные гормоны [1]. Способность связывать некоторые стероидные соединения впервые была показана [3]. Возможность связывания неполярных соединений типа тестостерона сывороточными ЛП была показана в экспериментах с растворением стероидов в липемической сыворотке [13]. Позднее обнаружили связывание тестостерона суммарной фракцией ЛП низкой и очень низкой плотности (ЛПНП и ЛПОНП соответственно), выделенной из сыворотки крови свиньи с помощью полианионной преципитации [11].

В настоящей работе изучали связывание меченых стероидных гормонов ЛП сыворотки крови, а также распределение их между ЛП-фракциями, используя методы ультрацентрифугирования и гель-фильтрации. Для выяснения природы связывания стероидов с ЛП применяли метод тушения флюоресценции триптофана.

Методика

Опыты проводили на крысах-самках Вистар массой 180—200 г. Бензол-этанольные растворы Δ^5 -[4- ^{14}C]-прегненолона, дезокси[1 α ,2 α (n)- ^3H]-кортикостерона, [1 α ,2 α (n)- ^3H]-кортизола, [1 α ,2 α (n)- ^3H]-кортикостерона и [1 α ,2 α (n)- ^3H]-прогестерона фирмы «Амершам» (Англия), выпаривали в токе азота при 40—50°C, добавляли 10 мкл абсолютного этанола и разводили 0,15 М NaCl до концентрации 100 мкКи/мл. Меченые кортикостероиды вводили животным внутривенно в дозе 25 мкКи на 100 г массы. Животных забивали через 30 мин после введения метки. К полученной крови добавляли $\text{Na}_2\text{-ЭДТА}$ в количестве 1 мг/мл. Сыворотку получали центрифугированием при 2000 г в течение 20 мин. Препаративное выделение ЛП осуществляли методом ультрацентрифугирования с добавлением сухого КВг [9] на центрифуге «L-75 Beckman», ротор 75 Ti. Полученные ЛПОНП (плотность менее 1,006 г/см 3), ЛПНП (плотность 1,006—1,063 г/см 3) и ЛПВП (плотность 1,063—

1,21 г/см 3) оценивали на содержание радиоактивности.

Распределение кортикостероидов между отдельными фракциями ЛП в опытах *in vitro* изучали при добавлении в сыворотку крови человека или крысы меченых гормонов в дозе 1 мкКи/мл. Сыворотку инкубировали 30 мин при 37°C и 60 мин при 4°C. Несвязавшаяся метку удаляли с помощью декстранированного угля («Амершам», Англия), который добавляли в количестве 50 мг/мл. Фракции ЛП выделяли с помощью ультрацентрифугирования и измеряли в них радиоактивность.

В другой серии опытов выделенные ЛП инкубировали с мечеными стероидными гормонами, смесь разделяли с помощью гель-фильтрации. Концентрацию ЛП доводили до 0,5 мг белка в 1 мл. К 0,5 мл ЛП добавляли 1 мкКи меченых гормонов (10^{-10} — 10^{-11} моль) и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Смесь наносили на колонку (1,6×30 см) с сефадексом G-25 («Фармация», Швеция) и элюировали 0,02 М трис-HCl-буфером pH 8,0, содержащем 5 мМ $\text{Na}_2\text{-ЭДТА}$ и 5 мМ 2-меркаптоэтанол, со скоростью 40 мл/ч. Профиль элюции регистрировали на УФ-детекторе «Увикорд II» фирмы ЛКБ (Швеция).

Меченые стероиды экстрагировали из ЛП добавлением 20-кратного объема хлорида метилена с последующим интенсивным встряхиванием в течение 3 мин. Верхнюю водную фазу удаляли, счет радиоактивности проводили после упаривания метиленхлоридного экстракта. Использовали сцинтиллятор, содержащий 4 г РРО и 0,04 г РОРОР в 1 л толуола. Радиоактивность измеряли на жидкостном счетчике («Intertechnique SL-30», Франция). Эффективность счета составляла 40 %.

Анализ белковой конформации триптофансодержащих апопротеинов проводили на спектрофлуориметре МПФ-4 (фирма «Хитачи», Япония) при длине волны возбуждения — 285 нм и эмиссии — 336 нм. Использовали спиртовые растворы кортизола и кортикостерона в 50 % этаноле. Тушение флюоресценции регистрировали на самописце при добавлении 10 мкл стероида ($2,8 \cdot 10^{-2}$ М) к 2 мл раствора ЛП в термостатируемых кюветках при 4°C. Концентрация белка в каждом из классов ЛП в 0,05 М трис-ацетатном буфере (pH 8,0) составляла 0,01—0,05 мг/мл. Исходную величину флюоресценции раствора ЛП принимали за 100 %. Рассчитывали снижение величины флюоресценции в процентах после добавления стероида. Концентрация этанола в растворе ЛП не превышала 0,5 %.

Результаты и обсуждение

Введение животным ^3H -кортикостерона показало, что через 30 мин 14,6 % меченого кортикостерона было связано с ЛП. При этом среди ЛП-фракций

Распределение меченых кортикостероидов между фракциями ЛП сыворотки крови в опытах *in vivo* и *in vitro* (в % от общей радиоактивности)

Кортикостероид	Радиоактивность			
	ЛПОНП	ЛПНП	ЛПВП	Верхний флотирующий слой
<i>In vivo</i>				
Кортикостерон	7,13±0,59	4,28±0,61	3,19±0,12	85,40±0,61
Кортизол	11,98±0,17	2,83±0,61	2,98±0,14	82,24±0,11
<i>In vitro</i>				
Прегненолон	18,43±1,15	12,13±0,53	8,17±0,24	61,26±0,21
Дезоксикортикостерон	14,44±0,90	7,70±0,32	5,00±0,22	72,86±0,73
Кортизол	18,35±1,12	14,39±2,48	8,79±0,17	58,47±1,12
Кортикостерон	15,65±0,38	11,09±0,48	6,97±0,19	66,28±1,21

Примечание. В опытах *in vitro* с прегненолоном, дезоксикортикостероном и кортизолом использовали сыворотку человека, а в опытах с кортикостероном — крысы.

распределение было следующим: 7,13 % составляла радиоактивность ЛПОНП, 4,28 % — радиоактивность ЛПНП и 3,19 % — радиоактивность ЛПВП. 85,4 % радиоактивности сыворотки обнаруживалось в верхнем флотирующем слое.

Известно, что у крыс основным глюкокортикоидным гормоном является кортикостерон, а уровень кортизола в крови этих животных составляет менее 1 мкг/100 мл [6]. Распределение ³H-кортизола между ЛП-фракциями в сыворотке крыс было сходным с ³H-кортикостероном. Однако отмечалось более высокое содержание метки во фракции ЛПОНП (см. таблицу).

Связывание стероидов с ЛП наблюдали также в опытах *in vitro* при инкубировании меченых стероидов с сывороткой человека и крысы. Установлено, что в условиях *in vitro* степень

связывания метки несколько больше, чем в опытах *in vivo*.

Для доказательства связывания стероидных гормонов с ЛП использовали метод гель-фильтрации (рис. 1). Предварительно выделенные ЛП крыс инкубировали с мечеными стероидами и с помощью хроматографии отделяли от несвязавшейся метки. Наибольшее связывание стероидных гормонов отмечено для ЛПОНП, несколько меньше связывали метку ЛПВП и ЛПНП.

Известно, что в плазме крови основная часть глюкокортикоидов (80—90 %) связана с белками, главным образом с кортикостероидсвязывающим глобулином (транскортином). По данным [12], в плазме крови человека 89—90 % кортизола связано с белками. Другие авторы [15] приводят следующие цифры: 78 % кортизола связано с транскортином, 13 % — с альбумином и только 9 % находится в свободном состоянии, т. е. являются биологически активными.

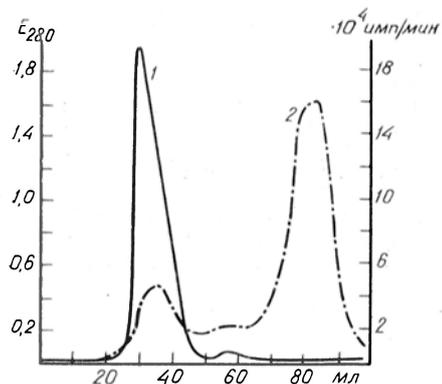


Рис. 1. Гель-фильтрация смеси ЛПОНП (1) и ³H-кортикостерона (2) на сефадексе G-25. Сплошная линия — поглощение при 280 нм, пунктирная — радиоактивность фракций (в имп/мин).

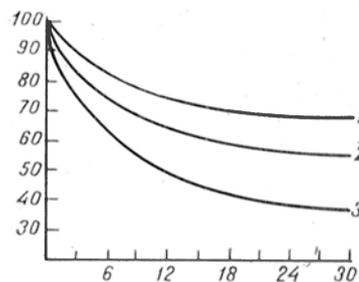


Рис. 2. Тушение флуоресценции триптофана в ЛП сыворотки крыс кортизолом. 1 — ЛПНП, 2 — ЛПОНП, 3 — ЛПВП. По оси ординат — флуоресценция (в %); по оси абсцисс — время (в мин).

Транскортин представляет собой гликопротеид с мол. м. 52 000 [4]. Этот белок синтезируется на рибосомах гепатоцитов, а затем гликозилируется [2]. Поскольку большая часть белков ЛП (апопротеинов) также является гликопротеидами, есть основание предполагать, что связывание стероидов с ЛП происходит за счет апопротеинов, содержащих глюкозаминогликаны. С другой стороны, нельзя исключить и возможность связывания стероидов липидными компонентами ЛП. В частности, известно, что степень связывания стероидов с искусственными фосфолипидными мембранами коррелирует с растворимостью стероидных гормонов в липидах [10].

На рис. 2 представлены кривые тушения флюоресценции триптофана в ЛП сыворотки крови крыс при добавлении кортизола. Характерно, что изменения величин флюоресценции для каждого класса ЛП имели существенные различия. Наибольшее снижение флюоресценции отмечено для ЛПВП. Слабее этот эффект был выражен при добавлении кортизола к ЛПОНП и особенно к ЛПНП. Снижение флюоресценции можно расценивать как результат образования комплекса апопротеин — кортизол, сопровождающегося изменением конформации белка в ЛП. Кроме того, выявленные различия свидетельствуют, что в ЛПВП большая часть белка расположена на поверхности ЛП-частиц или вблизи поверхности. В ЛПНП триптофансодержащие участки белковой молекулы погружены в липидный слой и отдалены от заряженных полярных групп фосфолипидов, что подтверждается другими исследованиями [7].

Полученные результаты позволяют предполагать участие ЛП в транспорте кортикостероидов в организме и по-новому оценить из известных в настоящее время регуляторных эффектов ЛП.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Лифищ И. Б., Шерстюк Г. В.* // Лаб. дело. — 1980. — № 7. — С. 409—412.

2. *Розен В. Б., Завадский П. С.* // Пробл. эндокринологии. — 1968. — № 6. — С. 66—71.
3. *Avigan J.* // J. Biol. Chem. — 1959. — Vol. 234, N 4. — P. 787—790.
4. *Brien T. G.* // Clin. Endocr. — 1981. — Vol. 14, N 2. — P. 196—212.
5. *Counsell R. E., Pohland R. C.* // J. Med. Chem. — 1982. — Vol. 25, N 10. — P. 1115—1120.
6. *Daniels V. G., Hardy R. N., Malinowska K. W., Nathanielsz P. W.* // J. Endocr. — 1972. — Vol. 52, N 2. — P. 405—406.
7. *Dobretsov G. E., Spirin M. M., Chekrygin O. V. et al.* // Biochim. Biophys. Acta. — 1982. — Vol. 710, N 2. — P. 172—180.
8. *Fainaru M., Mahley R. W., Hamilton R. L., Innerarity T. L.* // J. Lipid Res. — 1982. — Vol. 23, N 5. — P. 702—714.
9. *Hatch F. T., Lees R. S.* // Advanc. Lipid Res. — 1968. — Vol. 6. — P. 2—68.
10. *Heap R. B., Symons A. M., Watkins J. C.* // Biochim. Biophys. Acta. — 1970. — Vol. 218. — P. 482—495.
11. *Hobbelen P. M. J., Coert A., Geelen J. A. A., Van Der Vies J.* // Biochem. Pharmacol. — 1975. — Vol. 24, N 2. — P. 165—172.
12. *Predine J., Brailly S., Delaporte P., Milgrom E.* // J. Clin. Endocr. — 1984. — Vol. 58, N 1. — P. 6—11.
13. *Rudman D., Hollins B., Bixler T. G., Mosteller R. C.* // J. Pharmacol. exp. Ther. — 1972. — Vol. 180. — P. 797—801.
14. *Takahashi Y., Urano K., Kimura S.* // J. Nutr. Sci. Vitaminol. — 1977. — Vol. 23, N 3. — P. 201—209.
15. *Tait J. F., Burstein S.* // The Hormones / Ed. G. Pincus et al. — New York, 1964. — Vol. 5. — P. 441—557.
16. *Vitols S. G., Gahrton G., Peterson C. O.* // Brit. J. Pharmacol. — 1982. — Vol. 77, N 9. — P. 430—P.

Поступила 02.05.87

TRANSPORT OF STEROID HORMONES BY MEANS OF BLOOD SERUM LIPOPROTEINS

L. E. Panin, L. M. Polyakov, A. A. Rozumenko, N. G. Biushkina

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

Binding and distribution of glucocorticoids as well as of some of their precursors in lipoprotein fractions of human and rat blood serum were studied. Binding of the corticosteroids with blood serum lipoproteins was shown by ultracentrifugation and gel filtration. The binding of corticosteroids with lipoproteins was accompanied by alterations in the apoprotein conformation, detected by means of quenching of tryptophane fluorescence. The data obtained suggest that the lipoproteins are involved in transport of corticosteroids.

Ф. З. Меерсон, М. П. Явич, И. И. Рожницкая

ВЛИЯНИЕ ЭМОЦИОНАЛЬНО-БОЛЕВОГО СТРЕССА НА СКОРОСТЬ СИНТЕЗА ДНК В КЛЕТКАХ СЕРДЦА И ПЕЧЕНИ

НИИ общей патологии и патологической физиологии АМН СССР, Москва

Известно, что при однократном стрессорном воздействии вслед за относительно короткой фазой угнетения синтеза РНК и белков возникает длительная фаза активации биосинтеза этих макромолекул [8]. Выявлено, что при интенсивном стрессорном воздействии в начале происходит повреждение ДНК ядер в клетках ряда внутренних органов с последующей вспышкой ее репаративного синтеза [4, 5]. Очевидно, что молекулярная целостность ДНК и ее матричная активность составляют необходимую предпосылку для сохранения структуры и функции органов в процессе жизнедеятельности и адаптационных реакций организма. В связи с этим в настоящей работе было осуществлено сопоставление влияния длительного эмоционально-болевого стресса (ЭБС) на репликативный и репаративный синтез ДНК в ядрах и митохондриях двух жизненно важных органов — сердца и печени.

Методика

Опыты проводили на крысах-самцах линии Вистар массой 200—220 г. ЭБС вызывали в форме тревоги невроза в течение 6 ч [18]. О скорости синтеза ДНК судили по включению [³H]-тимидина, введенного животным внутрибрюшинно из расчета 50 мкКи на 100 г массы. Время экспозиции составляло 2 ч. Исследовали скорость репликации и репарации ДНК в ядрах клеток сердца и печени, а также скорость синтеза ДНК в митохондриях.

Для изучения репаративного синтеза ядерной ДНК животным внутрибрюшинно вводили ингибитор репликации — оксимочевину [16, 17] из расчета 50 мг на 100 г массы за 30 мин до введения изотопа. Ядра клеток сердца и печени выделяли из соответствующего гомогената, приготовленного на 0,32 М сахарозе, 0,003 М MgCl₂ и 0,01 М трис-HCl (pH 7,6), осаждением при 2000 g. Митохондрии выделяли из полученного супернатанта центрифугированием при 12 000 g в течение 30 мин.

Было выяснено, что удельная радиоактивность ДНК гомогената и ядер близка между собой. Это соответствует данным, что основная масса ДНК сосредоточена в ядрах [11]. В связи с этим при исследовании скорости репликации мы определяли радиоактивность ДНК гомогената.

Определение ДНК в гомогенатах, ядрах и митохондриях проводили по методу [12]. Радиоактивность образцов измеряли в жидкости Брея на сцинтиляционном счетчике и выражали числом распадов в 1 мин на 1 мг ДНК.

Результаты и обсуждение

Как видно на рис. 1, в контроле скорость репликации в ядрах клеток сердца примерно вдвое ниже, чем в ядрах клеток печени. В результате ЭБС скорость репликации ядерной ДНК в клетках сердца резко возрастает. Это увеличение обнаруживается через 4—6 ч после завершения стрессорного воздействия и достигает своего максимума через 10—12 ч, превышая контрольный уровень в 3,5 раза. Через 22—24 ч и в более поздние сроки после прекращения стрессорного воздействия скорость репликации в ядрах клеток сердца возвращается к исходным величинам. В ядрах клеток печени наблюдается совершенно иная картина — в результате ЭБС скорость репликации оказывается существенно подавленной. Непосредственно после прекращения стрессорного воздействия и в последующие 48 ч скорость репликации снижена примерно вдвое по сравнению с контролем и даже через 72 ч после за-

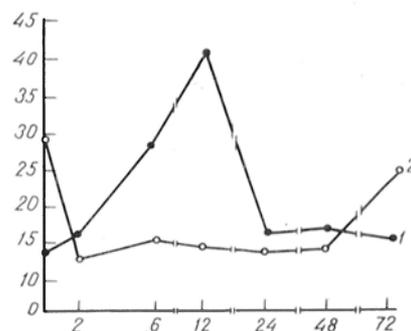


Рис. 1. Влияние ЭБС на репликативный синтез ДНК в ядрах клеток сердца (1) и печени (2).

Здесь и на рис. 2 и 3: по оси абсцисс — время после завершения стрессорного воздействия, ч; по оси ординат — включение [³H]-тимидина, в распадах в 1 мин на 1 мг ДНК.

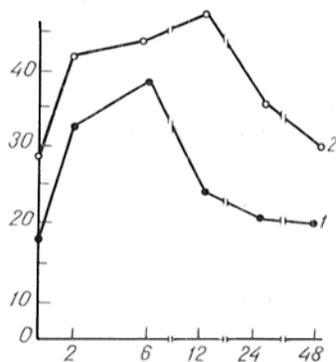


Рис. 2. Влияние ЭБС на репаративный синтез ДНК в ядрах клеток сердца (1) и печени (2).

вершения ЭБС она остается сниженной примерно на 20 %.

В следующей серии экспериментов исследовали скорость репаративного синтеза ДНК в ядрах клеток сердца и печени на фоне введения оксимочевины. Как известно, это соединение ингибирует репликацию ядерной ДНК и почти не действует на ее репаративный синтез [16, 17]. В наших опытах оксимочевина ингибировала синтез ДНК в ядрах клеток сердца на 88 %, в ядрах клеток печени на 89 %. Эти результаты сопоставимы с литературными данными, полученными при исследовании других клеток [14, 15]. Синтез ДНК, протекающий в ядрах при введении оксимочевины, очевидно, отражает скорость репаративного синтеза.

Как видно на рис. 2, скорость репарации ДНК в клетках как сердца, так и печени в условиях ЭБС значительно возрастает. В клетках сердца скорость репаративного синтеза увеличивается непосредственно после завершения ЭБС в 2 раза, через 10—12 ч — на 48 %, а через 24—48 ч скорость репарации ДНК в ядрах сердца возрастает и превышает контрольный уровень на 20 %. В контрольных опытах в ядрах печени скорость репаративного синтеза ДНК в 1,6 раза выше, чем в ядрах сердца. В условиях ЭБС в первые 6 ч

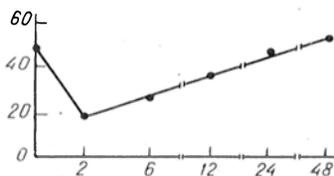


Рис. 3. Влияние ЭБС на синтез ДНК в митохондриях печени.

после завершения стресса скорость репарации ДНК увеличена на 56 %, через 10—12 ч — на 64 %, а через 46—48 ч не отличается от нормы. Таким образом, непосредственно после стрессорного воздействия в ядрах сердца и печени происходит вспышка репаративного синтеза ДНК, обусловленная по современным представлениям повреждениями в молекулярной структуре ДНК. Существенно, что активация репаративного синтеза в клетках сердца реализуется на фоне увеличения скорости репликации, а в клетках печени — на фоне угнетения этого процесса.

На следующем этапе исследований изучали синтез ДНК в митохондриях клеток сердца и печени. В соответствии с данными литературы [11] было установлено, что удельная радиоактивность ДНК митохондрий выше, чем таковая для ядер. По современным представлениям, высокая скорость включения предшественников в ДНК митохондрий отражает ее репликативный синтез [19]. Было выяснено, что оксимочевина — ингибитор репликации ядерной ДНК — не оказывает действия на этот процесс в митохондриях.

На рис. 3 представлены результаты исследования синтеза митохондриальной ДНК в условиях ЭБС, свидетельствующие, что ЭБС не влияет на репликацию ДНК в митохондриях клеток сердца, но резко угнетает этот процесс в клетках печени. Так, непосредственно после прекращения ЭБС синтез ДНК в клетках печени подавлен на 60 %, через 4—6 ч — на 45 %, через 10—12 ч — на 25 %. Только через 22—24 ч после завершения ЭБС скорость синтеза митохондриальной ДНК в печени возвращается к исходным величинам.

Таким образом, под влиянием ЭБС различные системы синтеза ДНК в клетках двух жизненно важных органов — сердца и печени — изменяются неодинаково. В клетках сердца возрастает скорость репликации и репарации ядерной ДНК и не меняется скорость синтеза ДНК митохондрий. В клетках печени скорость репликации ядерной и митохондриальной ДНК угнетается, а скорость репаративного процесса в ядрах также возрастает.

Полученные данные позволяют выделить некоторые основные положения.

1. При ЭБС в ядрах клеток сердца и печени наблюдается вспышка репаративного синтеза, продолжающаяся около суток после прекращения стрессорного воздействия. Это может быть связано с повреждением ДНК свободными радикалами, образование которых увеличивается при активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) во время стресса [9]. В пользу этого предположения свидетельствует, во-первых, то, что вспышка репаративного синтеза по времени совпадает со стрессорной активацией ПОЛ [7]; во-вторых, антиоксиданты, подавляющие ПОЛ, предупреждают увеличение репаративного синтеза [6].

2. При ЭБС в клетках печени происходит угнетение, а в клетках сердца — активация репликации ядерной ДНК. Оценивая данный результат, следует иметь в виду, что скорость репликации ДНК в таких дифференцированных клетках, как кардиомиоциты и гепатоциты, очень низкая [13]. В то же время в активно пролиферирующих клетках этих органов — фибробластах, макрофагах, клетках Купфера — скорость репликации значительно выше. Поскольку количество пролиферирующих клеток в сердце составляет около 78 % [20], а в печени — около 36 % от всей клеточной популяции органа [2], можно считать, что гепатоциты печени по сравнению с кардиомиоцитами вносят относительно больший вклад в репликативный синтез ДНК. По-видимому, противоположная реакция систем репликации ДНК в клетках сердца и печени обусловлена тем, что поврежденные высокочувствительных к глюкокортикоидам и катехоламинам гепатоцитов за счет нарушения их метаболизма приводит к подавлению синтеза ДНК как собственно в гепатоцитах, так и в других клетках печени. В кардиомиоцитах сердца таких глубоких нарушений не происходит, но активируется адренергически обусловленное функциональное состояние этих клеток, которое, как это было показано [3], влечет за собой увеличение скорости биосинтеза ДНК. В пользу этого предположения свидетельствуют данные о том, что активация ПОЛ при ЭБС весьма значительна. Она выражается в увеличении содержания малонового диальдегида (МДА) в 2 раза и сопровождается повышением активности супероксиддисмутазы (СОД). При этом

в сердце содержание МДА возрастает только на $\frac{1}{3}$, а активность СОД не меняется (предварительные результаты). Это согласуется с представлением о большей уязвимости систем синтеза ДНК в клетках печени по сравнению с клетками сердца.

3. Синтез ДНК в митохондриях печени под влиянием стресса снижается примерно в 2 раза, а в митохондриях сердца остается на уровне контроля. Популяция митохондрий гепатоцитов составляет 98,8 % общего числа этих органелл в печени [1]. Соответственно и подавляющее большинство митохондрий сердца локализовано в кардиомиоцитах. Следовательно, в условиях ЭБС именно в гепатоцитах происходит угнетение биосинтеза митохондриальной ДНК, в то время как в кардиомиоцитах интенсивность репликации не меняется. Выявленные различия также могут быть вызваны более значительной активацией ПОЛ в клетках печени при стрессе по сравнению с сердцем.

Полученные результаты свидетельствуют о глубоком нарушении под влиянием ЭБС различных систем репликации ДНК как в гепатоцитах, так и в непарейхиматозных клетках. Угнетение репликации разных классов ДНК в клетках печени при воздействии стресса может быть причиной нарушения биосинтеза целого ряда белков, играющих существенную роль в метаболизме данного органа, в частности в обмене холестерина. С таким предположением согласуются данные [10] о возникновении под влиянием стресса выраженной атерогенной дислипидемии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гепатоцит: Функционально-метаболические свойства / Гулак П. В., Дудченко Л. М., Зайцев В. В. и др. — М., 1985. — С. 33.
2. Логинов А. С., Аруин Л. И. Клиническая морфология печени. — М., 1985.
3. Меерсон Ф. З., Алехина Г. М. // Докл. АН СССР. — 1967. — Т. 173, № 5. — С. 1222—1226.
4. Меерсон Ф. З., Васильев В. К. // Бюл. exper. биол. — 1981. — № 9. — С. 297—299.
5. Меерсон Ф. З., Васильев В. К. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 1. — С. 107—110.
6. Меерсон Ф. З., Васильев В. К., Досмагамбетова Р. С. // Бюл. exper. биол. — 1982. — № 6. — С. 57—60.
7. Меерсон Ф. З., Малышев В. В., Каган В. Е. // Арх. пат. — 1980. — № 2. — С. 9—12.

8. Меерсон Ф. З., Павлова В. И., Сухих Г. Т. и др. // Пат. физиол. — 1982. — № 5. — С. 3—14.
9. Меерсон Ф. З., Радзиевский С. А., Гибер Л. М. и др. // Докл. АН СССР. — 1977. — Т. 237, № 4. — С. 977—980.
10. Твердохлиб В. П., Лобанова Г. Т., Меерсон Ф. З. // Бюл. exper. биол. — 1986. — № 12. — С. 681—682.
11. Хансон К. П., Иванова Д. В. // Успехи совр. биол. — 1971. — Т. 72, № 1(4). — С. 3—23.
12. Blobel J., Potter V. R. // Biochim. biophys. Acta. — 1968. — Vol. 166. — P. 48—57.
13. Brodsky W. Y., Tsirekidse N. N., Arifeyeva A. M. // J. molec. cell. Cardiol. — 1985. — Vol. 17. — P. 445—455.
14. Castellot J. J., Miller M. R., Lehtomaki D. M., Pardee A. B. // J. biol. Chem. — 1979. — Vol. 254. — P. 6904—6908.
15. Chin M. L., Irvin J. L. // Arch. Biochem. — 1985. — Vol. 236. — P. 260—265.
16. Cleaver J. E. // Radiat. Res. — 1969. — Vol. 37. — P. 334—340.
17. Cohn S. M., Krawisz B. R., Dresler S. L., Liberman M. W. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1984. — Vol. 81. — P. 4828—4832.
18. Desiderato O., MacKinnon J. R., Hisson H. J. et al. // J. comp. Physiol. Psychol. — 1974. — Vol. 87. — P. 208.
19. Iross N. I., Iodfrey S. Y., Rabinovitch M. // J. biol. Chem. — 1969. — Vol. 244. — P. 1552—1560.
20. Morkin E. // Cardiac Hypertrophy / Ed. N. R. Alpert. — New York, 1971. — P. 259—271.

Поступила 17.11.87

EFFECT OF EMOTIONAL-PAINFUL STRESS ON THE RATE OF DNA SYNTHESIS IN HEART AND LIVER CELLS

F. Z. Meerson, M. P. Yavich, I. I. Rozhitskaya

Institute of General Pathology and Pathophysiology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Effect of a single long-term (6 hrs) emotional-painful stress on DNA synthesis was studied in nuclei and mitochondria of heart and liver cells. Various systems of DNA synthesis in heart and liver cells were shown to respond dissimilarly to the stress. The rates of replication and reparative synthesis of nuclear DNA were increased while synthesis of mitochondrial DNA was unaltered in heart cells within the first day after the stress. In liver cells the reparative synthesis of nuclear DNA was also increased, whereas the rate of its replication in nuclei and mitochondria was distinctly inhibited for a long time. Thus, the systems of DNA synthesis in liver cells proved to be more sensitive to extreme stress-reactions as compared with heart cells. Effect of the stress on the systems of DNA synthesis in specific and connective tissue cells of liver and heart is discussed. At the same time, mitochondria are localized in specialized cells of both heart and liver tissues. The data obtained suggest that inhibition of the mitochondrial DNA synthesis is realized in hepatocytes.

УДК 617-001.17-07:616.153.915-39-095.38.015.2:615.831.4

В. К. Осипович, З. А. Туликова, А. В. Матвеевко, И. В. Крайник

СИНДРОМ ЛИПИДНОЙ ГИПЕРПЕРОКСИДАЦИИ У ОБОЖЖЕННЫХ И ЕГО КОРРЕКЦИЯ МЕТОДОМ АУФОК

Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Ленинград

Известно, что в патогенезе ожоговой болезни важную роль играет интенсификация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [4, 9, 15]. Активация ПОЛ при ожогах приводит к уменьшению содержания в крови и тканях естественных антиоксидантов, снижению активности одного из основных ферментов антиоксидантной защиты — супероксиддисмутазы [1, 3, 22] и таким нарушениям в организме, как изменения проницаемости клеточных мембран и активности ферментов, разобщение окислительного фосфорилирования, снижение митотической активности, угнетение сердечно-сосудистой системы, нервно-психические расстройства [7, 8, 10, 21, 42]. Токсичность продуктов ПОЛ настолько велика, что в ряде ис-

следований им отводится роль «ожоговых токсинов» [40].

Приведенные сведения отражают в основном результаты экспериментальных исследований, тогда как сообщения о состоянии процессов ПОЛ у больных с ожогами крайне немногочисленны [29]. В то же время детальное исследование ПОЛ у обожженных в зависимости от тяжести и давности травмы позволило бы не только расширить представления о патохимии термической травмы, но и разработать новые патогенетически обоснованные методы ее лечения. Это относится прежде всего к антиоксидантной терапии, внедрение которой в клиническую практику происходит крайне медленно, хотя высокая эффективность антиоксидантной

терапии при ожоговой болезни в эксперименте уже доказана [2, 3, 25, 26].

В связи с этим нами предпринята попытка исследовать динамику процессов ПОЛ у пострадавших с ожогами различной глубины и площади. В целях коррекции выявленных сдвигов был применен метод аутотрансфузии УФ-облученной крови (ЛУФОК).

Методика

Обследовано 74 пострадавших с ожогами пламенем: 30 пациентов с поверхностными (10 — до 10 % поверхности тела, 20 — более 10 %) и 44 с глубокими ППБ—IV степени (21 — до 10 % поверхности тела, 23 — более 10 %). Возраст больных был от 18 до 50 лет. 31 пострадавшему на 2—15-е сутки проводили ЛУФОК. Облучение крови выполняли с помощью аппарата «Изольда МД-73М» со скоростью 6—20 мл/мин. Объем облучаемой крови составлял 1—2 мл на 1 кг массы тела. Для стабилизации крови использовали гепарин (500 ЕД.) или 3,5 % цитрат натрия. В зависимости от тяжести состояния обожженных и эффективности лечения количество сеансов ЛУФОК варьировало от 1 до 4 (иногда до 12) с перерывами в 1 сут.

О наличии у пострадавших синдрома повышенной перекисидации судили по содержанию в плазме крови продуктов ПОЛ: малонового диальдегида (МДА) [43] и коньюгированных диенов (КД) [11]. В качестве показателя, характеризующего способность системы противостоять избыточной перекисидации, исследовали антиоксидантную активность (АОА) плазмы крови [39]. Результаты определения АОА выражали в процентах ингибирования сывороточной крови больных спонтанного ПОЛ в гомогенатах головного мозга интактных мышей. Параллельно в плазме крови определяли содержание олигопептидов, так называемых «молекул средней массы» (МСМ) [20]. Для изучения нормальных показателей были привлечены 32 здоровых донора.

Результаты и обсуждение

Как видно из результатов, приведенных в табл. 1, развитие ожоговой болезни сопровождалось значительным накоплением МДА в плазме крови. Степень и длительность сохранения высокого уровня МДА в целом соответствовали тяжести ожоговой травмы. Однако в отдельные сроки подобного соответствия выявлено не было. Так, в течение 1-й недели у пострадавших с глубокими ожогами до 10 % поверхности тела концентрация МДА была выше, чем у пациентов с глубокими обширными ожогами. Однако нормализация (хотя и не всегда полная) этого показателя наступала тем позже, чем большей тяжестью характеризовалась

Таблица 1

Глубина повреждения и площадь его поверхности	Динамика содержания МДА (мкМ/л) в сыворотке крови пострадавших с ожогами различной тяжести (M ± m)											
	Время после травмы, сут											
	1	3	5	7	10	14	21	28	35	42	49	56
Поверхностное — до 10%	—	—	—	5,9±0,6* (10)	—	6,8±0,9* (10)	4,8±0,4 (10)	—	—	—	—	—
Поверхностное — более 10%	4,8±0,7 (10)	5,1±0,6 (8)	5,4±0,4* (9)	5,4±0,6 (20)	5,5±0,2* (8)	5,8±0,5* (20)	7,8±0,8* (12)	5,9±0,8 (12)	—	—	—	—
Глубокое — до 10%	6,9±0,8* (14)	7,1±0,9* (12)	8,7±1,0* (12)	7,9±0,5* (21)	10,6±0,9* (11)	8,1±0,8* (21)	7,4±0,6* (11)	6,4±0,5* (11)	7,8±0,9* (11)	5,3±0,3* (11)	4,0±0,4 (11)	—
Глубокое — более 10%	5,6±0,6* (12)	6,6±0,7* (10)	7,8±0,5* (8)	7,1±0,4* (23)	9,4±1,3* (9)	7,9±0,9* (21)	7,9±0,7* (13)	7,1±0,7* (13)	8,0±1,4* (13)	7,4±0,5* (13)	7,0±0,4* (13)	5,9±0,8 (13)

Примечание. Среднее содержание МДА в сыворотках крови 32 здоровых доноров (контроль) — 4,2±0,3 мкМ/л. Здесь и в табл. 2 и 3 звездочкой отмечены достоверные различия по сравнению с контролем ($p < 0,05$), в скобках указано число наблюдений.

Динамика содержания КД (в усл. ед.) в сыворотке крови пострадавших с ожогами различной тяжести (M ± m)

Глубина повреждения и площадь его поверхности	Время после травмы, сут					
	1	3	5	7	10	15
Поверхностные, более 10%	1,13±0,11 (10)	1,10±0,08 (8)	1,11±0,12 (9)	1,14±0,14 (8)	1,09±0,09 (9)	1,05±0,06 (8)
Глубокие, до 10%	1,47±0,13* (14)	1,09±0,15 (12)	1,20±0,16* (12)	1,27±0,24* (10)	1,73±0,18* (11)	1,41±0,18* (9)
Глубокие, более 10%	1,64±0,21* (12)	1,28±0,17 (10)	1,22±0,18 (8)	1,59±0,12* (10)	2,29±0,19* (9)	1,60±0,17* (8)

Примечание. Среднее содержание КД в сыворотке крови 32 здоровых доноров (контроль) — 0,88±0,09 усл. ед.

ожоговая травма. При глубоких обширных ожогах уровень МДА оставался повышенным даже через 2 мес после травмы, т. е. в период, когда другие виды эндотоксикации (кроме бактериальной) практически отсутствовали. Наиболее резкое повышение уровня МДА у больных с поверхностными ожогами отмечалось через 2—3 нед после травмы, у больных с глубокими ожогами — уже с конца 1-й недели. Повторное повышение содержания МДА в плазме крови совпадало с оперативным вмешательством с целью восстановления кожного покрова (см. табл. 1).

Содержание КД в плазме крови обожженных более соответствовало тяжести ожоговой травмы, чем концентрации МДА, однако различия в уровне КД между разными группами больных были сравнительно невелики. Максимальное увеличение этого показателя при глубоких ожогах было отмечено в 1-е и 10-е сутки после ожога (табл. 2).

Исследование АОА плазмы крови пострадавших с глубокими ожогами разной площади позволило выявить резкое снижение этого показателя — до 39,4±3,3 % (при норме 85,5±1,9 %; $p < 0,001$).

Таким образом, результаты проведения биохимических исследований позволяют сделать заключение о наличии у обожженных синдрома выраженной липидной гиперпероксидации, интенсивность и длительность которого зависят от тяжести ожоговой травмы. Одним из факторов, способствующих развитию синдрома, является резкое снижение АОА плазмы крови. К клиническим проявлениям синдрома гиперпероксидации можно отнести заторможенность, вялость, потерю сна, аритмию дыхания, расстройства желудочно-кишечного тракта, преобладание дистрофических процессов над регенераторными, изъязвления слизистой оболочки глаз и носа [14].

Результаты определения содержания

Таблица 3

Изменение показателей ПОЛ и АОА плазмы крови обожженных в процессе курсового лечения АУФОК (M ± m)*

Исследуемые показатели	Число сеансов АУФОК											
	1			2			3			4		
	а	б	в	а	б	в	а	б	в	а	б	в
КД, усл. ед.	1,99 ±0,17	1,17 ±0,16*	1,81 ±0,16	1,78 ±0,20	1,15 ±0,11*	1,77 ±0,21	1,90 ±0,20	1,09 ±0,12*	1,85 ±1,85	1,04 ±0,28*	1,68 ±0,36	1,42 ±0,13*
МДА, мкМ/л	11,4 ±0,5	7,3 ±0,5*	10,2 ±0,6*	10,6 ±0,4	6,2 ±0,3*	9,8 ±0,4*	9,5 ±0,6*	5,9 ±0,1*	7,8 ±1,0*	9,7 ±0,5*	6,4 ±0,3*	8,5 ±1,6*
АОА, %	28,2 ±2,3	33,8 ±3,2*	27,0 ±2,6	26,3 ±2,0	29,3 ±1,7	25,8 ±3,1	25,8 ±4,2	39,8 ±6,4*	31,9 ±3,3	35,4 ±11,5	59,1 ±10,4*	33,5 ±10,5

Примечание. Число обследованных — от 3 до 31. Момент регистрации показателей: а — до облучения (контроль), б — сразу после облучения, в — в кювете аппарата; в — через 1—2 мин после АУФОК.

продуктов ПОЛ и АОА плазмы крови при АУФОК представлены в табл. 3.

Как видно, содержание МДА и КД в облученной крови снижалось как непосредственно после УФ-облучения, так и через несколько минут и 1—2 сут (перед следующим сеансом) после реинфузии УФ-облученной крови. Проведение 3—4 сеансов АУФОК сопровождалось прогрессирующим уменьшением содержания МДА и КД. Наряду со снижением содержания продуктов ПОЛ в плазме крови после УФ-облучения наблюдалось увеличение АОА сыворотки крови. Таким образом, в отличие от УФ-облучения других биологических субстратов, в том числе отмытых эритроцитов [10, 16, 23, 24, 27, 36, 41], АУФОК не только не стимулирует процессы ПОЛ, но и, напротив, дает выраженный антиоксидантный эффект.

Полученные результаты согласуются с данными работы [30], где отмечена способность сыворотки крови блокировать ПОЛ в эритроцитах, инициированное УФ-облучением, на этой основе был предложен метод определения АОА сыворотки крови. Антиоксидантное действие УФ-облучения на кровь подтверждается также данными других авторов [17, 31, 35]. Так, применение АУФОК в комплексном лечении больных с лимфопензией недостаточно повышением активности супероксиддисмутазы эритроцитов и оксидазной активности церулоплазмينا с одновременным снижением содержания КД в плазме крови [35]. Показано повышение активности каталазы и пероксидазы крови больных с ишемической болезнью сердца после сеанса АУФОК [17]. Следовательно, одним из механизмов антиоксидантного действия АУФОК следует признать активацию ферментов антирадикальной защиты.

Наряду с этим одним из факторов, способствующих торможению ПОЛ при АУФОК, может быть накопление в крови МСМ, антиоксидантные свойства которых были показаны нами ранее [32, 33] и подтверждены другими исследователями [34]. Как показали специальные исследования, сеанс АУФОК приводил к резкому увеличению содержания этих компонентов в плазме облученной крови. Их уровень увеличивался с 1104 ± 151 до 2560 ± 305 мг/л ($p < 0,01$).

Возможным механизмом накопления МСМ, обладающих антиоксидантной активностью, в плазме облученной крови может быть десорбция пептидных молекул с мембран эритроцитов, являющихся носителями МСМ [18, 19, 38], «шелушение» мембран лимфоцитов и эритроцитов [5, 6, 28] или резонансное поглощение квантов УФ-излучения белками с последующим разрывом пептидных связей и образованием пептидных фрагментов [13, 37].

Результаты проведенного исследования позволяют заключить, что течение ожоговой болезни сопровождается развитием синдрома липидной гиперпероксидации, выраженность и длительность которого определяется тяжестью термической травмы. При этом эффективным средством купирования синдрома гиперпероксидации является АУФОК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агаджанов М. И. Липидная пероксидация в патогенезе ожоговой болезни и влияние антиоксидантов на ее течение: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — Ереван, 1979.
2. Агаджанов М. И., Овакимян С. С., Мхитарян В. К. и др. // Укр. биохим. журн. — 1979. — Т. 51, № 1. — С. 23—26.
3. Агаджанов М. И., Баджигян С. А. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 3. — С. 143—144.
4. Аристархова С. А., Бурлакова Е. Б., Заец Т. Л. // Там же. — 1983. — № 4. — С. 102—106.
5. Арцишевская Р. А., Миронова А. П., Самойлова К. А. // Цитология. — 1984. — Т. 26, № 2. — С. 209—214.
6. Арцишевская Р. А., Самойлова К. А. // Там же. — 1983. — Т. 25, № 12. — С. 1387—1392.
7. Биленко М. В., Чуракова Т. Д. // Бюл. экспер. биол. — 1982. — № 7. — С. 22—25.
8. Бурлакова Е. Б., Джалибова М. И., Гвахария Н. Н. и др. // Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. — М., 1982. — С. 113—140.
9. Бурлакова Е. Б., Заец Т. Л., Шелудченко Н. И., Аристархова С. А. // Нарушения гомеостаза и их коррекция при ожоговой травме. — М., 1982. — С. 15—19.
10. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М., 1972.
11. Гаврилов В. Б., Мишкорудная М. И. // Лаб. дело. — 1983. — № 3. — С. 33—36.
12. Гевондян В. С., Кудрявцева Т. П., Бархударян В. А. и др. // Вопр. биол. — 1979. — Т. 25, № 11. — С. 86—88.
13. Демченко А. П. Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков. — Киев, 1981.
14. Журавлев А. И. // Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. — М., 1982. — С. 3—37.

15. Заец Т. Л., Сологуб В. К. // Ожоговая болезнь. — Киев, 1984. — С. 25.
16. Каменецкая Т. М., Ливенсон А. Р., Обросов А. Н. и др. // Ультрафиолетовое излучение. — М., 1971. — С. 127—130.
17. Левин А. О., Мозговая И. А., Романкова М. П. и др. // Там же. — С. 57—63.
18. Лифшиц Р. И. // Метаболические основы острой ожоговой токсемии. — Омск, 1977. — С. 135—141.
19. Лифшиц Р. И., Ильич Э. Я., Гладковская Р. Н. и др. // Ожоговая болезнь. — Киев, 1980. — С. 57—58.
20. Маркелов И. М., Вихриев Б. С., Тупикова Э. А. и др. // Вопр. мед. химии. — 1983. — № 3. — С. 105—108.
21. Меерсон Ф. З., Бершицкая О. Н., Салтыкова В. А. // Бюл. exper. биол. — 1986. — № 7. — С. 7—9.
22. Мхитарян В. Г., Агаджанов М. И., Геворкян О. М. и др. // Вестн. АМН СССР. — 1982. — № 9. — С. 15—19.
23. Пелепицин А. В., Роцупкин Д. И., Владимиров Ю. А. // Ультрафиолетовое излучение и его применение в биологии. — Пушино-на-Оке, 1973. — С. 65.
24. Петренко Ю. М., Пувтинский А. В., Роцупкин Д. И., Владимиров Ю. А. // Свободнорадикальное окисление липидов в норме и патологии. — М., 1976. — С. 139—141.
25. Ревской А. К., Исаев Г. А. // Ожоговая болезнь. — Киев, 1980. — С. 127—128.
26. Ревской А. К., Исаев Г. А., Подкопаев С. Н. // Научная конф. по проблеме «Ожог», 7-я. — Л., 1981. — С. 117—118.
27. Роцупкин Д. И., Владимиров Ю. А. // Ультрафиолетовое излучение и его применение в биологии. — Пушино-на-Оке, 1973. — С. 69—70.
28. Самойлова К. А., Миронова А. П., Арцишевская Р. А. // Цитология. — 1984. — Т. 26, № 1. — С. 102—108.
29. Спекор Е. Б., Политова Л. Н., Васильева Л. А. // Научная конф. по проблеме «Ожог», 7-я. — Л., 1981. — С. 130.
30. Спекор Е. Б., Ананенко А. А., Политова Л. Н. // Лаб. дело. — 1984. — № 1. — С. 26—28.
31. Терновой К. С., Бутылин Ю. П., Стрелко В. В. и др. // Докл. АН УССР. — Сер. Б. — 1983. — № 11. — С. 81—84.
32. Тупикова Э. А. // Вопр. мед. химии. — 1983. — № 3. — С. 108—111.
33. Тупикова Э. А., Маркелов И. М., Осипович В. К. // Система мозговых и внемозговых пептидов. — Л., 1984. — С. 95—97.
34. Фархутдинов Р. Р., Юханова А. Ш. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 4. — С. 38—40.
35. Шабуневич Л. В., Александрова Л. А., Перельгин В. Г. // Механизмы влияния облученной ультрафиолетовыми лучами крови на организм человека и животных. — Л., 1986. — С. 50—56.
36. Barber A. A., Ottolenghi A. // Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) — 1957. — Vol. 96. — P. 471—473.
37. Friedberg E. C., Cook K. H., Duncan J. et al. // Photochemical and Photobiological Reviews. — New York, 1977. — Vol. 2. — P. 263—322.
38. Gajdos M., Spustova V., Gerykova M. et al. // Proc. Europ. Transplant. Ass. — 1981. — Vol. 18. — P. 183—187.
39. Granfield L. M., Gellan J. L., White A. O. et al. // Ann. Clin. Biochem. — 1979. — Vol. 16. — P. 289—306.
40. Nishigaki J., Hagihara M., Miramatsu M. et al. // Biochem. Med. — 1980. — Vol. 24, N 2. — P. 185—189.
41. Ottolenghi A., Bernhein F., Wilbur K. M. // Arch. Biochem. — 1955. — Vol. 56. — P. 157—164.
42. Sano K., Asano T., Tahishima T. et al. // Neurol. Res. — 1980. — Vol. 2, N 3—4. — P. 253—272.
43. Saton K. // Clin. chim. Acta. — 1978. — Vol. 90, N 1. — P. 37—43.

Поступила 25.08.87

SYNDROME OF LIPID PEROXIDATION IN PATIENTS WITH BURNS AND ITS CORRECTION USING AUTOTRANSFUSION OF UV-IRRADIATED BLOOD

V. K. Osipovich, Z. A. Tupikova, A. V. Matvienko, I. V. Krainik

Medical Military Academy, Leningrad

Dynamics of lipid peroxidation was studied in blood serum of patients with burns of various severity and degree. The burns development was accompanied by syndrome of lipid hyperperoxidation, the intensity and duration of which correlated with the disease severity. The procedure of UV-irradiated blood autotransfusion was used to correct the impairments detected. High efficiency of the procedure was demonstrated by reduction of the lipid hyperperoxidation syndrome in patients with burns.

УДК 612.262.015.1:577.152.112].088.1+616-088.922.1-074

И. Н. Кендыш, В. А. Братцев, Ю. В. Гольяпин, Т. В. Климова,
Т. Н. Смирнова

¹²⁵I-*n*-ИОДФЕНАМИН КАК ПРОТОТИП СРЕДСТВА ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОСОМАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ

Институт биофизики Минздрава СССР, Москва

В настоящее время изучение микросомального окисления, катализируемого системой изоферментов цитохрома

P-450, уже выходит за рамки чисто исследовательских целей. Будучи сосредоточенной преимущественно в печени,

эта система привлекает внимание клиницистов возможностью оценки антитоксической функции печени. Основанные на измерении скорости метаболизма определенных ксенобиотиков как принципиальном постулате конкретные исследования в этом плане развиваются по нескольким направлениям. Клиренсовые тесты проводятся путем определения клиренса крови после введения производных антипирина [8, 9, 13, 26, 31, 34]. При дыхательных тестах регистрируется в динамике радиоактивность выдыхаемого углекислого газа после введения ^{14}C -амидопирина, ^{14}C -метацетина или ^{14}C -фенацетина [10—12, 17, 22, 29]. Эти тесты, успешно применяемые за рубежом в клинике, имеют свои недостатки. К недостаткам клиренсового метода относятся сложность и трудоемкость химического определения исходного вещества в крови, сопряженного с повторными венопункциями, к недостаткам дыхательного теста — необходимость уникальной нестандартной аппаратуры и высокий потенциальный риск ^{14}C , в связи с чем ^{14}C в СССР запрещен к применению в клинике. Недавно нами предложен экскреторный тест для определения функции микросомального окисления, основанный на измерении скорости экскреции с мочой ^{125}I -4-йодантипирина. Не уступая по точности и информативности клиренсовым и дыхательным тестам, этот метод значительно упрощает исследование [3]. В предлагаемой работе экспериментально обосновывается вариант экскреторного метода с применением ^{125}I -п-йодфенамина.

Методика

^{125}I -п-йодфенамин получали по методу [25] каталитическим изотопным обменом йода в п-йодфенаминс при нагревании последнего с раствором Na^{125}I без добавления носителя при pH 3,0—4,0 в присутствии CuSO_4 и аскорбиновой кислоты. Реакцию проводили 30 мин при 120 °C. ^{125}I -п-йодфенамин выделяли экстракцией гексаном из реакционной смеси после подщелачивания и рекстрагировали его в 0,1 М HCl с последующим приведением к pH 5,5—6,5. Радиохимический выход составлял 80—85 %, примесь радиоидид-ионов не более 1 %. Полученный препарат представляет собой прозрачный раствор с содержанием п-йодфенамина 3,5 мг/мл и удельной активностью 9,5 МБк/мл. ^{125}I -4-амино-3-йодбензойную кислоту и ^{125}I -п-йодфенол получали по аналогичным методикам каталитического изотопного обмена в ароматических соединениях [6] из соответствую-

ющих немеченных соединений и Na^{125}I без добавления носителя при нагревании их в водном растворе в присутствии CuCl в течение 1 ч при 100 °C. Меченые соединения очищали от соединений меди осаждением щелочью, выделяли при подкислении реакционных смесей и растворяли в 1 % бикарбонате натрия. Растворы меченых соединений получали с концентрацией 1—2 мг/мл, удельной активностью 10—20 МБк/мл и примесью радиоидид-ионов не более 3 %. Радиохимический выход составлял 60—80 %.

Эксперименты проведены на беспородных крысах-самках и кроликах-самцах средней массой 0,2 и 2,5 кг соответственно. CCl_4 вводили внутривенно в 50 % растворе растительного масла в дозах 0,2—2,0 мл/кг за 24 ч до исследования. ^{125}I -п-фенол, ^{125}I -4-амино-3-йодбензойную кислоту и ^{125}I -п-йодфенамин вводили внутривенно по 10 мкКи (0,37 МБк) на животное. Радиоактивность органов и экскрементов измеряли методом прямой радиометрии. Для индукции системы микросомального окисления внутривенно вводили фенобарбитал 3 раза в сутки по 100 мг/кг, метку вводили этим животным через 3 ч после последней инъекции фенобарбитала. При ингибировании данной системы ^{125}I -п-йодфенамин вводили одновременно с внутривенным введением этилового спирта в дозе 3 мл/кг. Радиоактивность в образцах мочи измеряли через 6 ч после введения ^{125}I -п-йодфенамина. Микросомы выделяли методом дифференциального центрифугирования [2], содержание белка в микросомах определяли по методу Лоури [23]. Содержание цитохрома P-450 в микросомах печени определяли по методу [27], а в микросомах почек — по методу [19, 20]. Двумерную тонкослойную хроматографию мочи через 6 ч после введения ^{125}I -п-йодфенамина проводили на силфоле [32]. Полученные результаты обрабатывали методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Результаты исследований о влиянии CCl_4 на содержание цитохрома P-450 в печени и почках приведены в табл. 1. Соответственно использованным дозам CCl_4 содержание фермента в печени снижается и составляет 47, 43 и 31 %

Таблица 1
Влияние CCl_4 на содержание цитохрома P-450 в печени и почках крыс

Доза CCl_4 , мл/кг	Цитохром P-450, нмоль на 1 мг белка	
	печень	почки
Контроль	0,47±0,04	—
0,2	0,22±0,03*	—
Контроль	0,42±0,04	—
0,5	0,18±0,01*	—
Контроль	0,65±0,04	0,14±0,01
1,0	0,20±0,02*	0,12±0,02

Примечание. Здесь и в табл. 2—4 звездочка — $p < 0,05$ при $n = 4—7$.

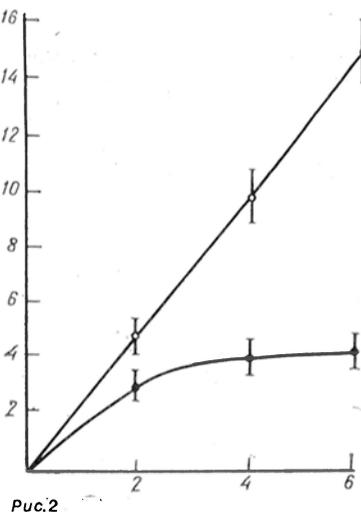
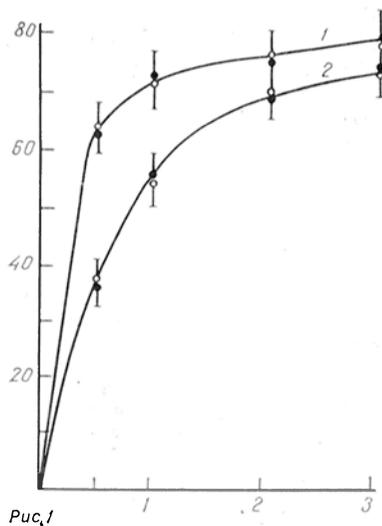


Рис. 1. Влияние CCl_4 в дозе 1 мл/кг на экскрецию с мочой ^{125}I -п-амино-3-йодбензойной кислоты (1) и ^{125}I -п-йодфенола (2).

По оси ординат: экскреция с мочой (в % от введенной дозы); по оси абсцисс: время после введения меток (в ч). Светлые кружки — контроль, темные — CCl_4 , $n=10$.

Рис. 2. Влияние CCl_4 в дозе 1 мл/кг на экскрецию с мочой ^{125}I -п-йодфенамина. Обозначения те же, что на рис. 1.

от контрольных величин. При максимальной дозе CCl_4 содержание фермента в почках не изменяется.

Для оценки возможного воздействия CCl_4 на экскреторную функцию почек изучали динамику экскреции с мочой ^{125}I -п-йодфенола и ^{125}I -1-4-амино-3-йодбензойной кислоты. Первое из этих соединений у млекопитающих не гидроксилируется и выводится в виде глюкуроновых и сульфатных конъюгатов, а второе, также не гидроксилируясь, экскретируется примерно в равных соотношениях в виде глюкуроновых и ацетилированных форм и неизмененного соединения [5, 33]. CCl_4 не влияет на динамику выделения этих соединений с мочой и, следовательно, не ока-

зывает тормозящего действия на процессы конъюгации в печени и канальцевую секрецию в почках, с помощью которой экскретируются данные соединения (рис. 1). Эти материалы служат решающим аргументом в пользу адекватности использованной модели поражения печени для поставленной цели.

На рис. 2 показана динамика экскреции ^{125}I -п-йодфенамина у крыс при дозе CCl_4 1 мл/кг. Поражение печени существенно замедляет элиминацию метки с мочой, составляющую через 6 ч 29 % от контрольных значений.

Взаимоотношения между содержанием метки в крови и экскрецией с мочой представлены на рис. 3 и в табл. 2. CCl_4 дозозависимо замедляет удаление метки из крови и выделение ее с мочой. Следует подчеркнуть, что экскреторный тест с данным соединением гораздо демонстративнее клиренсового теста — соответственно тестам удаление метки составляет при максимальной дозе CCl_4 32 и 52 % от контрольных значений. Поражение печени CCl_4 сопряжено с резким снижением накопления ^{125}I в щитовидной железе и дозозависимой тенденцией к задержке изотопа в печени (см. табл. 2).

В табл. 3 представлены данные о распределении ^{125}I -п-йодфенамина на протяжении 24 ч. Наибольшая радиоактивность обнаружена в легких, печени, желудочно-кишечном тракте и мышцах. CCl_4 препятствует поступлению метки в щитовидную железу и ее элиминации из печени, не влияя на распределение метки в других органах,

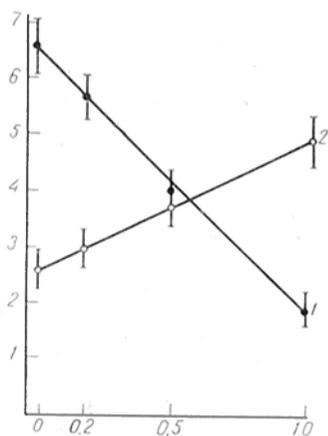


Рис. 3. Содержание ^{125}I -п-йодфенамина в моче (1) и крови (2) в зависимости от дозы CCl_4 ($n=10$).

По оси ординат: радиоактивность (в % от введенной); по оси абсцисс: доза CCl_4 (в мл/кг).

Т а б л и ц а 2

Распределение ^{125}I -п-йодфенамина у крыс через 3 ч после введения в зависимости от дозы CCl_4

Доза CCl_4 , мл/кг	Радиоактивность, % от введенной				
	кровь	цитовидная железа	печень	почки	моча
Контроль	$2,50 \pm 0,40$	$0,10 \pm 0,01$	$11,40 \pm 0,40$	$2,60 \pm 0,20$	$6,60 \pm 0,60$
0,2	$2,90 \pm 0,20$	$0,05 \pm 0,005^*$	$12,60 \pm 1,10$	$2,60 \pm 0,20$	$5,80 \pm 0,40$
0,5	$4,00 \pm 0,50^*$	$0,02 \pm 0,004^*$	$14,00 \pm 0,80$	$2,60 \pm 0,20$	$3,60 \pm 0,50^*$
1,0	$4,80 \pm 0,30^*$	$0,01 \pm 0,002^*$	$16,60 \pm 0,80^*$	$2,40 \pm 0,20$	$2,10 \pm 0,20^*$

т. е. CCl_4 нарушает распределение меченого соединения только в тех органах, в которых осуществляются его метаболизм и фиксация свободного ^{125}I . Содержание ^{125}I в цитовидной железе минимальное и почти на 2 порядка меньше такового в случае введения свободного йода, что свидетельствует об отсутствии отщепления свободного ^{125}I .

При модифицирующих воздействиях на микросомальные окислительные ферменты получены следующие данные по экскреции с мочой ^{125}I -п-йодфенамина за 6 ч: контроль — $11,0 \pm 0,8\%$, фенобарбитал — $16,0 \pm 0,6\%$, этиловый спирт — $4,0 \pm 0,3\%$ ($n=5$; $p < 0,05$). Эти данные свидетельствуют о корреляции экскреторного теста с активностью цитохрома Р-450.

На радиохроматограммах мочи обнаружены 4 пятна, максимальное из которых идентифицировано как п-йодфенамин и составляет 40% от общей радиоактивности мочи. Остальные 3 неидентифицированных метаболита со-

держат примерно по 20% радиоактивности.

В экспериментах с прижизненным измерением радиоактивности установлено, что у кроликов в отличие от крыс CCl_4 не подавляет экскрецию с мочой ^{125}I -п-йодфенамина. Кроме того, скорость экскреции метки с мочой у кроликов существенно превышает таковую у крыс (табл. 4).

Таким образом, экскреторный метод исследования функции микросомального окисления ксенобiotиков в печени можно считать экспериментально обоснованным. При выраженном поражении печени скорость экскреции меченого соединения и активность цитохрома Р-450 в печени снижаются в одинаковой степени и составляют примерно 30% от контрольных величин, т. е. экскреторный тест довольно точно отражает содержание цитохрома Р-450 в печени. Это заключение может быть дополнено данными о том, что выбранный в качестве модели поражения печени CCl_4 и другие модифицирующие

Т а б л и ц а 3

Влияние CCl_4 в дозе 1 мл/кг на распределение ^{125}I -п-йодфенамина у крыс через 2 и 24 ч после введения

Объект исследования	Радиоактивность, % от введенной			
	контроль		опыт	
	через 2 ч	через 24 ч	через 2 ч	через 24 ч
Щитовидная железа	$0,15 \pm 0,02$	$0,50 \pm 0,08$	$0,05 \pm 0,002^*$	$0,10 \pm 0,01^*$
Сердце	$1,00 \pm 0,10$	$0,30 \pm 0,02$	$1,00 \pm 0,10$	$0,30 \pm 0,04$
Легкие	$16,60 \pm 0,80$	$6,50 \pm 1,00$	$18,00 \pm 1,10$	$7,50 \pm 1,00$
Печень	$12,00 \pm 0,20$	$6,50 \pm 0,25$	$14,40 \pm 0,60$	$15,50 \pm 2,10^*$
Селезенка	$2,60 \pm 0,20$	$1,00 \pm 0,10$	$2,80 \pm 0,20$	$1,40 \pm 0,20$
Почки	$2,80 \pm 0,20$	$2,00 \pm 0,10$	$2,80 \pm 0,20$	$2,50 \pm 0,20$
Желудочно-кишечный тракт	$14,40 \pm 0,90$	$9,25 \pm 1,10$	$13,80 \pm 1,30$	$13,00 \pm 1,20$
Мышечная ткань	$32,00 \pm 3,10$	$3,00 \pm 0,20$	$32,10 \pm 4,10$	$3,50 \pm 0,70$
Кровь	$4,80 \pm 0,50$	$2,20 \pm 0,30$	$10,00 \pm 1,20^*$	$2,00 \pm 0,30$
Моча	—	$60,8 \pm 2,5$	—	$45,0 \pm 4,2^*$
Кал	—	$7,50 \pm 0,75$	—	$5,25 \pm 0,55$
Всего	—	$99,4 \pm 6,8$	—	$96,0 \pm 7,2$

Влияние CCl_4 на экскрецию ^{125}I -п-йодфенамина у кроликов

Доза CCl_4 , мл/кг	Радиоактивность мочи (в % от введенной) через		
	2 ч	4 ч	6 ч
Контроль	32,10±2,20	55,20±1,75	73,00±5,20
0,5	40,00±2,70	60,00±2,80	77,50±3,50
1,0	45,00±3,30*	68,00±1,10*	88,00±1,50*
2,0	Гибель животных		

агенты не влияют на содержание цитохрома P-450 в экстрагепатических тканях [18].

Выбор адекватного препарата для оценки системы микросомального окисления с учетом видовых особенностей метаболизма является важным вопросом. Предложенный нами тест эффективен у крыс, но не информативен у кроликов. У крыс главным путем биотрансформации фенамина служит ароматическое гидроксилирование в 4-окси-1-фенамин с минорным образованием бензойной и гиппуровой кислот. У человека, кролика и других животных, напротив, ароматического гидроксилирования фенамина не происходит, а основной реакцией является окислительное дезаминирование в бензойную кислоту. Кроме того, относительно высокого доля неметаболизированного фенамина: у человека, например, она составляет до 50 % от всех метаболитов мочи [15, 28]. Повышение экскреции препарата у кроликов при больших дозах CCl_4 объясняется способностью последнего стимулировать процессы конъюгации [18]. Следовательно ^{125}I -п-йодфенамин можно рассматривать только как прототип, но не как средство исследования микросомальной окислительной системы у человека.

В литературе достаточно полно представлены сведения о видовых особенностях метаболизма ксенобиотиков, однако данные о сравнительной чувствительности отдельных метаболических реакций микросомальной окислительной системы при ее поражении практически отсутствуют. Апеллируя к представленным данным, можно утверждать, что при отравлении CCl_4 поражается реакция ароматического гидроксилирования и не подавляются реакции окислительного дезаминирования и глюкуроновой конъюгации. Воздействие CCl_4 на крыс приводит к более

существенному инактивированию гидроксилирования анилина, чем N-деметилирования амидопирин и гидроксилирования бензопирена, по-видимому, вследствие относительно селективного ингибирования фенобарбиталзависимого изофермента цитохрома P-450 [16].

Выбор потенциального препарата осложняется также множественностью изоферментов цитохрома P-450. По способности к индукции различаются 3 основных изофермента — индуцируемый фенобарбиталом (тип I), канцерогенными углеводородами (тип II) и этиловым спиртом (тип III) [1]. Следует отметить, что индукция типа III отмечается только при хроническом потреблении этанола, тогда как при остром алкогольном отравлении фермент инактивируется [17]. Субстратная специфичность этих изоферментов относительна и не распространяется на целый ряд соединений, например, таких, как антипирин, амидопирин и др. [9, 26, 31, 33]. В настоящее время выделено около 20 изоферментов цитохрома P-450, каждый из которых специфически взаимодействует с определенной группой ксенобиотиков. В этом плане применение антипирин, фенацетин, амидопирин и теофиллин для мониторинга микросомального окисления не решает проблемы, так как эти агенты взаимодействуют с ограниченным числом изоферментов цитохрома P-450 [30]. В последнее время выделена и активно изучается система микросомального окисления дебризохина. Генетический дефект этой системы, связанный с дефицитом минорной формы цитохрома P-450, осуществляющей 4-гидроксилирование дебризохина, установлен у 7—10 % популяции. При наличии этого дефекта содержание в моче 4-оксидебризохина уменьшается более чем в 50 раз, а общее содержание цитохрома P-450 и скорость окисления

антипирина не изменяются. Установлено также около 30 соединений, метаболизм которых зависит или не зависит от дебризохиновой системы [14, 21, 24].

Токсическое поражение печени CCl_4 сопровождается нарушением системы цитохрома Р-450, тогда как при повреждении печени галактозамином, протекающем по типу вирусного гепатита, система микросомального окисления остается интактной [4, 7]. Определенные выводы позволяют сделать и клинические исследования. Клиренсовые тесты с антипирином и ^{123}I -4-йодантипирином у лиц, страдающих алкоголизмом, существенно понижаются по мере развития патологии печени вплоть до 3-кратного снижения при циррозе печени, причем алкогольной индукции микросомального окисления не отмечается [8, 13]. При проведении дыхательного теста, основанного на реакции окислительного деметилирования, получены примерно аналогичные данные. При оценке дыхательного теста с ^{14}C -амидопирином обнаружены нормальные величины при первичном билиарном циррозе печени и пониженные в 4 раза при алкогольном циррозе печени и хроническом активном гепатите в 2—5 раз [12, 29]. У больных с неактивным алкогольным циррозом печени дыхательный тест с ^{14}C -метацетином или ^{14}C -фенацетином снижен в 1,7 раза, а при активном алкогольном циррозе — в 3 раза [11, 22]. Следовательно, исследование микросомального окисления является важным инструментом дифференциальной диагностики патологии печени.

Представленные материалы и их анализ позволяют сформулировать требования к потенциальному препарату для исследования микросомального окисления в печени с помощью экскреторного теста. 1. Препарат должен окисляться в реакциях ароматического гидроксирования, окислительного дезалкилирования или других специфических реакций не менее чем на 80% и в таком виде экскретироваться с мочой в форме конъюгатов. 2. Препарат должен обладать максимально широкой субстратной специфичностью по отношению к изоферментам цитохрома Р-450, по крайней мере не менее чем к двум изоферментам. 3. Препарат должен быть эффективен в условиях патологии не менее чем на двух видах экспериментальных животных с раз-

личным типом обмена ксенобиотиков. 4. В процессе метаболизма радионуклид в составе препарата не должен отщепляться в свободной форме. В этом плане $^{123,125}I$ -4-йодантипирин не соответствует последнему требованию, так как в результате реакции эпоксирирования по месту включения радиоактивного йода последний высвобождается и накапливается в щитовидной железе [3, 13], ^{125}I -п-йодфенамин не соответствует первому и третьему требованию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. — М., 1975.
2. Карузина И. И., Арчаков А. И. // Современные методы в биохимии. — М., 1977. — С. 49—62.
3. Кендыш И. Н., Братцев В. А., Ирошников Н. Г. // Депонир. рукописи. — Библиогр. указатель ВИНТИ. — 1986. — № 1. — б/о 425.
4. Матюшин Б. М., Логинов А. С., Аушева Л. Х. и др. // Бюл. экспер. биол. — 1983. — № 2. — С. 53—55.
5. Парк Д. В. Биохимия чужеродных соединений: Пер. с англ. — М., 1973.
6. Станко В. И., Ирошникова Н. Г., Строкова А. А. А. с. 228014 СССР. — 1968.
7. Фарбер Н. А., Кетиладзе Е. С., Губский Л. В. и др. // Бюл. экспер. биол. — 1982. — № 6. — С. 41—45.
8. Adamska-Dyniewska H., Biernat S., Kulig A. et al. // Pol. Arch. Med. wewnet. — 1981. — Vol. 66. — P. 265—270.
9. Belanger P. M., Atitsé-Gbeassor A. // Canal. J. Physiol. Pharmacol. — 1983. — Vol. 61. — P. 524—529.
10. Bircher J., Preisig R. // Meth. Enzymol. — 1983. — Vol. 77. — P. 3—9.
11. Breen K. J., Desmond P. V., Bury R. et al. // Gastroenterology. — 1977. — Vol. 72, Pt 2. — P. 1033.
12. Burnstein A. V., Galambos J. T. // Dig. Dis. Sci. — 1981. — Vol. 26. — P. 1078—1083.
13. Champailer A., Vontay M., Healy J. C. // Nucl. Med. Commun. — 1984. — Vol. 5. — P. 551—557.
14. Davies D. S., Boobis A. R. // Genetic Variability in Responses to Chemical Exposure. — Coldspring Harbor, 1984. — P. 97—104.
15. Dring L. G., Smith R. L., Williams R. T. // Biochem. J. — 1970. — Vol. 116. — P. 425—435.
16. Enosawa S., Nakasawa Y. // Biochem. Pharmacol. — 1986. — Vol. 35. — P. 1555—1560.
17. Gellert J., Alderman J., Lieber C. S. // Ibid. — P. 1037—1041.
18. Gram T., Sikic B., Litterat C., Minnaugh E. // Microsomes and Drug Oxidations. — Oxford, 1978. — P. 527—533.
19. Jakobsson S. V., Cintig D. L. // J. Pharmacol. exp. Ther. — 1973. — Vol. 185. — P. 226—234.

20. *Johannesen K., De Pierre J. W.* // *Analyt. Biochem.* — 1978. — Vol. 86. — P. 725—732.
21. *Kalow W.* // *Clin. Biochem.* — 1986. — Vol. 19. — P. 76—82.
22. *Krumbiegel P., Gunther K., Faust H.* et al. // *Europ. J. nucl. Med.* — 1985. — Vol. 10. — P. 129—133.
23. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Fandall R.* // *J. biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
24. *Mahgoub A., Dring L. G., Idle J. R.* et al. // *Lancet.* — 1977. — Vol. 2. — P. 584—586.
25. *Mertens J., Vanryckeghem W., Bossuyt A.* // *Proc. International Conference on Radiopharmaceuticals and Labelled Compounds.* — Tokyo, 1984. — P. 303—310.
26. *Ohnhaus E. E., Gerber-Taras E., Park B. K.* // *Europ. J. clin. Pharmacol.* — 1983. — Vol. 24. — P. 247—250.
27. *Omura T., Sato R.* // *J. biol. Chem.* — 1964. — Vol. 239. — P. 2379—2385.
28. *Parke D. V.* // *Reactions and Processes.* — Berlin, 1982. — P. 141—178.
29. *Pauwels S., Geubel A. P., Dive C., Beckers C.* // *Dig. Dis. Sci.* — 1982. — Vol. 27. — P. 49—56.
30. *Renton K. W.* // *Clin. Biochem.* — 1986. — Vol. 19. — P. 72—75.
31. *Rhodes J. C., Houston J.* // *Drug Metab. Dispos.* — 1983. — Vol. 11, P. 131—136.
32. *Sakai T., Niwaguchi T.* // *Xenobiotica.* — 1982. — Vol. 12. — P. 233—239.
33. *Williams R. T.* *Detoxication Mechanisms. The Metabolism of Drug and Allied Organic Compounds.* New York, 1949.
34. *Wilson V. L., Larson R. E., Moldovan M. J.* // *Chem. Biol. Interact.* — 1982. — Vol. 40. — P. 159—168.

Поступила 17.11.87

¹²⁵I-P-IODOPHENAMINE AS A PROTOTYPE COMPOUND FOR STUDIES OF MICROSO-MAL OXIDATION

I. N. Kendysh, V. A. Bratsev, Yu. V. Gol'tyapin, T. V. Klimova, T. N. Smirnova

Institute of Biophysics, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

Dynamics of distribution and excretion with urine of ¹²⁵I-p-iodophenamine were studied impairment of rat liver tissue microsomal oxidation by means of CCl₄ treatment. This poison inhibited distinctly metabolism and excretion of the labelled compound in rats but not in rabbits, which was due to difference in the mechanisms of the compound biotransformation. The requirements for compounds suitable for studies of microsomal oxidation by means of excretory test were not met by ¹²⁵I-p-iodophenamine.

УДК 616.28-056.43-07:[616.233/.24-008.931:577.152.344-074

В. П. Комов, О. М. Спасенкова, М. А. Стрелкова

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТЕИНАЗ В БРОНХОЛЕГОЧНОМ АППАРАТЕ КРЫС С БРОНХИАЛЬНОЙ АНАФИЛАКСИЕЙ

Ленинградский химико-фармацевтический институт

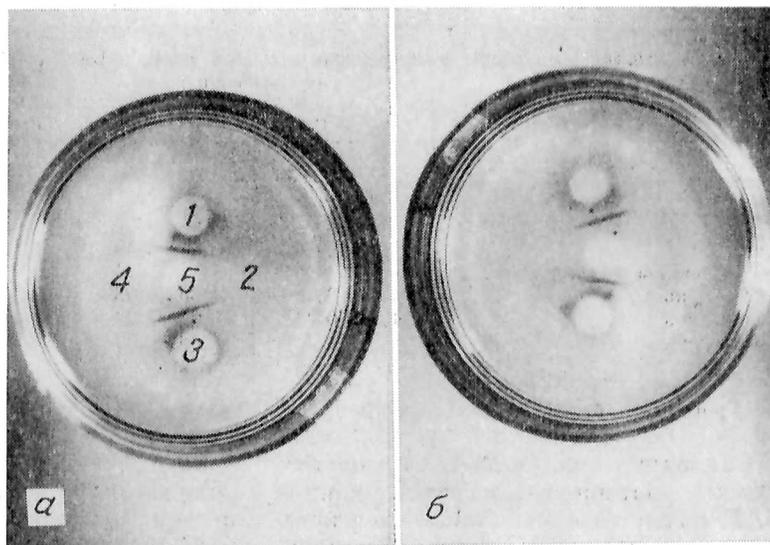
Для инфекционно-аллергической формы бронхиальной астмы характерно наличие как воспалительного, так и анафилактического процесса в легких [1]. При воспалительных процессах протеолитическая активность резко возрастает, что связано с лизисом клеток в очаге воспаления, а также со стимуляцией их секреции из жизнеспособных клеток [8]. Что касается бронхиальной анафилаксии, то ее влияние на протеолитический потенциал в легких до последнего времени оставался малоисследованным [7, 12]. Между тем представляется весьма актуальным анализ вклада анафилаксии в суммарный эффект изменения протеолиза в бронхолегочном аппарате при бронхиальной астме. В представленной работе изучали общую протеолитическую активность, а также свойства и скорость обновления индивидуальной протеиназы в бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) и легочной

ткани крыс с бронхиальной анафилаксией, которую рассматривали как экспериментальную модель бронхиальной астмы.

Методика

Опыты проводили на беспородных крысах-самцах массой 180—200 г. Экспериментальную модель бронхиальной астмы создавали по методу [19]. Для сенсибилизации животных использовали яичный альбумин, который вводили внутривентриально в дозе 2 мг на крысу с гидроксидом алюминия (200 мг) в качестве адьюванта. Разрешающую дозу яичного альбумина (15 мг) вводили в яремную вену на 14-й день после сенсибилизации. Забор бронхиального содержимого проводили на высоте бронхоспазма, через 15—20 мин после введения яичного альбумина. Материал для исследования получали путем введения в трахею 1,5—2 мл 0,01 М трис-сахарозного буферного раствора pH 7,8 с последующей его аспирацией при помощи шприца в пробирку. Бронхиальный секрет центрифугировали при 5000 g в течение 20 мин. Полученный надосадок использовали для дальнейших исследований. Измельченную легочную ткань гомогенизировали в

Рис. 1. Иммунодиффузия в 1 % агаре.
1, 3 — фракция БАЛ; 2 — альдолаза; 4 — каталаза; 5 — антисыворотка.



10 объемах 0,01 М трис-сахарозного буфера рН 7,8 и центрифугировали при 5000 g в течение 20 мин, осадок отбрасывали, а полученный надосадок использовали для определения протеолитической активности.

Протеолитическую активность оценивали двумя методами: по приросту свободных аминокрупп, используя нингидриновую реакцию, и по накоплению радиоактивной метки в надосадочных жидкостях после осаждения белка ТХУ [2, 9]. За единицу активности принимали количество фермента, которое в условиях определения приводило к высвобождению за 120 мин инкубации 1 мкМ аминного азота. В качестве субстрата использовали денатурированный гемоглобин, полученный по методу [14], и [³H]-альбумин, выделенный из сыворотки крови крыс. Инкубацию проб проводили при рН 4,0 и 7,8, используя ацетатный и фосфатный буферные растворы соответственно. Содержание белка определяли по методу Лоури [16]. Выделение и очистку протеиназы из БАЛ проводили при помощи аффинной хроматографии на полисахаридном сорбенте.

Ингибиторный анализ осуществляли при рН 7,8 в фосфатном буфере, содержащем ЭДТА, фенолметилсульфонилфторид, п-хлормеркурибензоат натрия, соевый ингибитор трипсина в концентрации 5, 0,5, 1 и 0,2 мМ соответственно. Результаты оценивали в процентах остаточной активности по сравнению с контрольной пробой, в которой ингибитор отсутствовал.

Обогащенную фракцию сывороточного ингибитора трипсина получали при гель-фильтрации на сефадексе G-75. Кислотоустойчивый низкомолекулярный ингибитор получали по методу [6]. Ингибиторную активность оценивали по степени торможения протеолиза, используя в качестве субстрата [³H]-альбумин и денатурированный гемоглобин. Константу ингибирования (K_i) рассчитывали по методу [5].

Молекулярную массу протеиназы определяли методом диск-электрофореза в 10 % ПААГ с DDS-Na [20]. Пробу и маркерные белки инкубировали в течение 10 мин при 100 °С в 0,1 М фосфатном буфере рН 7,4, содержащем 1 % DDS-Na, 4 М мочевины и 1 % меркаптоэтанол. Электрофорез проводили в течение 1 ч

при силе тока 5 мА на одну трубку. После окончания электрофореза гели обрабатывали 50 % раствором ТХУ и окрашивали кумасси. Для оценки протеолитической активности в гелях проводили специфическое выявление протеиназ [3] и определение протеолитической активности по всей длине геля, разрезая гель после окончания электрофореза на фрагменты величиной 4 мм с последующим определением протенинавной активности, используя в качестве субстрата денатурированный гемоглобин при рН 4,0 и 7,8.

Для получения антител к протеиназе 700 мкг антигена эмульгировали с равным объемом адьюванта (3 части вазелинового масла, 1 часть обезвоженного ланолина и 50 мг БЦЖ) и эмульсию вводили подкожно в область лопатки в несколько приемов кроликам массой 2—2,5 кг. Через 3 нед проводили повторную иммунизацию через кровоток трижды по 100 мкг антигена через день. Через 10 дней после последней иммунизации отбирали кровь. Для обнаружения в сыворотке крови иммунизированного животного специфических антител использовали метод иммунодиффузии в 1 % агаре [17] (рис. 1). Для изучения интенсивности обновления протеиназы вводили [³H]-лейцин крысам массой 200 г из расчета 500 мкКи на животное (удельная радиоактивность 78 мКи/ммоль). Константы скорости синтеза (K_s) и деградации (K_d) протеиназы и полупериод жизни (T_{1/2}) фермента оценивали по методу [11, 18]. Забор бронхиального секрета проводили через 1, 2, 3, 4, 6, 12, 24 и 48 ч после введения [³H]-лейцина. Радиоактивность измеряли с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика «Mark-III».

Результаты и обсуждение

Как в легочной ткани, так и в бронхиальном секрете обнаружены кислые и щелочные протеиназы, причем изменение их активности в динамике развития бронхиальной анафилактики было далеко не однозначным.

Протеолитическая активность в надосадках легочной ткани и БАЛ при развитии бронхиальной анафилаксии

Условия опыта	Протеолитическая активность, мкМ на 1 мг белка			
	легочная ткань		БАЛ	
	pH 4,0	pH 7,8	pH 4,0	pH 7,8
Контроль	4,2±0,18	2,65±0,03	21,32±0,22	17,21±0,33
Бронхиальная анафилаксия:				
14-й день	4,70±0,12*	4,66±0,18	22,38±0,96*	25,14±1,44
21-й день	4,36±0,23*	6,58±0,2	23,41±0,36	33,96±2,66
31-й день	4,54±0,25*	5,03±0,25	22,3±0,63*	26,97±1,15

Примечание. Звездочка — $p > 0,05$.

Как видно из табл. 1, активность кислых протеиназ в легочной ткани и БАЛ почти не изменялась, что указывает на целостность клеток — продуцентов протеиназ при сенсibilизации и анафилаксии. Что касается щелочных протеиназ, то как в легочной ткани, так и в БАЛ отмечено достоверное увеличение их активности по мере развития патологического процесса. Это подтверждается также данными электрофореза в ПААГ (рис. 2). Для более детального изучения выявленного эффекта из БАЛ выделили индивидуальную протеиназу и исследовали ее физико-химические и биологические свойства.

Электрофоретическая подвижность выделенного фермента соответствовала зоне повышенной протеолитической активности при анализе БАЛ у крыс с бронхиальной анафилаксией (см. рис. 2, 3).

Исследование протеиназы по разработанному нами методу из БАЛ у

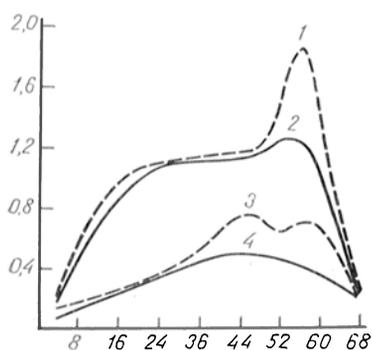


Рис. 2. Энзимограммы протеиназ различных биологических жидкостей в 7,5% ПААГ. По оси абсцисс — длина геля, мм; по оси ординат: протеолитическая активность, мкМ на 1 мг белка. 1 — БАЛ бронхиальной анафилаксии; 2 — БАЛ интактных крыс; 3 — надосадок легочной ткани при бронхиальной анафилаксии; 4 — надосадок легочной ткани интактных крыс.

крыс с бронхиальной анафилаксией показало, что данный фермент активируется в 2 раза по сравнению с нормой на 21-й день развития патологического состояния.

Для идентификации выделенной протеиназы проводили ингибиторный анализ с использованием как синтетических, так и природных ингибиторов (табл. 2). Как видно, изучаемый фермент является металлонезависимой сериновой протеиназой, чувствительной как к сывороточным, так и к местносинтезируемым ингибиторам. Кроме того данная протеиназа имеет большее сродство к кислотоустойчивому ингибитору, выделенному из бронхиального секрета.

Субстратная специфичность фермента была изучена по отношению к денатурированному гемоглобину и к альбумину. Анализ констант Михаэлиса ($7,64 \cdot 10^{-6}$ и $4,12 \cdot 10^{-5}$ М соответственно для гемоглобина и альбумина) показывает, что лучшим субстратом для данной протеиназы является денатурированный гемоглобин. При изучении

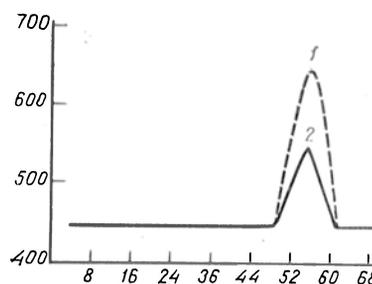


Рис. 3. Энзимограмма щелочной протеиназы из БАЛ в 7,5% ПААГ.

По оси абсцисс — длина геля, мм; по оси ординат — активность фермента, мкМ/мл. 1 — бронхиальная анафилаксия (21-й день сенсibilизации); 2 — интактные крысы.

Т а б л и ц а 2

Влияние ингибиторов на протеиназу из БАЛ крыс

Тип ингибитора	% ингибирования	K_i
Фенилметилсульфонилфторид	66	—
p-Хлормеркурибензоат натрия	0	—
ЭДТА	0	—
Соевый ингибитор трипсина	80	—
Сывороточный ингибитор трипсина	69	$4,8 \cdot 10^{-8} M$
Кислотоустойчивый низкомолекулярный ингибитор	73	$1,35 \cdot 10^{-9} M$

действия протеиназы на некоторые синтетические субстраты установлено, что фермент не проявлял активности по отношению к бензоил-аргинин-этиловому эфиру и ацетил-тирозин-этиловому эфиру — субстратам трипсина и химотрипсина. Молекулярная масса выделенной протеиназы была определена посредством электрофореза в ПААГ и оказалась равной 39 кДа (рис. 4).

Выделив индивидуальную протеиназу из БАЛ крыс и моноспецифичные антитела к ней, мы определили основные параметры обновления данного фермента в бронхолегочном аппарате. На рис. 5 показано включение [3H]-лейцина в повосинтезированную протеиназу. Следует отметить, что максимум радиоактивности приходится на 4 ч после введения изотопа.

Как видно, из табл. 3, концентрация фермента в БАЛ при бронхиальной анафилаксии существенно не изменяется, а увеличение общей протео-

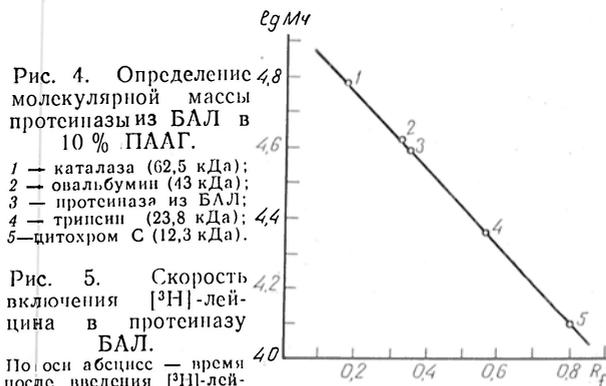


Рис. 4. Определение молекулярной массы протеиназы из БАЛ в 10% ПААГ.

1 — каталаза (62,5 кДа);
2 — овальбумин (43 кДа);
3 — протеиназа из БАЛ;
4 — трипсин (23,8 кДа);
5 — цитохром С (12,3 кДа).

Рис. 5. Скорость включения [3H]-лейцина в протеиназу БАЛ.

По оси абсцисс — время после введения [3H]-лейцина, ч; по оси ординат — радиоактивность, имп/мин на 1 мг белка.

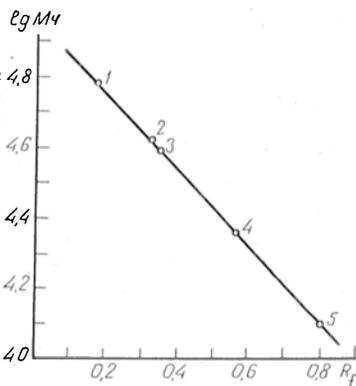


Рис. 4

Т а б л и ц а 3

Обновление протеиназы из БАЛ интактных и подопытных крыс ($M \pm m$)

Показатели обновления фермента	Норма	Бронхиальная анафилаксия
K_d , ч $^{-1}$	$0,018 \pm 0,001$	$0,087 \pm 0,008$
K_s , мкг/мг·ч	$2,0 \pm 0,31$	$10,42 \pm 0,86$
$T_{1/2}$, ч	$39,1 \pm 2,5$	$8,3 \pm 0,86$
E, мкг/мг	$111,7 \pm 18,1$	$119,8 \pm 10,0$

Примечание. E — концентрация фермента.

литической активности осуществляется, по-видимому, за счет поступления в БАЛ новосинтезированной протеиназы. Действительно, количество новосинтезированного фермента в БАЛ крыс с анафилаксией увеличивается в 5 раз по сравнению с нормой. Избыток протеиназы в определенной мере компенсируется значительно меньшим временем ее функционирования за счет интенсивной дегградации фермента.

Таким образом, нами выделена, очищена и охарактеризована протеиназа, активность которой в БАЛ крыс с бронхиальной анафилаксией повышена в 2 раза по сравнению с нормой. Этот фермент является сериновой протеиназой с молекулярной массой 39 кДа, не содержит металл и не относится к протеиназам типа трипсина или химотрипсина. Выделенный фермент сходен с эластазой, продуцируемой в БАЛ полиморфными лейкоцитами или альвеолярными макрофагами [15].

Широко распространено мнение о том, что активация протеолиза при легочных заболеваниях обусловлена трансформацией системы протеиназа — ингибитор [4, 10, 13]. Вместе с

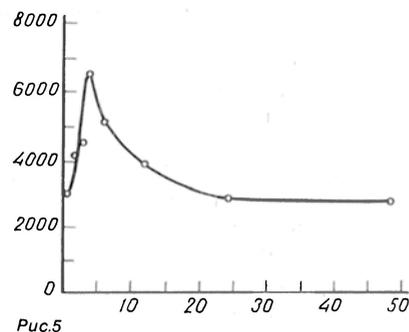


Рис. 5

тем выполненное нами исследование скоростей синтеза и распада, а также времени функционирования индивидуальной протеиназы из БАЛ крыс с бронхиальной анафилаксией показывает, что существуют иные механизмы активации протеолиза при данном патологическом состоянии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адо А. Д., Лобкова О. С., Шустова В. И., Федосеева В. П. // Сов. мед. — 1984. — № 9. — С. 7—13.
2. Комов В. П., Стрелкова М. А., Фирсова В. И. // Биохимия. — 1984. — Т. 49, № 1. — С. 149—154.
3. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. — М., 1980. — С. 245—246.
4. Кубышкин А. В. // Сов. мед. — 1984. — № 9. — С. 42—46.
5. Мосс Д. У., Баттервоорт П. Д. Энзимология и медицина: Пер. с англ. — М., 1978. — С. 87.
6. Оглоблина О. Г., Платонова Л. В., Мясникова Л. В. // Вопр. мед. химии. — 1980. — № 3. — С. 387—392.
7. Паньшина Г. С. Белковый состав и протеолитические ферменты мокроты при легочных заболеваниях: Автореф. дис. ... мед. наук. — М., 1977.
8. Паньшина Г. С., Спасская В. А., Трусова Н. Ф. // Сов. мед. — 1976. — № 4. — С. 41—45.
9. Современные методы в биохимии. — М., 1964. — Т. 1. — С. 151—152.
10. Хоменко А. Г., Каминская Г. О., Пыляцкие Я. А. // Тер. арх. — 1983. — № 3. — С. 60—63.
11. Arias J., Goldberg A. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1977. — Vol. 74, N 1. — P. 54—58.
12. Bednarski W., Pilarek M. // Pol. Tyg. lek. — 1974. — Vol. 29, N 49. — P. 2121—2123.

13. Hochrasser K., Rasche B., Beihert F. // Pneumologie. — 1974. — Vol. 150, N 2—4. — P. 253—259.
14. Lieberman J., Jawad M. // J. Lab. clin. Med. — 1971. — Vol. 77. — P. 713—721.
15. Lonky S. A., McCaren L. // Amer. Rev. resp. Dis. — 1983. — Vol. 127, N 2. — P. S9—S15.
16. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
17. Ouchterlony O. // Ark. Kemi. — 1950. — Vol. 1, N 7. — P. 43—50.
18. Schimke R., Brady M. // Proteases and Biological Control. — New York, 1975. — Vol. 2. — P. 515—530.
19. Stotland L., Share N. // Canad. J. Physiol. Pharmacol. — 1974. — Vol. 52. — P. 1114—1118.
20. Weber K., Osborn M. // J. biol. Chem. — 1969. — Vol. 244, N 16. — P. 4406—4412.

Поступила 17.11.87

PROTEINASES IN BRONCHOPULMONARY SYSTEM OF RATS WITH BRONCHIAL ANAPHYLAXIS

V. P. Komov, O. M. Spasenkova, M. A. Strelkova

Chemico-Pharmacological Institute, Leningrad

Proteolytic activity was studied in bronchoalveolar lavage in dynamics of rat bronchial anaphylaxis; in the disease alkaline proteinases were activated. Physico-chemical properties of an alkaline proteinase, isolated from the rat lavage, were studied. Quantitative metabolic patterns of the enzyme metabolism, involving the rates of its synthesis and decomposition as well as a period of the newly synthesized protein functioning, were evaluated. Under conditions of bronchial anaphylaxis the parameters of the proteinase turnover were altered in bronchopulmonary system.

УДК 616.379-008.64-092.9-07: [616.831-008.64:577.175.82+616.831-076.5]: [576.315.42:577.213.3

Л. В. Архипова, А. В. Куликов, О. Н. Озолин

РНК-СИТЕЗИРУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ ХРОМАТИНА МОЗГОВОЙ ТКАНИ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ АЛЛОКСАНОВЫМ ДИАБЕТОМ

Институт биологической физики АН СССР, Пущино

Вопросы молекулярной патологии сахарного диабета и в настоящее время остаются недостаточно разработанными. Неясна роль гипoinsулинемии в развитии патологических сдвигов в ЦНС. Несмотря на то, что исследование значения инсулина в развитии мозга [9, 10, 11] и его участие в регуляции различных ферментных процессах посвящено значительное число

работ [6, 12], связь между специфической нейрохимической патологией и основными процессами синтеза в ткани мозга при диабете продолжает оставаться неясной.

Задачами настоящего исследования явились определение уровня нейромедиаторов в неокортексе и стволочной части мозга и изучение РНК-синтезирующей способности хроматина у крыс

с экспериментальным аллоксановым диабетом (АЛД).

Методика

Реактивами служили норадrenalин (НА), допамин (ДА), серотонин или 5-окситриптамин (5-ОТ), АТФ, ГТФ, ЦТФ, УТФ (фирма «Reanal», Венгрия), L-3,4-дигидроксифенилаланин (L-ДОФА), ЭДТА, трис-НСI, актиномицин D, ортофталдальдегид (ОФА), ДНК фага T7, цистин (фирма «Serva», «ВНД»); бычий кристаллический альбумин («ВНД»); ³H-АТФ, ¹⁴C-АТФ (ЛМО «Изотоп»), n-бутанол, гептан, НСI, СН₃СООН, сульфит Na («Реахим»).

В опытах использовали самцов крыс Вистар, массой 180—200 г. Диабет вызывали внутривнутрибрюшинным введением 150 мг/кг аллоксангидрата. Появление диабета тестировали измерением концентрации глюкозы в моче с помощью орто-толуидинового реактива с регистрацией окраски на спектрофотометре СФ-26 при длине волны 600 нм. Содержание глюкозы в моче подопытных животных составляло 3000 мг%.

Определение 5-ОТ и НА в неокортексе и стволовой части мозга крыс проводили по методу [3].

Хроматин из мозга крыс выделяли по методу [7], РНК-полимеразу из E. coli с удельной активностью 4000 ед. на 1 мг белка в 1 мин выделяли по методу [4]. Реакционная смесь для определения РНК-синтезирующей способности хроматина объемом 0,2 мл имела следующий состав: 0,01 М трис-НСI буфер рН 8,0, содержащий 2 ммоль 2-меркаптоэтанола; 0,01 М MgCl₂; 0,2 М NaCl; 10⁻⁴ М ЭДТА; по 0,2 мМ ГТФ, ЦТФ, УТФ; 0,02 мМ [³H]-АТФ (удельная активность 24,8 Ки/мМ) или [¹⁴C]-АТФ (удельная активность 47 Ки/мМ; 10 мкг РНК-полимеразы из E. coli. В целях изучения влияния катехоламинов и 5-ОТ на РНК-синтезирующую способность хроматина в пробы добавляли L-ДОФА, ДА, НА и 5-ОТ в концентрации 5·10⁻⁹ М, в отдельные пробы — 0,1 мкг актиномицина D. Реакцию запускали добавлением 0,01 мл хроматина (или ДНК), содержащего около 10 мкг ДНК. Время инкубации при 37 °С составляло 15 мин. Реакцию останавливали перенесением проб в ледяную баню, добавляли 1 мг альбумина, 2 мл 5 % ТХУ и оставляли на 2 ч при температуре 0—2 °С. Отмывку материала от неключившегося меченого нуклеотида проводили на фильтрах «Сынпор» № 6 20 мл 5 % ТХУ и 10 мл 96 % этанола. Радиоактивность подсчитывали на сцинтилляционном счетчике «Ин-

тертехник» (Франция). Все растворы приготавливали на тридистиллированной воде. Содержание белка определяли по Лоури [9], ДНК — по Дише [5].

Результаты и обсуждение

Развитие диабетического синдрома у аллоксановых крыс сопровождается падением уровня НА в неокортексе и стволовой части мозга. Из табл. 1 видно, что уменьшение НА в коре по сравнению с контролем составило 70 %, в стволовой части мозга — 50 %. Измерение содержания 5-ОТ у крыс в стадии острого диабета показало значительное его снижение в неокортексе (в среднем на 50 %). В стволовой части мозга достоверных изменений не выявлено.

При исследовании синтеза РНК in vitro обнаружено, что хроматин ткани мозга крыс с аллоксановым диабетом обладает повышенной РНК-синтезирующей способностью по сравнению с хроматином контрольных животных (уровень включения [¹⁴C]-АТФ в опытных пробах более чем в 3 раза превышает таковой контрольных, табл. 2).

Поскольку при развитии диабетического синдрома содержание нейромедиаторов катехоламиновой природы в мозге крыс снижалось, представлялось интересным выяснить, как будут влиять нейромедиаторы, введенные в систему синтеза РНК, на синтез РНК. Дозу нейромедиатора рассчитывали на основании физиологической концентрации их в мозге: 10⁻⁸—10⁻⁹ М. Величину радиоактивности РНК получали после вычитания значения радиоактивности проб, инкубированных без РНК-полимеразы. Показано, что хроматин мозга диабетических крыс стал менее чувствительным к действию нейромедиаторов (табл. 3). Если в контроле добавление L-ДОФА,

Таблица 1

Содержание НА и 5-ОТ в неокортексе и стволовой части мозга крыс с аллоксановым диабетом (мкг на 1 г ткани) : 10⁻³

Структура мозга	НА		5-ОТ	
	контроль	острый диабет	контроль	острый диабет
Неокортекс n=6	0,160±0,008	0,045±0,005**	0,282±0,034	0,143±0,026**
Ствол n=6	0,215±0,039	0,100±0,02**	0,460±0,054	0,437±0,035

Примечание. Здесь и в табл. 3 и 4 одна звездочка — P < 0,01, две — P < 0,001; n — число животных.

Т а б л и ц а 2

Активность ДНК-зависимой РНК-полимеразы E. coli по отношению к различным субстратам (ими на 1 мкг ДНК в 1 мин)

Субстрат	Активность фермента
ДНК фага T17	630±52
Хроматин из мозга контрольных животных	554±40
Хроматин из мозга крыс с аллоксановым диабетом	2552±86

ДА и НА в концентрации $5 \cdot 10^{-9}$ М увеличивает включение $[^{14}\text{C}]\text{-АТФ}$ приблизительно на 40—50 %, то в опытных пробах активирующее действие медиаторов выражено не так сильно. В данном случае действие добавленных моноаминов, по-видимому, недостаточно в силу уже отмеченного нами снижения уровня нейромедиаторов в мозге диабетических животных. Альтернативным может быть предположение о том, что уровень РНК-синтезирующей системы в мозге диабетических крыс максимален и добавление активирующих средств оказывается менее эффективным.

Массовый выброс инсулина в кровяное русло, наблюдавшийся в 1-е сутки острого экспериментального диабета, объясняется разрушением инсулярных клеток [1]. В связи с этим можно предположить, что усиление активности РНК-синтезирующей системы, изолированной у аллоксановых крыс, происходит за счет прижизненного влияния гиперпродукции инсулина.

Интересно отметить, что 5-ОТ оказывает ингибирующее влияние на РНК-синтезирующую способность хроматина. Доза экзогенного серотонина $5 \cdot 10^{-9}$ М у интактных животных вызывает снижение включения $[^{14}\text{C}]\text{-АТФ}$ на 60—65 %, а у диабетических крыс — на 20—25 %. Ингибирующее влияние 5-ОТ также можно объяснить исходя из определения содержания

этого медиатора в мозге диабетических крыс. Пониженное его содержание приводит к меньшему избирательному эффекту включения $[^{14}\text{C}]\text{-АТФ}$ в опытных пробах.

В нейрофизиологической литературе в настоящее время разрабатываются направления по реципрокному действию катехоламинэргической и серотонинэргической систем [2]. В наших опытах мы показали, что 5-ОТ и НА даже на молекулярном уровне проявляют активность противоположного значения: НА активирует, а 5-ОТ ингибирует уровень синтеза РНК. Однако 5-ОТ как и НА, оказывает меньшее влияние на РНК-синтезирующую систему диабетических крыс, чем на таковую контрольных животных.

У диабетических крыс обнаружены также особенности влияния нейромедиаторов на синтез РНК в присутствии актиномицина D. Оказалось, что добавление актиномицина D снижает включение $[^{14}\text{C}]\text{-АТФ}$ в контроле на 30—35 %, в опытных пробах — на 60—65 % (табл. 4). Преинкубация хроматина контрольных животных с L-ДОФА нивелировала ингибирующее влияние актиномицина D на синтез РНК. Однако в случае применения актиномицина D в РНК-синтезирующей системе диабетических крыс его ингибирующая способность при предварительной инкубации хроматина с L-ДОФА частично сохранялась, что кажется вполне объяснимым с точки зрения патофизиологического состояния диабетических крыс.

Исходя из результатов, полученных при исследовании РНК-синтезирующей способности хроматина мозга крыс в стадии острого диабета, и контрольных животных, можно сделать следующие выводы: 1) при развитии диабетического синдрома в неокортексе и стволовой части мозга уровень НА снижается на 70 и 50 % соответственно, 5-ОТ — на 50 % в неокортексе;

Т а б л и ц а 3

Влияние катехоламинов и 5-ОТ в концентрации $5 \cdot 10^{-9}$ М на синтез РНК (в % от контроля)

Исследуемый материал	L-ДОФА ($5 \cdot 10^{-9}$ М)	ДА (10^{-9} М)	НА (10^{-9} М)	5-ОТ ($5 \cdot 10^{-9}$ М)
Хроматин мозга контрольных животных	138±5,3*	156±8,4**	148±9,2*	32±5,4**
Хроматин мозга крыс с аллоксановым диабетом	112±4,6*	95±4,1	113±5,2*	78±5,9*

Влияние L-ДОФА на включение [¹⁴C]-АТФ в присутствии актиномицина D (нмп на 1 мкг ДНК в 1 мин)

Хроматин из мозга контрольных животных			Хроматин из мозга крыс с аллоксановым диабетом		
Интактный хроматин (контроль)	Интактный хроматин + актиномицин D	Хроматин после 20 мин инкубации с L-ДОФА + актиномицин D	Интактный хроматин (контроль)	Интактный хроматин + актиномицин D	Хроматин после 20 мин инкубации с L-ДОФА + актиномицин D
542±22	380±13**	507±17	2552±86	1153±38**	1631±43**

2) острый аллоксановый диабет крыс приводит к увеличению РНК-синтезирующей способности хроматина по сравнению с контролем; 3) катехоламины (L-ДОФА, ДА и НА), активирующие синтез РНК *in vitro*, оказывают более слабое влияние на синтез РНК у диабетических крыс; 4) 5-ОТ, в норме проявляющий ингибирующее действие на синтез РНК *in vitro*, оказывает более слабое ингибирующее влияние при проведении эксперимента с мозгом диабетических крыс; 5) ингибитор РНК-полимеразы — актиномицин D может быть нейтрализован L-ДОФА, активирующим в физиологических дозах процесс синтеза РНК *in vitro*.

В эксперименте с хроматином, выделенным из мозга диабетических крыс, L-ДОФА не проявил в полной мере нейтрализующего действия на актиномицин D, следовательно последний оказывал более сильное ингибирующее действие на активность РНК-синтезирующей системы диабетических крыс.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баранов В. Г., Соколова И. М., Гаспарян Э. Г. // Экспериментальный сахарный диабет. Роль в клинической диабетологии. — Л., 1983. — С. 27—28.
2. Громова Е. А., Семенова Т. П., Чубакова А. Р. и др. // Препринт. — Пущино. — 1985. — С. 1—59.
3. Коган Б. М., Нечаев Н. В. // Лаб. дело. — 1979. — № 5. — С. 301—303.
4. Berg D., Barrett K., Chamberlin M. // Meth. Enzymol. — 1971. — Vol. 21. — P. 506—509.

5. Dische L., Shettles L. B. // J. biol. Chem. — 1948. — Vol. 175. — P. 595—603.
6. Horvat A. // Nature. — 1980. — Vol. 286. — P. 906.
7. Huang C. C., Huang P. C. // J. Neurochem. — 1969. — Vol. 29. — P. 5—12.
8. Kappy M., Sellinger S., Raizada M. // Ibid. — 1984. — Vol. 42. — P. 198—203.
9. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
10. Puro D. C., Agardh E. // Science. — 1984. — Vol. 225. — P. 1170—1172.
11. Straus D. S. // Life Sci. — 1981. — Vol. 29. — P. 2131—2139.
12. Tholey G., Sena A. H., Ledig M. // J. Neurochem. — 1986. — Vol. 47. — P. 1490—1492.

Поступила 17.11.87

RNA SYNTHESIZING ABILITY OF BRAIN CHROMATIN IN RATS WITH ALLOXANE DIABETES

L. V. Arkhipova, A. V. Kulikov, O. N. Ozolin

Institute of Biological Physics, Academy of Sciences of the USSR, Puschino

Content of noradrenaline was decreased in neocortex and brain stem of rat brain by 70 % and 50 %, respectively, and that of serotonin — by 50 % in the neocortex after development of the diabetic syndrome. At the same time, the RNA synthesizing ability of brain chromatin from the experimental animals was 3-fold higher as compared with controls. Catecholamines (L-DOPA, dopamine, noradrenaline) activated the RNA synthesis in controls by 40-50 %, whereas in the animals with alloxane diabetes the effect was distinctly decreased. *In vitro* inhibitory effect of serotonin on the RNA synthesis was markedly decreased in preparations of brain chromatin from diabetic rats. Inhibitory effect of actinomycin D on the RNA synthesis was neutralized completely in controls after preincubation of the brain chromatin with L-DOPA, while only partial influence was detected in diabetic rats.

А. И. Дагис, А. И. Толейкис, А. К. Прашкявичюс

ИЗУЧЕНИЕ ЦЕЛОСТНОСТИ МЕМБРАННЫХ СТРУКТУР
КЛЕТОК СЕРДЦА ПРИ ИШЕМИИ

ЦНИЛ медицинского института, Каунас

Митохондрии, выделенные из ишемического миокарда, характеризуются структурными повреждениями их внутренней и наружной мембран, повышенной их проницаемостью для протонов (и других ионов) [12] и цитохрома с, а также, соответственно, дефицитом последнего [1, 2], пониженной активностью сукцинатоксидазной системы, которая, однако, практически полностью восстанавливается добавлением цитохрома с [1, 2]. Известно, что дефицит его может возникнуть при выделении митохондрий [13], особенно поврежденных ишемией, которые являются более хрупкими, нежели контрольные [7]. Поскольку интактная наружная мембрана митохондрий непроницаема для цитохрома с [13], то это явление, очевидно, связано с ее повреждением. На основании обнаруженных электронно-микроскопически *in situ* ультраструктурных изменений сердечных митохондрий и их мембран при ишемии миокарда [3] можно также предполагать, что выход цитохрома с из митохондрий возможен уже в ишемической клетке, т. е. до их выделения. Изучению этого вопроса и посвящена настоящая работа. Его решение является важным для экстраполяции функциональных изменений изолированных из ишемического миокарда митохондрий к условиям *in vivo*.

Методика

В работе использовали кроликов массой 2,5—3,5 кг. Перфузию изолированного сердца проводили по Лангендорфу в изометрическом режиме модифицированным раствором Тирде [10] (144 мМ NaCl, 4 мМ KCl, 1,8 мМ CaCl₂, 15 мМ трис-HCl, 5 мМ глюкозы, рН 7,4), насыщенный кислородом. После вскрытия грудной клетки в левый желудочек сердца вводили 0,5 мл (2500 ЕД) гепарина и быстро извлекали сердце, натягивали его на конец канюли и закрепляли лигатурой. Затем сердце помещали в термостатируемую (37°C) камеру и в течение 20 мин промывали оксигенированным перфузионным раствором, после чего начинали рециркуляторную перфузию. Контрольную перфузию проводили при давлении 80 см вод. ст., ишемическую — при 16 см вод. ст. Продолжительность перфузии 3 ч. В течение всего этого

периода регистрировали силу и частоту сердечных сокращений, а также измеряли скорость потока перфузата через сердце, которая составляла $17 \pm 1,7$ и $13 \pm 0,6$ мл/мин в начале и после 3 ч контрольной перфузии и $4,3 \pm 0,5$ и $1,9 \pm 0,3$ мл/мин после 0,5 и 3 ч ишемической перфузии соответственно. Сила и частота сокращений после 3 ч ишемической перфузии изолированного сердца уменьшились на 66 и 92 %.

Перфузат для спектрофотометрических исследований в объеме 50 мл забирали через 0,5, 1 и 3 ч после начала процесса и концентрировали в лиофилизаторе TG 54 (VEB Hoch Vakuum, ГДР) при температуре от -30°C до 0°C (16 ч) и затем от 0°C до $+15^\circ\text{C}$ (8 ч). При таком режиме лиофилизации спектры стандартов цитохрома с и миоглобина не изменялись. Полученные лиофилизаты растворяли в 5 мл перфузионного раствора и после добавления нескольких зерен дитионита регистрировали спектры абсорбции в интервале 400—500 нм на двухлучевом — двухволновом спектрофотометре (Hitachi 557, Япония). По величине абсорбции при 420 нм судили о суммарном содержании гемопротеидов — цитохрома с и миоглобина, так как в этих условиях цитохром с и миоглобин не разделяются (рис. 1). При регистрации производных спектров четвертой степени эти гемопротеиды хорошо разделялись в отдельные пики с максимумами при 418 и 434 нм соответственно. Скорость сканирования — 30 нм/мин, щель — 2 нм, шаг дифференциации ($\Delta\lambda$) — 10 нм, оптический путь кюветы — 10 мм, температура — 37°C (см. рис. 1). О содержании цитохрома с и миоглобина судили по $\Delta\lambda$ амплитуд производных спектров. Концентрацию цитохрома с в перфу-

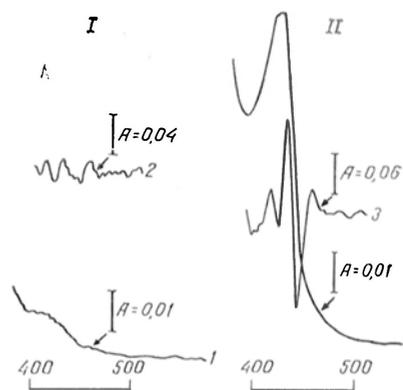


Рис. 1. Спектры восстановленных митохондриальных цитохромов (1, 2) и их производные спектры четвертой степени (3) после 3-часовой перфузии контрольного (I) и ишемического (II) изолированного сердца кролика.

Здесь и на рис. 2 по оси абсцисс — длина волны (в нм); по оси ординат — оптическая плотность.

зате (в нг/мл) после восстановления дитионитом измеряли также в двухволновом режиме (413—443,6 нм). Пару указанных волн подобрали опытным путем, для чего использовали цитохром с и миоглобин (Серва, ФРГ); в этих условиях последний не мешал измерению концентрации цитохрома с, которую определяли по калибровочной кривой.

Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования в среде, содержащей 180 мМ КСl, 2 мМ ЭДТА, рН 7,0 (доведено добавлением трис-ОН) и суспендировали в той же среде. Скорость окисления сукцината (20 мМ) измеряли полярографически при 37°C с электродом типа Кларка в среде, содержащей 150 мМ КСl, 5 мМ КН₂РO₄, 10 мМ трис, 1,25 мМ MgCl₂, 2 мкМ ротенона, рН 7,2. Концентрация белка митохондрий — 0,5 мг/г, АDP — 2 мМ, цитохрома с — 30 мкМ.

Количественный состав цитохромов в митохондриях измеряли спектрофотометрически при 37°C в среде 150 мМ КСl, 5 мМ КН₂РO₄, 10 мМ трис-НСl, содержащей 0,1 % тритон Х-100 и 50 % глицерин. Цитохромы восстанавливали дитионитом. Концентрация белка митохондрий — 1 мг/мл, оптический путь кюветы — 10 мм. Производные спектры четвертой степени митохондриальных цитохромов регистрировали как описано выше. Белок определяли как описано ранее [4].

Результаты и обсуждение

Известно [6, 8], что в первые часы инфаркта миокарда в сыворотке крови и моче появляется миоглобин. Это указывает на повреждение клеточных мембран. Однако исследований выхода из клеток цитохрома с мы не встретили. Учитывая тот факт, что при ишемии миокарда усиливается гидролиз митохондриальных фосфолипидов [5] и нарушается целостность наружной мембраны митохондрий [3], можно было ожидать и потерь цитохрома с митохондриями ишемических клеток.

Из данных, приведенных на рис. 1 и в табл. 1, видно, что при перфузии ишемического изолированного сердца кролика прогрессивно увеличивается абсорбция перфузата при 420 нм, вызывающая на появление в нем и постепенное увеличение содержания гемопротенидов — миоглобина и (или) цитохрома с. Из производных спектров четвертой степени (см. рис. 1) и динамики величины амплитуд пиков с максимумами при 418 и 434 нм (см. табл. 1) следует, что при ишемической перфузии сердца в перфузате увеличивается концентрация обоих гемопротенидов — цитохрома с и миоглобина соответственно, но последнего — более значительно. При измерении в перфузате абсолютного содержания цитохрома с, выраженного в нанogramмах на 1 мл перфузата и в наномолях на 1 г сердечной ткани, двухволновым методом (413—443,6 нм) обнаружена та же тенденция изменений. Следует отметить, что выход цитохрома с из сердечных клеток в перфузат имел место и при аэробной перфузии сердца, но в данном случае он был менее выраженным, чем при ишемии, и практически не увеличивался после 0,5 ч перфузии. Это же относится и к миоглобину.

Анализ производных спектров четвертой степени восстановленных цитохромов изолированных митохондрий показывает (табл. 2, рис. 2), что после 3-часовой перфузии сердца при ишемии значительно (на 50 %) снижается только характерная для цитохромов с+с₁ амплитуда пика с максимумом при 546 нм. В результате этого соотно-

Т а б л и ц а 1

Влияние ишемии на выход цитохрома с и миоглобина из изолированного сердца кролика в перфузат

Условия и длительность перфузии, г	Оптическая плотность перфузата при 420 нм	ΔА амплитуд производных четвертой степени спектров гемопротенидов перфузата		Цитохром с в перфузате, нг/мл	Выход цитохрома с в перфузат из сердечной ткани, нмоль/г
		цитохром с (418—409)	миоглобин (434—444)		
Контроль, 0,5	0,009±0,001	0,014±0,002	0,022±0,004	41±6	0,25±0,06
Ишемия, 0,5	0,016±0,005	0,031±0,011	0,044±0,011	54±20	0,28±0,08
Контроль, 1	0,009±0,001	0,017±0,002	0,022±0,003	50±9	0,31±0,09
Ишемия, 1	0,021±0,004*	0,026±0,011	0,063±0,018*	74±22	0,37±0,09
Контроль, 3	0,011±0,001	0,016±0,002	0,026±0,004	54±11	0,32±0,09
Ишемия, 3	0,049±0,012*	0,048±0,007*	0,185±0,055*	118±14*	0,64±0,07*

П р и м е ч а н и е. Оптическую плотность перфузата измеряли при 420 нм (см. рис. 2), производные спектры четвертой степени гемопротенидов перфузата показаны на рис. 2. Здесь и в табл. 2 и 3 звездочка — статистически достоверные различия по сравнению с контролем. ΔА вычисляли из производных спектров четвертой степени. Здесь и в табл. 2 первое число в скобках указывает максимум, второе — минимум амплитуды (в нм). Число опытов в контроле — 5, при ишемии — 4.

Влияние ишемии миокарда на количественный состав цитохромов в изолированных митохондриях сердца кролика

Условия и длительность перфузии, ч	Число опытов	ΔА амплитуд производных спектров четвертой степени			
		a (600—611)	b (558—566)	c+c ₁ (546—553)	
Контроль, 3	6	0,130±0,004	0,115±0,017	0,114±0,014	0,87±0,09
Ишемия, 3	4	0,116±0,002	0,112±0,011	0,057±0,012*	10,49±0,11*

Примечание. ΔА даны для проб при содержании митохондрий 1 мг белка в 1 мл.

ишение амплитуд пиков цитохрома с + c₁ и цитохрома а (600 нм) уменьшается в сходной степени — на 44 %. Поскольку ранее нами было показано [2], что после 2-часовой тотальной ишемии миокарда кролика в изолированных митохондриях сердца снижается только количество цитохрома с, то с достаточной уверенностью можно полагать, что уменьшение амплитуды пика цитохромов с + c₁ в данных экспериментах отражает уменьшение содержания цитохрома с в митохондриях. В связи с этим следует отметить, что в условиях наших измерений величина амплитуды пиков цитохромов была пропорциональна содержанию митохондрий или добавленного цитохрома с. Результаты полярографического исследования функциональной активности митохондрий находятся в согласии с измерениями в них содержания цитохромов. Как видно из табл. 3, после 3-часовой перфузии изолированного сердца при ишемии скорость дыхания митохондрий с сукцинатом в состоянии 3 в среде без цито-

хрома с снижается, а в среде с цитохромом с не изменяется. Снижение содержания последнего в митохондриях при ишемии миокарда приводит также к более выраженной (на 43 %) по сравнению с контролем активации дыхания в состоянии 3 экзогенным цитохромом с. Следовательно, эти данные указывают на повреждение наружной мембраны ишемических митохондрий и обусловленное этим увеличение в них недостатка цитохрома с. Как и при тотальной ишемии миокарда [1, 2], при перфузии ишемического изолированного сердца наблюдается увеличение скорости окисления сукцината митохондриями в отсутствие АДФ и снижение дыхательного контроля, что указывает на увеличение протонной проводимости внутренней мембраны и разобщение окислительно-фосфорилирования. Таким образом, цитохром с выходит как из митохондрий, так и из клеток ишемического перфузируемого сердца. Это является свидетельством весьма раннего (0,5 ч) повреждения наружной мембраны митохондрий *in situ* и сарколеммы, которое электронно-микроскопически удается обнаружить позднее [3, 11]. Следует, однако, отметить, что потеря цитохрома с клетками сердца, и, следовательно, митохондриями *in situ* невелика, и, по нашим расчетам, после 3 ч перфузии ишемического сердца составляет лишь около 3—4 % от его содержания в сердечной ткани (при расчетах принимали, что 1 г влажной ткани сердца содержит 16—20 наномолей цитохрома с) [9]. По данным же спектроскопических и полярографических исследований изолированных митохондрий, она явно выше (см. табл. 2 и 3). По-видимому, митохондрии теряют больше цитохрома с при их выделении, чем *in situ*. Если это действительно так, то обнаруженное при ише-

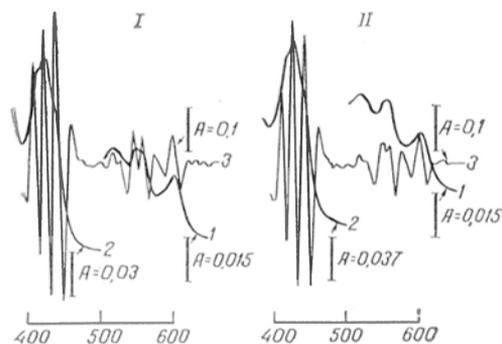


Рис. 2. Спектры восстановленных гемопротеидов (миоглобин и цитохром с) перфузата (1) и их производные спектры четвертой степени (2) после 3-часовой перфузии контрольного (I) и ишемического (II) изолированного сердца кролика.

Влияние ишемии и цитохрома с на окисление сукцината в митохондриях, выделенных из перфузированного сердца кролика

Условия и длительность перфузии, ч	Число опытов	V_2	V_3	V_2^c	V_3^c	V_3/V_2	V_3^c/V_2^c	Недостаток цитохрома с, %
Контроль, 3	6	77±5	288±32	211±10	471±38	3,74±0,28	1,67±0,07	39±2,6
Ишемия, 3	5	97±6*	216±41	346±21*	487±58	2,16±0,29	2,39±0,19*	55±3,4*

Примечание. V_2 и V_3 — скорости дыхания до и после добавления ADP, V_2^c , V_3^c — то же, но в среде с цитохромом с. V_3/V_2 — дыхательный контроль по Ларди, V_3^c/V_2^c — кратность активации дыхания митохондрий цитохромом с. Недостаток цитохрома с = $(1 - V_3/V_3^c) \cdot 100$.

мин снижение активности сукцинатоксидазы следовало бы объяснить потерей цитохрома с, возникающей главным образом при выделении митохондрий. В связи с этим следует отметить, что оцениваемая по выходу в перфузат потеря митохондриями цитохрома с и убыль их функциональной активности *in situ* может быть заниженной, поскольку не исключено, что некоторая часть диссоциированного от внутренней мембраны цитохрома с не выходит из клетки и содержится в межмембранном пространстве митохондрий и (или) в цитозоле. В свою очередь появление цитохрома с в перфузате во время ишемической перфузии изолированного сердца или в других условиях может служить показателем повреждения сарколеммы и наружной мембраны митохондрий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баласявичюс Р. В., Толейкис А. И., Прашкявичюс А. К. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 2. — С. 130—132.
2. Баласявичюс Р. В., Толейкис А. И., Прашкявичюс А. К. // Бюл. exper. биол. — 1984. — № 1. — С. 40—42.
3. Глаголева В. В., Чечулин Ю. С. Ультраструктурная основа нарушения функции сердечной мышцы: Атлас. — М., 1968.
4. Дзея П. П., Толейкис А. И., Прашкявичюс А. К. // Вопр. мед. химии. — 1980. — № 6. — С. 731—735.
5. Толейкис А. И., Дагис А. И., Прашкявичюс А. К. // Там же. — 1982. — № 4. — С. 64—67.
6. Groth T., Sylven C. H. // Scand. J. clin. Lab. Invest. — 1981. — Vol. 41. — P. 79—85.
7. Jennings R. B., Ganote Ch. N., Reimer N. A. // Amer. J. Path. — 1981. — Vol. 41. — P. 79—85.
8. Kunec-Vajic E., Rukavina Z., Pavlovic S., Weber K. // Acta med. iug. — 1980. — Vol. 34. — P. 347—353.
9. Margoliash E., Walasek O. F. // Meth. Enzymol. — 1967. — Vol. 10. — P. 339—348.
10. Payet M. D., Schanne O. F., Ruiz-Ceretti E., Demers J. M. // J. Physiol. (Paris). — 1978. — Vol. 74. — P. 31—35.
11. Steembergen Ch., Jennings R. B. // J. molec. cell. Cardiol. — 1984. — Vol. 16. — P. 605—621.
12. Toleikis A., Dzeja P., Praskevicius A., Jasaitis A. // Ibid. — 1979. — Vol. 11. — P. 57—76.
13. Wojtczak L. // Rev. roum. Physiol. — 1974. — Vol. 11. — P. 173—185.

Поступила 25.05.87

THE STATE OF HEART CELLS MEMBRANE STRUCTURES IN ISCHEMIA

A. I. Dagis, A. I. Toleikis, A. K. Prashkyavichus

Medical School, Kaunas

Under conditions of perfusion of isolated rabbit heart in aerobic medium and, especially, during ischemia, cytochrome c was liberated from heart cells into perfusate, thus indicating that integrity of mitochondrial outer membrane and of cell membrane was impaired. *In situ* developed deficiency of cytochrome c was distinctly less as compared with isolated mitochondria (50%, 3hrs perfusion in ischemia), which appears to occur in response to ultrastructural impairments of mitochondria arising during their isolation and to other reasons.

А. А. Ржанинова, Е. Л. Требухина, В. Н. Прозоровский

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ВЫСОКООЧИЩЕННОЙ КРЕАТИНФОСФОКИНАЗЫ ИЗ МОЗГА СВИНЬИ

Институт медицинской энзимологии АМН СССР, Москва

Определение изоферментов креатинфосфокиназы (КФК) в сыворотке крови в настоящее время находит все более широкое применение в диагностике инфаркта миокарда, черепно-мозговых травм, злокачественных новообразований желудка, мозга, легких и других заболеваний [1, 2, 4, 7, 9, 11].

Разработаны различные методы по определению изоферментов КФК в сыворотке крови: электрофоретический; метод, основанный на ингибировании субъединиц соответствующими антителами; метод, использующий разделение изоформ с помощью ДЭАЭ-сефадекса и др. Каждый из этих методов имеет недостатки, сдерживающие широкое распространение их в клинической энзимодиагностике. Основными из них являются сложность и большая стоимость компонентов сопряженной реакции, необходимой для определения активности, наличие специального оборудования в случае электрофоретического определения изоформ [10, 14, 15, 17, 18]. Наиболее перспективными в отношении чувствительности, специфичности, простоты и стоимости сейчас становятся иммуноферментные методы.

Учитывая важность создания удобного и простого метода по определению изоферментов КФК, нами были начаты работы по созданию иммуноферментного метода анализа изофермента МВ на основе антител, полученных к изоферментам КФК свиньи (МВ и ВВ). Высокая степень гомологии между КФК человека и свиньи позволяет рассматривать креатинфосфокиназу свиньи не только как доступный материал для анализа, но и как антиген для получения антисыворотки, реагирующей с соответствующими изоферментами КФК человека [12].

В связи с необходимостью создания иммуноферментного анализа потребовалась разработка методики выделения ВВ изофермента КФК свиньи высокой степени очистки, по-

скольку к настоящему времени разработан лишь метод выделения ММ изофермента КФК свиньи [16].

Предлагаемый способ очистки изофермента ВВ из мозга свиньи основан на традиционных методах фракционирования макромолекул (осаждение сульфатом аммония, ионообменная хроматография, адсорбционная хроматография на гидроксипатите) и может быть использован в промышленном производстве, так как процент выхода фермента достаточно велик (около 50%) и большинство используемых реактивов могут быть заменены на отечественные аналоги.

Препаратами очищенного изофермента КФК свиньи иммунизировали кроликов и получили моноспецифические антисыворотки к КФК свиньи, что подтверждает высокую степень очистки фермента.

Методика

В работе использовали отечественные реактивы марки ос. ч., ДЭАЭ-целлюлозу («Whatman», Англия), гидроксипатит, ЭДТА в виде динатриевой соли, 2-меркаптоэтанол, сульфат аммония («ВДН Chemicals Ltd», Англия), трис, акриламид, («Reanal», Венгрия), 2-метил-бис-акриламид, ТЭМЭД, агарозу («Serva», ФРГ).

Для очистки КФК из мозга свиньи использовали следующие растворы: № 1 — 0,01 М КСl, содержащий 0,001 М ЭДТА, 0,01 М 2-меркаптоэтанол pH 7,0, буфер № 2 — 0,005 М трис-HCl, содержащий 0,01 М 2-меркаптоэтанол pH 8,5, буфер № 3 — 0,01 М Na_2HPO_4 — NaH_2PO_4 с 0,01 М 2-меркаптоэтанолом pH 6,7, буфер № 4 — 0,01 М Na_2HPO_4 — NaH_2PO_4 с 0,01 М 2-меркаптоэтанолом pH 7,0. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [13].

Активность КФК измеряли на приборе «Enzimast» («Adproducts», Италия) при 340 нм, используя наборы для определения активности КФК («Boehringer Mannheim», Австрия).

Электрофорез в 7,5% ПААГ pH 8,9 проводили на приборе фирмы «Pharmacia Fine Chemicals» (Швеция). Пластины геля окрашивали в течение 30 мин 0,25% раствором ку-масы бриллиантового синего G-250 («Serva», ФРГ) в 10% CH_3COOH . Полную отмывку фона проводили на приборе фирмы «Pharmacia Fine Chemicals» с использованием раствора $\text{CH}_3\text{COOH} - \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$ (3:1:6 объемные части).

Очистка КФК (ВВ-изоформы) из мозга свиньи (1 кг)

Стадия очистки	Белок, г	Общая активность, Е	Удельная активность, Е/мг	Степень очистки	Выход, %
Экстракт	10,66	126,189	11,84	1,0	100
Осаждение ацетатом магния, 40% сульфатом аммония	9,49	118,695	12,51	1,06	94,1
Высаливание 60% сульфатом аммония	2,89	109,230	37,80	3,19	86,56
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе (I)	0,530	95,860	180,87	15,28	75,93
То же (II)	0,131	93,740	715,57	60,43	74,29
Адсорбционная хроматография на гидроксипатите	0,084	64,200	764,29	64,55	50,88
Концентрирующий диализ	0,084	64,200	764,29	64,55	50,88

Результаты и обсуждение

В процессе разработки метода были опробованы гель-фильтрация на сефадексе G-200, аффинная хроматография на blue-сефарозе, ионообменная хроматография на фосфоцеллюлозе [3, 6, 8], однако хороших результатов достичь не удалось.

Результаты выделения и очистки изофермента КФК из мозга свиньи приведены в таблице. Для выделения КФК использовали ткань мозга массой 1 кг. Весь процесс выделения проводили при температуре 4 °С.

Мозговую ткань свиньи гомогенизировали при 3000 об/мин в течение 5 мин в буфере № 1 (1:2, масса/объем). Экстракт мозга свиньи получали после центрифугирования при 22 000 g в течение 30 мин.

Первым стандартным этапом очистки являлось осаждение балластных

веществ 0,07 М ацетатом магния при рН 8,9 [3, 6, 8, 16]. Затем проводили дробное высаливание сульфатом аммония. Белок, полученный при 40—60 % насыщения соли, использовали для дальнейшей очистки.

Полученные белковые фракции диализовали против буфера № 2 (1:20) и наносили на колонку 3,7×57 см с ДЭАЭ-целлюлозой, предварительно уравновешенную тем же буфером. После нанесения раствора колонку промывали 1 л буфера № 2 с добавлением 0,1 М NaCl со скоростью 100 мл/ч. Элюцию КФК проводили градиентом молярности NaCl (0,1—0,5 М) со скоростью 40 мл/ч (рис. 1). Оптическую плотность выходящих фракций контролировали при помощи оптического денситометра «Uvicord II» (LKB, Швеция) при 280 нм. Элюированный фермент собирали по фракциям объемом 15 мл и подвергали электрофоретическому и энзиматическому анализам.

Хороших результатов удалось достичь при использовании повторной ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе при изменении условий. Для этого колонку 3,8×35 см уравновешивали буфером

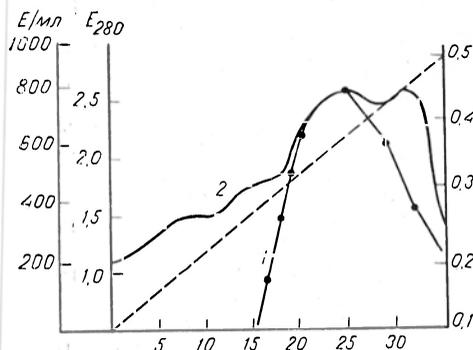


Рис. 1. Ионообменная хроматография белковой фракции, полученной при 40—60 % насыщении сульфатом аммония, на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой.

Здесь и на рис. 2 по оси абсцисс — номер фракции от начала линейного градиента NaCl; по оси ординат: слева — активность КФК в единицах на 1 мл (1) и величина оптической плотности при E₂₈₀ (2), справа — концентрация NaCl, М. Пунктир — градиент концентрации NaCl.

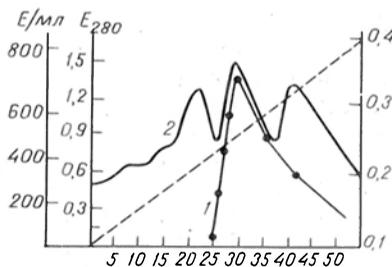


Рис. 2. Рехроматография препарата КФК на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой.

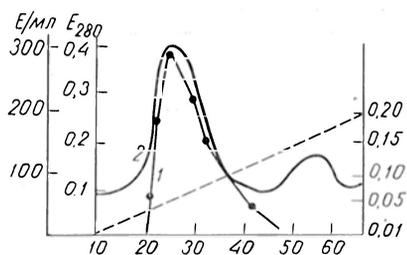


Рис. 3. Хроматография препарата КФК на гидроксипатите.

По оси абсцисс: номер фракции от начала линейного градиента фосфатного буфера; по оси ординат: слева — активность КФК в единицах на 1 мл (1) и величина оптической плотности при E_{280} (2), справа — концентрация фосфатного буфера, М. Пунктир — градиент концентрации фосфатного буфера.

№ 3 и наносили отдиализованный против этого буфера фермент. Элюцию проводили градиентом молярности NaCl (0,1—0,4 М) со скоростью 40 мл/ч. Результаты типичного эксперимента представлены на рис. 2. Ввиду некоторых специфических особенностей КФК из мозга свиньи (кальций является обратимым ингибитором КФК [5] для дальнейшей его очистки был использован метод адсорбционной хроматографии на гидроксипатите, который ранее при очистке КФК не применяли. Эту стадию очистки проводили на колонке 3,4 × 35 см. Отобранные по активности фракции, отдиализованные против буфера № 4, наносили на колонку с гидроксипатитом со скоростью 20 мл/ч. Элюцию фермента проводили градиентом молярности Na_2HPO_4 — NaH_2PO_4 буфера (0,01—0,2 М) при постоянном значении рН 7,0 с добавлением 0,01 М 2-меркаптоэтанола (рис. 3). Элюированный фермент собирали по фракциям объемом 6 мл и анализировали. При электрофорезе препарата, полученного после хроматографии на гидроксипатите, обнаруживалась одна белковая зона, соответствующая ВВ изоферменту КФК свиньи.

Необходимость введения стадии хроматографирования на гидроксипатите была обусловлена тем, что после очистки на ДЭАЭ-целлюлозе препарат КФК содержал несколько минорных белков, которые не удавалось отделить ни гель-фильтрацией на сефадексе G-200, ни аффинной хроматографией на blue-сефарозе, ни ионообменной хроматографией на фосфоцеллюлозе. Полученный гомо-

генный препарат КФК диализовали против буфера № 4 в целях устранения ингибирующего действия ионов кальция и концентрировали для последующего хранения против насыщенного раствора сульфата аммония рН 7,5, содержащего 2-меркаптоэтанол.

В результате выделен ВВ изофермент КФК со степенью очистки в 65 раз, при этом выход фермента составлял 51% от первоначального, удельная активность, определяемая с помощью набора «СК NAC akt.» фирмы «Boehringer Mannheim» (Австрия), составила 764 Е на 1 мг белка.

С помощью полученного препарата проводили иммунизацию кроликов (вводили подкожно от 1 до 4 мг фермента в 0,5 мл раствора вместе с 0,5 мл полного адьюванта Фрейнда; инъекции повторяли 3 раза через 7—10 дней). Полученная антисыворотка образовывала одну полосу precipitation с частично очищенным экстрактом мозга свиньи.

Таким образом, предложенный метод позволяет получить высокоочищенный активный препарат ВВ изофермента КФК в сравнительно короткий срок с помощью (в основном) доступных реактивов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иванов И. И., Коровкин Б. Ф., Маркелов И. М. Введение в клиническую энзимологию. — Л., 1974.
2. Burlina A., Plebani M., Rizzotti P. // Clin. Chem. — 1983. — Vol. 29. — N 2. — P. 390—391.
3. Eppenberger H. M., Dawson D. M., Kaplan N. O. // J. biol. Chem. — 1967 — Vol. 242. — P. 204.
4. Gerhardt W., Waldenström J., Billström R., Uofxendahl S. // Clin. Biochem. — 1979. — Vol. 12, N 6. — P. 211—213.
5. Jung K., Neumann R., Ziese W., Egger E. // Z. klin. Chem. klin. Biochem. — 1979. — Bd 17, N 11. — S. 717—719.
6. Jacobs H. K., Keutel H. J. // Fed. Proc. — 1968. — Vol. 27. — 640.
7. Kanemitsu F., Okigaki T. // Clin. chim. Acta. — 1985. — Vol. 151, N 1. — P. 23—31.
8. Keutel H. J., Jacobs H. K. // Biochemistry (Wash.). — 1968. — Vol. 7, N 12. — P. 4283—4290.
9. Kontinen A. // Acta med. scand. — 1978. — Vol. 204, N 62. — P. 115—117.
10. Koons S. S., Echert B. S., Zobel R. C. // Exp. Cell. Res. — 1982. — Vol. 140, N 2. — P. 401—409.

11. Kurtz K. J., Nielsen R. D. // *Cancer*. (Philadelphia). — 1985. — Vol. 51, N 3. — P. 562—565.
12. Lott J. A., Wenger W. C., Massion C. G., Homburger H. A. // *Amer. J. clin. Path.* — 1982. — Vol. 78, N 4. — Suppl. — P. 626—633.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // *J. biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
14. Nicholson G. A., Griffiths L. R. // *Pathology*. — 1983. — Vol. 15, N 1. — P. 23—25.
15. Shell W. E., Kligermen M., Burman M. // *Amer. J. Cardiol.* / 1979. — Vol. 44, N 1. — P. 67—75.
16. Takasawa T., Shiokawa H. // *J. Biochem.* (Tokyo). — 1981. — Vol. 90. — P. 195—204.
17. Witherspoon L. R., Shuler S. E., Genere C. F., Mackenzie F. J. // *J. nucl. Med.* — 1982. — Vol. 23, N 2. — P. 136—142.
18. Yuan G. L., Kuan S. S., Guibault G. G. // *Fresenius Z. analyt. Chem.* — 1982. — Bd 312, N 2. — S. 192.

Поступила 17.11.87

УДК 612.591.08;612.111.1.015.1+612.111.1.015.31:546.32+546.33

Д. П. Бондарев, Н. Б. Козлов

СОТНОШЕНИЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА, СОДЕРЖАНИЯ Na^+ и K^+ , АКТИВНОСТИ Na , K -АТФАЗЫ В ЭРИТРОЦИТАХ С ИХ ОБЪЕМОМ И ФОРМОЙ В УСЛОВИЯХ ПЕРЕГРЕВАНИЯ ОРГАНИЗМА

Смоленский медицинский институт

Одним из неблагоприятных физических факторов, часто воздействующих на организм человека, является высокая температура окружающей среды. Перегреванию подвергаются значительные массы людей как в связи с естественными природно-климатическими особенностями, так и в процессе производственной деятельности [7, 8, 19, 20, 22, 25]. Воздействие на человека высокой температуры внешней среды, особенно при наличии других неблагоприятных условий, может привести к различным тепловым повреждениям [26], крайним проявлением которых является тепловой удар.

Нарушения функций различных систем и органов, отмечаемые в условиях гипертермии, в значительной мере зависят от состояния крови, ее физико-химических свойств, состава, возможности клеточных элементов, в первую очередь эритроцитов, выполнять свои функции в условиях перегрева организма.

Нам представлялось важным изучить в эксперименте на животных соотношение между состоянием энергетического обмена, уровнем натрия и калия, активностью Na , K -АТФазы в эритроцитах с изменением их объема и формы при перегревании животных до состояния теплового удара.

Методика

Опыты проводили на 80 белых крысах обоего пола массой 140—180 г. Перегревание

животных осуществляли в воздушном термостате с естественной вентиляцией при температуре 44—45 °С и относительной влажности 30—40 %. Методика перегрева животных и характеристика теплового удара описаны ранее [4]. Результаты экспериментов обрабатывали статистически с использованием критерия Фишера—Стьюдента. Учитывая значительное изменение гемоконцентрации в условиях перегрева организма, все показатели пересчитывали на единицу массы гемоглобина.

Содержание АТФ в эритроцитах определяли, используя наборы реактивов ("Boehringer Mannheim", ФРГ). Состояние гликолиза оценивали по приросту молочной кислоты [3]. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) определяли по унифицированной методике [13]. Об активности Na , K -АТФазы судили по количеству неорганического фосфата, отщепленного от АТФ за 1 ч. Неорганический фосфат определяли по методу [21] в модификации [24], содержание в эритроцитах и плазме ионов калия и натрия — методом пламенной фотометрии [6]. Для определения относительного объема эритроцитов нами был предложен (совместно с Н. М. Стунжасом) простой и доступный способ (заявка на изобретение в Госкомизобретений, приоритетная справка № 3870749/14) с использованием пористых фильтров. Диаметр эритроцитов определяли с помощью газового лазера ЛГ-75 [10]. Содержание гемоглобина определяли по методу [1].

Результаты и обсуждение

Важным энергетическим процессом в эритроцитах является гликолиз. В ряде работ [5, 12] отмечено при перегревании организма усиление процессов гликолиза в других тканях (мозг, миокард, скелетные мышцы). Данные наших исследований показали, что на высоте теплового удара ин-

Т а б л и ц а 1
Интенсивность гликолиза, активность Г-6-ФДГ
и уровень АТФ

Показатель	Контроль	Тепловой удар
Интенсивность гликолиза, мкмоль лактата на 1 г Нб	0,94±0,03 (10)	0,66±0,02 (9) $p < 0,001$
Активность Г-6-ФДГ, МЕ на 1 г Нб	5,1±0,17 (11)	4,3±0,29 (12) $p < 0,01$
Уровень АТФ, мкмоль на 1 г Нб	5,28±0,18 (10)	3,52±0,12 (10) $p < 0,001$

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 представлены средние арифметические величины ± средние ошибки средних арифметических. В скобках — число опытов.

Интенсивность гликолиза в эритроцитах существенно снижается (табл. 1).

Другим важным для эритроцитов процессом обмена является пентозо-фосфатный путь расщепления углеводов. В условиях снижения интенсивности гликолиза возможно повышение роли этого процесса как источника энергии. Данные наших исследований (см. табл. 1) показывают, что при перегревании животных до состояния теплового удара активность ключевого фермента пентозо-фосфатного пути расщепления углеводов Г-6-ФДГ существенно снижается.

Факт снижения энергопродуцирующих процессов в эритроцитах в условиях перегревания организма до состояния теплового удара предполагал уменьшение уровня АТФ в этих клетках. Снижение уровня АТФ при перегревании в других тканях (мозг, печень, скелетные мышцы) отмечено многими авторами [2, 17, 23]. Наши эксперименты показали, что уровень АТФ в эритроцитах животных, перегретых до теплового удара, существенно снижался (см. табл. 1).

Однако содержание АТФ зависит не только от его продукции, но и от процессов утилизации АТФ в клетке. В связи с этим представлялось важным исследовать активность Na, K-АТФазы эритроцитов. Действие указанного фермента определяет утилизацию более половины энергии всей массы АТФ клетки [9]. Результаты исследований показали (табл. 2), что активность Na, K-АТФазы эритроцитов на высоте теплового удара значительно снижалась, что можно рассматривать, с одной стороны, как результат повреждающего действия тепла, а с другой, возможно, как компенсаторную реакцию организма, направленную на сохранение уровня АТФ в клетке и снижение теплопродукции [18].

Изменение активности Na, K-АТФазы эритроцитов не могло не сказаться на содержании натрия и калия в эритроцитах, поскольку перенос ионов натрия и калия через клеточные мембраны против градиента концентрации во многих случаях связан с активностью Na, K-АТФазы [11]. При этом ионы натрия удаляются из

Т а б л и ц а 2
Активность Na, K-АТФазы, содержание Na⁺ и K⁺ в плазме и в эритроцитах

Показатель	Контроль	Тепловой удар
Активность Na, K-АТФазы, мкмоль неорганического фосфора в час на 1 мг Нб: эритроциты	0,40±0,04 (10)	0,29±0,02 (10) $p < 0,02$
Содержание натрия: плазма, мМ/л	145±2,8 (11)	150±2,0 (11) $p > 0,05$
эритроциты, ммоль на 1 г Нб	0,12±0,01 (11)	0,09±0,01 (11) $p < 0,02$
Содержание калия: плазма, мМ/л	5,6±0,3 (11)	5,8±0,2 (11) $p > 0,05$
эритроциты, ммоль на 1 г Нб	0,76±0,04 (11)	0,62±0,02 (11) $p < 0,01$

Т а б л и ц а 3

Диаметр эритроцитов, относительный объем эритроцитов, абсолютный объем эритроцитов

Показатель	Контроль	Тепловой удар
Диаметр эритроцитов, мкм	6,2±0,1 (12)	5,7±0,1 (12) $p < 0,01$
Относительный объем эритроцитов, %	100 (12)	82±1,6 (12) $p < 0,001$
Абсолютный объем эритроцитов, мкм ³	89,6±0,9 (10)	79,6±1,0 (10) $p < 0,001$

клетки в окружающую среду, а ионы калия поступают в клетку. Учитывая сказанное, мы исследовали содержание указанных ионов в плазме и эритроцитах в контроле и на высоте перегревания. Данные экспериментов показывают (см. табл. 2), что при перегревании животных до состояния теплового удара содержание ионов натрия и калия в эритроцитах снижалось, в то время как плазма относительно стойко сохраняет свой электролитный состав. Из представленных данных видно, что ионы калия транспортируются вместе с ионами натрия в одном и том же направлении — из эритроцитов в плазму, что в большей мере связано не с Na, K-АТФазой, а, по-видимому, с механизмом так называемой облегченной диффузии, обеспечивающей Na⁺, K⁺-котранспорт, и другими системами транспорта одновалентных ионов [11].

Таким образом в процессе перегревания организма в большей степени поддерживается постоянство ионного состава плазмы, чем эритроцитов. Несмотря на то что содержание натрия в эритроцитах при развитии теплового удара у животных уменьшалось на 26%, а содержание калия — на 19%, количество ионов калия, поступивших из эритроцитов в плазму, значительно (более чем в четыре раза) превышает количество ионов натрия. Поскольку при этом концентрация калия в плазме крови не изменяется, следует предположить значительную потерю организмом в про-

цессе перегревания солей калия. Увеличение выведения калия из организма при перегревании отмечали и другие авторы [15].

Потеря эритроцитами ионов может приводить к снижению в них осмотического давления. В то же время ионный состав плазмы крови практически не изменялся, что может способствовать перераспределению воды между клетками и плазмой. С целью выяснения участия внутриклеточной воды в перераспределении жидкости между тканями и сосудистым руслом, общем обезвоживании организма на высоте гипертермии нами были проведены исследования изменения диаметра эритроцитов при перегревании животных до состояния теплового удара. Как видно из табл. 3, диаметр эритроцитов крови контрольных животных оказался равным 6,2 мкм. При развитии теплового удара диаметр эритроцитов уменьшился на 9% и составил 5,7 мкм.

Однако по изменению диаметра эритроцитов нельзя в полной мере судить об изменении их величины, так как эритроциты, имея в нормальных условиях форму двояковогнутого диска, при изменении диаметра могут сохранять свой объем. Для более точного определения величины эритроцитов при воздействии на организм высокой внешней температуры нами был определен относительный объем эритроцитов. Данные экспериментов показывают (см. табл. 3), что при перегревании животных до состояния теплового удара относительный объем эритроцитов составлял 82±1,6% по отношению к этому показателю у крыс контрольной группы.

Поскольку метод определения относительного объема эритроцитов основан на степени прохождения их через пористую мембрану, полученные данные об изменении объема эритроцитов нельзя было принимать абсолютно, без учета возможного изменения формы эритроцитов. В связи с этим представилось необходимым определить абсолютный объем эритроцитов, который рассчитывали с учетом гематокритного показателя и числа эритроцитов, причем эксперименты в контроле и на высоте теплового удара проводили на одном животном. Из представленных данных (см. табл. 3)

видно, что в контроле объем эритроцитов составляет $89,6 \text{ мкм}^3$, что соответствует данным литературы [14]. Перегревание животных до теплового удара сопровождалось снижением объема эритроцитов до $79,6 \text{ мкм}^3$, т. е. на 13 %. Таким образом, полученные данные (уменьшение диаметра и объема эритроцитов) свидетельствуют о потере эритроцитами воды и, следовательно, об участии внутриклеточной воды в поддержании постоянства содержания воды в плазме.

Наличие данных об изменении диаметра эритроцитов позволило вычислить их возможный объем, исходя из предложения о том, что эритроциты имели строго сферическую форму. Объем эритроцитов контрольных животных составил бы $119,5 \text{ мкм}^3$ (диаметр $6,2 \text{ мкм}$), а объем эритроцитов животных, перегретых до теплового удара, — $96,9 \text{ мкм}^3$ (при диаметре $5,7 \text{ мкм}$). Истинный объем эритроцитов контрольных животных, как это видно из табл. 3, равнялся $89,6 \text{ мкм}^3$, что составляет 75 % по отношению к возможному («сферическому») объему. Истинный объем эритроцитов животных, перегретых до теплового удара, оказался равным $79,6 \text{ мкм}^3$ (82 % от «сферического»). Таким образом, перегревание животных сопровождается не только изменением объема эритроцитов, но, по-видимому, и изменением их формы, которая как бы приближается к сферической.

Выше было показано, что при перегревании животных до теплового удара энергетический потенциал эритроцитов, связанный с уровнем АТФ, существенно снижается. Показано угнетение основных процессов энергообразования. Понижение же уровня свободной энергии ведет к самопроизвольным изменениям в системе, при этом увеличивается энтропия [16], что может привести к образованию сферических частиц, имеющих наименьшую площадь поверхности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дервиз Г. В. // Биохимические методы исследований в клинике / Под ред. А. А. Покровского. — М., 1969. — С. 345—349.
2. Держачев Э. Ф., Алексеев В. А., Константинов М. В. и др. // Митохондрии: Транспорт электронов и преобразование энергии. — М., 1976. — С. 136—156.
3. Ещенко П. Д. // Методы биохимических исследований: (Липидный и энергетический обмен) / Под ред. М. И. Прохоровой. — Л., 1982. — С. 222—224.
4. Козлов Н. Б. // Труды Смоленск. мед. ин-та. — 1970. — Т. 30. — С. 3—7.
5. Козлов Н. Б. // Там же. — 1978. — Т. 57. — С. 3—14.
6. Колб В. Г., Камышников В. С. Справочник по клинической химии. — Минск, 1982.
7. Максимова О. Ф. // Организм человека и животного в условиях высокой температуры внешней среды. — Донецк, 1962. — С. 192—198.
8. Магузов Н. М. // Информ. бюл. по вопросам военно-медицинской службы иностранных армий и флотов. — Л., 1960. — № 13. — С. 93—94.
9. Мецлер Д. Биохимия: Химические реакции в живой клетке: Пер. с англ. — М., 1980.
10. Определение размеров эритроцитов. / Описание лабораторных работ по физике для студентов медико-биологического факультета / Под ред. В. В. Лаврентьева. — М., 1983. — С. 48—57.
11. Орлов С. П. // Успехи совр. биол. — 1985. — Т. 100, № 2(5). — С. 203—218.
12. Розанова Е. С. Обмен углеводов в условиях воздействия на организм высокой внешней температуры: Дис. ... канд. биол. наук. — Смоленск, 1972.
13. Стандартизация методов исследования глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы: Пер. с англ. — М., 1968.
14. Страйер Л. Биохимия: Пер. с англ. — М., 1985. — Т. 1. — С. 68.
15. Султанов Ф. Ф., Тодрис И. И., Пригарина Л. П. // Всесоюзная конф. по водно-солевому обмену и функции почек, 3-я: Материалы науч. сообщений. — Орджоникидзе, 1971. — С. 184—185.
16. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э. и др. // Основы биохимии: Пер. с англ. — М., 1981. — Т. 1. — С. 323—330.
17. Шаров А. Н. Состояние энергетического обмена в тканях головного мозга при воздействии на организм высокой внешней температуры и введении в этих условиях ионола и углекислого газа: Дис. ... канд. мед. наук. — Смоленск, 1984.
18. Edelman I. S. // New Engl. J. Med. — 1974. — Vol. 290. — P. 1303—1308.
19. Ellis F. P. // Milit. Med. — 1955. — Vol. 116, N 5. — P. 323—329.
20. Ellis F. P. // Trans. roy. Soc. trop. Med Hyg. — 1976. — Vol. 70, N 5—6. — P. 402—425.
21. Fiske C. H., Subbarow I. // J. biol. Chem. — 1925. — Vol. 66, N 2. — P. 375—380.
22. Leithead C. S. // Lancet. — 1964. — Vol. 2. — P. 637—648.
23. Nilsson L., Kogure K., Busto R. // Acta anaesth. scand. — 1975. — Vol. 19, N 3. — P. 199—205.
24. Shibuya I., Honda H., Maruo B. // Agricult. biol. Chem. — 1967. — Vol. 31, N 1. — P. 111—114.
25. Wyndham C. H. // J. S. Afr. Inst. Mining. Metallurgy. — 1965. — Vol. 66. — P. 125—165.
26. Wyndham C. H. // Proc. Mine Med. Offic. Ass. — 1966. — Vol. 64. — P. 68—79.

Поступила 03.02.88

RELATION BETWEEN ENERGY METABOLISM, CONTENT OF Na^+ and K^+ , ACTIVITY OF Na^+, K^+ -ATPase in erythrocytes and the cells form and volume under conditions of overheating

D. P. Bondarev, N. B. Kozlov

Medical School, Smolensk

Development of heat stroke led to a decrease in main reactions of energy production and energy potential in erythrocytes, to a decrease in activity of Na^+, K^+ -ATPase and in content of sodium and potassium as well as to alterations in forms and to decrease in volume of these cells.

УДК 612.351.11:577.152.112].014.46:547.979.733

*Б. Н. Галкин, О. Н. Ершова, Н. Я. Головенко, З. И. Жилина,
Т. И. Олешко, С. В. Водзинский*

ИНГИБИРОВАНИЕ ЦИТОХРОМ Р-450-ЗАВИСИМЫХ ФЕРМЕНТОВ МИКРОСОМ ПЕЧЕНИ КРЫС ТЕТРАФЕНИЛПОРФИРИНОМ И ЕГО МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСАМИ

Одесский университет им. И. И. Мечникова

Микросомы печени животных и человека содержат ферментные системы, в состав которых входит цитохром Р-450. Они катализируют окисление самых разнообразных соединений (ксенобиотиков, природных субстратов и лекарственных препаратов) [4]. Цитохром Р-450 — это гемсодержащий белок, который в качестве простетической группы содержит протогем IX [1]. Синтетические мезоамещенные порфирины и их металлокомплексы являются структурными аналогами природных порфиринов и могут оказывать модифицирующее действие на активность гемсодержащих ферментов, в частности на систему цитохрома Р-450. Ранее нами было показано [7], что комплекс железа с тетрафенилпорфирином (ТФП) ингибирует активность ферментных реакций, катализируемых цитохромом Р-450. Целью данной работы явилось изучение влияния ТФП и его металлокомплексов (Fe^{3+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+}) на активность цитохром Р-450-зависимых ферментов.

Методика

ТФП и его комплексы с Fe^{3+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} синтезированы по методу [14]. Эксперименты проводили на беспородных крысах-самцах массой 160—200 г. Животных декапировали через сутки после однократного внутривентриального введения препаратов в дозе 25 мг на 1 кг массы тела. Другой группе животных аналогичным образом вводили соли металлов, которые использовались для получения металлокомплексов, в количествах, эквивалентных их содержанию в комплексах (10 мг/кг). Отдельной группе животных одно-

кратно вводили подкожно CoCl_2 в дозе, приводящей к активации гемоксигеназы — 30 мг/кг [11].

Микросомы печени крыс выделяли центрифугированием по методу [2]; содержание цитохрома Р-450 измеряли спектрофотометрически [13]. Активность монооксигеназ [N-деметилазы, анилингидроксилазы, бенз(а)пиренгидроксилазы] определяли по количеству образовавшихся окисленных продуктов [6, 12]. Содержание белка и РНК находили по методам [5, 10].

Результаты и обсуждение

Как видно из табл. 1, при однократном введении ТФП и его металлокомплексов только в случае ТФП- Fe^{3+} отмечено достоверное увеличение относительной массы печени. Концентрация микросомального белка практически не изменялась, в то время как количество РНК увеличивалось во всех случаях в среднем в 1,5 раза. Содержание гемопротейна снижалось на 27—49% в зависимости от введенного препарата. Под действием ТФП- Fe^{3+} , ТФП- Co^{2+} и ТФП- Zn^{2+} активность N-деметилазы снижалась в среднем на 30%. Скорость п-гидроксилирования анилина уменьшалась на 30—45% в зависимости от типа металлокомплекса. Следует отметить, что на активность бенз(а)пиренгидроксилазы эти соединения практически не оказывали воздействия. Для доказательства того, что ингибирование монооксигеназных реакций является свойством изученных комплексов, было проведено исследование по влиянию на изученные ферментные системы ионов металлов, ко-

Влияние ТФП и его металлокомплексов на активность цитохром Р-450-зависимых ферментов микросом печени крыс ($M \pm m$, $n = 5-6$)

Вводимый препарат	Относительная масса печени	Концентрация белка, мг на 1 г ткани	Концентрация РНК, мг на 1 г ткани	Содержание цитохрома Р-450, нмоль на 1 мг белка	Н-Деметиллазная активность, нмоль на 1 мг белка в 1 мин	п-Гидроксиллазная активность, нмоль на 1 мг белка в 1 мин	Бенз(а)пиренгидроксилазная активность, нмоль на 1 мг белка в 1 мин
Контроль	4,6±0,2	8,9±0,9	1,1±0,1	0,82±0,06	9,4±0,8	1,10±0,07	18,2±1,3
ТФП	4,9±0,3	8,7±0,9	1,5±0,1*	0,55±0,05*	7,4±0,8	0,70±0,16*	18,4±1,3
ТФП-Fe ³⁺	5,3±0,1*	7,8±0,9	1,8±0,2*	0,45±0,06**	7,0±0,6*	0,80±0,09*	15,2±2,1
ТФП-Co ²⁺	5,2±0,2	7,8±0,9	1,6±0,2*	0,42±0,04**	6,7±0,8*	0,7±0,10*	14,4±1,7
ТФП-Cu ²⁺	4,8±0,3	8,1±0,9	1,6±0,2*	0,60±0,05*	9,3±1,3	0,86±0,10	18,8±1,3
ТФП-Zn ²⁺	5,1±0,2	7,5±0,7	1,3±0,2*	0,70±0,09	6,6±0,7*	0,69±0,16*	16,6±1,1
ТФП-Ni ²⁺	4,9±0,3	8,4±1,0	1,5±0,1*	0,62±0,07	9,7±1,3	0,61±0,10*	20,6±3,2

Примечание. Здесь и в табл. 2 одна звездочка — $p < 0,05$, две — $p < 0,01$.

которые входят в состав порфириновых структур. Данные этой серии экспериментов представлены в табл. 2. Как видно, содержание цитохрома Р-450 уменьшалось на 34 % только в случае введения FeCl₃. Активность N-деметилазы и скорость п-гидроксилирования анилина практически не изменялась. Возрастание активности бенз(а)пиренгидроксилазы отмечено только при введении FeCl₃. Из представленных результатов следует, что существуют различия между действием солей металлов и ТФП и металлокомплексов. При введении подкожно CoCl₂ в дозе 30 мг/кг были получены результаты, которые согласуются с данными других авторов [11]. Ингиби-

рующий эффект ионов кобальта на цитохром Р-450 и его зависимые реакции связаны с активацией фермента гемоксигеназы, который катализирует деградацию порфирина, входящего в состав цитохрома Р-450. При внутривенном введении доза CoCl₂ была почти в 3 раза меньше, поэтому данный препарат, вероятно, не оказывал стимулирующего действия на гемоксигеназу.

Ингибирующее действие синтетических мезозамещенных порфиринов и их металлокомплексов на цитохром Р-450-зависимые ферменты можно объяснить следующим образом. Все они являются структурными аналогами природных порфиринов, а те в свою очередь снижают активность

Т а б л и ц а 2

Влияние солей металлов, входящих в металлокомплексы ТФП, на активность цитохром Р-450-зависимых ферментов микросом печени крыс ($M \pm m$, $n = 5-6$)

Вводимый препарат	Относительная масса печени	Концентрация белка, мг/г ткани	Концентрация РНК, мг/г ткани	Содержание цитохрома Р-450, нмоль/мг белка	Н-деметиллазная активность, нмоль/мин на 1 мг белка	п-Гидроксиллазная активность, нмоль/мин на 1 мг белка	Бенз(а)пиренгидроксилазная активность, нмоль/мин на 1 мг белка
Контроль	5,1±0,5	8,4±0,9	2,4±0,3	0,82±0,06	7,2±0,5	0,70±0,10	18,4±1,3
FeCl ₃	5,2±0,4	7,9±0,9	2,4±0,2	0,62±0,05**	8,6±0,9	0,87±0,18	23,8±2,1*
CoCl ₂	4,5±0,2	8,4±1,1	2,2±0,3	0,82±0,07	9,1±1,0	1,20±0,10**	19,2±2,0
CuCl ₂	5,1±0,4	8,5±0,6	3,0±0,4	0,74±0,06	8,6±0,8	0,87±0,07	20,0±2,5
ZnCl ₂	5,1±0,3	7,8±0,3	2,7±0,3	0,61±0,08	8,1±1,1	0,52±0,06	20,2±2,3
NiCl ₂	5,2±0,3	8,4±0,8	3,3±0,2*	0,72±0,09	6,6±0,8	0,78±0,10	19,4±1,69
CoCl ₂ (подкожно)	4,3±0,2	9,1±0,9	3,3±0,3*	0,40±0,05**	4,4±0,24***	0,54±0,05	9,7±0,9**

*** $p < 0,001$.

монооксигеназ за счет усиления де-струкции цитохрома P-450 [9]. Увеличение разрушения гемопротейна связано с активацией гемоксигеназы и природные порфирины индуцируют этот фермент [8]. Вероятно мезозамещенные порфирины также индуцируют этот фермент. Кроме того, ранее нами было показано, что ТФП-Fe³⁺ способен *in vivo* усиливать перекисное окисление липидов (ПОЛ) биомембран печени [7]. Активация ПОЛ обычно приводит к снижению содержания цитохрома P-450 в мембранах за счет его инактивации, т. е. перехода в цитохром P-420, и, следовательно, уменьшению активности ферментных систем микросом [3]. По-видимому, и другие металлокомплексы ТФП обладают способностью инициировать ПОЛ в микросомах печени крыс.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. — М., 1975.
2. Богатский А. В., Галкин Б. Н., Головенко Н. Я. и др. // Укр. биохим. журн. — 1981. — Т. 53, № 6. — С. 108—110.
3. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М., 1972.
4. Головенко Н. Я., Карасева Т. Л. Сравнительная биохимия чужеродных соединений. — Киев, 1983.
5. Методы вирусологии и молекулярной биологии: Пер. с англ. — М., 1972.
6. Современные методы в биохимии / — М., 1977. — С. 53—68.
7. Стефанская О. Н., Андронати С. А., Головенко Н. Я. и др. // Докл. АН УССР, сер. б. — 1985. — № 11. — С. 77—80.

8. Kikuchi J., Joshida T. // Molec. Cell. Biochem. — 1983. — Vol. 53—54, N 1—2. — P. 163—168.
9. Krikun G., Cederbaum A. J. // Biochem. Pharmacol. — 1985. — Vol. 34, N 16. — P. 2929—2935.
10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.
11. Matsunaga I., Nagata K., Tanaka E. et al. // J. Pharmaco-Bio-Dyn. — 1985. — Vol. 8, N 1. — P. 5—20.
12. Nebert D., Gelboin H. V. // J. biol. Chem. — 1968. — Vol. 243, N 22. — P. 6242—6249.
13. Omura T., Sato R. // Ibid. — 1964. — Vol. 239, N 7. — P. 2374—2385.
14. Rothmund B., Menotti A. // J. Amer. chem. Soc. — 1948. — Vol. 70, N 22. — P. 1808—1812.

Поступила 17.11.87

INHIBITORY EFFECT OF TETRAPHENYL-PORPHYRINE AND OF ITS METAL COMPLEXES ON CYTOCHROME P-450 DEPENDENT ENZYMES IN RAT LIVER MICROSOMES

B. N. Galkin, O. N. Ershova, N. Ya. Golovenko, Z. I. Zhilina, T. I. Oleshko, S. V. Vodzinsky

State University, Odessa

Tetraphenyl porphyrine (TPP) and its complexes with Fe³⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ and Ni²⁺ inhibited cytochrome P-450-dependent enzymes in rat liver microsomes. Content of cytochrome P-450 was decreased by 27 % or 49 % depending on the substance administered (TPP or its metal complexes, respectively). N-demethylase was inactivated by about 30 %; the rate of aniline p-hydroxylation was decreased by 30-45 % depending on the type of the metal complex. But these substances did not affect practically the benz(α)pyrene hydroxylase activity. The inhibitory effect of TPP of its metal complexes appears to occur due to activation of lipid peroxidation and of hemoxygenase, which is responsible for biodegradation of hem in cytochrome P-450.

УДК 612.111.015.1:577.152.1].06:612.396.13:547.455.623

П. Г. Сторожук, В. А. Скляр, И. М. Быков

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИДФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ, ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ, СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ И КАТАЛАЗЫ В ЭРИТРОЦИТАХ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СКОРОСТИ УТИЛИЗАЦИИ ГЛЮКОЗЫ

Кубанский медицинский институт им. Красной Армии, Краснодар

В эритроцитах после сахарной нагрузки значительно повышается активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и мало изменяется активность дегидрогеназ цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) — изоцитратдегидрогеназы и

малатдегидрогеназы [9]. Это позволяет предположить, что поскольку митохондрии в эритроцитах отсутствуют, а ферменты ЦТК не составляют единых ансамблей, то оксидоредуктазы ЦТК в меньшей мере причастны к

окислительному фосфорилированию АДФ, чем дегидрогеназы пентозного пути или гликолитической фазы основного пути окисления глюкозы. В последнее время высказывается предположение, что дегидрогеназы, осуществляющие окисление глюкозы, участвуют и в устранении из эритроцитов токсичных перекисных соединений, а также в процессах оксигенации гемоглобина через механизм биосинтеза и расщепления перекиси водорода [9, 10].

В связи с этим представляет интерес параллельное изучение активности оксидоредуктаз, окисляющих глюкозу по гликолитическому пути (глицеральдегидфосфатдегидрогеназы — α -ГФД; КФ 1.2.1.12) и по пентозному пути (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы — Г-6-ФДГ; КФ 1.1.1.49), и ферментов, участвующих в биосинтезе и расщеплении перекиси водорода, — супероксиддисмутазы (СОД; КФ 1.15.1.1.) и каталазы (КА; КФ 1.11.1.6). Это тем более важно, что имеются доказательства зависимости утилизации глюкозы в эритроцитах крови человека от активности оксидоредуктаз, изменяющейся под влиянием некоторых химических агентов [7, 9, 11, 12].

В настоящей работе предпринята попытка проверить, существует ли взаимосвязь активности α -ГФД и Г-6-ФДГ как наиболее вероятных доноров водорода для синтеза перекиси водорода и СОД и КА, синтезирующих и расщепляющих перекись водорода, с одной стороны, и содержания глюкозы в эритроцитах и в крови после сахарной нагрузки — с другой.

Методика

Исследования проведены у 57 добровольцев в возрасте от 20 до 32 лет. Кровь из пальца брали натощак до нагрузки и 4 раза с интервалом 30 мин после нагрузки сахарозой (100 г с чаем). Содержание глюкозы определяли глюкозооксидазным методом [5], используя набор реактивов «Био-Тест» фирмы «Лахсма» (ЧССР), ее количество выражали в миллимолях на 1 л крови и в миллимолях на 0,5 л эритроцитной массы, гемолизированной бидистиллированной водой.

Для определения активности ферментов и количества глюкозы использовали отмытые эритроциты. Полученную кровь смешивали в равных объемах с 3,8 % раствором цитрата. Эритроциты отмывали 0,9 % охлажденным NaCl и осаждали центрифугированием при 3000 g.

При определении активности Г-6-ФДГ эритроциты гемолизировали путем добавления 1 % дигитонина. Об активности фермента судили по скорости восстановления НАДФ [6] и выражали в микромолях за 1 мин на 10^9 эритроцитов.

При определении активности α -ГФД эритроциты гемолизировали бидистиллированной водой. Об активности фермента судили по скорости окисления НАД·Н [8], которую выражали в микромолях за 1 мин на 1 мг белка.

Активность СОД определяли после гемолиза эритроцитов в 0,05 М трис-буфере pH 7,5 модифицированным [1] методом [14], основанном на способности фермента тормозить реакцию аутоокисления адреналина в адренехром, и выражали в условных единицах на 1 мг белка.

Активность КА определяли по количеству разложившейся перекиси водорода [4] в интактных эритроцитах ($КА_{эп}$) в изотоническом растворе NaCl pH 7,4 и в гемолизатах эритроцитов ($КА_{гем}$) в 0,05 М фосфатном буфере pH 8,3 с добавлением 1 % сапонина и выражали в микромолях H_2O_2 за 1 мин на $5 \cdot 10^6$ эритроцитов. Полученные результаты обработаны статистически [3].

Результаты и обсуждение

Из полученных данных следует (см. таблицу), что максимальная концентрация глюкозы в эритроцитах обнаруживается через 30 мин после нагрузки сахарозой, остается повышенной спустя 60 мин и только к 90-й минуте ее количество возвращается к исходному уровню. Это, вероятно, можно объяснить тем, что первые порции глюкозы, поступающие из кишечника в кровь, сразу проникают в эритроциты, где включаются в обменные процессы. Образующиеся из глюкозы метаболиты препятствуют поступлению в эритроциты новых порций сахара, поэтому максимальная ее концентрация и определяется через 30 мин. В крови концентрация глюкозы увеличивается позже и ее повышенный уровень сохраняется более длительное время.

Следует также отметить, что наряду с повышением концентрации глюкозы в эритроцитах начинает увеличиваться активность α -ГФД. Через 30 мин ее прирост составляет 29 %, а на 60-й минуте достигает максимальной величины — 55 %; к 90-й минуте активность фермента возвращается к исходному уровню. Активность Г-6-ФДГ также увеличивается, начиная с 30-й минуты, но максимум прироста (на 70 %) отмечен через 90 мин. Существенно, что активность Г-6-ФДГ остается повышенной (на

Содержание глюкозы и активность Г-6-ФДГ, α -ГФД, СОД, $КА_{эр}$ и $КА_{гем}$ у здоровых людей после нагрузки сахарозой ($M \pm m$)

Показатель	n	Исходный уровень	Время после нагрузки сахарозой, мин			
			30	60	90	120
Глюкоза крови	10	4,20 \pm 0,28	5,40 \pm 0,91	6,10 \pm 0,38	4,55 \pm 0,32*	4,50 \pm 0,20*
Глюкоза эритроцитов	7	4,60 \pm 0,29	6,80 \pm 0,31	5,87 \pm 0,22	4,73 \pm 0,24*	4,63 \pm 0,25*
α -ГФД	10	6,09 \pm 0,24	7,34 \pm 0,23	9,47 \pm 0,34	6,59 \pm 0,26*	6,38 \pm 0,27*
Г-6-ФДГ	10	244 \pm 9,3	302 \pm 7,3	328 \pm 10,0	415 \pm 18,6	336 \pm 15,0
СОД	10	0,77 \pm 0,012	0,92 \pm 0,04	1,24 \pm 0,06	1,44 \pm 0,04	1,04 \pm 0,047
$КА_{эр}$	10	20,0 \pm 0,3	22,8 \pm 0,27	23,2 \pm 0,26	28,3 \pm 0,45	24,8 \pm 0,48
$КА_{гем}$	10	321 \pm 6,9	362 \pm 4,6	376 \pm 5,1	461 \pm 6,3	427 \pm 8,7

Примечание. Звездочка — $p > 0,05$, в остальных случаях — $p < 0,05$. Единицы измерения см. «Методику».

37 %) и через 120 мин. Это свидетельствует о том, что пентозный путь окисления глюкозы при гипергликемических состояниях превалирует над гликолизом.

Полученные данные позволяют считать, что при гипергликемии, развившейся на фоне сахарной нагрузки, в процесс утилизации глюкозы в эритроцитах включаются одновременно основной (гликолитическая фаза) и пентозный (восстановительная фаза) пути катаболизма глюкозы. Затем первый из них быстро (через 60 мин) возвращается к исходному уровню, а второй — продолжает интенсивно функционировать на протяжении всего периода (120 мин) наблюдения.

СОД, синтезирующая перекись водорода, используя супероксидный кислород [13], а в качестве доноров водорода восстановленные формы НАД и НАДФ, входящие в состав дегидрогеназ основного (α -ГФД) и альтернативного (Г-6-ФДГ) пути окисления глюкозы, активируется также постепенно. Уже через 30 мин после нагрузки сахарозой ее активность увеличивается на 25 %, через 60 мин — на 69 %, а на 90-й минуте — на 95 %. Она остается повышенной и через 120 мин. Параллельно увеличивается активность $КА_{эр}$ и $КА_{гем}$. При этом следует отметить, что в процесс метаболизма в одинаковой мере вовлекаются как молекулы фермента, подлежащие к мембране ($КА_{эр}$), так и молекулы, расположенные в строме эритроцита между глобулами гемоглобина, проявляющие свою активность после гемолиза ($КА_{гем}$). На долю последних, как видно из таблицы, приходится более 93 % от общего количества КА. Ак-

тивность КА увеличивается постепенно и достигает максимальных величин также к 90-й минуте, что совпадает с наивысшей активностью Г-6-ФДГ и СОД.

Таким образом, исследования с применением сахарной нагрузки свидетельствуют, что в эритроцитах НАД- и НАДФ-содержащие оксидоредуктазы (α -ГФД и Г-6-ФДГ) активно участвуют в катаболизме глюкозы и сопряжены с ферментами, ответственными за синтез и распад перекиси водорода, — СОД и КА. На основании этих данных можно предположить, что в эритроцитах существует единая ферментная система: НАД и НАДФ-содержащие оксидоредуктазы акцептируют H^+ от метаболитов глюкозы и переносят его на супероксидный анион O_2^- , СОД синтезирует перекись водорода, КА разлагает ее, а молекулярный кислород, который высвобождается по типу микровзрывной реакции [2], легче взаимодействует с гемоглобином, чем атмосферный кислород. Эту систему, вероятно, следует рассматривать не только как механизм для устранения перекисных радикалов, образующихся при метаболизме в эритроците, но и как механизм, облегчающий оксигенацию гемоглобина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Брусов О. С., Герасимов А. М., Панченко Л. Ф. // Бюл. экспер. биол. — 1976. — № 1. — С. 33—35.
2. Грубан З., Рехциг М. Микротельца и родственные им структуры: Пер. с англ. — М., 1972.
3. Каминский Л. С. Статистическая обработка лабораторных и клинических данных. — М., 1959.
4. Крайнев С. И. // Лаб. дело. — 1967. — № 9. — С. 562—563.

5. Лукомская Н. С., Городецкий В. К. // Биохимия. — 1961. — Т. 26, № 3. — С. 16—20.
6. Мотульский Л. Г., Кемпель И. М. // Биохимические методы исследования в клинике. — М., 1969. — С. 153—156.
7. Скляр В. А., Сторожук П. Г., Корочанская С. П. и др. // Всесоюзный биохимический съезд, 5-й: Тезисы. — М., 1986. — Т. 2. — С. 305—306.
8. Сидоренков И. В., Гильмиярова Ф. П. // Вопр. мед. химии. — 1973. — № 5. — С. 468—470.
9. Сторожук П. Г., Скляр В. А., Корочанская С. П., Быков И. М. // Укр. биохим. журн. — 1987. — Т. 59, № 1. — С. 86—88.
10. Сторожук П. Г. // Некоторые вопросы медицинской и прикладной энзимологии. — Краснодар, 1985. — Вып. 2. — С. 78—87.
11. Сторожук П. Г., Шамсутдинова В. В. // Пробл. эндокринол. — 1976. — № 6. — С. 106—110.
12. Сторожук П. Г., Скляр В. А., Корочанская С. П., Гонтмахер Ю. В. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 5. — С. 32—35.
13. Турков М. И. // Успехи совр. биол. — 1976. — Т. 81, № 3. — С. 341—354.
14. Mistra H. P., Fridovich J. // J. Biol. Chem. — 1972. — Vol. 241. — P. 1370—1373.

Поступила 01.12.87

ALTERATIONS IN ACTIVITIES OF GLYCERALDEHYDE PHOSPHATE- AND GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASES, SUPEROXIDE DISMUTASE AND CATALASE DEPENDING ON THE RATE OF GLUCOSE CONSUMPTION IN ERYTHROCYTES

P. G. Storozhuk, V. A. Sklyar, I. M. Bykov

Chair of Bioorganic and Biological Chemistry, Medical School, Krasnodar

Content of glucose as well as activities of glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (α -GPD), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), superoxide dismutase (SOD) and catalase were studied in whole blood, in intact and hemolyzed erythrocytes of 57 volunteers within 120 min after sucrose loading. Direct correlation was found between the activity of the enzymes studied and level of glucose as well as the rate of its utilization in erythrocytes. These data suggest that reduced NAD- and NADP-containing oxidoreductases α -GPD and G6PD are donors of H^+ used in biosynthesis of H_2O_2 catalyzed by SOD. Intact and hemolyzed erythrocytes are involved in destruction of H_2O_2 accompanied by liberation of O_2 , which reacted with Hb more readily as compared with atmospheric oxygen.

УДК 617-001.17-092.9-07:616.379-008.6-033-07.616.155.32-008.943.7

Н. П. Микаелян

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ИНСУЛИНА С ЕГО РЕЦЕПТОРАМИ В ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАНАХ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ОЖГОВОЙ ТРАВМЕ У КРЫС

И ММИ им. Н. И. Пирогова

Ожоговая травма вызывает токсическое поражение паренхимы печени и глубокие нарушения обмена веществ [3, 4, 9, 13]. Ведущим фактором считают нарушение обмена белков, которое начинается уже в стадии шока и проявляется гипоальбуминемией, диспротеинемией и другими изменениями [1, 2, 8]. Уже на ранних стадиях ожоговой травмы возникает гипергликемия [7] как следствие повышенного гликогенолиза, накапливаются молочная и пировиноградная кислоты, некоторые аминокислоты, что свидетельствует о понижении активности аэробных окислительных процессов. Изменение регуляции углеводного обмена зависит от нарушения специфического связывания инсулина с рецепторами плазматических мембран клеток тканей-мишеней, что приводит к нейтрализации биологического действия инсулина [17, 18, 21, 23],

или от снижения чувствительности тканей-мишеней к действию инсулина (нострепторный дефект действия гормона) [14, 19].

Изучение состояния инсулиновых рецепторов при ожоговой травме представляет интерес, так как одной из причин инсулярией недостаточности при этом патологическом состоянии может явиться изменение связывания инсулина с его специфическими рецепторами.

Нами было установлено, что ожоговая травма вызывает гиперпротеинемию, гипергликемию, резко выраженный распад белков и другие изменения [5, 6]. Мы исследовали содержание глюкозы, иммунореактивного инсулина (ИРИ) и взаимодействие инсулина с рецепторами лимфоцитов у крыс на ранних стадиях после ожоговой травмы. Лимфоциты представляют собой удобную модель для ис-

следования состояний, характеризующихся резистентностью к инсулину, поскольку являются клетками-мишенями для действия инсулина [15, 20, 24] и доступны для клинических исследований. Процесс связывания инсулина с рецепторами лимфоцитов отражает иммунореактивность последних [16], что представляет интерес при состояниях, связанных с иммунодефицитом.

Методика

Работа выполнена на крысах-самцах массой 180—200 г. Термический ожог площадью 20—25 % поверхности тела IIIa—IIIb степени вызывали погружением эмалированной спишки и боковых поверхностей туловища в кипящую воду на 6—7 с (животные находились под эфирным раун-наркозом). Через 1 и 3 сут крысы забивали. Контролем служили интактные крысы той же массы, подвергнутые только действию наркоза. В каждую группу входило 8—10 животных. В сыворотке крови определяли содержание глюкозы глюкозооксидазным методом и концентрацию ИРИ с помощью стандартных наборов (Behringwerke, ФРГ).

Лимфоциты выделяли по методу [12]. Гепаринизированную кровь разводили раствором Хенкса без Ca^{2+} и Mn^{2+} в 2 раза. 8 мл разведенной крови насливали на 2,5—3 мл градиента и центрифугировали при 1800 об/мин в течение 45 мин при комнатной температуре. Плотность градиента (смесь 14 % фиколла и 36 % верографина, взятых в соотношении 24:10) для разделения клеток крови крыс составляла 1,085.

Лимфоциты собирали, дважды отмывали раствором Хенкса без Mn^{2+} и Ca^{2+} ; 3-й раз — со средой 199, затем ресуспендировали в среде 199 (рН 7,4). Связывание ^{125}I -инсулина с лимфоцитами исследовали по методу [25]. К 200 мкл суспензии лимфоцитов ($6,0—8,0 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл) в буфере Хенкса, содержащем 1 % альбумина и 10 ммоль глюкозы (рН 7,7), добавляли по 100 мкл меченого инсулина в концентрации $4 \cdot 10^{11}$ М (удельная активность $6,7$ ГБК/мг), $4 \cdot 10^{-8}$ М или $0,4 \cdot 10^{-6}$ М немеченого инсулина. Препараты инсулина готовили на том же буфере. Инкубацию проводили 90 мин при $30^\circ C$. По окончании пробы центрифугировали в течение 90 с при 1800 об/мин, надосадочную жидкость удаляли, а в осадке определяли радиоактивность счетчиком "Bechman" (ФРГ). Специфическое связывание инсулина рассчитывали по разности между тотальным и неспецифическим связыванием (в присутствии немеченого инсулина в концентрации $0,4 \cdot 10^{-6}$ М) и выражали в процентах по отношению к тотальной радиоактивности инкубационной среды.

Результаты и обсуждение

Как видно из табл. 1, содержание инсулина в сыворотке крови животных с ожогами было сниженным по сравнению с контролем только в 1-е

Таблица 1

Содержание ИРИ в сыворотке крови обожженных крыс ($M \pm m$)

Сутки после ожога	ИРИ, пмоль/л	p	p_1
Контроль	$69,4 \pm 12,0$		
1-е	$42,5 \pm 8,0$	$<0,02$	
3-е	$163 \pm 19,3$	$<0,05$	
7-е	$134,0 \pm 18,3$	$<0,01$	
14-е	$140,0 \pm 21,0$	$<0,001$	$>0,5$
21-е	$115,0 \pm 28,0$	$<0,01$	$>0,5$

Примечание. p — по отношению к контролю, p_1 — по отношению к 7-м суткам.

сутки после травмы, к 3-м суткам оно резко возрастало. Гиперинсулинемия патоцек у крыс с ожогами сохранялась на протяжении всего срока исследования.

Известно, что инсулиновые кривые у обожженных крыс при максимальной гипергликемии в сыворотке крови на фоне проведения теста на толерантность к глюкозе имеют диабетоподобный тип [6]. Сахарная кривая у них свидетельствует об ослабленном ответе на инсулин, поскольку при высоком его содержании в крови сохраняется гипергликемия.

При исследовании взаимодействия инсулина с рецепторами лимфоцитов (табл. 2) установлено, что уже в 1-е сутки после ожога снижается инсулинрецепторное взаимодействие. Таким образом, пониженное связывание инсулина с рецепторами лимфоцитов на фоне гиперинсулинемии после ожоговой травмы отражает резистентность к инсулину, возникающую на рецепторном уровне. Резистентность к инсулину при инсулинзависимом диабете, которая проявлялась в снижении связывания инсулина с рецепторами адипоцитов и сопровождалась

Таблица 2

Связывание инсулина с рецепторами лимфоцитов крыс после ожога ($M \pm m$)

Сутки после ожога	Специфическое связывание, %	p
Контроль	$29,0 \pm 0,6$	
1-е	$15,7 \pm 0,6$	$<0,01$
3-е	$13,2 \pm 0,8$	$<0,01$
7-е	$15,1 \pm 6,3$	$<0,05$

также гиперинсулинемией, наблюдалась и ранее [22]. Снижение связывания с рецепторами лимфоцитов, а также острый дефицит инсулиновых рецепторов в клетках печени и адипоцитах при резистентности к препарату у людей могут быть вызваны ожирением [10, 11].

Таким образом, стрессовая реакция, вызванная ожоговой травмой, и токсическое поражение паренхимы печени продуктами измененного метаболизма могут привести к эндокринопатии, связанной с нарушением связывания гормона с рецепторами клеток. Как известно, инсулин претерпевает наиболее существенные изменения в печени, которая играет ауторегулирующую роль в поддержании нормогликемии в организме.

Нельзя исключить также, что гипергликемия, возникающая после термической травмы (1-е сутки), является отражением недостаточной продукции инсулина β -клетками поджелудочной железы и может быть вызвана также торможением секреции инсулина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Заец Т. Л. // Пат. физиол. — 1962. — № 2. — С. 73—78.
2. Клячкин Л. М., Пинчук В. М. Ожоговая болезнь. — Л., 1969.
3. Кочетыгов Н. И. Ожоговая болезнь: (Очерки по патологической физиологии). — Л., 1973.
4. Литвиненко Т. Г. // Механизмы некоторых патологических процессов. — Ростов н/Д, 1975. — Вып. 6. — С. 49—58.
5. Лопухин Ю. М., Микаелян Н. П., Халилов Э. М. // Хирургия. — 1984. — № 11. — С. 3—5.
6. Моренкова С. А., Карелин А. А., Давлетов Э. Г. // Пат. физиол. — 1985. — № 1. — С. 26—28.
7. Слободин В. Б. // Вопр. мед. химии. — 1981. — № 4. — С. 496—500.
8. Федоров Н. А., Львова В. В. // Пат. физиол. — 1962. — № 4. — С. 34—38.

9. Федоров Н. А., Мовшев Б. Е., Недошвина Р. В., Корякина И. К. Ожоговая аутоинтоксикация: Пути иммунологического преодоления. — М., 1985.
10. Archer I. A., Gordon P. et al. // J. clin. Endocr. — 1973. — Vol. 36. — P. 627.
11. Archer J. A., Gordon P., Kahn C. R. et al. // J. clin. Invest. — 1973. — Vol. 52. — P. 4.
12. Böyum A. // Scand. J. clin. Lab. Invest. — 1968. — Suppl. 97. — P. 77—89.
13. Czaja A. J., Rizzo T. A., Smith W., Pruitt B. A. // J. Trauma. — 1975. — Vol. 15. — P. 887—894.
14. Freuchet P. // Diabetologia. — 1976. — Vol. 12. — P. 83—87.
15. Gavin V. R., Roth I., Ven P. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1972. — Vol. 69. — P. 747.
16. Helderman J. H., Renolds T. C., Strom T. B. // Europ. J. Immunol. — 1978. — Vol. 8. — P. 589.
17. Kahn C. R. // Meth membran. Biol. — 1975. — Vol. 3. — P. 81—88.
18. Maugh Zt. H. // Science. — 1976. — Vol. 193. — P. 220—222.
19. Martin C. // Canad. J. Physiol. Pharmacol. — 1983. — Vol. 61. — P. 802—807.
20. Merimee T. J., Pulkkomen A. J., Lafton S. // J. clin. Endocr. — 1976. — Vol. 43. — P. 1190.
21. Misbin R. J. // J. biol. Chem. — 1983. — Vol. 258. — P. 2157—2162.
22. Olefsky J. M. // Diabetes. — 1981. — Vol. 30. — P. 148—162.
23. Pang D. T. // J. biol. Chem. — 1983. — Vol. 258. — P. 1514—1518.
24. Roth J. // Meth. Enzymol. — 1975. — Vol. 37. — P. 66.

Поступила 08.08.87

INTERACTION OF INSULIN AND ITS RECEPTORS IN LYMPHOCYTE PLASMATIC MEMBRANES OF RATS WITH BURNS TRAUMA

N. P. Mikaelyan

II Medical School, Moscow

Evaluation of insulin receptor state in lymphocytes of rats with burns trauma enabled to detect that impairment of carbohydrate metabolism in burns might be considerably dependent on content of insulin and the state of its receptors. Strees, which developed after burns trauma, appears to cause a decrease in production of insulin.

*Н. Н. Прозоровская, С. В. Глиняная, Л. П. Геращенко, С. С. Рудаков,
В. Г. Солониченко, А. А. Дельвиц*

ВЛИЯНИЕ ТЕРАПИИ β -АДРЕНОБЛОКАТОРОМ И КОМПЛЕКСОМ ВИТАМИНОВ НА ПОКАЗАТЕЛИ ЭКСКРЕЦИИ ОКСИПРОЛИНА ПРИ НЕКОТОРЫХ НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЯХ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

НИИ медицинской энзимологии АМН СССР, Москва

При некоторых наследственных болезнях соединительной ткани часто отмечаются поражения сердечно-сосудистой системы и легких. Так, к самым тяжелым проявлениям синдрома Марфана относятся расширение корня аорты с развитием недостаточности аортального клапана и аортальной регургитации крови, расслаивающая аневризма аорты, пролапс митрального клапана. При синдроме Элерса—Данло (СЭД), особенно IV, экхимозного типа, нередки неукротимые кровотечения, парезы и спонтанные разрывы кишечника, спонтанные пневмотораксы.

Оперативные вмешательства, например при синдроме Марфана, осложняются расслаивающей аневризмой аорты, что часто приводит к летальному исходу [9, 14]. У больных с синдромом Марфана, марфаноподобными синдромами и СЭД довольно часто встречаются врожденные деформации грудной клетки (ВДГК), в частности воронкообразная ВДГК, которая оказывает негативное влияние на функцию сердца; она может прогрессировать и поэтому требует хирургической коррекции. Однако выполнение торакопластики таким больным сопряжено со значительными трудностями по изложенным выше причинам.

Помимо хирургических способов профилактики и лечения недостаточности сердечных клапанов и расслаивающей аневризмы аорты, известны попытки терапевтической профилактики путем назначения β -адреноблокаторов для снижения частоты и силы сердечных сокращений, что способствует уменьшению давления крови на стенку аорты [13, 14, 17]. Однако наблюдения в процессе профилактического лечения пропранололом за 25 больными с синдромом Марфана в среднем на протяжении около 5 лет дали основание авторам [17] признать неэффективность применения этого препарата в целях

предупреждения развития аневризм аорты.

Нами был предложен и апробирован модифицированный способ профилактики и терапии сердечно-сосудистых осложнений, предназначенный для предоперационной подготовки больных с СЭД, синдромом Марфана и марфаноподобными синдромами к торакопластике по поводу ВДГК. Модификация заключалась, во-первых, в назначении курса β -адреноблокатора на вполне определенный срок — 2,5 мес и, во-вторых, в одновременном назначении на этот же срок комплекса витаминов: рибофлавина (B_2), пиридоксина (B_6) и аскорбиновой кислоты. В доступной литературе нам не удалось найти ссылок на проведение предоперационной подготовки такого типа.

Известно, что СЭД, синдром Марфана и марфаноподобные синдромы относятся к наследственным заболеваниям, в основе которых лежат дефекты формирования соединительной ткани, а именно — нарушения структуры и (или) метаболизма коллагена и эластина [1]. Все названные выше препараты на том или ином уровне оказывают влияние на количество и качество образующихся в стенках аорты коллагеновых и эластиновых фибрилл.

В настоящей статье приведены результаты исследования влияния терапии β -адреноблокатором и комплексом витаминов на показатели экскреции оксипролина с мочой у 16 больных, которые наряду с клиническими методами обследования были использованы для оценки эффективности данного лечения.

Методика

Обследовано 16 детей в возрасте 5—14 лет: 7 детей с синдромом Марфана и 4 ребенка с марфаноподобными синдромами, имеющих ВДГК I—III степени; 4 ребенка с СЭД, из которых 1 — с СЭД экхимозного типа без ВДГК и 3 — с СЭД других типов и ВДГК I—II сте-

пени; 1 ребенок с синдромом Ларсена и ВДГК III степени.

Каждому больному был назначен 2,5-месячный курс β -адреноблокатора (обзидан) по 0,001 г/кг в сутки и следующих витаминов: рибофлавина (B_2) — 0,0004 г/кг; пиридоксина (B_6) — 0,01 г/кг и аскорбиновой кислоты — 0,01 г/кг в сутки.

Для контроля лечения использовали клинический и биохимический методы обследования. При клиническом методе обследования непосредственно перед началом лечения и после его окончания проводили эхокардиографическое исследование для определения ширины корня аорты, характера и степени пролапса сердечных клапанов и уровня аортальной регургитации крови. При биохимическом методе обследования в динамике в моче больных определяли содержание общего оксипролина в расчете на креатинин (ОП/КР, в ммоль/моль) и связанного оксипролина в пептидах с мол. массой более 700—1000 Д. С этой целью порцию утренней мочи (50 мл), собранной после соблюдения в предшествующие сутки ограничивающей диеты, фракционировали на колонке (70×5 см) с сефадексом G-10 [2]. Оксипролин, определенный с использованием кислотного гидролиза в материале первых двух пиков: фракция 1 (Ф1) — пептиды с мол. массой более 700—1000 Д и фракция 2 (Ф2) — менее 700 Д, в сумме составлял общий оксипролин, который пересчитывали на креатинин и вычисляли относительное содержание оксипролина Ф1 в процентах от общего оксипролина с учетом свободного [2].

В качестве реактивов использовали сефадекс G-10 ("Pharmacia", Швеция), хлорамин Т и парадиметиламинобензальдегид ("Sigma", США); оксипролин ("Reanal", ВНР); остальные реактивы — отечественного производства аналитической степени чистоты квалификации ос. ч.

При статистическом анализе для сравнения показателей экскреции оксипролина до и после лечения применяли метод сопряженных пар [4].

Результаты

1. Синдром Марфана и марфаноподобные синдромы. Результаты исследований в динамике содержания в моче общего оксипролина — ОП/КР и показателя Ф1 представлены на рис. 1.

По исходному уровню общего оксипролина больных с синдромом Марфана и марфаноподобными синдромами можно разделить на две группы: группа А — показатель ОП/КР ниже нормы и группа Б — ОП/КР выше нормы (см. рис. 1). Показатель Ф1 у больных обеих групп был ниже нормы (см. рис. 1). У 5 больных группы А в процессе лечения наблюдали постепенное увеличение содержания общего оксипролина практически до диапазона нормы к концу лечения и нормализацию показателя Ф1 уже через 6 нед после начала лечения. У всех больных

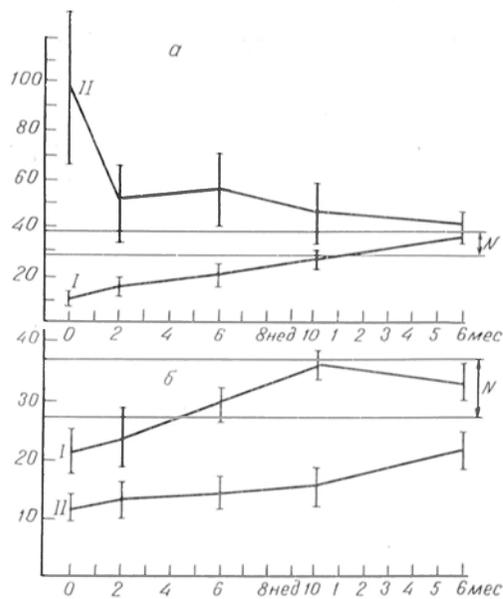


Рис. 1. Изменение экскреции оксипролина у больных с синдромом Марфана и марфаноподобными синдромами при комплексном лечении (обзидан + витамины).

По осям абсцисс — продолжительность лечения (в нед), после лечения (в мес). а — изменение содержания общего оксипролина в пересчете на креатинин (ОП/КР, в ммоль/моль); б — изменение относительного содержания (в %) пептидосвязанного оксипролина — Ф1. I — группа А, II — группа Б. Каждая точка — $M \pm \sigma$. N — 95% доверительный интервал нормы для возрастного диапазона 5—14 лет [2].

этой группы после лечения отмечено уменьшение диаметра корня аорты в среднем на $18 \pm 5\%$ ($M \pm$ стандартное отклонение), у 4 — снижение пролапса митрального клапана, у одной больной — полное исчезновение. У 4 больных выполнена торакопластика, имплантация магнитной пластинки в грудное пространство с последующим вытяжением грудины тракционным аппаратом [3]. В ходе операции и в послеоперационном периоде осложнений не было. Получена правильная конфигурация грудной клетки. Через 7,5 мес после торакопластики показатели экскреции оксипролина практически оставались в пределах нормы. У одной больной с ВДГК I степени, которой торакопластику не выполняли, положительный эффект лечения был устойчив на протяжении 9,5 мес после окончания лечения как с клинической точки зрения, так и по показателям экскреции оксипролина с мочой.

У 6 больных группы Б уже в первые 2 нед лечения наблюдали резкое снижение показателя ОП/КР, далее отмечали тенденцию к постепенной его нор-

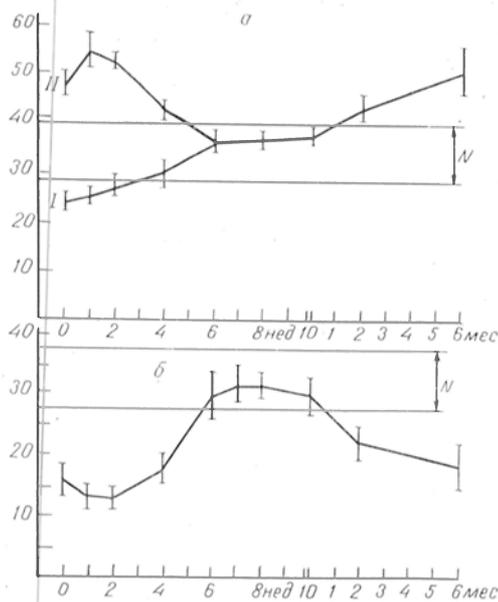


Рис. 2. Изменение показателей экскреции оксипролина у больных с синдромом Элерса—Данло при комплексном лечении (обзидан + витамины).

Обозначения те же, что на рис. 1.

мализации (см. рис. 1). Показатель Ф1 в процессе лечения у них увеличивался в значительно меньшей степени, чем у больных группы А, не достигая диапазона нормы даже после торакопластики (см. рис. 1). Однако у больных группы Б, как и группы А, отмечали положительную динамику показателей ультразвуковой эхокардиографии. В ходе операции и в послеоперационном периоде каких-либо серьезных осложнений не было. Торакопластика выполнена 5 больным, одному пациенту операция отложена в связи с контактом по ветряной оспе.

Сравнение показателей ОП/КР до и после лечения у больных обеих групп показало статистически достоверные различия (p соответственно $<0,05$ и $<0,01$); значимые различия имели место также в отношении Ф1 в группе А ($p < 0,05$).

2. Синдром Элерса—Данло. Результаты исследований в динамике показателей ОП/КР и Ф1 у больных с СЭД представлены на рис. 2. Исходный уровень общего оксипролина у 3 больных был ниже нормы (группа А). В процессе лечения прослеживалась его нормализация, однако в последующем он превышал норму. У одной больной (группа Б) с СЭД экхимозного типа

исходный высокий уровень общего оксипролина в процессе лечения снижался до нормы, но после окончания лечения снова возрастал (см. рис. 2). Характер изменения показателя Ф1 у всех больных (группа А+группа Б) был сходным: нормализация во время лечения в период 6—10 нед и возвращение практически к исходному уровню после окончания лечения (см. рис. 2). Торакопластика была выполнена 2 больным без каких-либо осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы. У всех больных с СЭД положительный клинический эффект проявлялся только в период лечения, начиная с 6-й недели. Имела место прямая корреляция между положительным эффектом лечения и нормализацией показателя Ф1.

3. Синдром Ларсена. Обследован только один больной, у которого ни содержание общего оксипролина, ни показатель Ф1 в ходе лечения существенно не изменялись, претерпевая лишь некоторые колебания. Не было обнаружено каких-либо заметных изменений и после торакопластики. Графически результаты не представлены.

Обсуждение

Полученные результаты позволили выявить 3 варианта воздействия курса лечения β -адреноблокатором и комплексом витаминов на показатели экскреции оксипролина с мочой и эхокардиографические показатели у обследованных больных.

1. Стойкий положительный эффект лечения с полной или частичной нормализацией показателей экскреции оксипролина и эхокардиографическими признаками уплотнения стенки аорты, сужение ее просвета (если исходно он был расширен) на 0,5—1,5 см, уменьшение или исчезновение пролапса митрального клапана и аортальной регургитации крови на фоне улучшения общего состояния больных в виде исчезновения жалоб со стороны сердца и прибавки массы тела в среднем на 1,5—2 кг. Данный эффект получен у больных с синдромом Марфана и марфаноподобными синдромами.

2. Временный положительный эффект, наблюдаемый практически только в процессе лечения с нормализацией показателей экскреции оксипролина за 6—10 нед лечения и такой же не-

стойкой картиной клинического улучшения без столь заметных, как в первом случае, положительных сдвигов эхокардиографических данных у больных с синдромом Элерса—Данло.

3. Отсутствие какого-либо эффекта у больного с синдромом Ларсена.

Следует подчеркнуть, что ни у одного из больных, получавших курс лечения, не было каких-либо осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы в связи с торакопластикой по поводу ВДГК.

Каждое из использованных веществ (обзидан, аскорбиновая кислота, витамины В₂ и В₆) обладает прямой или косвенной корригирующей способностью в отношении отдельных компонентов сложной системы метаболизма коллагена. Так, установлено, что блокада β-адренергических рецепторов клеток, продуцирующих коллаген, приводит к снижению внутриклеточного уровня цАМФ, который прямо коррелирует со скоростью внутриклеточного распада вновь синтезированного коллагена [5]. Таким образом, можно повысить продукцию коллагена, преимущественно типа III, путем модулирования уровня его внутриклеточной деградации с помощью β-адреноблокатора [19].

Аскорбиновая кислота увеличивает синтез коллагена, стимулируя проколлагеновую мРНК [20]. Не изменяя соотношения типов коллагена, высокие дозы аскорбиновой кислоты повышают соотношение коллаген—эластин в стенке аорты, увеличивая ее механическую прочность [10]. Аскорбат способствует также нормализации гидроксирования остатков лизина и пролина под действием соответствующих диоксигеназ [6]. Оксипролин ответствен за формирование стабильной при температуре тела человека тройной спирали коллагеновой молекулы, а остаток оксилизина участвует в образовании поперечных связей в коллагеновых и эластиновых фибриллах [18].

Причинами сниженного образования поперечных связей (обнаруженного при синдроме Марфана и марфаноподобных синдромах), ведущего к изменению структуры коллагеновых и эластиновых фибрилл и их метаболизма, может быть уменьшение активности лизилоксидазы, осуществляющей окислительное дезаминирование ε-аминогрупп лизина или оксилизина, или на-

копление в организме метаболитов, например гомоцистеина, блокирующих альдегидные группы аллизина и оксилизина и таким образом препятствующих процессу образования поперечных связей между соседними молекулами коллагена или тропоэластина в соответствующих фибриллах. Механизм положительного терапевтического эффекта пиридоксина не установлен. Однако имеющиеся в настоящее время данные позволяют предполагать, что пиридоксаль-5'-фосфат либо активирует лизилоксидазу, являясь кофактором этого фермента [7, 8], либо снижает концентрацию гомоцистеина, активируя пиридоксальзависимый фермент цистотионинсинтетазу [16, 21]. Поскольку пиридоксаль-5'-фосфат образуется в организме из пиридоксина (витамин В₆) под действием пиридоксип-4-оксигеназы, использующей в свою очередь в качестве кофактора производное рибофлавина (витамин В₂) — флавинадениннуклеотид (ФАД), то экзогенное введение в организм большого пиридоксина и рибофлавина обеспечивает образование активной формы витамина В₆ — пиридоксаль-5'-фосфата [11].

Несмотря на то что каждое из названных выше веществ обладает прямой или косвенной корригирующей способностью в отношении синтеза коллагена и эластина, ни одно из них при индивидуальном применении не может привести к нормализации метаболизма коллагена, поскольку у больных с синдромом Марфана, марфаноподобными синдромами, синдромом Элерса—Данло разных типов нарушения метаболизма могут включать генерализованную недостаточность синтеза коллагена в целом, недостаточность коллагена определенного типа, дефект на уровне ферментов его модификации и распада или же синтез дефектного коллагена, обусловленный структурной мутацией в коллагеновом гене. В такой ситуации индивидуальное применение одного из названных препаратов может оказать даже негативное влияние. Например, назначение одного только β-адреноблокатора приводит к относительному увеличению продукции коллагена, однако, если это дефектный коллаген, происходит увеличение его продукции, что может иметь негативные клинические последствия. Так, при профилактическом лечении пропранололом у нескольких больных

с синдромом Марфана на фоне лечения наблюдалось развитие аневризмы аорты с летальным исходом [17].

Таким образом, по-видимому, только при комплексном применении названных препаратов достигается полная или частичная количественная и качественная коррекция образования коллагеновых и, очевидно, эластиновых фибрилл.

У всех обследованных больных, за исключением одного больного с синдромом Ларсена, исходно был снижен показатель Ф1, ассоциируемый со вновь синтезируемым коллагеном. Его снижение в сочетании со сниженным общим содержанием оксипролина может свидетельствовать о недостаточности синтеза коллагена в целом, а в сочетании с повышенным общим уровнем оксипролина — о синтезе дефектного коллагена, который подвержен активной внутриклеточной деградации [12, 18]. В процессе лечения прослеживались увеличение показателя Ф1, а также нормализация общего содержания оксипролина (см. рис. 1 и 2). На основании только данных наблюдений трудно решить, идет ли речь об абсолютном увеличении синтеза коллагена, или же мы имеем дело с устойчивостью синтезируемых коллагеновых молекул к действию коллагенолитических ферментов, приобретенной в результате структурной коррекции под влиянием назначенных препаратов; а может быть, имеет место одновременно и то и другое. Однако, судя по полученным результатам, предлагаемое комплексное лечение может быть назначено в качестве предоперационной подготовки больных с синдромом Марфана, марфаноподобными синдромами и синдромом Элерса—Данлю к торакопластике по поводу ВДГК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дельвиц А. А. // *Вопр. мед. химии.* — 1986. — № 2. — С. 2—14.
2. Проzorovskaya Н. Н., Глиняная С. В., Дельвиц А. А. // *Там же.* — № 6. — С. 84—86.
3. Рудиков С. С., Солонищенко В. Г. // *Магнито-хирургическая коррекция воронкообразной деформации грудной клетки.* — М., 1986. — С. 123—138.
4. Урбах В. Ю. *Биометрические методы.* — М., 1964. — С. 155—157.
5. Berg R. A., Moss J., Baum B. J., Crystal R. G. // *J. clin. Invest.* — 1981. — Vol. 67. — P. 1457—1462.
6. Berg R. A., Steinmann B., Rennard S. I., Crystal R. G. // *Arch. Biochem.* — 1983. — Vol. 226. — P. 681—686.
7. Bird T. A., Levene C. I. // *Biochem. J.* — 1983. — Vol. 210. — P. 633—638.
8. Bird T. A., Levene C. I. // *Biochem. biophys. Res. Commun.* — 1982. — Vol. 108. — P. 1172—1180.
9. Dolan F., Sisko F., Riley E. M. // *Anesthesiology.* — 1980. — Vol. 52. — P. 266—269.
10. Faris B., Ferrera R., Toselli P., Namba J. et al. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1984. — Vol. 797. — P. 71—75.
11. Fujii K., Kajiwara T., Kurosu H. // *FEBS Lett.* — 1979. — Vol. 97. — P. 193—195.
12. Geesin J., Murad I., Pinnel S. R. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1986. — Vol. 886. — P. 272—274.
13. Halpern B. L., Char F., Murdoch J. L. et al. // *John Hopk. med. J.* — 1971. — Vol. 129. — P. 123—129.
14. *Inherited Disease and Anaesthesia* / Ed. F. Ellis. — Amsterdam, 1981.
15. Lind J., Hoynck van Papendrencht H. P. // *Europ. J. Obstet. Gynec.* — 1984. — Vol. 18. — P. 161—168.
16. Myers B. A., Dubick M. A., Reynolds R. D. et al. // *Biochem. J.* — 1985. — Vol. 229. — P. 153—160.
17. Ose L., McKusick V. A. // *Birth Defects: Orig. Article Ser.* — 1977. — Vol. 13, N 3C. — P. 163—169.
18. Pinnel S. R. // *Yale J. Biol. Med.* — 1985. — Vol. 58. — P. 553—559.
19. Steinmann D. U., Abe Sh., Nartlin G. R. // *Collagen Relat. Res.* — 1982. — Vol. 2. — P. 553—559.
20. Tajima S., Pinnel S. R. // *Biochem. biophys. Res. Commun.* — 1982. — Vol. 106. — P. 632—637.
21. Williamson P. R., Kittler J. M., Thanassi J. W., Kagan H. M. // *Biochem. J.* — 1986. — Vol. 235. — P. 597—605.

Поступила 15.05.87

EFFECT OF THERAPY INVOLVING A BETA-ADRENOBLOCATOR AND COMPLEX OF VITAMINS ON PATTERNS OF HYDROXYPROLINE EXCRETION IN SOME HEREDITARY DISEASES OF CONNECTIVE TISSUE

N. N. Prozorovskaya, S. V. Glinyanaya, L. P. Geraschenko, S. S. Rudakov, V. G. Solonichenko, A. A. Del'vig

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

Excretion of hydroxyproline with urine was studied in 16 children (5-14 years old) with Marfan-Like syndrome and Marfan, Ehlers-Dunlos and Larson syndromes after therapy involving propranolol and a complex of vitamins (ascorbic acid, riboflavin and pyridoxine) and recommended on the basis of echocardiographic analyses. The therapeutic course appears to cause quantitative and qualitative correction of collagen and apparently of elastin fibrilles development. Depending on initial patterns of hydroxyproline excretion and the syndrome form the correction could be complete or partial, while positive effect of the

treatment was stable or provisional. The data obtained suggest that the complex treatment developed might be applied as a preoperative therapy of the patients with Marphan-like

syndrome as well as with syndromes of Marphan and Ehlers-Dunlos before thoracoplastics caused by hereditary chest deformation and by impairments of cardiovascular system.

УДК 616.248+616.5]-056.43-053.2-07:[616.155.32-008.931+616.155.32-008.93:577.123.3

А. А. Герасимов, М. И. Баканов, И. И. Балаболкин, Т. В. Бершова

КОРРЕЛЯЦИОННЫЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ ЛИЗОСОМНЫХ ФЕРМЕНТОВ И ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ ПРИ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ У ДЕТЕЙ

НИИ педиатрии АМН СССР, Москва

В развитии всех 4 типов аллергических реакций, свойственных патогенезу бронхиальной астмы, важную роль играет лизосомный аппарат клеток [16]. Лизосомы участвуют в катаболизме антигенов [15], образовании иммуноглобулинов, выделяют ферменты, вызывающие повреждение ткани, воспаление и гиперчувствительность [13]. Проницаемость мембран лизосом для ферментов регулируется циклическими нуклеотидами: высокий уровень цГМФ способствует лабильзации лизосомных мембран и усиливает выход кислых гидролаз в цитоплазму клетки; цАМФ, наоборот, стабилизирует мембраны лизосом [1].

Несомненна также роль лизосомных ферментов в легочном компоненте патогенеза дермореспираторного синдрома (ДРС), вероятно, сходном с бронхиальной астмой. Вместе с тем необходимо подчеркнуть, что ДРС представляет собой один из наиболее тяжелых вариантов аллергической патологии, сочетающий бронхиальную астму и атопический дерматит. Комплексное исследование активности лизосомных ферментов и уровня циклических нуклеотидов при данных аллергических заболеваниях имеет важное значение для раскрытия неясных сторон их патогенеза. Успешному решению этой задачи может способствовать обнаружение корреляционных связей между указанными биохимическими параметрами [2].

В настоящей работе впервые исследована корреляция между активностью β -галактозидазы, N-ацетил- β -D-галактозаминидазы и N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы лимфоцитов и полиморфно-ядерных лейкоцитов (ПЯЛ) и содержанием цАМФ и цГМФ в этих клетках, выделенных из перифериче-

ской крови детей, больных атопической бронхиальной астмой (АБА), и с ДРС.

Обследовано 29 детей с аллергическими заболеваниями, из них 20 страдали АБА и у 9 был ДРС. Возраст детей был от 5 до 15 лет. Большинство обследованных находилось в межприступном периоде заболевания.

Методика

Выделение лимфоцитов и гранулоцитов проводили по методу [6] с небольшими модификациями. Венозную кровь брали в пробирки, содержащие гепарин (10 ЕД/мл), разбавляли 0,9 % хлоридом натрия в соотношении 1:1 и паславляли на фиколл-пак («Pharmacia Fine Chemicals», Швеция), затем центрифугировали при 400 g в течение 40 мин при комнатной температуре. Отбирали верхний слой (плазму), слой лимфоцитов переносили в центрифужную пробирку, суспендировали в тройном объеме 0,9 % хлорида натрия, центрифугировали при 100 g в течение 10 мин, удаляли надосадок. Процедуру повторяли. Полученная конечная клеточная суспензия содержала 93—97 % лимфоцитов. К осадку (эритроциты с гранулоцитами) прибавляли 0,9 % хлорид натрия в количестве, равном первоначальному объему крови, добавляли 3 % раствор декстрана Т500 («Pharmacia Fine Chemicals») на 0,9 % хлориде натрия, оставляли на 30 мин при комнатной температуре для осаждения эритроцитов. Надосадочную жидкость отбирали и центрифугировали при 400 g 10 мин. Оставшиеся эритроциты удаляли, применяя двукратный гипотонический осмотический шок: к 0,5 мл суспензии клеток приливали 12 мл деионизованной воды, через 30 с восстанавливали изотоничность добавлением 4 мл 3,6 % хлорида натрия. Затем клетки дважды промывали 0,9 % хлоридом натрия и получали конечную суспензию, содержащую как минимум 95 % полиморфно-ядерных клеток.

В качестве флюорогенных субстратов при определении активности ферментов использованы: 4-метилумбеллиферил- β -D-галактопирапозид, 4-метилумбеллиферил-N-ацетил- β -D-галактозамид, 4-метилумбеллиферил-N-ацетил- β -D-глюкозаминид («Serva», ФРГ). Конечные концентрации субстратов в пробах соответст-

венно 2,0, 1,5 и 2,6 ммоль/л [5, 11]. Суспензии клеток размельчали в гомогенизаторе типа Поттера — Эльвейема с тefлоповым пестиком, («В. Braun Melsungen AG», ФРГ) в течение 3 мин при 3000 об/мин с поступательными движениями пестика. Среда гомогенизации: 0,9 % хлорид натрия с добавлением тритона X-100 («Merck», ФРГ) в конечной концентрации 0,1 %. Гомогенат центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин, надосадоk использовали для определения активности ферментов. Инкубационная проба конечным объемом 1,5 мл содержала 0,5 мл ферментного препарата, 0,5 мл 0,15 М цитрат-фосфатного буфера (рН 4,5) и 0,5 мл субстрата, приготовленного на монометиловом эфире этиленгликоля. Пробы инкубировали при 37 °С в течение 1 ч, реакцию останавливали добавлением 1,5 мл 0,4 М глицинового буфера (рН 10,8). Количество освобожденного 4-метилумбеллиферона в пробах определяли на спектрофлуориметре MPF2A («Hitachi», Япония) при длине волны возбуждения 366 нм, длине волны эмиссии 452 нм, используя в качестве стандарта 4-метилумбеллиферон («Serva»). Активность ферментов выражали в наномолях субстрата, расщепленного за 1 ч на 1 мг белка. Содержание белка определяли по Лоури [12] с предварительной обработкой 0,5 % дезоксихолатом натрия в 0,1 н. NaOH.

Содержание цАМФ и цГМФ исследовали в суспензиях клеток радиоизотопными методами с использованием специальных наборов реактивов фирмы «Amersham» (Англия). Обработку данных проводили на ЭВМ LАVТAM с применением пакета программ «Microstat» (Австралия).

Результаты и обсуждение

В результате корреляционного анализа полученных данных выявлено большое количество статистически достоверных связей между уровнем активности лизосомных ферментов клеток крови и содержанием в них циклических нуклеотидов. Известно, что перераспределение лизосомных ферментов и усиление способности к синтезу РНК в лимфоцитах при их стимуляции фитогемагглютинином регулируется внутриклеточным уровнем цАМФ [17]. В то же время выход ферментов из лизосом, регулируемый циклическими нуклеотидами [8], неизбежно отражается на уровне их общей активности.

При АБА отмечена умеренная обратная корреляция между уровнем активности всех 3 ферментов и содержанием цАМФ в лимфоцитах, а также обнаружена и прямая корреляция между активностью 3 гликозидаз и содержанием цГМФ в ПЯЛ (табл. 1). При ДРС выявлена умеренная прямая корреляция между активностью N-ацетил-β-D-галактозаминидазы, N-ацетил-

Т а б л и ц а 1

Корреляционные связи между уровнем активности лизосомных гликозид в клетках крови и содержанием в них циклических нуклеотидов при АБА у детей (в каждой выборке 20 величин)

Сравниваемые параметры	Коэффициент корреляции	
	лимфоциты	ПЯЛ
β-Галактозидаза — цАМФ лимфоцитов	-0,363	
N-ацетил-β-D-галактозаминидаза — цАМФ лимфоцитов	-0,404	
N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза — цАМФ лимфоцитов	-0,379	
β-Галактозидаза — цГМФ нейтрофилов		0,388
N-ацетил-β-D-галактозаминидаза — цГМФ нейтрофилов		0,559
N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза — цГМФ нейтрофилов		0,613

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 приведенные коэффициенты корреляции достоверны при $p < 0,05$.

β-D-глюкозаминидазы и уровнем цГМФ в ПЯЛ, а взаимосвязи между активностью изучаемых ферментов и содержанием циклических нуклеотидов в лимфоцитах не обнаружено. Последнее позволяет предположить более выраженный дефект регуляции циклическими нуклеотидами стабильности лизосомных мембран лимфоцитов при ДРС в отличие от АБА. Известно, что у большинства больных с проявлениями респираторной и кожной аллергии преобладают парасимпатические регуляторные влияния. Вместе с тем парасимпатикотония обуславливает накопление внутриклеточного цГМФ, который в свою очередь усиливает синтез и секрецию гистамина и

Т а б л и ц а 2

Корреляционные связи между содержанием эозинофилов, активностью лизосомных гликозидаз и уровнем цГМФ при ДРС у детей (в каждой выборке 9 величин)

Сравниваемые параметры	Коэффициент корреляции	
	лимфоциты	ПЯЛ
Эозинофилия — N-ацетил-β-D-галактозаминидаза	0,696	0,759
Эозинофилия — N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза	0,663	0,709
Эозинофилия — β-галактозидаза	0,714	0,874
Эозинофилия — цГМФ	0,751	0,629

Корреляционные связи между активностью лизосомных ферментов одной популяции клеток крови при аллергических заболеваниях у детей

Сравниваемые параметры	Коэффициент корреляции			
	Лимфоциты		ПЯЛ	
	ДРС	АБА	ДРС	АБА
β -Галактозидаза — N-ацетил- β -D-галактозаминидаза	0,797 (9)	0,959 (20)	0,921 (9)	0,879 (20)
β -Галактозидаза — N-ацетил- β -D-глюкозаминидаза	0,806 (9)	0,954 (20)	0,897 (9)	0,857 (20)
N-ацетил- β -D-галактозаминидаза — N-ацетил- β -D-глюкозаминидаза	0,984 (9)	0,987 (20)	0,984 (9)	0,983 (20)

Примечание. В скобках — количество сравниваемых пар.

понижает порог чувствительности клеточных мембран к раздражителям [10]. Выявленная прямая корреляция между активностью гликозидаз и внутриклеточным уровнем цГМФ может рассматриваться как отражение повышенного тонуса холинергической регуляции при бронхиальной астме и ДРС.

В клинической практике хорошо известна важная роль эозинофилии периферической крови при аллергической патологии. Эозинофилы синтезируют хемотаксический фактор анафилаксии [4], цитотоксические белки к эпителиальным клеткам и фибробластам, продуцируют простагландин E_2 , лейкотриены B_4 и C_4 [14]. Фактор, выделяемый эозинофилами в процессе иммунологической реакции, угнетает выделение гистамина из других лейкоцитов человека, увеличивая в них содержание цАМФ [7]. При бронхиальной астме эозинофилы инфильтрируют стенку бронха, скапливаясь вокруг дегранулированных тучных клеток [4], при аллергодерматозах скопления эозинофилов обнаруживаются в коже [3].

Анализ взаимосвязи эозинофилии с исследованными нами биохимическими параметрами выявил высокий коэффициент корреляции между эозинофилией периферической крови, активностью всех изученных ферментов и содержанием цГМФ в лимфоцитах и ПЯЛ у детей с ДРС (табл. 2). При бронхиальной астме подобной взаимосвязи не обнаружено. Известна роль лизосомных гликозидаз, в том числе β -галактозидазы и N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы, в локальном повреждении ткани — десквамации эпителия [9]. Вероятно, у больных с ДРС в процессе реакций

немедленного типа наряду с дегрануляцией тучных клеток, выбросом медиаторов аллергии более интенсивно, чем при бронхиальной астме, в аллергическое воспаление вовлекаются лизосомные гликозидазы, повреждающие структуру соединительной ткани.

При анализе взаимосвязи между уровнем активности разных гликозидаз, отражающей степень их взаимодействия в процессе гидролитического разрушения ткани, в одной популяции клеток обнаружено, что при ДРС у детей наблюдается более выраженная корреляционная зависимость между лизосомными ферментами в ПЯЛ и менее выраженная в лимфоцитах по сравнению с таковой при АБА (табл. 3).

Обнаружена также отчетливая корреляция для β -галактозидазы двух изучавшихся клеточных популяций и менее выраженная для N-ацетил- β -D-галактозаминидазы и N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы при ДРС в отличие от АБА, что отражает особенности дисбаланса лизосомных аппаратов при названных патологических состояниях.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о выраженных корреляционных связях между активностью лизосомных ферментов и уровнем циклических нуклеотидов лимфоцитов и ПЯЛ при АБА и ДРС у детей. Наряду с этим отмечена тесная корреляция между выраженностью эозинофилии, активностью исследованных ферментов и уровнем цГМФ лимфоцитов и нейтрофилов при ДРС. Результаты исследований указывают на различие в регуляторных механизмах функции лизосом клеток крови при АБА и ДРС и соответственно на необходимость дифференцированного

подхода к патогенетической терапии каждого из этих заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коровкин Б. Ф. // Вестн. АМН СССР. — 1982. — № 9. — С. 69—74.
2. Марчук Г. И. Математические модели в иммунологии. — М., 1980. — С. 264.
3. Кожа: Строение, функция, общая патология и терапия / Под. ред. А. М. Чернуха, Е. П. Фролова. — М., 1982. — С. 198.
4. Чуцалин А. Г. Бронхиальная астма. — М., 1985. — С. 27.
5. Annunziata P., Di Malleo G. // Clin. chim. Acta. — 1978. — Vol. 90. — P. 101—106.
6. Boyum A. // Scand. J. clin. Lab. Invest. — 1968. — Suppl. 97. — P. 77.
7. Hubscher T., Eisen A. H. // J. Allergy. — 1973. — Vol. 51. — P. 83—84.
8. Ignarro L. J., Colombo C. // Science. — 1973. — Vol. 180. — P. 1181—1183.
9. Kay A. B. // Europ. J. resp. Dis. — 1983. — Suppl. 129. — P. 1—44.
10. Lichtenstein L. M. // Allergology. — Amsterdam, 1974. — P. 294—305.
11. Lombardo A., Goi G., Passerini C. G. et al. // Clin. chim. Acta. — 1984. — Vol. 137. — P. 67—75.
12. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
13. Movat H. Z., Uriuhara T., Taichman N. S. et al. // Immunology. — 1968. — Vol. 14. — P. 637.
14. Raphael G. D., Melcalfe D. D. // Europ. J. resp. Dis. — 1986. — Suppl. 147. — P. 52.
15. Ryan W. L., Lee J. W. // Immunochemistry. — 1970. — Vol. 7. — P. 251—256.

16. Weissman G., Dukor P. // Advanc. Immunol. — 1970. — Vol. 12. — P. 306—322.
17. Weissman G., Hirschorn R. // Advanc. Cytopharmacol. — 1971. — Vol. 1. — P. 191—198.

Поступила 09.12.87

CORRELATION BETWEEN LYSOSOMAL ENZYMES AND CYCLIC NUCLEOTIDES IN CHILDREN WITH ALLERGIC IMPAIRMENTS

A. A. Gerasimov, M. I. Bakanov, I. I. Balabolkin, T. V. Bershova

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

Correlation between activity of β -galactosidase, N-acetyl- β -D-glucosaminidase and content of cAMP and cGMP was studied in lymphocytes and polymorphonuclear leukocytes obtained from 20 children with atopic form of bronchial asthma and 9 patients with dermo-respiratory syndrome. Activity of the lysosomal hydrolases studied correlated distinctly with the content of cyclic nucleotides in the leukocytes and lymphocytes of children with bronchial asthma and dermo-respiratory syndrome. The most distinct relationship was found between the eosinophilia, the enzymatic activity and the cGMP content in lymphocytes and neutrophils under conditions of dermo-respiratory syndrome. The data obtained suggest the dissimilarity of regulatory effects of cyclic nucleotides on functional activity of lysosomes in leukocytes of children with atopic form of bronchial asthma and dermo-respiratory syndrome.

УДК 617-001.17-008.6-07:616.155.3.085-008.931:577.152.1

А. А. Карелин, А. А. Алексеев, А. Г. Глоба, В. С. Демидова,
В. О. Цветков

ЭНЗИМАТИЧЕСКАЯ ПРОДУКЦИЯ СУПЕРОКСИДА ПОЛИМОРФНО-ЯДЕРНЫМИ ЛЕЙКОЦИТАМИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ОЖГОВОЙ БОЛЕЗНИ

Институт хирургии им. А. В. Вишневского АМН СССР, Москва

Полиморфно-ядерные лейкоциты (ПЯЛ) осуществляют фагоцитоз микроорганизмов, бактерий, микоплазм, вирусов, опухолевых клеток [13, 14]. Поглощение бактерий лейкоцитами в процессе фагоцитоза сопровождается «вспышкой дыхания» — увеличением потребления кислорода с образованием супероксидного иона кислорода, оказывающего антибактериальное действие [4, 5, 8].

Фермент, катализирующий образование супероксида, НАДФ·Н-оксидаза, находится на наружной поверхности плазматической мембраны лейкоцита

и использует в качестве субстрата НАДФ·Н. Отсутствие этого фермента у пациентов с хроническим лимфогранулематозом лишает нейтрофилы способности вырабатывать супероксид [6, 10]; у таких больных лейкоциты не способны убивать микроорганизмы. Есть сообщения о снижении продукции супероксида лейкоцитами у больных с остеомиелитом [1], а также сведения о том, что снижение фагоцитарной активности лейкоцитов у больных с различными формами хирургической инфекции способствует генерализации последней и развитию сепсиса.

При обширных глубоких ожогах происходят утрата защитного кожного покрова на большой площади поверхности тела, дезорганизация важнейших нейтротрофических и обменных функций организма, нарушение барьерных защитных механизмов, резкое снижение содержания и продолжительное угнетение факторов иммунитета, что создает условия для возможной генерализации инфекции. Ранее была исследована активность НАД·Н- и НАДФ·Н-оксидаз, полученных из ПЯЛ ожоговых больных непосредственно после травмы [11]. Однако сведений об энзиматической продукции супероксида ПЯЛ крови больных в различные периоды ожоговой болезни в литературе нет.

В данном сообщении представлены результаты определения продукции супероксида ПЯЛ у больных в зависимости от степени тяжести ожоговой травмы и периода ожоговой болезни.

Методика

Использовали следующие реактивы: D-глюкозу, НЕРЕС («Serva», ФРГ), цитохром с из сердца лошади («Sigma», США), супероксиддисмутазу — СОД («Boehringer», ФРГ), N-формил-L-метионил-L-лейцил-L-фенилаланин — ФМЛФ («Calbiochem-Boehringer», США), фикол-400 («Pharmacia», Швейцария), верографин («Sprofa», ЧССР), ЭДТА, NaCl, CaCl₂, MgSO₄, KCl («Союзреактив», квалификация не ниже х.ч.).

Лейкоциты выделяли из 10 мл гепаринизированной венозной крови по методике, описанной ранее [7]. Конечный осадок нейтрофилов суспендировали в 1 мл 0,85 % раствора NaCl, число клеток подсчитывали в камере Горяева. Измерение генерации супероксида осуществляли, используя ингибируемое СОД восстановление цитохрома с. Суспензию нейтрофилов (100 мкл) вносили в 1 мл инкубационной среды, содержащей 128 мМ NaCl, 1,4 мМ CaCl₂, 5,2 мМ KCl, 5,6 мМ D-глюкозы, 10 мМ НЕРЕС, 50 мкМ цитохрома с, рН которой с помощью 1 М КОН доводили до 7,4. В случае измерения продукции супероксида неактивированными ПЯЛ в контрольные образцы вносили 16 мкг СОД в объеме 20 мкл буфера инкубационной среды, а в экспериментальные — 20 мкл буфера. Для определения генерации супероксида ПЯЛ, активированными ФМЛФ, кроме указанных выше компонентов, как в экспериментальные, так и в контрольные образцы вносили 4·10⁻⁵ М ФМЛФ, растворенный в 20 мкл буфера. Инкубацию проводили в стеклянных конических пробирках при 37°С на водяной бане, встряхивая их в течение 10 мин, после чего пробирки помещали в ледяную воду. Затем нейтрофилы осаждали центрифугированием при 800 g в течение 5 мин. Оптическую плотность надосадочной жидкости определяли на фотометре LP-300 («Langex», ФРГ), с фильтром, имеющим максимум пропускания 546 нм.

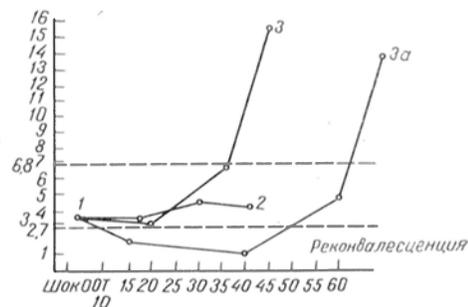
Количество образовавшегося супероксида расчитывали, как описано ранее [9].

Результаты и обсуждение

В наших исследованиях в качестве активатора лейкоцитов был использован ФМЛФ. Этот хемоаттрактантный пептид наряду с хемотаксическими свойствами в больших концентрациях вызывает усиленную продукцию супероксиданиона [3].

Нами обследовано 28 доноров. Параллельно с определением продукции супероксида активированными лейкоцитами проводили измерение супероксидгенерирующей активности ПЯЛ без добавки ФМЛФ. При этом выяснилось, что продукция супероксида неактивированными ПЯЛ достаточно высока и находится в пределах 1—5 нмоль на 10⁶ клеток (в среднем 2,70 нмоль на 10⁶ клеток), в то время, как активированные ПЯЛ производят 5,3—9,6 нмоль на 10⁶ клеток (в среднем 7,35 нмоль на 10⁶ клеток) супероксида. Продукция супероксида нейтрофилами без активатора может быть объяснена их повреждением в процессе выделения и активацией при помещении в систему *in vitro*. Очевидно, подобный уровень активации не может быть информативен и служить диагностическим и прогностическим критерием в клинике.

В качестве критерия защитных иммунных сил организма мы выбрали разницу между количеством супероксида, производимого ПЯЛ в присутствии активатора, и его количеством в отсутствие формилпептида: ΔСО = СО_{акт} — СО_{неакт}. Для группы доно-



Изменение продукции супероксида у больных ожоговой болезнью в различные периоды течения заболевания.

По оси абсцисс — дни и периоды ожоговой болезни; по оси ординат — количество продуцируемого ПЯЛ супероксида за 10 мин инкубации (в нмоль на 10⁶ клеток). Арабскими цифрами обозначены группы больных (см. текст).

ров, обследованных нами, эта разница лежит в пределах 2,7—6,8 нмоль на 10^6 клеток (в среднем $4,67 \pm 0,20$ нмоль на 10^6 клеток).

В отделении термических поражений Всесоюзного ожогового центра проведено 56 исследований крови у 21 больного с ожоговой болезнью. Площадь ожогов у них составила от 25 до 80 % поверхности тела, при этом глубокие ожоги занимали 15—60 % поверхности тела. Продукцию супероксида определяли в периоды ожоговой токсемии, ожоговой септикотоксемии и в период реконвалесценции.

В период острой ожоговой токсемии (ООТ) обследовано 6 больных (1-я группа). Уровень продукции супероксида у больных этой группы колебался от 2,3 до 4,8 нмоль на 10^6 клеток (см. рисунок). Токсемия у всех пациентов была тяжелой, 2 больных умерли. Различий в уровне продукции супероксида в зависимости от площади полученных ожогов в период ООТ у больных не выявлено.

У обследованных больных 2-й группы (7 человек) площадь глубоких ожогов составила от 15 до 25 % поверхности тела. При исследовании продукции супероксида в период с 14-го по 20-й день после травмы его уровень находился в пределах 1,8—4,7 нмоль на 10^6 клеток, составляя в среднем 3,4 нмоль на 10^6 клеток. В последующие дни уровень продукции супероксида у этих больных колебался от 0,4 до 8,7 нмоль на 10^6 клеток, составив в среднем 4 нмоль на 10^6 клеток. В период реконвалесценции средний уровень супероксида составлял 3,9 нмоль на 10^6 клеток (3,5—4,3 нмоль на 10^6 клеток). Таким образом, в среднем уровень продукции супероксида у больных 2-й группы во все периоды ожоговой болезни находился в пределах нормы, определенной у доноров. Снижение его ниже нормы в двух случаях (соответственно до 1,8 и 0,4 нмоль на 10^6 клеток) в периоде ожоговой септикотоксемии было обусловлено неоправданно отсроченной аутодермопластикой вследствие нагноения ожоговых ран.

У 12 больных основной, 3-й группы, площадь глубоких ожогов составляла более 25 % поверхности тела (преимущественно 30—40 % глубоких ожогов). Большая площадь глубокого поражения (индекс Франка более 100 у всех больных) обуславливала возможность

генерализации инфекции. Однако своевременно проведенное адекватное лечение, направленное на возможное раннее отторжение струпа и закрытие ожоговой раны с помощью трансплантатов аутокожи, позволили избежать сепсиса в большинстве случаев.

Особенно успешное лечение было проведено у больных подгруппы 3а (6 больных). Об этом свидетельствует показатель продукции супероксида. К 20-му дню после травмы уровень супероксида находился в пределах 2,1—4,4 нмоль на 10^6 клеток, составляя в среднем 3,0 нмоль на 10^6 клеток. К 30—40-му дню отмечено его повышение в среднем до 6,7 нмоль на 10^6 кл (2,1—15,0 нмоль на 10^5 клеток). К моменту полного закрытия ожоговых ран и начала периода реконвалесценции средний уровень продукции супероксида составил 15,6 нмоль на 10^6 клеток (4,0—35,8 нмоль на 10^6 клеток), что свидетельствует о высокой степени фагоцитарной активности нейтрофилов.

Иная динамика изменений показателей продукции супероксида нейтрофилов отмечена у больных подгруппы 3б (6 больных). В эту подгруппу были включены пациенты, поступившие в ожоговый центр через 10—15 дней после травмы. К 20-му дню после ожогов активность продукции супероксида составляла 1,7—2,0 нмоль на 10^6 клеток, в среднем 1,8 нмоль на 10^6 клеток. Позднее, к 30—40-му дню, а у некоторых больных до 50-го дня после травмы, происходило дальнейшее снижение продукции супероксида до 0,6—1,9 нмоль на 10^6 клеток. Другими словами, продукция супероксида у этих больных в указанные периоды болезни находилась ниже нормы, установленной для доноров.

Низкая активность супероксида соответствовала степени тяжести состояния пациентов и коррелировала с активностью хирургической тактики. Так, у 2 больных, доставленных в ожоговый центр в поздние сроки после травмы, промедление с закрытием ожоговых ран трансплантатом аутокожи привело к развитию сепсиса. Активность супероксида к моменту выявления сепсиса у этих больных составляла соответственно 1,4 и 0,6 нмоль на 10^6 клеток. Проведение последующего комплексного лечения, включающего этапные аутодермопластики, применение антибактериальных препаратов и иммуне-

терапии обеспечило благоприятный исход. Продукция супероксида нейтрофилов восстановилась до нормы, составив у этих больных соответственно 3,6 и 3,4 нмоль на 10^6 клеток.

Восстановление уровня продукции супероксида до нормальных величин отмечено также у других больных этой группы. При адекватном лечении активность супероксида повышалась до 3,6—7,6 нмоль на 10^6 клеток (в среднем до 4,3 нмоль на 10^6 клеток), а в период реконвалесценции — до 12—15 нмоль на 10^6 клеток (в среднем до 13,8 нмоль на 10^6 клеток).

Таким образом, исследование супероксидгенерирующей энзиматической активности лейкоцитов у больных с тяжелыми ожогами позволяет определить уровень и напряженность фагоцитоза, а следовательно, оценить состояние клеточного иммунитета пострадавшего от ожогов в зависимости от степени тяжести травмы, периода ожоговой болезни и адекватности проводимого лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Герасимов А. М., Гудошникова Л. В., Махсон Н. Е., Уразгильдиев З. И. // *Вопр. мед. химии.* — 1986. — № 5. — С. 103—106.
2. Кузин М. И., Белоцкий С. М., Карлов В. А. // *Раны и раневая инфекция.* — М., 1981. — С. 221.
3. Andrews P. C., Babior B. M. // *Blood.* — 1984. — Vol. 64. — P. 883—890.
4. Babior B. M. // *New Engl. J. Med.* — 1978. — Vol. 298. — P. 659—668.
5. Babior B. M., Curhette J. T., McMurrich B. J. // *J. clin. Invest.* — 1976. — Vol. 58. — P. 989—996.
6. Babior B. M., Kipnes R. S., Curhette J. T. // *Ibid.* — 1973. — Vol. 52. — P. 741—744.
7. Bradford P. G., Rubin R. P. // *Molec. Pharmacol.* — 1985. — Vol. 27. — P. 74—78.

8. Badwey J. A., Karnovsky M. L. // *J. biol. Chem.* — 1979. — Vol. 254. — P. 11530—11537.
9. Bretz U., Baggiolini M. // *J. Cell. Biol.* — 1974. — Vol. 63. — P. 251—269.
10. Curhette J. T., Whitten D. M., Babior B. M. // *New Engl. J. Med.* — 1974. — Vol. 290. — P. 593.
11. Heck E. L., Edgar E. A., Masters B. S., Baxter C. R. // *J. Trauma.* — 1979. — Vol. 19. — P. 49—51.
12. Karnovsky M. L. // *Fed. Proc.* — 1973. — Vol. 32. — P. 1527—1533.
13. Klebanoff S. J. // *Semin. Hemat.* — 1975. — Vol. 12. — P. 117—142.

Поступила 26.08.87

ENZYMATIC PRODUCTION OF SUPEROXIDE ANION BY HUMAN POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES IN BURNS DISEASE

A. A. Karelin, A. A. Alexeev, A. G. Globa, V. S. Demidova, V. O. Tsvetkov

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

Production of superoxide anion by polymorphonuclear leukocytes (PMNL) was studied in donors and patients with burns. N-formyl-L-Met-L-Leu-L-Phe (FMLP) was used as an activator of PMNL. Elevation in production of superoxide anion, caused by the activating effect of FMLP, proved to be useful as a diagnostic and prognostic criterion. 56 preparations of blood were studied in 21 patients with burns within the periods of acute burns toxemia, burns septicotoxemia and convalescence. Superoxide anion generating activity correlated with the disease severity: content of superoxide anion was distinctly decreased within the period of sepsis development. At the same time, complex treatment of the patients, involving step-by-step autodermoplastics, antibacterial preparations and immunotherapy, enabled to restore the superoxide anion production up to normal values. Evaluation of the superoxide anion generating activity by PMNL in the patients with severe forms of burns enabled to estimate the state of cell immunity in the patients depending on severity of burns trauma, period of burn disease and adequacy of the treatment applied.

УДК 616.36-008.931:577.152.344]-02:615.285.7:547.496.2].099

С. И. Табагари, Т. М. Шубитидзе, Г. В. Абдушелишвили

ВЛИЯНИЕ СИЛИМАРИНА НА АКТИВНОСТЬ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ПРОТЕИНАЗ ПЕЧЕНИ И ПОЧЕК ПРИ ВВЕДЕНИИ ТЕТРАМЕТИЛТИУРАМДИСУЛЬФИДА

Кафедра биохимии Тбилисского медицинского института

Выяснение биохимических механизмов действия чужеродных веществ, загрязняющих внутреннюю среду организма, дает возможность оценить патологические последствия их

токсического влияния и разработать профилактические и терапевтические меры при интоксикации. Следует отметить, что повреждающее действие экзогенных химических веществ опосре-

дуются прежде всего через структурно-функциональные нарушения, возникающие на субклеточном уровне. При этом специфичность токсического влияния определяется характером действия на отдельные звенья метаболизма. Среди загрязнителей окружающей среды и организма человека значительное место занимают пестициды, однако детально особенности биологического эффекта многих из них не изучены, что, в частности, относится к группе пестицидов дитиокарбаматного ряда [6—8]. Сравнительно недавно было обнаружено повреждающее действие сульфокарбатиона и тетраметилтиурамдисульфида (ТМТД) на лизосомальный аппарат клетки, следствием которого является нарушение целостности лизосомальных мембран печени и почек [2, 5].

В связи с изложенным целью настоящей работы явилось определение возможности коррекции структурных нарушений лизосом, вызванных дитиокарбаматами, с помощью мембраностабилизирующего агента силимарипа [10, 11].

Методика

Крысам-самцам линии Вистар массой 190—200 г ежедневно в течение 20 дней перорально вводили ТМТД в дозах $1/10$ и $1/5$ ЛД₅₀ [4] в виде суспензии в растительном масле (1 мл). Половине животных из каждой группы за 5 дней до окончания эксперимента аналогичным образом вводили силимарин в дозе 10 мг на 100 г массы. Контролем служили интактные животные (контроль 1), а также крысы, которым вводили только подсолнечное масло (контроль 2).

По окончании эксперимента животных декапировали. Извлеченные печень и почки промывали холодным физиологическим раствором и готовили гомогенаты, используя в качестве суспендирующей среды 0,25 М раст-

вор сахарозы (рН 7,4), содержащий 0,001 М ЭДТА [3]. В гомогенатах печени, почек и в сыворотке крови определяли общую, а в полученной на ультрацентрифуге L5-65 («Spinco», США) надосадочной жидкости — неседиментируемую активность лизосомальных протеиназ: катепсинов А (КФ 3.4.12.1), В (КФ 3.4.22.1), С (КФ 3.4.14.1) и D (КФ 3.4.23.5) — спектрофлуориметрическими методами [1] с помощью спектрофлуориметра MPF-2A («Hitachi», Япония), используя в качестве субстратов соответственно N-карбобензоксид-L-глутамил-L-тирозин, N-бензоил-D,L-аргинин-β-нафтиламид, глицил-L-фенилаланин-β-нафтиламид и гемоглобин («Sigma», США). Кроме того, в исследуемых образцах определяли концентрацию белка [9].

Результаты и обсуждение

У животных, получавших ТМТД в дозе $1/10$ ЛД₅₀ в течение 20 дней, в последние 4—6 сут отмечали снижение двигательной активности, в отдельных случаях понос. У крыс, получавших, начиная с 15-го дня и до конца эксперимента, силимарин на фоне введения ТМТД, также наблюдалась некоторая адинамия, но желудочных расстройств у животных этой опытной группы не было. В группе животных, получавших силимарин в течение 5 дней, не было отмечено каких-либо симптомов интоксикации. Величина среднесуточной прибавки массы тела у интактных животных была наибольшей и составляла 4,38 г/сут, тогда как у животных, получавших внутрижелудочно подсолнечное масло, суспензию ТМТД, суспензию силимарина и ТМТД в сочетании с силимарином, эта величина была равна соответственно 2,88, 3,04, 3,21 и 1,87 г/сут. Значительное различие в величинах среднесуточной прибавки массы у животных данных групп по сравнению с интактными крысами

Таблица 1

Общая активность протеолитических ферментов лизосом в печени крыс при введении силимарина на фоне действия ТМТД (в мкмоль/мин на 1 г белка)

Фермент	Условия опыта				
	контроль 1	контроль 2	ТМТД	силимарин	ТМТД+силимарин
Катепсин:					
А	2,29±0,18	2,41±0,11	1,37±0,08***	2,97±0,12**	1,49±0,05***
В	3,08±0,09	3,18±0,10	1,99±0,07***	2,74±0,11**	2,25±0,07***
С	27,19±2,01	25,47±1,78	20,02±1,20**	26,40±1,46	18,12±1,27**
D	7,43±0,29	7,19±0,32	3,66±0,33***	6,90±0,27	4,00±0,18***
Белок, мг на 1 г сырой ткани	235,3±13,3	237,0±8,3	262,5±11,6	276,3±5,4*	269,8±3,2*

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 и 4 представлены средние данные ($M \pm m$) из 8 опытов; одна звездочка — $p < 0,05$; две — $p < 0,01$; три — $p < 0,001$.

Общая активность протеолитических ферментов лизосом в почках крыс при введении силимарина на фоне действия ТМТД (в мкмоль/мин на 1 г белка)

Фермент	Условия опыта				
	контроль 1	контроль 2	ТМТД	силимарин	ТМТД+силимарин
Катепсин:					
А	3,76±0,31	3,22±0,27	2,30±0,19**	4,11±0,34	3,29±0,36
В	4,21±0,40	4,77±0,17	3,15±0,22**	4,53±0,37	4,03±0,26
С	7,27±1,00	6,94±0,44	5,13±0,54*	5,87±0,42	6,63±0,91
D	6,14±0,40	5,89±0,29	4,38±0,20**	6,73±0,21	6,39±0,38
Белок, мг на 1 г сырой ткани	211,2±2,9	244,2±7,7	219,7±4,4	217,8±5,6	210,8±5,7

(снижение на 27—58 %) скорее всего связано не с действием ТМТД или силимарина, а со способом их введения (с помощью зонда), поскольку у животных в контроле 2 также отмечено снижение среднесуточной прибавки массы. По-видимому, по этой же причине наименьшую прибавку массы наблюдали у животных, которые в течение последних 5 дней эксперимента получали ТМТД в сочетании с силимарином, т. е. подвергались зондированию дважды в сутки. Никаких изменений относительной массы печени и почек у животных всех опытных групп по сравнению с контрольными не выявлено, за исключением незначительного (на 10 %; $p > 0,05$) снижения относительной массы печени и почек при введении силимарина.

Результаты исследований общей активности лизосомальных протеиназ в печени и почках (табл. 1 и 2) отчетливо показывают, что введение ТМТД вызывало ранее выявленное угнетение функциональной активности протеолитической системы лизосом. Общая активность протеиназ в печени снижалась на 26—51 %, в почках — на 25—39 %. Введение животным одного силимарина не вызывало достоверных

изменений активности изученных ферментов в этих органах, исключение составляют активация катепсина А в печени на 30 % и незначительного снижения активности катепсина В (см. табл. 1). В то же время заслуживает внимания тот факт, что при сочетании введении силимарина и ТМТД ингибирующее действие пестицида на протеолитическую систему лизосом печени практически полностью сохранялось. Как и при действии одного ТМТД, его введение в комплексе с силимарином вызывало снижение общей активности катепсинов А, В, С и D в печени соответственно на 35, 27, 33 и 46 %. В почках при этих же условиях ингибирующего действия ТМТД на протеиназы лизосом не обнаружено (см. табл. 2).

Особый интерес представляют результаты, полученные при исследовании неседиментируемой активности лизосомальных гидролаз (табл. 3 и 4). При подострой интоксикации ТМТД в печени возрастала неседиментируемая активность всех протеиназ: катепсина А на 39 %, В на 17 %, С на 41 % и D на 72 %. В почках прирост неседиментируемой активности носил менее выраженный характер, так как актив-

Т а б л и ц а 3

Неседиментируемая активность протеолитических ферментов лизосом в печени крыс при введении силимарина на фоне действия ТМТД (в % от общей)

Катепсин	Условия опыта				
	контроль 1	контроль 2	ТМТД	силимарин	ТМТД+силимарин
А	3,78±0,17	4,06±0,24	5,24±0,21***	4,29±0,22	3,77±0,20**
В	7,19±0,26	6,73±0,33	8,45±0,41*	7,40±0,38	6,17±0,27
С	4,20±0,20	4,43±0,18	5,91±0,24***	3,71±0,14*	3,90±0,17***
D	5,36±0,19	5,22±0,27	9,21±0,43***	6,17±0,31*	6,45±0,44*

Неседиментируемая активность протеолитических ферментов лизосом в почках крыс при введении силимарина на фоне действия ТМТД (в % от общей)

Катепсин	Условия опыта				
	контроль 1	контроль 2	ТМТД	силимарин	ТМТД+силимарин
А	6,21±0,27	5,98±0,26	7,39±0,31*	6,01±0,21	6,20±0,20
В	10,93±0,58	9,21±0,51	12,15±0,47	11,46±0,68	12,77±0,60*
С	9,08±0,39	10,73±0,44	14,04±0,62***	10,36±0,47	10,39±0,65***
Д	12,41±0,54	11,92±0,38	15,03±0,67**	11,33±0,41	11,12±0,48

ность катепсина В в этом случае не изменялась, а активность катепсинов А, С и D увеличивалась соответственно лишь на 19, 55 и 21 %. Введение силимарина не вызывало значимых изменений неседиментируемой активности, тогда как его введение на фоне ТМТД в определенной степени снижало повреждающее действие пестицида на мембраны лизосом в печени и почках. Так, по сравнению с действием одного ТМТД силимарин снижал в печени неседиментируемую активность катепсина А на 28 %, катепсина В на 27 %, катепсина С на 34 % и катепсина D на 52 %. Аналогичное сравнение в отношении почек показывает снижение неседиментируемой активности катепсина А на 16 %, катепсинов С и D на 26 %.

Исследование активности лизосомальных ферментов в сыворотке крови (данные не приведены) позволило установить увеличение активности катепсина А на 32 %, С на 48 % и D на 60 % при ТМТД. При сочетании введения ТМТД и силимарина выявлено лишь увеличение на 28 % активности катепсина D. Введение одного силимарина не вызывало изменения активности ферментов по сравнению с ее уровнем у животных контрольных групп.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлена возможность коррекции вызванных ТМТД повреждений лизосомальной мембраны путем применения мембраностабилизирующих препаратов. При этом критериями оценки эффективности их действия могут служить уровень неседиментируемой активности лизосомальных гидролаз в печени и почках и активность в сыворотке крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильев А. В., Капелевич Т. А., Тутельян В. А. // *Вопр. мед. химии.* — 1983. — № 3. — С. 127—130.
2. Непесова Ш. А., Васильев А. В., Тутельян В. А. // *Гиг. и сан.* — 1985. — № 1. — С. 89—91.
3. Покровский А. А., Тутельян В. А. *Лизосомы.* — М., 1976.
4. Справочник по пестицидам / Под ред. Л. И. Медведя. — Киев, 1974.
5. Табагари С. И., Шубитидзе Т. М., Абдушелишвили Г. В. // *Вопр. мед. химии.* — 1987. — № 5. — С. 112—115.
6. Bluzat R., Jonot O., Seuge J. // *Bull. environm. Contam. Toxicol.* — 1982. — Vol. 29. — P. 248—252.
7. Danielsson B. R. G. // *Arch. Toxikol.* — 1984. — Bd 55. — S. 161—167.
8. Heijbroek W. M. H., Muggleton D. F., Parke D. V. // *Xenobiotica.* — 1984. — Vol. 14. — P. 235—249.
9. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // *J. biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
10. Valenzuela A., Lagos C., Schmidt K., Videla L. A. // *Biochem. Pharmacol.* — 1985. — Vol. 34. — P. 2209—2212.
11. Vogel G. // *New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity.* — Berlin, 1977. — P. 249—265.

Поступила 03.02.88

EFFECT OF SILIMARINE ON ACTIVITY LYSOSOMAL PROTEINASES IN LIVER AND KIDNEY TISSUES OF RATS TREATED WITH TETRAMETHYLTHIURAM DISULFIDE

S. I. Tabagari, T. M. Shubitidze, G. V. Abdu-shelishvili

Medical School, Tbilisi

Total and nonsedimented activities of lysosomal proteinases were studied in rat liver and kidney tissues after administration of silimarine simultaneously with tetramethylthiuram disulfide (TMTD). Silimarine did not affect the pattern of alterations in total activity of lysosomal proteinases, caused by the TMTD treatment, but the nonsedimented activity of the enzymes studied was normalized. Silimarine appears to exhibit the membrane-stabilizing effect.

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 615.373.03:[616.154:577.175.343]-078.73].012

Т. А. Менявцева, Г. М. Ратнер, Т. Д. Лимарева, В. П. Масенко

ПРИМЕНЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ КОНТРОЛЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АНТИСЫВОРОТОК К ВАЗОПРЕССИНУ

НИИ вакцины и сывороток Минздрава СССР, Томск

Методика

Развитие радиоиммунного (РИА) и иммуноферментного (ИФА) методов микроанализа открывает широкие возможности для определения содержания биологически активных веществ и изучения их динамики при различных патологических состояниях. Актуальной задачей в плане создания РИА- и ИФА-тест-систем является получение высокоактивных и специфичных антисывороток, поскольку именно от этих качеств антител к биологически активным веществам зависит чувствительность и специфичность анализа последних, а также экономичность разрабатываемых наборов.

Пептидный гормон гипоталамуса вазопрессин, оказывающий выраженное антидиуретическое и вазопрессорное действие, играет важную роль в осуществлении физиологических и патологических реакций организма. Недостаточность этого гормона приводит к развитию несахарного диабета. Повышение уровня вазопрессина в крови может наблюдаться при поражениях мозга, бронхогенном раке, некоторых других патологических состояниях, а также при стрессорных воздействиях, мышечном перенапряжении, облучении, кровопотерях, действии различных фармакологических агентов.

Биологические методы определения вазопрессина малочувствительны и трудоемки [1]. Поэтому в настоящее время для измерения количества вазопрессина в биологических жидкостях применяют методы РИА и ИФА [1—9].

Цель настоящей работы — получение антисыворотки к вазопрессину и разработка чувствительного метода микроанализа для определения ее активности и пригодности для создания в дальнейшем ИФА-тест-системы на вазопрессин.

В качестве антигена для иммунизации животных использовали синтетический аргинин-8-вазопрессин — АВП («Biochem-Behring Co», Швейцария). Поскольку вазопрессин, подобно другим гормонам с низкой молекулярной массой, обладает слабой иммуногенностью, проводили его конъюгацию с белком-носителем путем ковалентного связывания при помощи глутарового альдегида по методу [8]. Для этого к 2 мг АВП, растворенного в 3 мл 0,1 М фосфатного буферного раствора pH 7,0, добавляли 20 мг лошадиного сывороточного альбумина (ЛСА, получен в лаборатории иммунохимии Томского НИИВС З. Р. Кусковой и М. В. Колмаковой) и при постоянном помешивании постепенно приливали 1,5 мл 0,02 М глутарового альдегида («Serva», ФРГ). Полученную смесь перемешивали еще 18—20 ч при 4°C и далее диализовали против дистиллированной воды в течение 1 сут. Аликвоты конъюгата АВП — ЛСА хранили при -20°C.

Антисыворотку к вазопрессину получали путем длительной иммунизации кроликов массой 2,5—3 кг. Курс иммунизации состоял из 5—7 инъекций с интервалом 14 дней. Конъюгат антигена с ЛСА (0,25 мл на 1 кролика) эмульгировали в равном объеме полного адьюванта Фрейнда («Calbiochem-Behring Corp.», США) и вводили подкожно в подушечки лап или в область шейных лимфатических узлов. Повторные курсы иммунизации, состоящие из 2—3 аналогичных инъекций, проводили через 1—3 мес. Кровь для получения антисыворотки забирали на 7—10-й день после очередной иммунизации.

Титр антител к вазопрессину в полученных антисыворотках определяли с помощью твердофазного ИФА в непрямом варианте на микропланшетах («Titertek», Великобритания) с использованием иммунопероксидазного видового кроличьего конъюгата. Последний получали по [9] методом периодатного окисления углеводного компонента пероксидазы с последующим ковалентным его связыванием с антителами к кроличьему IgG, выделенными из антисыворотки морской свинки к F(ab)₂-фрагментам IgG кролика путем аффинной хроматографии на колонке с иммобилизованным на CNBr-сфарозе 4B («Pharmacia Fine Chemicals», Швеция) иммунохимически чистым кроличьим IgG. Рабочее разведение полученного таким образом видового конъюгата составляло 1:600—1:800. Конъюгат хранили в глицерине при температуре -20°C.

Для проведения иммуноферментного анализа раствор АВП вносили в 96-ячеечные микролашеты в объеме 0,2 мл. После инкубации в течение 16—18 ч при 4°C лунки тщательно промывали поочередно водопроводной и дистиллированной водой с добавлением в последнюю 0,1% твина-20. Далее в лунки вносили по 0,2 мл последовательных разведений исследуемых кроличьих антисывороток к вазопрессину и вновь проводили инкубацию при 37°C в течение 2 ч с последующим трехкратным отмыванием лунок в указанном режиме. Контролем служили соответствующие разведения нормальной кроличьей сыворотки (НКС). Образовавшийся комплекс вазопрессин — антитела к вазопрессину проявляли видovým конъюгатом в рабочем разведении (объем 0,2 мл, инкубация 1 ч при 37°C). Субстратом для ферментативной реакции служила смесь ортофенилендиамина с перекисью водорода (5 мг ортофенилендиамина в 50 мл 0,05 М цитратно-фосфатного буфера рН 4,7 и 5 мкл 36% H_2O_2), реакция продолжалась 8—10 мин, после чего ее останавливали добавлением 0,05 мкл 50% серной кислоты. Изменение окраски хромогенного субстрата, характеризующее пероксидазную активность, фиксировали с помощью микрофотометра («Titertek Uniskan», Великобритания), определяя оптическую плотность при длине волны 492 нм.

Результаты и обсуждение

В предварительных опытах определяли оптимальные значения рН комплексирующего буфера и концентрации используемого для иммобилизации на полистироле АВП.

В первом случае изучали различные буферные системы: 0,85% раствор NaCl рН 3,3; 0,01 М фосфатный буферный раствор (ФБР) рН 7,4; 0,01 М карбонатно-бикарбонатный буферный раствор рН 9,6. Наибольшая

оптическая плотность продукта ферментативной реакции, соответствующая наибольшему количеству белка, адсорбированного на твердой фазе, регистрировалась при использовании 0,01 М ФБР рН 7,4 (рис. 1), который и был отобран для дальнейшей работы.

Важным фактором, определяющим чувствительность и специфичность реакции, является количество сорбированного на полистироле АВП. Выбор оптимальных концентраций АВП для активации проводили в реакции с иммунной и нормальной кроличьей сывороткой в разведении 1 : 10 000. Из рис. 2 видно, что оптическая плотность продукта ферментативной реакции растет по мере увеличения концентрации АВП от 1 до 20 мкг/мл; последующее увеличение дозы белка не приводит к повышению чувствительности реакции, что указывает на полное насыщение гидрофобных связей твердофазного полистиролового носителя. Малые концентрации АВП давали низкий уровень сигнала. Поэтому в последующих опытах для процесса активации полистирола использовали растворы АВП в концентрации 10 мкг/мл.

Подобранные оптимальные параметры реакции были применены для определения титра антител к вазопрессину в сыворотках иммунизированных кроликов. Иммунные и контрольные сыворотки последовательно разводили в 2 раза с 1 : 2000 до 1 : 64 000, за титр принимали то последнее разведение кроличьей антисыворотки к вазопрес-

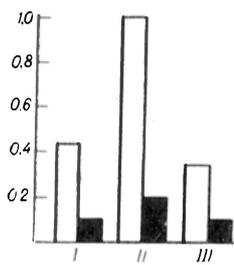


Рис. 1

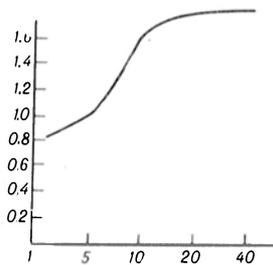


Рис. 2

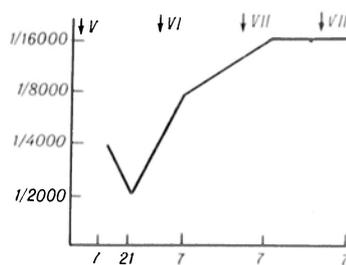


Рис. 3

Рис. 1. Влияние рН буфера на эффективность сенсibilизации твердой фазы АВП. По оси ординат — оптическая плотность, при λ 492 нм; белые столбики — иммунная сыворотка, черные — НКС. I — рН 9,6; II — рН 7,4; III — рН 3,3.

Рис. 2. Выбор концентрации АВП, иммобилизованного на твердой фазе. По оси абсцисс — концентрация АВП (в мкг/мл); по оси ординат — оптическая плотность при λ 492 нм.

Рис. 3. Динамика накопления антител к АВП в процессе гипериммунизации (кролик № 145). По оси абсцисс — дни после очередной иммунизации; по оси ординат — разведения сыворотки. Стрелками указаны номера иммунизаций.

сину, при котором оптическая плотность продукта ферментативной реакции в 3 раза и более превышала интенсивность ферментативной реакции в лунках с соответствующим разведением НКС. Результаты титрования отличались хорошей воспроизводимостью.

В качестве примера на рис. 3 представлена динамика накопления антител к АВП, установленная в результате одномоментного титрования парных сывороток, полученных после пробных кровопусканий в процессе гипериммунизации одного из кроликов. Антитела к вазопрессину у этого животного-продуцента обнаруживались после 5-й иммунизации в титре 1 : 4000; последующие инъекции антигена вызывали нарастание концентрации антител (1 : 16 000 после 8-й инъекции).

Получено несколько серий антивазопрессиновой сыворотки с титром в ИФА от 1 : 10 000 до 1 : 20 000. Проверка активности полученного препарата методом радиоиммунного анализа подтвердили данные ИФА (титр сыворотки в РИЛ составил 1 : 10 000).

Антисыворотка к вазопрессину не давала перекрестных реакций с ангиотензином, миоглобином и инсулином, однако сыворотка от некоторых продуцентов реагировала с окситоцином — пептидным гормоном, близким по антигенным свойствам с вазопрессин. Для повышения специфичности антисыворотки необходимо либо отбирать отдельные ее образцы, не реагирующие с окситоцином, либо извлекать «чистые» антитела к вазопрессину путем аффинной хроматографии,

либо использовать в анализе антисыворотку, предварительно «истощенную окситоцином».

ЛИТЕРАТУРА

1. Резников А. Г. Методы определения гормонов: Справочное пособие. — Киев, 1980.
2. Beardswell C. G. // J. clin. Endocr. — 1971. — Vol. 33, N 2. — P. 254—260.
3. Christen J. D., Jensen S. E. // Acta endocr. (Kbh.). — 1978. — Vol. 87, N 2. — P. 283—291.
4. Forsling M. L., Henneberry H., Slater J. D. H. // J. Physiol. (Lond.). — 1984. — Vol. 349. — P. 2.
5. Francoise R. R., Bernard L.-H. P., Chapleur-Chateau M. M. et al. // J. Neuroimmunol. — 1985. — Vol. 9, N 3—4. — P. 205—220.
6. Jones C. A., Zamboni G., Hanley M. R. // Regul. Peptides. — 1985. — Vol. 11, Suppl. N 4. — P. 71—73.
7. Moore G., Lutterodt A., Burford G., Lederis K. // Endocrinology. — 1977. — Vol. 10, N 5. — P. 1421—1435.
8. Oyama S. N., Kagan A., Glick S. M. // J. clin. Endocr. — 1971. — Vol. 33, N 5. — P. 739—744.
9. Wilson M. B., Nakane P. K. // Immunofluorescence and Related Staining Techniques. — Amsterdam, 1980. — P. 215—244.

Поступила 18.12.86

IMMUNOENZYME ASSAY IN ESTIMATION OF SPECIFIC ACTIVITY OF THE ANTISERUM AGAINST VASOPRESSIN

T. A. Menyavtseva, G. M. Ralner, T. D. Limaeva, V. P. Masenko

Institute of Vaccines and Blood Sera, Ministry of Public Health of the USSR, Tomsk

A procedure is described for production of antiserum against peptide hormone Arg-vasopressin. A sensitive immunoenzyme assay is developed for estimation of the antiserum activity and specificity.

УДК 57.083.34

С. М. Крылова, И. Ю. Сахаров, М. А. Слинкин, А. П. Савицкий,
А. Л. Клибанов, В. П. Торчилин, И. В. Березин

МЕТОД ФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО ИММУНОАНАЛИЗА С ВРЕМЕННЫМ РАЗРЕШЕНИЕМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЕВРОПЕЙСКОЙ МЕТКИ И ПОЛИМЕРНОГО КОМПЛЕКСОНА

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Всесоюзный кардиологический научный центр АМН СССР, НИИЛ биологических веществ гидробионтов Минздрава СССР, Москва

Современные методы иммунохимического анализа являются одним из наиболее важных достижений в развитии биохимических методов последних лет.

Они нашли широкое применение в медицинской практике для диагностики различных заболеваний и лекарственной терапии при необходимости опре-

деления веществ в количестве нескольких наногرامмов в образце.

Среди методов иммуноанализа, различающихся системой детекции, широко используют иммунофлюоресцентный метод. Он является простым, быстрым и воспроизводимым. К преимуществам флюоресцентной метки следует отнести ее стабильность в течение длительного времени, а также отсутствие радиационного повреждения меченого антигена (или антитела), опасности облучения [10, 11]. При разработке новых методов флюоресцентного иммуноанализа наиболее общей задачей является минимизация уровня фона, обусловленного собственной флюоресценцией и светорассеянием большинства анализируемых биологических жидкостей. Эту задачу удалось решить методом флюоресцентного иммуноанализа с временным разрешением (ФИАВР) при использовании комплексов редкоземельных металлов, обладающих уникальными спектральными свойствами, в частности длительным временем жизни в возбужденном состоянии [2, 4, 8]. В этом методе образец возбуждают коротким импульсом света (2—10 мкс) с частотой 100—1000 Гц и через определенный промежуток времени (100—400 мкс) с момента возбуждения измеряют интенсивность флюоресценции. За это время флюоресценция фона, рассеянный свет, имеющие значительно меньшее время жизни, менее 10 мкс, гаснет, а измеряемый сигнал является истинной флюоресценцией европиевой метки [12]. Таким образом достигается высокая чувствительность анализа.

При использовании европия в качестве метки в иммуноанализе необходимо получение комплексов диазофенил — ЭДТА — Eu или изотиоцианатофенил — ЭДТА — Eu с антителами, получение которых довольно трудоемко и требует стадии хроматографического разделения, без которой существенную роль играет неспецифическая сорбция Eu при проведении твердофазного иммуноанализа. Для сохранения активности антител оптимальным является соотношение Eu/белок в конъюгате 2—3. Это ограничивает чувствительность анализа. Нами предлагается новый метод с использованием модифицированного большим количеством остатков хелатирующего агента (ДТПА) и молекул биотина —

полимер, который способен связываться с биотинилированными молекулами антитела через авидиновый мостик. Целью разработки нового метода является повышение чувствительности и упрощение известного метода.

Методика

В работе были использованы бычий сывороточный альбумин (БСА), («Serva», ФРГ), авидин («Sigma», США), тритон X-100 («Fergack», Западный Берлин), триоктилфосфин-оксид (ТОПО) («Aldrich», США), 2,2-азиноди-1,3-этилбензилтиазолин-сульфонат (АБТС) («Boehringer», ФРГ), 3-нитробензолсульфонилкислота (ТНБС) («Sigma», США), N-оксисукцинимидный эфир биотина (ОСИБ) («Sigma», США), полиэтиленимин мол. масса 70 000 (ПЭИ) («Serva», ФРГ), диэтилен триаминопентауксусная кислота (ДТПА) («Sigma», США), перекись водорода, кислоты, щелочи, соли (компоненты буферных растворов) марки ос.ч. По известным методикам были получены β-нафтил-3-флюороацетилацетон [9], конъюгат биотин — пероксидаза [7].

В работе были использованы полистирольные микропланшеты («Dunatetsk», Швейцария). Все растворы готовили по навеске с использованием деионизированной на установке Millipore (США) воды.

Измерение pH проводили на pH-метре ОР-211/1 («Radelkis», Венгрия) с точностью до 0,01 единицы pH. Оптическую плотность растворов на микропланшетах измеряли на автоматическом адсорбциометре («Dunatetsk», США) при длине волны 414 нм. Флюоресцентный сигнал с временным разрешением измеряли на установке, собранной в Институте биохимии им. А. Н. Баха АН СССР и аналогичной описанной в работе [12]. Частота вспышек азотного лазера ЛГИ-21 100 Гц, задержка 300 мкс, счет импульсов 1 мс.

Титр антисывороток кролика против иммуноглобулина IgG мыши определяли непрямым иммуноферментным методом. На поверхности полистирольного микропланшета сорбировали раствор IgG мыши, содержащий 10 мкг белка в 0,1 М карбонатном буфере pH 9,2 (буфер 1), в течение 1 ч при 37°C и затем при 4°C в течение ночи. Лунки микропланшета отмывали 1 мМ трис-HCl pH 7,4 с 0,15 М NaCl и 0,01 % тритона X-100 (буфер 2). Затем лунки микропланшета заполняли 0,5 % раствором бычьего сывороточного альбумина в буфере 1 на 2 ч при 37°C. После отмывки буфером 2 проводили инкубацию с IgG кролика против IgG мыши в течение 2 ч при 37°C, используя серию двукратных последовательных разведений в буфере 2. В качестве контрольного эксперимента на этой стадии проводили инкубацию тех же растворов в лунках микропланшета, на поверхности которых предварительно не был адсорбирован антиген. В отмытых буфером 2 лунках микропланшета проводили инкубацию антител козла против иммуноглобулина кролика, меченных пероксидазой (10 мкг/мл), в буфере 2 в течение 1 ч при 37°C. После отмывки буфером 2 детекцию проводили по реакции окисления АБТС; субстратная смесь имела конечные концентрации перекиси водорода 10^{-4} М, АБТС

$2 \cdot 10^{-4}$ М рН 4,5. Измерение оптической плотности проводили через 15 мин после окончания реакции.

Комплекс биотин — ПЭИ — ДТПА был получен следующим образом. К раствору 2,5 мг ПЭИ в 0,1 М карбонатном буфере рН 8,2 постепенно добавляли 44 мкл диметилсульфоксида, содержащего 4 мг циклического ангидрида ДТПА, полученного по методике [5]. После диализа полученной смеси против 50 мМ фосфата калия рН 8,0, к ней добавляли 75 мкл раствора диметилсульфоксида, содержащего 2,8 мг ОСИБ. При этом, как показал анализ с ТНБС [13], циклический ангидрид ДТПА модифицировал 53 %, а ОСИБ 30 % NH_2 -групп ПЭИ.

Конъюгат антитело — биотин получали следующим образом. К 850 мкл раствора антител в 50 мМ калий фосфатном рН 8,0 (концентрация 1,8 мг/мл), добавляли 85 мкл раствора ОСИБ в диметилсульфоксиде (1,65 мг/мл). Избыток биотина удаляли диализом против 0,01 М калий-фосфатного буфера с 0,15 М NaCl рН 7,4, с трехкратной сменой буфера. Как показал анализ с ТНБС, при этом модифицировалось 25 % NH_2 -групп антител.

При получении комплекса биотин — ПЭИ — ДТПА — Eu реакцию биотин — ПЭИ — ДТПА с нитратом европия проводили в течение 15 мин при комнатной температуре в 1 мМ трис-НСI буфере рН 7,4. Соотношение реагентов выбирали таким образом, чтобы отношение ДТПА/Eu составляло 1/1.

Метод проведения твердофазного иммуноанализа состоял из следующих стадий. Сорбцию антигена (иммуноглобулина мыши) проводили из буфера 1 в течение 1 ч при 37°C и затем при 4°C в течение ночи. После отмывки буфером 2 в лунках микропланшета проводили инкубацию 0,5 % ВСА в буфере 1—2 ч при 37°C . Отмытые лунки микропланшета заполняли раствором конъюгата антитело — биотин в буфере 2 на 1 ч при 37°C . В качестве контрольного эксперимента на этой стадии проводили инкубацию тех же растворов в лунках микропланшета, на поверхности которых не сорбировали антиген. После отмывки буфером 2 лунки заполняли раствором авидина в буфере 2 на 1 ч при 37°C . После

очередной отмывки буфером 2 проводили инкубацию с раствором биотин — ПЭИ — ДТПА — Eu в течение 1 ч при 37°C .

Детектирование флуоресцентного сигнала редкоземельной метки проводили после десорбции европия в течение 15 мин с поверхности в раствор, содержащий 10^{-6} М β -NТА $5 \cdot 10^{-5}$ М ТОПО, 0,025 % тритон X-100 рН 3,2.

Результаты и обсуждение

Разработанный нами новый метод проведения твердофазного иммунофлуоресцентного анализа предполагает использование нового способа связывания редкоземельной метки с антителами. Этот метод включает следующие стадии (рис. 1): адсорбция на поверхности полистирольного микропланшета иммуноглобулина мыши, выбранного в качестве антигена (стадия 1); проведение иммунологической реакции связывания антигена с биотинилированным антителом (иммуноглобулин кролика против мыши — Ат, стадия 2); связывание биотинилированных антител с авидином (стадия 3); связывание авидина с комплексом биотин — ПЭИ — ДТПА — Eu (стадия 4); десорбция европия с поверхности микропланшета в раствор и его детекция (стадия 5). После каждой из стадий 1—4 проводили тщательную отмывку лунок микропланшета от несвязавшихся реагентов.

Известно, что ранее в методе радиоиммунодиагностики для повышенной удельной радиоактивности Ат были использованы хелатные полимеры [1]. С другой стороны, известен пример применения полимера, содержащего

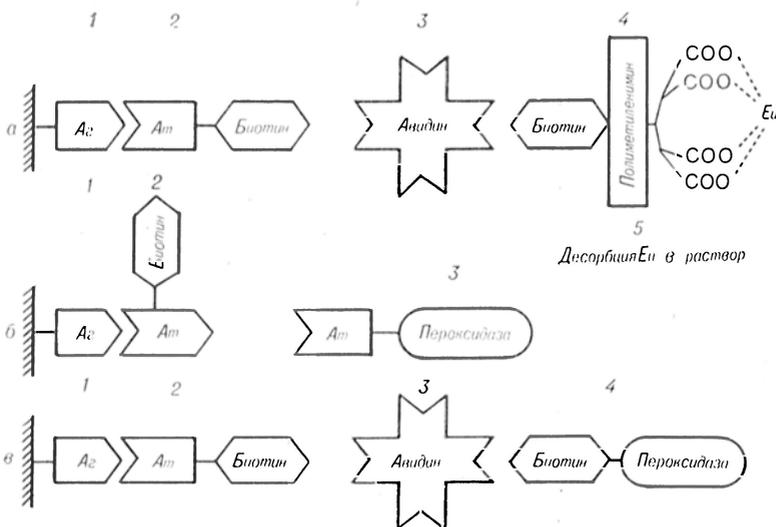


Рис. 1. Схема проведения твердофазного иммуноанализа. а — с использованием комплекса биотин — ПЭИ — ДТПА — Eu (ФИАВР); б — с использованием конъюгата IgG — пероксидаза, где IgG — иммуноглобулин козла против иммуноглобулина кролика (ИФА); в — с использованием конъюгата биотин-пероксидаза. Цифрами обозначены номера стадий (см. текст).

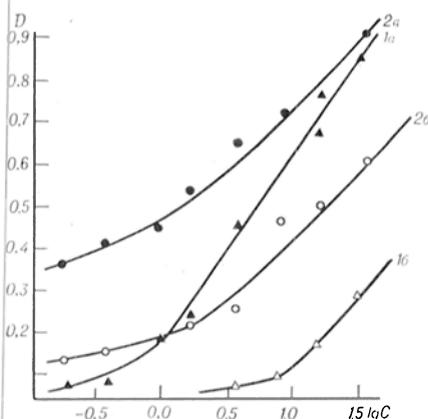


Рис. 2. Кривые разведения антисывороток кролика к IgG мыши.

1а — иммуноферментный анализ с использованием пероксидазного конъюгата иммуноглобулина козла против кролика; 2а — иммуноферментный анализ с использованием мостиковой структуры с авидином и биотинилированной пероксидазой; 1б, 2б — контроли соответствующие; иммуноферментные анализы с исключением стадий адсорбции антисыворотки кролика к IgG мыши. По оси ординат: D — оптическая плотность; по оси абсцисс: C — концентрация (в мкг/мл).

большое число флуоресцирующих молекул, для повышения чувствительности анализа. Из-за эффекта концентрационного тушения высокой локальной концентрацией метки на полимере необходимо было использовать такие типы связей метка — полимер, которые легко гидролизуются при последующей регистрации флуоресценции [3].

В предлагаемом нами методе ФИАВР заключительной стадии детекции флуоресцентного сигнала предшествует стадия диссоциации европия

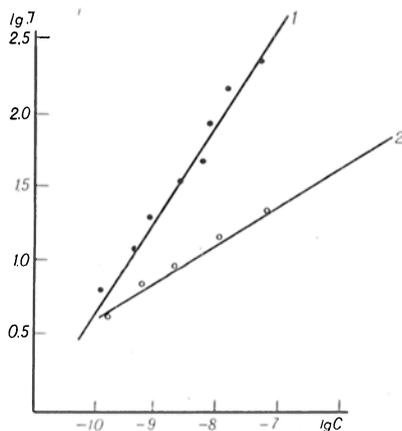


Рис. 3. Кривая разведения комплекса биотин—ПЭИ—ДТПА—Eu на стадии 4 при разведении твердофазного ФИАВР (1); контроль, анализ по схеме а (см. рис. 1) с исключением стадии 2(2).

из хелатного комплекса в раствор, которую проводят после связывания полимерного комплексона с антителом, при этом эффект концентрационного тушения флуоресценции европия на полимере не играет никакой роли. Для высокоэффективного связывания биотинилированного антитела и биотинилированного полимера, несущего хелатирующие группы, в качестве «мостика» использовали авидин, поливалентный белок, одна молекула которого способна связывать четыре молекулы биотина с $K=10^{-15}$ М [6].

Путем последовательной вариации параметров общей схемы были оптимизированы концентрация реагентов для каждой из стадий анализа (см. рис. 1). Оптимальную концентрацию Ат определяли путем последовательного разведения при фиксированной концентрации IgG мыши (10 мкг/мл) на стадии адсорбции. Определение проводили с использованием иммуноферментного метода. В первом варианте проявление адсорбированных антител проводили с использованием пероксидазного конъюгата иммуноглобулина козла против иммуноглобулина кролика (см. рис. 1), во втором — с использованием мостиковой структуры с авидином и биотинилированной пероксидазой (см. рис. 1). При сравнении кривых разведения, полученных в каждом из вариантов, видно, что титр не изменяется. Таким образом, образование мостиковой структуры через авидин на титр Ат не влияет (рис. 2).

Оптимальную концентрацию авидина определяли по кривым разведения, полученным при фиксированной концентрации остальных компонентов (см. рис. 1). В качестве оптимальной была выбрана концентрация авидина, при которой отношение сигнал/фон было максимальным (2—20 мкг/мл).

Таким же способом был найден диапазон оптимальной концентрации биотинилированного полимера, содержащего европий, который составил $5 \cdot 10^{-7}$ — $5 \cdot 10^{-6}$ М (рис. 3).

После оптимизации концентрации полимера была проведена оптимизация концентрации Ат, аналогичная описанной (см. рис. 2), но с флуоресцентной детекцией на стадии 4. Обращает на себя внимание различие в характере кривых разведения. При использовании биотинилированного полимера появляется четко выраженный

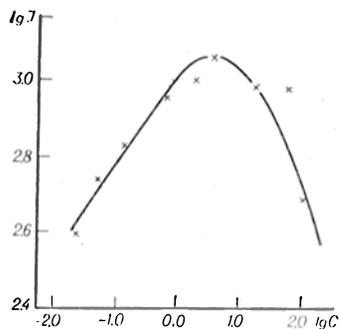


Рис. 4. Кривая разведения конъюгата антигено — биотин на стадии 2 при проведении твердофазного ФИАВР по схеме а (см. рис. 1).

максимум (рис. 4). Поскольку одна молекула полимера содержит несколько десятков молекул биотина, то по мере увеличения степени заполнения поверхности молекулами Ат и адсорбированного на них авидина, одна молекула полимера, имеющая достаточно большие линейные размеры, мо-

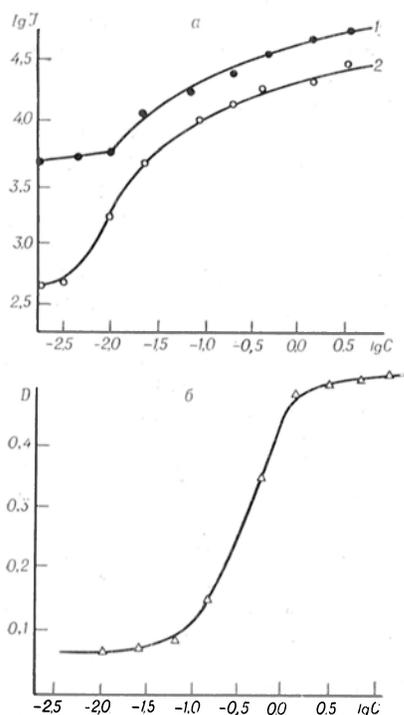


Рис. 5. Калибровочные кривые для определения концентрации иммуноглобулина мыши. а — кривые, полученные при проведении иммунофлюоресцентного анализа по схеме а (см. рис. 1); 1 — концентрация Еу в комплексе биотин — ПЭИ — ДТПА — Еу составляет $5 \cdot 10^{-7}$ М, молярное соотношение Еу/ДТПА равно 1/1; 2 — концентрация Еу в комплексе биотин — ПЭИ — ДТПА — Еу составляет $5 \cdot 10^{-8}$ М, молярное соотношение Еу/ДТПА равно 1/10; б — кривые, полученные при проведении анализа по схеме в (см. рис. 1).

жет взаимодействовать с несколькими молекулами авидина, приводя к снижению интенсивности флюоресцентного сигнала, во-первых, за счет стерической экранировки, во-вторых, за счет возможных конформационных изменений полимера, сопровождающихся изменением константы связывания европия с полимером.

После подбора оптимальных условий был проведен анализ иммуноглобулина мыши, адсорбированного на поверхности полистирольного микропланшета в интервале концентрации от 100 до 0,0035 мкг/мл. Анализ проводили по методу, описанному выше, с использованием компонентов в подобранном диапазоне концентрации. Вид полученной кривой показан на рис. 5. Чувствительность метода составляет 0,01 мкг/мл. Если в анализе использовать комплекс полимер — Еу, в котором молярное соотношение Еу/ДТПА составляет 1/10, интенсивность фоновой флюоресценции снижается (см. рис. 5). Более высокая концентрация европия в комплексе с полимером, по-видимому, ведет к изменению конформации полимера, к его разворачиванию, при этом константа связывания европия с полимером может уменьшаться, что приводит к увеличению количества европия, связавшегося неспецифически с полистирольной поверхностью микропланшета. Возможно и другое объяснение в различии калибровочных кривых на рис. 5. Весьма вероятно, что уже при молярном соотношении Еу/ДТПА, равном 1/10, европий связывается практически со всеми доступными остатками ДТПА, так что дальнейшее повышение содержания европия в комплексе приводит к росту его неспецифической адсорбции на микропланшете.

Для сравнения иммунофлюоресцентного и иммуноферментного методов анализа на последней стадии предложенной схемы вместо комплекса полимер — Еу был использован конъюгат биотин — пероксидаза. Проявление ферментативной метки проводили с использованием реакции окисления АБТС (см. рис. 5). Чувствительность метода 0,11 мкг/мл, что на порядок ниже, чем при использовании флюоресцентной метки.

Таким образом, предложен метод твердофазного иммунофлюоресцентного анализа с использованием нового

полимерного комплексона, что позволяет упростить получение реагентов для анализа. При этом метод отличается высокой чувствительностью, на порядок превосходя аналогичный ферментативный способ детекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Торчилин В. П., Ко Б. А., Клибанов А. Л. и др. // Бюл. экспер. биол. — 1986. — № 7. — С. 63—65.
2. Eskola J. U., Nevalainen T. J. // Clin. Chem. — 1983. — Vol. 29, N 10. — P. 1777—1780.
3. Exlay D., Ekeke J. L. // J. Steroid. Biochem. — 1981. — Vol. 14. — P. 1297—1302.
4. Hemmila J., Dakubu S., Mukkala V. N. et al. // Analyt. Biochem. — 1984. — Vol. 137. — P. 335—343.
5. Hnatowich D. V., Layne W. W., Childs R. L. // Int. J. Appl. Radiat. Isotop. — 1982. — Vol. 33. — P. 327—332.
6. Green N. N. // Advanc. Protein. Chem. — 1975. — Vol. 29. — P. 85.
7. Gnedson J. L., Ternyck T., Avameas S. // J. Histochem. Cytochem. — 1979. — Vol. 27. — P. 1131—1139.
8. Pettersson K., Siitarty H., Hemmila I., Soini E. // Clin. Chem. — 1983. — Vol. 29. — P. 60—64.
9. Red J. C., Calvin M. // J. Amer. chem. Soc. — 1950. — Vol. 72. — P. 2948—2952.

10. Siitarty H., Hemmila I., Soini E. et al. // Nature. — 1983. — Vol. 301. — P. 258—260.
11. Soini E., Hemmila I. // Clin. Chem. — 1979. — Vol. 25. — P. 353—355.
12. Soini E., Kojola H. // Ibid. — 1983. — Vol. 29. — P. 65—68.

Поступила 19.03.87

FLUORESCENT IMMUNOASSAY INVOLVING TEMPORAL DISTINCTION AS WELL AS EU LABEL AND POLYMERIC COMPLEXONE

S. M. Krylova, I. Yu. Sakharov, M. A. Slinkin, A. P. Savitsky, A. L. Klibanov, V. P. Torchilin, I. V. Berezin

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, All-Union Cardiological Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Institute of Biological Compounds from Hydrobionts, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

Recently developed solid-phase immunofluorescent assay with temporal distinction involved a newly produced procedure for binding of of the boron group label with antibodies via modified polymer, which is able to bind with antibodies across the ovidin bridge. The assay developed is more simple than the widely used procedures, it exhibits high sensitivity being superior as compared with a corresponding immunoenzyme assay by a decimal order.

УДК 616.153:[577.161.3+577.161.1.017.22]-074:543.544

Ю. В. Стукалов, Е. Н. Орлов

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕТИНОЛА, α -ТОКОФЕРОЛА, β -КАРОТИНА И СУММЫ КАРОТИНОИДОВ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Всесоюзный онкологический научный центр АМН СССР, Москва

При злокачественных новообразованиях уровень содержания витаминов А и Е в крови, в тканях опухолей, как правило, снижен [4, 6, 9, 14]. При индукции диметилбензантирацепом или другими канцерогенами рака молочной железы у экспериментальных животных назначение витаминов А и Е значительно увеличивает продолжительность жизни, снижает частоту возникновения и скорость роста опухоли [7, 8]. Наряду с этим отмечена положительная корреляция между уровнем ретинола в пище и крови пациентов [3], содержанием α -токоферола в крови [17] и степенью риска возникновения рака молочной железы. В ряде проведенных эпидемиологических исследований отмечена антиканцерогенная активность указанных витаминов при других формах рака [10, 13, 15,

16]. В связи с этим проблема первичной онкологической профилактики должна решаться с учетом необходимой обеспеченности организма витаминами [1]. Важную сторону решения данной проблемы составляет наличие соответствующих методов определения исследуемых витаминов, их предшественников или производных.

В настоящее время основным методом определения витамина А, его предшественника β -каротина и витамина Е является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Для определения указанных соединений в одном образце Вийллеумиер и соавт. использовали 3 системы ВЭЖХ одновременно, из которых каждая служила для анализа одного из компонентов [16]. Миллер и соавт. предложили 2 метода одновременного определения

витаминов А, Е и β -каротина в градиентном и изократическом режимах на обращенной фазе с применением УФ-детектора с автоматическим программным переключением длин волн [11, 12]. В наших условиях наиболее приемлемым оказался метод адсорбционной ВЭЖХ на силикагеле. Предлагаемый метод сравнительно прост, пригоден для рутинных анализов, позволяет использовать относительно дешевый сорбент и растворители, не требующие специальной очистки.

Методика

Реактивы. Ретинол, α -токоферол, β -каротин — препараты фирмы «Sigma» (США). Метанол квалификации х.ч., хлороформ, пентан, октан и бутилацетат квалификации ч. Диметилтерефталат квалификации ч. Предварительно очищали перекристаллизацией из этанола и степень чистоты определяли при помощи ВЭЖХ. Раствор диметилтерефталата в пентане (62 мкг/мл) использовали в качестве внутреннего стандарта.

Процедура экстракции. В центрифужные пробирки вносили 1 мл плазмы крови и 2 мл раствора, содержащего метанол и хлороформ в соотношении 4:1. Полученную смесь интенсивно встряхивали и после добавления к ней 200 мкл раствора диметилтерефталата трижды экстрагировали пентаном (порциями по 1 мл). Далее из объединенных экстрактов пентан удаляли током аргона, сухой остаток растворяли в 1 мл подвижной фазы (см. ниже) и раствор фильтровали через тefлоновый фильтр «Сарториус» (FPI) с диаметром пор 0,22 мкм.

Аппаратура и условия хроматографии. ВЭЖХ проводили на жидкостном хроматографе SP-8000 фирмы «Спектра-Физикс» (США). Разделение компонентов осуществляли в изократическом режиме на колонке размером 250×4,6 мм фирмы «Du Pont» (США), упакованной сорбентом «Зорбакс Сил» фирмы «Du Pont» с размером частиц 7 мкм. Предколонка (25×2 мм) была упакована сорбентом «Копелл ОДС» фирмы «Ватман» (США) с размером частиц 30—40 мкм. При разделении ретинола, α -токоферола и каротиноидов в качестве подвижной фазы использовали смесь (93:7) октана и бутилацетата (скорость потока 2 мл/мин, температура колонки 40 °С), при определении β -каротина в качестве подвижной фазы использовали октан (скорость потока 2 мл/мин, температура колонки комнатная). Объем анализируемых образцов составлял 100 мкл. Регистрацию анализируемых компонентов осуществляли с помощью УФ-детектора фирмы «Спектра-Физикс», модель 770. α -Токоферол и диметилтерефталат определяли при 295 нм, ретинол — при 330 нм, каротиноиды и β -каротин — при 452 нм. Режим работы был построен таким образом, что сначала при автоматическом переключении длин волн производился анализ 8—12 исследуемых образцов на содержание в них α -токоферола и ретинола, а затем после ручного переключения детектора на 452 нм производился анализ этих же образцов на

содержание каротиноидов. На заключительном этапе анализа при 452 нм в исследуемых образцах определяли содержание β -каротина. Время удерживания α -токоферола, диметилтерефталата и ретинола составляло соответственно 3,8, 6,2 и 18 мин, каротиноидов и β -каротина — соответственно 1,5 и 2,5 мин. Таким образом, полный анализ одного образца на содержание α -токоферола, ретинола, каротиноидов и β -каротина требовал в среднем 25 мин.

Результаты и обсуждение

В первоначальных экспериментах при разделении ретинола, α -токоферола и β -каротина в системе октан — бутилацетат использовали градиентный режим. Однако при высокой чувствительности детектора (0,02 опт. ед. на всю шкалу) применение оптически недостаточного чистых растворителей приводило к постоянному смещению базовой линии и, следовательно, к неправильному обсчету площадей пиков, что существенно понижало точность метода. В связи с этим нами был выбран изократический режим. Оптимальный состав подвижной фазы находили путем варьирования соотношения его компонентов: октан — бутилацетат в диапазоне от 70:30 до 95:5. Полученные данные приведены на рис. 1. С точки зрения производительности рутинного анализа опти-

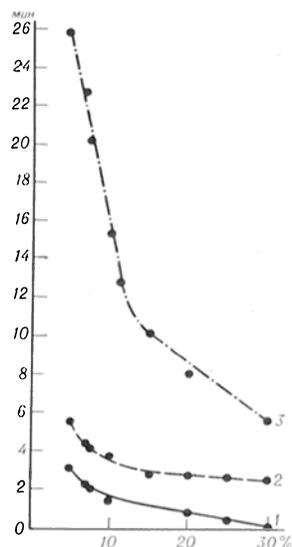


Рис. 1. Влияние состава подвижной фазы на время удерживания β -каротина (1), α -токоферола (2) и ретинола (3).

По оси абсцисс — содержание бутилацетата в подвижной фазе (в %); по оси ординат — время удерживания (в мин).

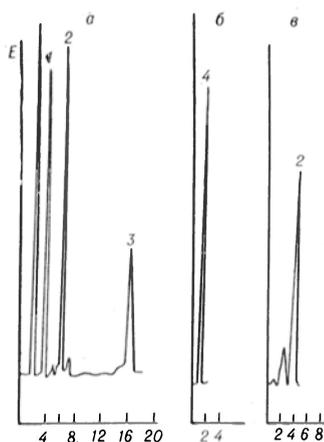


Рис. 2. Хроматограммы экстракта плазмы крови.

По оси абсцисс — время удерживания (в мин). а — в качестве подвижной фазы использовали смесь октан — бутилацетат (93 : 7), на 12 мин осуществляли автоматическое переключение длины волны (E) с 295 на 330 нм, 1 — α -токоферол, 2 — диметилтерефталат, 3 — ретинол, 4 — сумма каротиноидов. б — подвижная фаза та же; E — 452 нм. в — в качестве подвижной фазы использовали октан; E — 452 нм.

мальным является содержание бутилацетата в подвижной фазе, соответствующее 20—25 %. При этом время анализа не превышает 9 мин. Следует отметить, что все компоненты смеси разделяются в этом случае между собой. Однако, поскольку в экстрактах плазмы содержатся и другие соединения, пики которых перекрываются на хроматограммах с пиками α -токоферола, использовали подвижную фазу с соотношением октан — бутилацетат 93 : 7. При этом обеспечивается удовлетворительное время удерживания и наблюдается полное разделение компонентов плазмы (рис. 2).

Разработка высокочувствительного метода анализа исследуемых соединений подразумевает их спектрофотометрическое определение при длинах волн, соответствующих максимумам

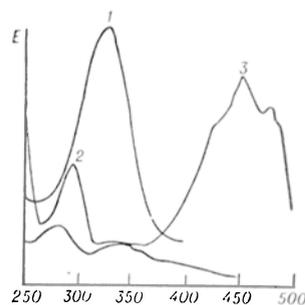


Рис. 3. УФ-спектры (поглощения E), ретинола (1), α -токоферола (2) и β -каротина (3) в системе октан — бутилацетат (93 : 7).

По оси абсцисс — длина волны (в нм).

поглощения. УФ-спектры поглощения β -каротина, α -токоферола и ретинола в системе октан — бутилацетат (93 : 7), снятые на жидкостном хроматографе 1084 В фирмы «Хьюлетт-Паккард» (США), представлены на рис. 3. Приведенные данные свидетельствуют о том, что β -каротин имеет максимум поглощения при 452 нм, α -токоферол — при 295 нм, ретинол — при 330 нм.

Для определения калибровочных коэффициентов определяемых соединений, выяснения диапазона линейности и точности разрабатываемого способа нами был проанализирован ряд стандартных образцов, содержащих различные концентрации исследуемых соединений (см. таблицу). На основании калибровочных графиков были определены коэффициенты линейной регрессии по методу наименьших квадратов, установлены наименьшие определяемые количества витаминов А, Е и β -каротина в соответствии с предложенным методом [2, 5]. Приведенные данные свидетельствуют о том, что линейность соблюдается во всем исследованном диапазоне concentra-

Характеристика предложенного метода определения β -каротина, α -токоферола и ретинола

Исследуемый показатель	β -каротин	α -токоферол	Ретинол
Калибровочные коэффициенты	$8,2 \cdot 10^{-3} \pm 5,1 \cdot 10^{-4}$	$8,0 \cdot 10^{-1} \pm 1,0 \cdot 10^{-2}$	$5,0 \cdot 10^{-2} \pm 1,6 \cdot 10^{-3}$
Коэффициенты корреляции	0,998	0,999	0,999
Стандартная ошибка аппроксимации	$2,9 \cdot 10^{-3}$	$9,0 \cdot 10^{-3}$	$4,5 \cdot 10^{-4}$
Наименьшее определяемое количество, мкг/мл	0,154	0,400	0,023
Степень извлечения, %	99,5	99,3	99,6

Примечание. Степень извлечения диметилтерефталата составляла 80%.

ний исследуемых соединений. Об этом же свидетельствуют и коэффициенты корреляции. Коэффициенты вариации находятся в пределах 0,5—2 %. По разработанному нами способу в плазме крови 10 здоровых доноров были определены уровни содержания исследуемых веществ. Содержание ретинола в расчете на 1 мл плазмы крови составляло $0,312 \pm 0,046$ мкг, α -токоферола — $7,482 \pm 1,636$ мкг, β -каротина — $0,298 \pm 0,087$ мкг и каротиноидов — $0,807 \pm 0,251$ мкг (значения $(\bar{x} \pm tS_{\bar{x}}$ при $p=0,05$). Эти результаты находятся в соответствии с литературными данными [11, 12]. Наименьшие определяемые количества позволяют использовать данный метод для рутинных эпидемиологических исследований.

Таким образом, разработан высокочувствительный способ рутинного определения α -токоферола, ретинола, каротиноидов и β -каротина в одной пробе, который отличается простотой, точностью, хорошей воспроизводимостью. Метод высокопроизводителен, относительно дешев, позволяет использовать реактивы без специальной очистки, колонка выдерживает до 1000 анализов.

За критические замечания при выполнении работы и ее обсуждение приносим благодарность доктору биологических наук Ю. В. Букину.

ЛИТЕРАТУРА

1. Букин Ю. В. // Вопр. онкол. — 1986. — № 11. — С. 35—47.
2. Гордон А., Форд Р. Спутник химика, Мир. — 1976. — С. 156.
3. Каратаева Н. С. // Экспер. онкол. — 1986. — № 3. — С. 23—31.
4. Морозкина Т. С. // Там же. — С. 3—10.

5. Руководство по аналитической химии: Пер. с нем. — М., 1975. — С. 16—27.
6. Audisio M., Dante O., Fidanza Fr., Villami C. // Boll. Soc. ital. Biol. sper. — 1985. — Vol. 61, N 3. — P. 467—474.
7. Black M. G., Zachrav R. E., Dion A. S., Katz M. // Vitamins, Nutrition and Cancer. — Basel, 1984. — P. 136—146.
8. Cook M. G., McNamara J. // Analyst. — 1980. — Vol. 40, N 4. — P. 1329—1331.
9. Friedman G. D. // Amer. J. Epidem. — 1986. — Vol. 123, N 5. — P. 781—789.
10. Kummet T., Meyskens F. L. // Nutr. Cancer. — 1983. — Vol. 10. — P. 281—289.
11. Miller K. W., Lorr N. A., Yang C. S. // Analyt. Biochem. — 1984. — N 138. — P. 340—346.
12. Miller K. W., Yang C. S. // Ibid. — 1985. — N 145. — P. 21—28.
13. Marshall L. // Int. Hlth Magaz. — 1983. — Vol. 4. — P. 14—15.
14. Palgi A. // Nutr. Cancer. — 1984. — Vol. 6, N 2. — P. 105—120.
15. Pelo R., Doll R., Buckley J. D., Sporn M. B. // Nature. — 1981. — Vol. 290. — P. 201—208.
16. Rensburg S. I. // J. nat. Cancer Inst. (Wash.) — 1981. — Vol. 67. — P. 251—273.
17. Vuilleumier J.-P., Keller H. E., Gysel D., Hunziker F. // Int. J. Vitam. Nutr. Res. — 1983. — Vol. 53. — P. 265—272.
18. Wald N., Boreham J., Hayward J. L. et al. // Brit. J. Cancer. — 1984. — Vol. 49, N 3. — P. 321—324.

Поступила 08.04.81

ESTIMATION OF RETINOL, α -TOCOPHEROL, β -CAROTENE AND TOTAL CAROTINOIDS USING HIGHLY EFFECTIVE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Yu. V. Stukalov, E. N. Orlov

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

The problem of primary oncophylaxis might be settled basing on maintaining of essential vitamins level in a body. Development of corresponding methods for estimation of vitamins, their precursors and derivatives is of importance in the problem solution.

УДК 616-008.839.634-078.73

Г. М. Ротт, Г. М. Лапина, И. В. Рожинская, О. А. Летова,
Т. В. Блинова, А. М. Поверенный

РАЗРАБОТКА И СОПОСТАВЛЕНИЕ ИНФОРМАЦИОННОЙ ЗНАЧИМОСТИ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИОГЛОБИНА: ТВЕРДОФАЗНЫЙ ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ И ГЕМАГГЛЮТИНАЦИОННЫЙ ТЕСТ

НИИ медицинской радиологии АМН СССР, Обнинск, НИИ эпидемиологии и микробиологии Минздрава РСФСР, г. Горький

В последние годы установлено важное клиническое значение определения уровня миоглобина (МГ) в крови при остром инфаркте миокарда [7, 16].

Миоглобиновый тест привлекает внимание кардиологов и специалистов других областей медицины ввиду того, что гипермиоглобинемия и миоглоби-

нурия входят в число важных и самых ранних признаков нарушения целостности мембран мышечных волокон. Гипермиоглобинемия отмечена, например, при травмах [8], операционных вмешательствах [4], нейрорегуляторных нарушениях [9, 19, 23], инфекционных заболеваниях [13], ожогах [17], нарушениях метаболизма углеводов и липидов [10, 14], эндокринных нарушениях [15] и т. п.

В связи с этим актуальной задачей остается разработка специфических методов обнаружения МГ в биологических жидкостях. Продолжающиеся работы по усовершенствованию методов анализа МГ направлены, во-первых, на уменьшение времени анализа при сохранении его высокой чувствительности, во-вторых, на упрощение техники анализа с тенденцией к его проведению без сложного дорогостоящего оборудования.

В настоящей работе сопоставлены разработанные нами гемагглютинационный тест на основе препарата «Диагностикум эритроцитарный для выявления миоглобина иммуноглобулиновый сухой», отвечающего требованиям простоты и быстроты выполнения анализа при высокой чувствительности определения, и твердофазный эзимоиммунологический метод обнаружения количественного содержания МГ.

Методика

Выделение и очистку МГ человека проводили, как описано в работе [2]. Полученный раствор белка замораживали порциями и хранили при -20°C .

Антимиоглобиновая сыворотка была получена путем 6-кратной иммунизации овец с интервалами между циклами 7—10 дней. Разовую дозу антигена на одно животное готовили эмульгированием 1 мл полного адьюванта Фрейнда («Calbiochem», США) и 1 мг МГ в 1 мл физиологического раствора. Эмульсию вводили внутривенно в несколько точек. На 7-й день после последнего цикла брали кровь. Наличие антител (АТ) и данные о моноспецифичности анtimiоглобиновой сыворотки подтверждены при изучении ее свойств во встречном электрофорезе.

Специфические АТ против МГ человека были выделены методом аффинной хроматографии на матрице сефарозы 4В («Pharmacia», Швеция) с ковалентно связанным МГ человека. Иммунизацию МГ на сефарозе 4В осуществляли по известной схеме [6] с помощью предварительной активации матрицы бромцианом («Merck», ФРГ) [20]. Специфические АТ элюировали с иммуносорбента 0,1 М глициновым буфером рН 2,3. Концентрацию анtimiоглобиновых АТ устанавливали методом Лоури [21]. АТ хранили при -20°C

до момента их использования.

При исследованиях МГ и специфических АТ против МГ в качестве маркера для иммуноферментного анализа использовали пероксидазу хрена — ПХ (RZ-3,0; «Sigma», США). Коньюгирование ПХ с МГ человека осуществляли методом периодатного окисления при молярном соотношении ПХ—МГ 1:1; аналогичный метод использовали при коньюгировании ПХ с АТ против МГ, молярное соотношение ингредиентов при коньюгировании 3:1. Коньюгаты очищали гель-хроматографией на колонке с сефадексом G-75, уравновешенной 0,01 М фосфатным буфером рН 7,2. Коньюгаты хранили при 4°C в 0,1 % растворе бычьего сывороточного альбумина (БСА) с добавлением 20 мг/л тимеросала.

Рабочие растворы коньюгатов, стандартов МГ и исследуемых образцов готовили с использованием в качестве растворителя 0,01 М фосфатного буфера рН 7,2, содержащего 0,15 М натрия хлорида, 0,05 % тритона X-100 и 0,1 % БСА (буфер А).

Стандартные растворы МГ (от 5 до 600 нг/мл) готовили из исходного раствора. Концентрацию исходного раствора устанавливали спектрофотометрически при длине волны 409 нм, молярный коэффициент экстинкции МГ $1,54 \cdot 10^5 \text{ см}^{-1} \cdot \text{л} \cdot \text{моль}^{-1}$ [11].

Промывающим раствором служил 0,01 М фосфатный буфер рН 7,2, содержащий 0,15 М натрия хлорида и 0,05 % тритона X-100 (буфер Б). Сорбцию специфических АТ на твердой фазе и блокирование свободной поверхности твердой фазы 1 % раствором БСА проводили из 0,05 М карбонатного буфера рН 9,6 (буфер В).

В качестве субстрата ПХ использовали о-фенилендиамин («Рсахим», СССР). Раствор субстрата готовили перед использованием в реакции следующим образом: 10 мг о-фенилендиамина растворяли в 18 мл дистиллированной воды и добавляли 2 мл 0,1 % раствора перекиси водорода, содержащего 0,04 М двузамещенного фосфата натрия и 0,02 М лимонной кислоты.

Содержание МГ определяли в 52 образцах сывороток крови доноров и больных первичными мышечными заболеваниями. Образцы сыворотки крови были предоставлены сотрудниками НИИ общей и патологической физиологии ЛМН СССР.

Имуноферментный анализ проводили в микротитрационных полистироловых пластинах с плоским профилем дна лунок (НИИ медицинской техники Минздрава СССР, Москва). С целью стандартизации лунки пластины подвергали предварительной обработке 96 % этиловым спиртом в течение 18—20 ч при комнатной температуре. После этого пластины тщательно промывали дистиллированной водой, высушивали и хранили до использования в герметичной упаковке.

При проведении иммуноферментного анализа специфические АТ против МГ сорбировали в лунках пластины стандартным способом. В каждую лунку вносили по 0,1 мл раствора АТ в буфере В, пластину инкубировали при комнатной температуре в течение 18—20 ч. Избыток АТ удаляли 3-кратной промывкой буфером Б. Оптимальную концентрацию антител для сорбции устанавливали экспериментально. Неспецифическую сорбцию предотвращали блокированием свободной поверхности твердой фазы 1 % раст-



Рис. 1. Пошаговая схема выполнения вариантов иммуноферментного анализа.

а — вариант типа «сэндвич»: 1 — внесено по 0,1 мл в лунку стандарта МГ или исследуемого образца, разведенных буфером А в 6 раз; 2 — инкубация 1 ч при комнатной температуре, 3-кратная промывка буфером Б; 3 — внесено по 0,1 мл в лунку конъюгата ПХ—АТ в соответствующем разведении буфером А; 4 — инкубация 1 ч при комнатной температуре, 3-кратная промывка буфером Б; *б* — конкурентный вариант: 1 — внесено по 0,05 мл в лунку стандарта МГ или исследуемого образца, разведенных буфером А в 3 раза, и по 0,05 мл в лунку конъюгата ПХ—МГ в соответствующем разведении буфером А; 2 — инкубация 1 ч при комнатной температуре, 3-кратная промывка буфером Б.

вором БСА (0,1 мл в буфере В в каждую лунку, инкубация 1 ч при комнатной температуре). Пластинки использовали для анализа в день их изготовления после 3-кратной промывки буфером Б.

Пошаговая схема выполнения вариантов иммуноферментного анализа представлена на рис. 1. Выявление МГ (гемагглютинационный тест) проводили в реакции пассивной гемагглютинации с помощью разработанного нами препарата, выпускаемого НИИ эпидемиологии и микробиологии Минздрава РСФСР (г. Горький) «Диагностикум эритроцитарный для выявления многоглобина иммуноглобулиновой сухой».

В каждую из 12 лунок полистироловой пластинки для иммунологических реакций с V-образным профилем дна разливают по 50 мкл физиологического раствора. В первую лунку вносят 50 мкл исследуемой жидкости и проводят двукратные разведения (1:2, 1:4 и т. д.) путем переноса 50 мкл жидкости в следующую лунку из предыдущей, перемешивания и следующего переноса. Затем во все лунки разливают по 25 мкл 1% взвеси эритроцитарного диагностикума. Пластинку встряхивают для равномерного распределения эритроцитов по объему и оставляют при комнатной температуре на 30 мин. Содержание МГ в исследуемом образце рассчитывают как произведение чувствительности метода на разведение образца, которое еще вызывает агглютинацию эритроцитов. Чувствительность определения МГ, равная для данного препарата 0,5—1 нг/мл, установлена на производстве в реакции пассивной гемагглютинации с использованием стандартного раствора МГ известной концентрации.

Результаты и обсуждение

Оптимальные условия проведения иммуноферментного анализа при за-

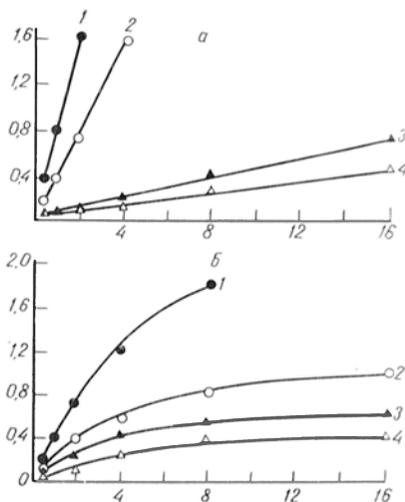


Рис. 2. Оптимизация аналитической системы иммуноферментного анализа.

а — конкурентный вариант; *б* — вариант типа «сэндвич»; разведение конъюгатов ПХ—МГ и ПХ—АТ: 1—1:50; 2—1:100; 3—1:200; 4—1:500. По осям абсцисс — концентрация раствора АТ против МГ, не используемая для сорбции на твердой фазе (в мкг/мл, масштаб логарифмический); по осям ординат — оптическая плотность при 492 нм.

данных параметрах времени и температуры инкубации установлены в серии экспериментов по изменению концентрации АТ, сорбируемых из раствора на поверхности полистиролового материала пластинки, и конъюгатов: ПХ—МГ в конкурентном варианте иммуноферментного анализа и ПХ—АТ в иммуноферментном анализе типа «сэндвич» (рис. 2). Диапазон концентрации АТ, сорбируемых на твердой фазе, варьировали от 0,5 до 16 мкг/мл. Используются разведения конъюгатов от 1:50 до 1:500 при проведении обоих вариантов иммуноферментного анализа.

Типичные стандартные кривые для определения МГ в иммуноферментном анализе конкурентного и «сэндвич»-типа приведены на рис. 3. Стандартные кривые построены в условиях сорбции на твердой фазе специфических АТ против МГ из раствора с концентрацией 5 мкг/мл, использования конъюгатов в разведении 1:100 и стандартов МГ от 2,5 до 5000 нг/мл. Как видно из рис. 3, рабочий диапазон определения МГ шире в конкурентном варианте иммуноферментного анализа по сравнению с вариантом «сэндвич»-типа. Коэффициент вариации при использовании образцов с различным содержанием МГ в 8 повторах на одной микротитраци-

Рис. 3. Типичные стандартные кривые определения МГ в конкурентном варианте (1) и варианте типа сэндвич (2) иммуноферментного анализа. По оси абсцисс — содержание МГ (в нг/мл); по оси ординат — оптическая плотность при 492 нм.

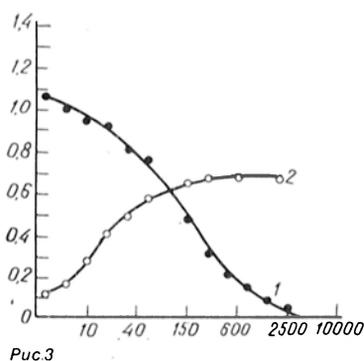
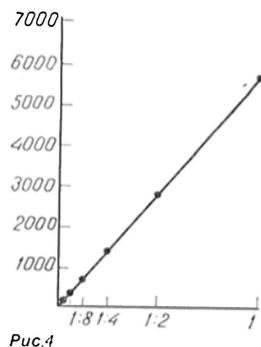


Рис. 4. Определение МГ в сыворотке крови пациента с высоким содержанием МГ после разведений исследуемого образца.

По оси абсцисс — разведение образца; по оси ординат — содержание МГ (в нг/мл).



онной пластине составил менее 4,3 % (табл. 1).

Из табл. 1 видно, что результат иммуноферментного анализа при прочих равных условиях зависит от свойств твердой фазы, что, вероятно, связано с различиями в сорбционной емкости. В связи с этим существует необходимость постановки стандартной кривой на каждой пластине.

Достоверность анализа оценивали с помощью исследования разведений сыворотки крови с высоким содержанием МГ (рис. 4) и теста на выявление — определение МГ, искусственно добавленного в сыворотку крови (табл. 2). Расчетное количество МГ в образцах соответствует его содержанию с достоверностью анализа от 90 до 110 %.

Коэффициент вариации при исследовании образца в 12 повторях составил 9,8 % (480 ± 49 нг/мл). Вместе с тем необходимо помнить, что постановку реакции пассивной гемагглютинации осуществляли путем двукратных разведений исследуемого образца и поэтому была возможна 50 % ошибка анализа. Гемагглютинационный тест является таким образом полуколичественным методом.

Мы сопоставили информационную значимость определения МГ в крови доноров и больных первично-мышечными заболеваниями (полимиозит, дерматомиозит, миопатия, миастения) разработанным методом иммуноферментного анализа в конкурентном варианте и с помощью гемагглютинационного теста. Результаты (рис. 5) показали хорошую корреляционную зависимость (коэффициент корреляции 0,966) между данными, полученными обоими методами, в диапазоне концентраций МГ от 30 до 2000 нг/мл.

В зависимости от целей и задач работы МГ определяют теми или иными методами, обладающими различными достоинствами. Радиоиммунологический анализ позволяет сократить время определения с 24—48 ч [26] или 5—6 ч [24] до 1 ч [25] без уменьшения чувствительности метода (1—5 нг/мл). Недостатков указанного метода, в частности требования радиационной безопасности, лишены различные варианты иммуноферментного анализа МГ [5, 18]. Существенный выигрыш во времени дает простой полуколичественный латекс-агглютинационный метод определения МГ, одна-

Т а б л и ц а 1

Коэффициент вариации определения МГ в конкурентном варианте твердофазного иммуноферментного анализа

Содержание МГ в пробе, нг/мл	Пластина		
	1-я	2-я	3-я
0	$3,240 \pm 0,027$ (0,8)	$2,637 \pm 0,031$ (1,2)	$2,194 \pm 0,029$ (1,3)
2,5	$3,171 \pm 0,050$ (1,6)	$2,474 \pm 0,018$ (0,7)	$2,052 \pm 0,024$ (1,2)
10	$2,627 \pm 0,025$ (1,0)	$2,092 \pm 0,040$ (1,9)	$1,773 \pm 0,027$ (1,5)
40	$1,717 \pm 0,020$ (1,2)	$1,270 \pm 0,010$ (0,8)	$0,983 \pm 0,011$ (1,1)
150	$0,740 \pm 0,017$ (2,3)	$0,551 \pm 0,014$ (2,5)	$0,500 \pm 0,011$ (2,1)
600	$0,244 \pm 0,009$ (3,7)	$0,162 \pm 0,007$ (4,3)	$0,150 \pm 0,006$ (3,8)

П р и м е ч а н и е. Результаты анализа 9 повторов, оптическая плотность при 492 нм. В скобках — проценты.

Таблица 2

Выявление МГ, добавленного в сыворотку крови, в конкурентном варианте иммуноферментного анализа

Количество МГ, добавленного в пробу, нг	Ожидаемое количество МГ, нг	Результат определения МГ, нг	Выявление МГ	
			нг	%
0	—	1,8	—	—
4,32	6,12	5,9±0,1	4,1	105,36
8,75	10,55	11,5±0,2	9,7	90,21
17,60	19,40	18,0±0,2	16,2	108,64
35,30	37,10	37,0±0,3	35,2	100,28
70,65	72,45	74,0±0,5	72,2	97,85
141,40	143,20	145,0±1,5	143,2	98,74
283,10	284,90	285,0±2,3	283,2	99,96

ко его чувствительность не превышает 100 нг/мл [12].

Главным критерием ценности метода в последнее время становится (наряду с высокой чувствительностью определения МГ и специфичностью) скорость получения нужных данных, простота проведения анализа и учета результатов. Этим требованиям в значительной мере удовлетворяет геммагглютинационный тест, проводимый с помощью препарата «Диагностикум эритроцитарный для выявления миоглобина иммуноглобулиновый сухой». Время проведения анализа геммагглютинационным тестом составляет 30 мин от момента взятия крови, его чувствительность 0,5—1 нг/мл, учет результатов — визуальный. Несмотря на то что при его использовании получают полуколичественные данные, он имеет, как установлено нами (см. рис. 5), равно-

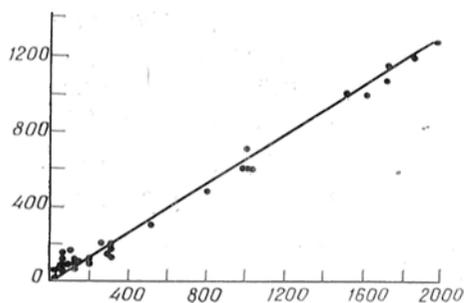


Рис. 5. Сопоставление результатов определения МГ в крови доноров и больных первичными заболеваниями методом конкурентного иммуноферментного анализа и с помощью геммагглютинационного теста. По оси абсцисс — содержание МГ, определенное с помощью геммагглютинационного теста (в нг/мл); по оси ординат — содержание МГ, определенное методом конкурентного иммуноферментного анализа (в нг/мл). Уравнение регрессии $y=1,46x-23,81$. Коэффициент корреляции $r=0,966$.

ценную информационную значимость с иммуноферментным методом анализа.

Препарат «Диагностикум эритроцитарный для выявления миоглобина иммуноглобулиновый сухой» выпускается отечественной промышленностью и может быть использован в условиях скорой медицинской помощи и для обследования пациентов на содержание МГ в крови и моче в учреждениях практического здравоохранения, не оснащенных специальным оборудованием. Миоглобиновый тест целесообразно применять как интегральный биохимический показатель функциональных и морфологических изменений в организме, так как, по-видимому, увеличение содержания МГ в крови связано с нарушением проницаемости клеточных мембран.

ЛИТЕРАТУРА

1. Домбровский В. И., Ротт Г. М., Староверов И. И. и др. // Мед. радиол. — 1981. — № 5. — С. 44—48.
2. Домбровский В. И., Поверенный А. М. // Вопр. мед. химии. — 1981. — № 4. — С. 566—568.
3. Домбровский В. И., Староверов И. И., Ротт Г. М. и др. // Бюл. Всесоюз. кардиол. науч. центра. — 1981. — № 1. — С. 88—94.
4. Домбровский В. И., Рожинская И. В., Чернов В. Н., Волощенко О. И. // Вестн. хир. — 1982. — № 3. — С. 86—88.
5. Ермолин Г. А., Диков М. М., Соловьев А. В. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 1. — С. 130—134.
6. Остерман Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. — М., 1985.
7. Староверов И. И. Диагностическое значение определения миоглобина в сыворотке крови и в моче больных инфарктом миокарда. Дис. ... канд. мед. наук. — М., 1981.
8. Шуманко Н. И., Милашенко А. П. // Вопр. мед. журн. — 1983. — № 9. — С. 20—24.
9. Askmark H., Osterman P. O., Roxin L. E., Venge P. // J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. — 1981. — Vol. 44. — P. 68—72.
10. Bertorini T., Yeh Y. Y., Trevisan C. et al. // Neurology (Minneapolis). — 1980. — Vol. 30. — P. 263—271.
11. Boyer S. H., Fainer D. C., Naughton M. A. // Science. — 1963. — Vol. 140. — P. 1228—1231.
12. Chapelle J. P., Heusghem C. // Clin. chim. Acta. — 1985. — Vol. 145. — P. 143—150.
13. Cunningham E., Kohli R., Venuto R. C. // J. A. M. A. — 1979. — Vol. 242. — P. 2428—2429.
14. DiMauro S., Dalakas M., Miranda A. F. // Ann. Neurol. — 1983. — Vol. 13. — P. 11—20.
15. Docherty I., Harrop J. S., Hine K. R. et al. // Clin. Chem. — 1984. — Vol. 30. — P. 42—46.

16. Drexel H., Dworzak E., Kirchmair W. et al. // Amer. Heart J. — 1983. — Vol. 105. — P. 642—651.
17. Guehot J., Lioret N., Cynober L. et al. // Clin. Chem. — 1986. — Vol. 32. — P. 857—859.
18. Higuma N. // Acta med. biol. (Niigata). — 1980. — Vol. 27. — P. 111—121.
19. Kagen L. J. // J. A. M. A. — 1977. — Vol. 237. — P. 1448—1452.
20. Kohn J., Wilchek M. // FEBS Lett. — 1983. — Vol. 154. — P. 209—210.
21. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
22. Nakane P. K., Kawai A. // J. Histochem. Cytochem. — 1974. — Vol. 22. — P. 1084—1091.
23. Nishikai M., Reichlin M. // Arthr. a. Rheum. — 1977. — Vol. 20. — P. 1514—1518.
24. Norregaard-Hansen K., Lindo K. E., Ludvigsen C. V., Norgaard-Pedersen B. // Acta med. scand. — 1980. — Vol. 207. — P. 265—270.
25. Roxin I. E., Venge P., Wide L. // Clin. chim. Acta. — 1980. — Vol. 107. — P. 129—134.
26. Stone M. J., Willerson J. T., Gomez-Sanchez C. E., Waterman M. R. // J. clin. Invest. — 1975. — Vol. 56. — P. 1334—1339.

Поступила 03.06.87

INFORMATIVE IMPORTANCE OF THE MYOGLOBIN ESTIMATION BY MEANS OF SOLID PHASE IMMUNOENZYME ASSAY AND HEMAGGLUTINATION TEST

G. M. Rott, G. M. Lapshina, I. V. Rozhinskaya, O. A. Letova, T. V. Blinova, A. M. Poverenny

Institute of Medical Radiology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Obninsk, Institute of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Public Health of the RSFSR, Gorki

Optimal conditions were developed for estimation of myoglobin using immunoenzyme assay (ELISA) of competitive and "sandwich" types. Informative efficiency of the ELISA procedures was compared with commercially available hemagglutination test "Erythrocyte diagnosticum for myoglobin detection; dry immunoglobulin". Efficiency of these assays both ELISA and hemagglutination test was found to be similar although hemagglutination is a semiquantitative procedure. The commercially available preparation exhibited some advantages; it is rapid, simple and reproducible. The hemagglutination test may be used as an express analysis in urgent medicine as well as in laboratories which do not possess special biochemical equipment.

УДК 616.129:547.262+612.015.2:547.262].088.1

С. Н. Шишкин, Ю. М. Островский, П. С. Пронько

ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ ЭНДОГЕННОГО ЭТАНОЛА В КРОВИ И ТКАНЯХ ЧЕЛОВЕКА И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Институт биохимии АН БССР, Гродно

Определение очень малых количеств этилового спирта в биологическом материале приобрело в последние годы особое значение в связи с обнаружением так называемого эндогенного этанола как нормального составного компонента крови и тканей человека и животных [12, 16, 17, 20]. Считается, что уровень эндогенного этанола играет определенную роль в явлениях алкогольной мотивации у животных [3, 7]. Обнаружена его взаимосвязь с таким тяжелым осложнением алкоголизма, как белая горячка [8].

Достаточно точно и специфично определить эндогенный этанол можно с помощью газовой хроматографии. Однако его концентрации, найденные отдельными исследователями с применением различной техники анализа, существенно варьируют. Так, в крови здоровых людей, не принимавших длительное время спиртных напитков, оп-

ределены концентрации эндогенного этанола менее 1,0 мг/л [12, 15, 20], 0—39 мг/л [17], до 40 мг/л с преобладанием концентраций менее 20 [6] и 10—30 мг/л [3]. Концентрации эндогенного этанола, найденные у нормальных лабораторных животных, имеют еще большие различия [1, 3, 7, 16]. В связи с этим целесообразно оценить достоинства и недостатки наиболее часто используемых методических приемов.

Самым удобным и достаточно точным методом определения этанола является анализ равновесной парогазовой фазы над жидкостью [2, 10, 18, 19, 22]. Для повышения выхода этанола из жидкой фазы в парогазовую используют добавки таких солей, как хлорид натрия [2, 21], сульфат натрия [10], карбонат калия [11, 18]. Это снижает значения коэффициентов распределения в системе жидкость — газ в

десятки раз [4]. Увеличение температуры нагревания флаконов с пробамми до 50—65 °С значительно повышает чувствительность метода, в результате чего анализ парогазовой фазы позволяет определить наличие летучих органических соединений при концентрации в растворе $1 \cdot 10^{-6}$ % [10].

Определение спиртов в виде алкилнитритов [14] также повышает чувствительность. Метод удобен и при идентификации спиртов в биологических средах с использованием методов газовой хроматографии и масс-спектрометрии [15]. Однако окислы азота могут существенно сокращать продолжительность работы колонки.

Разработан метод прямого введения образца в хроматограф [5]. При этом 100 мкл крови достаточно для нескольких анализов и следовательно отпадает необходимость в предварительной обработке проб перед исследованием. Однако метод не предназначен для исследования образцов тканей внутренних органов.

Использование для анализа капиллярной крови имеет некоторые преимущества перед таковым венозной, так как позволяет отбирать большее число образцов, упрощает саму процедуру взятия крови. Однако методы, предложенные для определения этанола в малых объемах капиллярной крови [19, 22], недостаточно чувствительны для определения эндогенного этанола. Применение хлорида натрия для увеличения выхода этанола в парогазовую фазу повышает чувствительность метода Wilkinson и соавт. [22] до 0,1 мг/л [9], но и этого бывает недостаточно: в ряде образцов обнаруживаются нулевые уровни. Ниже приведено описание техники определения, специально приспособленной для обнаружения эндогенного этанола в крови и тканях.

Методика

Использование высокочувствительного метода газовой хроматографии предъявляет особые требования к чистоте воды и реактивов, которые могут поглощать спирт из воздуха лаборатории. Для удаления этанола и других летучих соединений, мешающих анализу, карбонат калия прокаливали 10 ч при 200 °С, тиомочевину и сульфосалициловую кислоту 12 ч при 90 °С или 6 ч при 60 °С в вакуумном шкафу (вакуум 0,6 кг/см²) непосредственно перед применением. Для приготовления растворов использовали свежеполученную дис-

тиллированную воду. Перед каждой серией анализов определяли содержание этанола в реактивах. Проверив различные осадители белков в сравнительных опытах, мы отказались от применения хлорной кислоты, так как последняя содержала примеси, мешающие идентификации специфического пика на хроматограммах. Более удобным оказалось проведение депротенизации образцов сульфосалициловой кислотой и защита присутствующего в них алкоголя от неферментного окисления в ацетальдегид путем добавления тиомочевины до концентрации 25 мМ [13].

В герметично закрывающиеся пробирки для микропроб объемом 1,5 мл вносили 0,2 мл крови и 0,2 мл раствора, содержащего 12,8 % сульфосалициловой кислоты и 0,39 % тиомочевины. Содержимое пробирок перемешивали встряхиванием, выдерживали не менее 15 мин и центрифугировали 6 мин при 14 000 об/мин на холоду при 0—4 °С. Из пробирок отбирали 0,2 мл центрифугата и вносили в инсулиновые флаконы объемом 6 мл. Перед анализом во флаконы добавляли по 0,2 г карбоната калия, флаконы снова герметично закрывали и инкубировали 15 мин при 65 °С, затем отбирали 1 мл парогазовой фазы и вводили в хроматограф предварительно нагретым до 65 °С шприцем.

Измерение коэффициента распределения этанола в системе жидкость — газ проводили в аналогичных условиях путем замены газовой фазы, находящейся в равновесии с раствором этанола, на чистый газ в термостатируемых шприцах [4].

Для изучения выхода этанола, добавленного в кровь, готовили растворы этанола 0,1—1,0 мг/л на крови человека и крысы, получали безбелковые центрифугаты и сравнивали с растворами той же концентрации в 0,9 % хлориде натрия (в каждом опыте проводили 4 параллельных анализа).

При определении эндогенного этанола в тканях использовали замороженные в жидком азоте образцы 0,5—1,0 г, которые гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с 2 объемами охлажденного до 0 °С раствора, содержащего 9,6 % сульфосалициловой кислоты и 0,28 % тиомочевины. Пробирки с гомогенатом плотно закрывали пробками и ставили в лед, центрифугировали при 0—4 °С в течение 20 мин при 3000 об/мин. Затем отбирали 1 мл центрифугата, вносили в пенициллиновые флаконы объемом 14 мл, добавляли 1 г карбоната калия, герметично закрывали и обжимали алюминиевыми колпачками. При малых количествах ткани объемы центрифугата и навески карбоната калия могут быть соответствующим образом уменьшены. Флаконы термостатировали 15 мин при 65 °С, отбирали 1—2 мл парогазовой фазы и вводили в хроматограф. Удовлетворительное разделение метанола, этанола, ацетона и n-пропанола было получено нами на полисорбе I, 0,25—0,5 мм («Реахим», СССР). Полисорбом I заполняли стальную колонку длиной 1,5 м и внутренним диаметром 3 мм. Колонку кондиционировали 48 ч при температуре 200 °С при подаче газа-носителя (азот, ос. ч.).

Использовали отечественный газовый хроматограф ЛХМ 80 с детектором ионизации в пламени. Анализ проводили при температуре испарителя 150 °С и термостата колонок 125 °С. Расходы газов были следующими:

азота — 30 мл/мин, водорода — 30 мл/мин, воздуха — 300 мл/мин. Водород получен из системы газоснабжения типа СГС-2. Определение эндогенного этанола проводили при чувствительности усилителя $5 \cdot 10^{-12}$ — $10 \cdot 10^{-12}$ А.

Результаты и обсуждение

Время удерживания составило (в с): метанола 65, ацетальдегида 84, этанола 120, ацетона 180, н-пропанола 260. Определению этанола не мешало присутствие изопропилового спирта и диэтилового эфира. Время удерживания последних составило 190 и 195 с соответственно. На рис. 1 представлена типичная хроматограмма образца крови человека, содержащая эндогенный уровень этанола. В пробах крови обычно присутствуют ацетон в концентрации 0,1—3,0 мг/л и следовые количества метанола и ацетальдегида (пики всех этих соединений хорошо идентифицируются на хроматограммах).

Концентрацию этанола определяли по калибровочным графикам. В изученном диапазоне концентраций от 0,05 до 5,0 мг/л график представляет прямую линию. Перед каждой серией определений анализировали стандартные растворы этанола (0,125, 0,25 и 0,5 мг/л), приготовленные на 6,4 % водном растворе сульфосалициловой кислоты. Как видно из рис. 2, калибровочные графики, построенные по водным растворам этанола и полученный путем добавления известных количеств

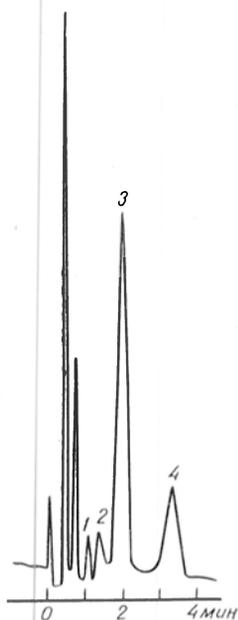


Рис. 1. Типичная хроматограмма, полученная при анализе равновесного газа над безбелковым центрифугатом пробы крови здорового человека.

По оси абсцисс: время удерживания (в мин). Пики 1—4 идентифицированы как метанол, ацетальдегид, этанол и ацетон соответственно.

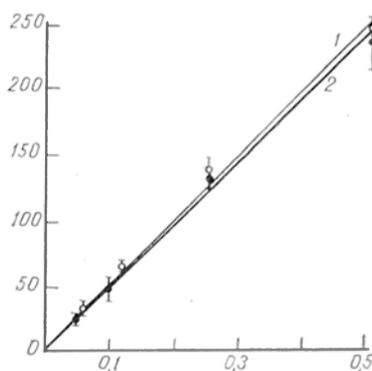


Рис. 2. Графики зависимости площади пиков на хроматограммах от концентрации этанола в пробах.

Этанол добавлен в 6,4% сульфосалициловую кислоту (1) и кровь крысы (2). По оси абсцисс концентрация этанола в жидкой фазе стандартных растворов (в мг/л). По оси ординат площадь пиков этанола (в мм²).

этанола к крысиной крови, практически не различаются.

Выход этанола, добавленного до концентрации 1,0 мг/л в кровь человека, и до 0,5 мг/л в кровь крысы после обработки проб по описанной в методике схеме, равняется $100,5 \pm 2,1$ % ($n=6$) и $97,6 \pm 2,5$ % ($n=5$) соответственно.

В условиях, использованных для анализа образцов крови и тканей, коэффициент распределения этанола в системе жидкость — газ равнялся $13,49 \pm 2,57$. Низкая величина коэффициента распределения обуславливает высокую чувствительность метода. Минимально детектируемая концентрация этанола составляет 0,05 мг/л. Это позволяет надежно определять эндогенный этанол в биологическом материале.

Анализ стандартных растворов этанола известной концентрации показал

Таблица 1
Точность определения этанола в стандартных растворах

Концентрация, мг/л		n	Коэффициент вариации, %	Относительная ошибка, %
рассчитанная	найденная ($\bar{X} \pm S_x$)			
0,05	$0,052 \pm 0,005$	6	23,1	+4,0
0,125	$0,125 \pm 0,004$	6	7,6	0
0,25	$0,265 \pm 0,013$	6	11,8	+6,0
0,50	$0,471 \pm 0,010$	6	5,1	-5,8
0,50*	$0,483 \pm 0,005$	8	2,9	-3,4
0,75	$0,744 \pm 0,024$	6	8,6	-0,8

Примечание. Звездочкой отмечен вариант введения этанола в кровь крысы.

Содержание этанола (в мг/л) в пробах крови человека в различные сроки хранения ($n = 4$)

Температура хранения	День хранения				
	1-й	2-й	8-й	15-й	29-й
4 °С	1,15±0,04	1,23±0,03	1,13±0,04	1,15±0,06	1,20±0,10
-12 °С	1,15±0,04	1,12±0,02	1,18±0,01	1,31±0,04	1,23±0,08
-20 °С	1,15±0,04	1,02±0,03	1,10±0,01	1,20±0,05	1,23±0,10

хорошее совпадение экспериментальных данных с расчетными величинами, максимальная относительная погрешность определения составила $\pm 6\%$ (в среднем $\pm 3,3\%$). Вариабельность при анализе нескольких параллельных проб также была менее 10% в диапазоне концентраций от 0,125 до 0,75 мг/л (табл. 1).

Если оценить величину разности между результатами в парах параллельных анализов из серии наблюдений, приведенных в табл. 1, получается среднее значение $0,030 \pm 0,009$ мг/л ($n=19$). Эта величина существенно не отличается от нуля ($\tau=0,789$; $p > 0,05$), что указывает на хорошую воспроизводимость измерений.

Хранение кислотных центрифугатов крови человека в герметически закрытых флаконах в течение месяца при температуре $+4$, -12 и -20 °С не приводит к изменению концентрации спирта в образцах, что проверено при анализе проб с интервалами в 7 дней (табл. 2).

Уровень эндогенного этанола в крови здоровых мужчин ($n=23$), не принимавших спиртные напитки в течение 1—3 нед, колеблется от 0,08 до 1,30 мг/л, медиана 0,24 мг/л, средняя арифметическая $0,38 \pm 0,07$ мг/л, 95% наблюдений распределяется в пределах от 0 до 1,05 мг/л.

В крови белых беспородных крыс самцов ($n=13$) массой 180—200 г, отобранной при декапитации, найдены концентрации эндогенного этанола 0,05—1,32 ($0,24 \pm 0,08$) мг/л, в печени — 0,07—3,07 ($0,45 \pm 0,05$) мг/кг, в почке — 0,20—3,12 ($0,62 \pm 0,05$) мг/кг, в мозге — 0,07—2,14 ($0,26 \pm 0,04$) мг/кг.

Приведенные уровни эндогенного этанола крови у здоровых людей практически не отличаются от найденных нами ранее [9] по модифицированному методу Wilkinson и соавт. [22]. Близкие результаты получены и другими исследователями с помощью различных газохроматографических ме-

тодов. У здоровых людей концентрация эндогенного этанола была менее 0,1 мг/л [12]; 0—1,6 мг/л, в среднем $0,39 \pm 0,45$ мг/л [15]; 0,06—0,8 мг/л [20]. У экспериментальных животных установлены сходные величины [7, 16].

В некоторых работах приводятся более высокие уровни эндогенного этанола в крови человека и животных [1, 3, 6, 17]. Противоречивость данных частично может быть объяснена видовыми особенностями экспериментальных животных, неоднородностью состава групп при обследовании людей. Вероятно, вносят свой вклад и различия методов обработки проб и анализа.

Обнаружение относительно высоких максимальных величин эндогенного этанола крови (до 40 мг/л) у части людей с преобладанием у обследованных значительно более низких цифр [5, 6, 17], возможно, связано с недостаточно тщательным отбором доноров: недавний прием напитков, содержащих алкоголь, или наличие сахарного диабета могут завязать результаты [6, 17].

Обнаруженные в крови у здоровых людей концентрации эндогенного этанола от 10 до 30 мг/л [4] отличаются высокими минимальными уровнями, которые почти в 100 раз превышают величины, найденные другими исследователями. Такие различия трудно объяснить особенностями обследованных лиц, вероятно, это связано с методикой анализа. Следует отметить, что к завышению результатов могут приводить загрязнение этанолом и другими летучими соединениями воды, реактивов, некоторых сортов резины, из которых изготовлены пробки [13, 22]. Гепарин, часто используемый в качестве антикоагулянта, тоже содержит спирт [5].

Оценивая результаты наших исследований и литературные данные в целом, можно с большой степенью вероятности утверждать, что в периферической крови и тканях паренхиматозных органов человека и эксперимен-

тальных животных преобладают уровни эндогенного этанола менее 1 мг/л, максимальные величины редко превышают 3 мг/л.

Предложенная техника определения отличается высокими чувствительностью и воспроизводимостью, может быть использована для анализа низких концентраций этанола и других низших алифатических спиртов в биологических жидкостях и тканях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андропова Л. М., Ушакова М. М., Кудрявцев Р. В., Барков Н. К. // Фармакол. и токсикол. — 1982. — № 5. — С. 101—105.
2. Баниковский А. А., Садовник М. Н., Сатиновская В. И. // Лаб. дело. — 1980. — № 2. — С. 89—91.
3. Буров Ю. В., Тресков В. Г., Кампов-Полевой А. Б. и др. // Бюл. экспер. биол. — 1983. — № 11. — С. 67—69.
4. Витенберг Л. Г., Иоффе Б. В. Газовая экстракция в хроматографическом анализе: Парофазный анализ и родственные методы. — Л., 1982.
5. Кудрявцев Р. В., Ушакова М. М. // Суд.-мед. эксперт. — 1980. — № 3. — С. 28—31.
6. Кудрявцев Р. В., Ушакови М. М., Суходеев В. В. // Там же. — 1981. — № 3. — С. 33—34.
7. Островский Ю. М., Садовник М. Н., Баниковский А. А., Обидин В. П. // Докл. АН БССР. — 1983. — Т. 27, № 3. — С. 272—275.
8. Пронько П. С., Шишкин С. Н., Островский Ю. М. и др. // Здравоохр. Белоруссии. — 1983. — № 9. — С. 50—54.
9. Пронько П. С., Шишкин С. Н. // Теория и практика хроматографии: Подготовка кадров. — Куйбышев, 1984. — С. 175—176.
10. Bazette E., Ozeris S., Whitman C. H. // *Analyt. Chem.* — 1962. — Vol. 34. — P. 1540—1543.
11. Bilzer N., Gruner O. // *Blutalkohol.* — 1983. — Bd 20. — S. 411—421.
12. Blomstrand R. // *Life Sci.* — 1971. — Vol. 10. — P. 572—582.
13. Eriksson C. J. P., Sippel H. W., Forsander O. A. // *Analyt. Biochem.* — 1977. — Vol. 80. — P. 116—124.
14. Gessner P. K. // *Ibid.* — 1970. — Vol. 38. — P. 499—505.
15. Jones A. W., Mardh G., Anggard E. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* — 1983. — Vol. 18, Suppl. 1. — P. 267—272.
16. Jones A. W., Ostrovsky Yu. M., Wallin A., Midtvedt T. // *Alcohol.* — 1984. — Vol. 1. — P. 393—396.
17. Liebich H. M., Buelow H. J., Kallmayer R. // *J. Chromatogr.* — 1982. — Vol. 239. — P. 343—349.
18. Machata G., Prokop L. // *Blutalkohol.* — 1971. — Bd 8. — S. 349—353.
19. Mendelhall C. L., Mac Gee J., Green E. S. // *J. Chromatogr.* — 1980. — Vol. 190. — P. 197—200.
20. Sprung R., Bonte W., Rüdell E. et al. // *Blutalkohol.* — 1981. — Bd 18. — S. 65—70.
21. Wallace J. E., Dahl E. V. // *Tech. Bull. Regist. med. Techn.* — 1966. — Vol. 36. — P. 150—152.
22. Wilkinson P. K., Wagner J. G., Sedman A. J. // *Analyt. Chem.* — 1975. — Vol. 47. — P. 1506—1510.

Поступила 17.11.87

OPTIMAL CONDITIONS FOR ENDOGENOUS ETHANOL ESTIMATION IN HUMAN AND ANIMAL BLOOD AND TISSUES

S. N. Shishkin, Yu. M. Ostrovsky, P. S. Pron'ko
Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Grodno

An improved procedure is described for estimation of endogenous ethanol in human and animal biological fluids using gas chromatographic analysis of equilibrated steam. Sensitivity of the procedure was as low as 0.05 mg/L and relative error—about 6%. Content of endogenous ethanol constituted from 0.08 mg/L to 1.30 mg/l (the mean value was 0.38 ± 0.07 mg/L) in blood of healthy men which did not consume alcohol for a long time. In blood and tissues of white rats content of ethanol was equal to 0.06-1.32 mg/L and 0.07-3.12 mg/l, respectively.

УДК 616.127-005.8-07:616.153.1:[577.152.1+577.152.273

К. Вагенкнехт, Х. Барлебен, Х. Хайне

ЗНАЧЕНИЕ ИЗОФЕРМЕНТОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ИНФАРКТА МИОКАРДА И СПОСОБЫ ИХ ИССЛЕДОВАНИЯ

Центральный институт исследования сердца и кровообращения АН ГДР, Берлин-Бух

Все больше возрастает значение изоферментов в диагностике различных заболеваний, для оценки течения и прогноза болезни. Это объясняется прежде всего тесной взаимосвязью между структурой и функцией органов или тканей. В то время как морфологические критерии основаны на струк-

турных изменениях, изоферменты являются показателями для оценки изменений обмена веществ, имеющих различную динамику [6]. Для использования анализа изоферментов в диагностике заболеваний необходимы знания о распределении изоферментов в организме, факторах, ведущих к их

выходу из клетки, и факторах, влияющих на концентрацию изоферментов в плазме крови. Известно, что для различных органов характерен определенный состав ферментов. Есть ферменты, которые обладают органной, тканевой или органелловой специфичностью, причем особое внимание привлекают изоферменты.

На активность ферментов и изоферментов в плазме крови влияют следующие факторы: 1) выход из клетки, степень и характер поражения, внутриклеточная локализация, градиент концентрации, молекулярная масса и структура изофермента; 2) концентрация веществ, необходимых для биосинтеза, транспорта и распада ферментов, а также веществ, участвующих в ферментативной реакции; 3) распределение во внесклеточном пространстве; 4) разбавление ферментов; 5) элиминация: старение (денатурация), агрегация, выделение, фагоцитоз.

При анализе изоферментов следует учитывать также, что факторы, которые относятся к физиологическим, влияют на обмен веществ и, таким образом, на концентрации ферментов и в особенности изоферментов в крови. Так, количество и качество пищи влияют на активность ферментов и изоферментов. Активность ферментов и их соотношения изменяются в процессе развития и регенерации, а также при старении клеток.

Изменения активности изоферментов при инфаркте миокарда

Для диагностики острого инфаркта миокарда наряду с типичными клиническими критериями и изменениями ЭКГ в последнее время широко применяют анализ изоферментов креатинкиназы (КК), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ). Анализ изоферментов важен и для оценки течения и прогноза инфаркта.

В диагностике инфаркта миокарда обычно используют определение КК и ее изофермента КК-МВ, активность которого в плазме крови возрастает через 4 ч после инфаркта и достигает максимума через 24 ч.

Активность ЛДГ при многочисленных патологических состояниях повышена. Поэтому дифференцирование изоферментов ЛДГ имеет важное значение. Известно, что существуют 5 изо-

ферментов ЛДГ, которые представляют собой гибриды 2 различных субъединиц — Н (специфична для сердечной мышцы) и М (специфична для скелетной мышцы) [14, 16]. Многочисленные эксперименты показали, что ЛДГ-Н обнаруживается преимущественно в тех органах, которые имеют аэробный обмен веществ, в то время как ЛДГ-М связана с гликолизом. Она ингибируется уже физиологическими концентрациями лактата. При гипоксии активность ЛДГ-Н снижается, в то время как ЛДГ-М — относительно повышается. Показано, что при инфаркте миокарда активность ЛДГ-Н начинает повышаться примерно через 8 ч, а после 48 ч опять снижается.

Существуют 2 изофермента АСТ: митохондриальный (АСТ-М) и цитоплазматический (АСТ-Ц), исследования которых имеют важное значение для оценки поражения клетки. Повышение уровня АСТ-М в плазме крови обусловлено стимуляцией обмена митохондрий. Показано, что через 24 ч после операции шунтирования на сердце, связанной с перекрытием аорты, активность АСТ-М в плазме крови повышена. Это повышение коррелирует ($r=0,9$) с длительностью перекрытия и, таким образом, указывает на поражение миокарда вследствие недостаточности кислорода [1].

Обширные исследования подтверждают высокую чувствительность и специфичность диагностики с помощью изоферментов [3] и показывают, что с помощью анализа изоферментов можно характеризовать течение острого инфаркта миокарда. Раннему распознаванию расширения зоны инфаркта или декомпенсации левого и правого желудочков еще до появления клинических симптомов способствует анализ изоферментов, особенно ЛДГ и АСТ. Определение только КК и КК-МВ для этого недостаточно.

Способы определения активности изоферментов

Активность изоферментов можно определять электрофоретическими, хроматографическими, иммунологическими и кинетическими методами. В медицинской практике предпочтительны кинетические методы, так как они нетрудоемки. Изоферменты различаются по первичной и вторичной структуре и по следующим физико-химическим

Рис. 1. Зависимость активности очищенных изоферментов ЛДГ человека от концентрации субстрата.

По оси абсцисс — концентрация субстрата (в $\log M$); по оси ординат — содержание продукта реакции (в $\mu\text{моль/мин}$ на 1 мг белка). I — ЛДГ-Н; II — ЛДГ-М.

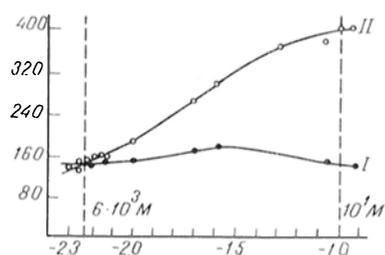


Рис. 2. Зависимость активности изоферментов АСТ от pH.

По оси абсцисс — pH; по оси ординат — активность (в %). I — АСТ-Ц; II — АСТ-М.

Рис. 1

Рис. 2

свойствам: сродству к субстрату, стабильности, заряду, реакции на ингибиторы и активаторы, оптимуму pH и температуре. Кинетические методы учитывают различное влияние этих факторов на скорость ферментативной реакции.

Дифференцирование изоферментов ЛДГ путем изменения концентрации субстрата

Каждая из субъединиц ЛДГ имеет одно место связи для кофермента и другое для субстрата. Активность каждой из субъединиц ЛДГ не зависит от степени агрегации [10]. Различную зависимость активности от концентрации субстрата для Н- и М-субъединиц ЛДГ можно использовать для их количественного определения. При этом как пируват, так и лактат могут с успехом служить в качестве субстрата [9, 15]. Мы работаем с лактатом и применяем тест, основанный на цветной реакции с феназинметосульфатом и дихлорфенолииндофенолом.

Зависимость активности высокоочищенных ЛДГ-Н и ЛДГ-М от концентрации субстрата представлена на рис. 1. При концентрации лактата, равной $6 \cdot 10^{-3} M$, оба типа ЛДГ обнаруживают одинаковую ферментативную активность. Таким образом, при этой концентрации субстрата можно определить суммарную активность обоих типов ЛДГ. При концентрации субстрата, равной $10^{-1} M$, различие в активности изоферментов максимально. Если известна активность каждой из очищенных субъединиц ЛДГ, то можно, измеряя активность в биологическом материале, вычислять количества ЛДГ-Н и ЛДГ-М с помощью уравнений с двумя неизвестными [15]. Это специфичный и чувствительный

способ для определения суммарной активности ЛДГ и активности субъединиц Н и М [15], но он не дает информации о тетрамерных гибридных формах. Несмотря на это, метод пригоден для решения диагностических вопросов [7, 8, 10, 11].

Другой способ дифференцирования изоферментов основан на применении специфичных субстратов. Например, α -гидроксibuтират обладает низким сродством к М-субъединице ЛДГ, тогда как Н-тип хорошо реагирует на этот субстрат [4]. Таким образом, можно двумя последовательными измерениями (сначала с лактатом для определения суммарной активности ЛДГ и потом с α -гидроксibuтиратом для определения ЛДГ-Н) также дифференцировать изоферменты ЛДГ.

Дифференцирование изоферментов ЛДГ посредством измерения зависимости ферментативной активности от температуры

Основой для разработки такого кинетического теста является определение зависимости констант скорости реакции от температуры. Нелинейная зависимость указывает на денатурацию. Определением чисел $Q=10$ для изоферментов можно найти также оптимальную температуру измерения. Мы определяли число $Q=10$ для ЛДГ-Н (1,18) и ЛДГ-М (2,5). Эти различия дали бы возможность определить оба изофермента. Однако использование различных чисел $Q=10$ для дифференцирования изоферментов является технически трудоемким и неудобным методом, так как необходимы измерения при различных температурах. Применение более высоких температур приведет к инактивации (денатурации) изоферментов. И в этом отношении

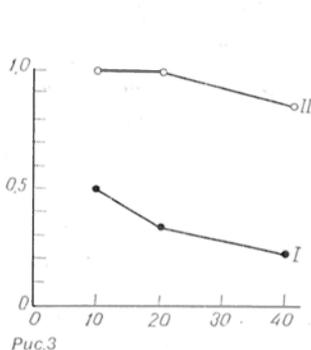


Рис. 3. Зависимость активности изоферментов АСТ от концентрации α -кетоглутарата. По оси абсцисс — концентрация α -кетоглутарата (в мМ); по оси ординат — соотношение активностей при рН 6,0 и 7,4. I, II — как на рис. 2.

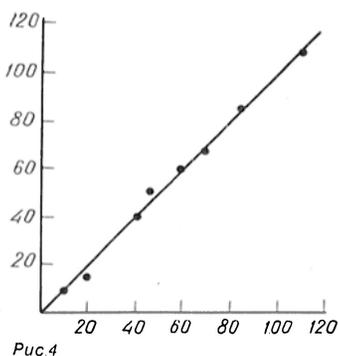


Рис. 4. Корреляция между результатами иммунологического и кинетического анализа АСТ-М.

По оси абсцисс — результаты кинетического анализа (в Е/л); по оси ординат — то же иммунологического (в Е/л).

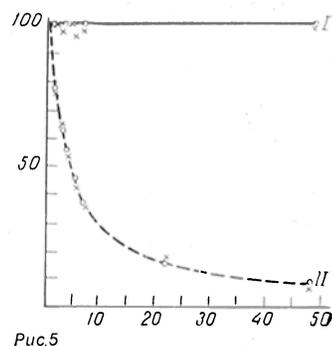


Рис. 5. Изменения активности очищенных изоферментов АСТ при хранении.

По оси абсцисс — длительность хранения (в ч). Остальные обозначения, как на рис. 2.

есть различия между изоферментами, которые можно использовать для дифференцирования. Такие методы требуют большой тщательности при стандартизации температуры и времени. Следует учитывать влияние различных концентраций белка на процесс денатурации.

В принципе изоферменты ЛДГ можно дифференцировать посредством температурной инактивации. Однако из-за низкой воспроизводимости результатов такой метод в практике не применяется.

Дифференцирование изоферментов АСТ по зависимости ферментативной активности от рН

Данные о влиянии рН среды на активность высокоочищенных изоферментов АСТ представлены на рис. 2. Исходя из результатов, полученных на очищенных изоферментах, мы измеряли активность АСТ при рН 7,4 и 6,0. Если при рН 7,4 не отмечено влияния различных концентраций α -кетоглутарата (10 или 20 ммоль) на активность изоферментов, то при рН 6,0 оно было явным. Соотношение активности, измеренной при рН 6,0 и 7,4, для АСТ-М составляет 1, для АСТ-Ц — только 0,3 при концентрации α -кетоглутарата, равной 20 ммоль (рис. 3). Этот метод имеет высокую воспроизводимости и не является трудоемким [5].

Был предложен метод дифференцирования изоферментов АСТ путем при-

менения адипината в качестве ингибитора [12]. При рН 6,2 адипинат ингибирует активность АСТ-Ц приблизительно на 90 %, а митохондриального изофермента лишь на 10 %. Эти исследования выполняли при 25 °С и относительно низкой концентрации α -кетоглутарата, что приводило к повышенной ошибке метода.

Дифференцирование изоферментов АСТ с помощью специфических антител

Для дифференцирования изоферментов АСТ могут применяться антитела [2, 13, 17, 18]. Нами показано ингибирование митохондриального и цитоплазматического изоферментов АСТ с помощью специфических антител. Для получения антител были использованы высокоочищенные изоферменты АСТ, которые применяли в качестве антигена для иммунизации кроликов. Антитела, полученные таким образом, оказались высокоспецифичными ингибиторами для соответствующих человеческих изоферментов.

Соответствие результатов кинетического и иммунологического методов определения изофермента АСТ представлено на рис. 4. Убыль активности изофермента АСТ-М при хранении *in vitro* (рис. 5) удавалось характеризовать любым методом. Однако сходство между кинетическим дифференцированием и иммунологическим ингибированием было менее выражено при низких значениях активности.

Неожиданно для нас митохондриальная АСТ в плазме по сравнению с АСТ ткаши не ингибировалась аптителами. Возможно, это объясняется тем, что при переходе митохондриального изофермента во внеклеточное пространство изменяется его структура, что в свою очередь препятствует распознаванию его специфичным аптителом. Применением ингибирующих аптител по сравнению с кипетическими методами дифференцирования можно, вероятно, получить дополнительную информацию об изменениях изоферментов, что в будущем, возможно, будет иметь значение для медицинской практики.

Авторы выражают благодарность за техническую помощь сотрудникам молодежного коллектива клиничко-химической лаборатории Центрального института исследования сердца и кровообращения.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Blätterlein I., Lehmann I., Wagenknecht C.* // Ber. Ges. inn. Med. — 1976. — Bd. 10. — S. 307—309.
2. *Boll A., Backs M., Pfeleiderer G.* // Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. — 1974. — Bd. 355. — S. 811—818.
3. *Burlina A.* // Clin. Chem. — 1979. — Vol. 12, N 3. — P. 71—76.
4. *Galen R. S.* // Progr. hum. Path. — 1975. — Vol. 6. — P. 141—155.
5. *Graubaum H.-J., Becker D., Nack B., Wagenknecht C.* // Zbl. Pharmakol. — 1975. — Bd. 114. — S. 793—803.
6. *Graubaum H.-J., Wagenknecht C.* // Z. Arztl. Fortbild. — 1975. — Bd. 69. — S. 964—975.
7. *Graubaum H.-J., Wagenknecht C., Klimmt G. et al.* // Dtsch. Gesundh.-Wes. — 1977. — Bd. 32. — S. 1087—1091.
8. *Graubaum H.-J., Wagenknecht C., Schnieder G. et al.* // Ibid. — S. 1119—1124.
9. *Heck H. d'A.* // J. biol. Chem. — 1969. — Vol. 244. — P. 4375—4381.
10. *Holzer K.-H., Binzus G.* // Klin. Wschr. — 1966. — Bd. 44. — S. 1301—1307.
11. *Kolhe K., Romaniuk P., Nußbaum R. et al.* // Dtsch. Gesundh.-Wes. — 1979. — Bd. 34. — S. 1112—1115.
12. *Martinez-Carrion M., Barber B., Pazoles P.* // Biochim. biophys. Acta. — 1977. — Vol. 482. — P. 323—329.
13. *Morin L. G.* // Clin. Chem. — 1979. — Vol. 25. — P. 1415—1419.
14. *Pfleiderer G., Jeckel D.* // Biochem. Z. — 1957. — Bd. 329. — S. 370—380.
15. *Wagenknecht C., Zinsmeyer J., Egger E.* // Zbl. Pharmakol. — 1972. — Bd. 111. — S. 917—931.
16. *Wachsmuth E. D., Pfeleiderer G.* // Biochem. — 1963. — Bd. 336. — S. 545—556.
17. *Weichsel A.* — Diss. — Berlin, 1981.
18. *Würzburg U., Wilz I., Henrich N., Lang H.* // Z. klin. Chem. klin. Biochem. — 1974. — Bd. 12. — S. 176—177.

Поступила 10.04.87

РЕЦЕНЗИЯ

Отражение проблем медицинской химии в выпусках журнала «Вопросы медицинской химии» в 1987 г.

Двухмесячный научно-теоретический журнал «Вопросы медицинской химии» является, пожалуй, единственным периодическим изданием, призванным освещать исследования по медицинской химии в нашей стране. В сложившихся условиях эта задача является весьма сложной, так как отразить всего лишь в 6 сравнительно небольших по объему номерах (около 150 стр. в номере) все направления исследований по медицинской химии тысяч специалистов из различных учебных и научно-исследовательских учреждений практически невозможно. Тем не менее вот уже более 30 лет журнал проводит большую и очень важную работу по формированию биохимического мышления в медицине, способствует внедрению передовых методов, публикует аналитические обзоры по самым различным проблемам.

Мы постараемся проанализировать лишь некоторые аспекты медицинской химии, кото-

рые нашли свое отражение в номерах XXXIII тома журнала, вышедших в 1987 г.

Традиционной для каждого номера является публикация обзоров литературы по различным проблемам, связанным с медицинской химией. В истекшем году журнал опубликовал 11 таких обзоров и статью к 70-летию Великой Октябрьской социалистической революции (С. С. Кривобокова) «Медицинская химия в СССР», подводящую итоги развития этой науки в нашей стране за годы Советской власти.

В обзоре И. Ф. Чернядьевой и В. Н. Титова «Апопротенины эфферентного транспорта холестерина в крови» обобщаются данные о роли белков в транспорте и метаболизме липидов в сосудистом русле. Рассматриваемая проблема имеет самое прямое отношение к этиологии и патогенезу сердечно-сосудистых заболеваний, развивающихся при нарушении обмена липидов. Транспорт этих соединений от синтезирующих их органов к тканям, в которых они подвергаются расщеплению (эфферентный транспорт), является одним из

важных звеньев в обмене липидов в норме и при патологии.

Медьсодержащим аминоксидазам кровеносных сосудов посвящен обзор З. Б. Мерребяи и Р. М. Налбандяна, в котором приведен материал о субстратной специфичности этих ферментов и их роли в обменных процессах в условиях недостаточного или избыточного поступления в организм меди.

В обзоре Ю. Е. Вельтицева и соавт. «Биологически активные метаболиты мембранных глицерофосфолипидов в норме и при патологии» обращено внимание на появление при ряде патологических состояний высокоактивных продуктов превращения глицерофосфолипидов, способных вызывать токсическое повреждение тканей. Детальное изучение спектра продуктов обмена глицерофосфолипидов и выяснение регуляции этого типа обмена является, по мнению авторов, актуальной проблемой медицинской химии.

В обзоре Л. П. Алексеенко и В. Н. Ореховича освещено совершенно новое направление исследований в области сердечно-сосудистой регуляции, связанное с эндокринной функцией сердца. Обнаружение синтеза и секреции предсердиями сердца пептидных гормонов (атриопептидов), регулирующих диурез, экскрецию электролитов с мочой и сосудистый тонус, может, по мнению авторов, совершить переворот в клинической медицине как в области понимания механизмов развития ряда сердечно-сосудистых заболеваний, так и в разработке принципиально новых методов их лечения.

Тромбоцитам как объекту исследований энзимопатий при заболеваниях крови посвящена статья Я. М. Соковинной и И. И. Вотрина. Авторами приведен обширный материал по оценке в тромбоцитах активности ферментов обмена адениловых нуклеотидов в норме и при гемофилии А, охарактеризованы дисферментемии пуринового обмена при различных видах лейкозов. В обзоре приведены данные по молекулярным основам гемостатической функции тромбоцитов и методам их изучения.

Проблемам атерогенеза и роли модификаций липопротеидов в этом процессе посвящен обзор В. О. Шниикитера. В соответствии с концепцией автора, модифицированные липопротеиды более атерогенны, чем нативные. Модификация липопротеидов может включать изменение этих соединений под действием ферментов, а также комплексообразование с коллагеном, эластином, протеогликанами и другими соединениями, включая и образование комплексов с антителами.

В обзоре В. А. Белицера и соавт. «Анти-тромбин III. Функциональная роль и методы определения» рассматривается важнейшая система инактивации избыточных количеств тромбина, образующихся при кровотечении. В статье обсуждаются механизмы действия антитромбина III и принципы методов определения его концентрации в плазме крови.

Роль активных форм кислорода в патогенезе пневмокопозов обсуждается в статье В. А. Гусева и Е. В. Даниловской. Авторы обращают внимание на важнейшую роль альвеолярных макрофагов в очищении легких от частиц пыли и особое место в этом процессе отводят так называемому респираторному взрыву, наблюдающемуся в фагоцитирующих клетках. Они подчеркивают, что неконтролируемая экзогенная генерация клетками

активных форм кислорода может приводить к повреждению легочной паренхимы, а гибель и разрушение самих макрофагов стимулируют приток нейтрофилов в очаг воспаления и способствуют поддержанию процесса воспаления.

В статье Т. Д. Большаковой и М. Я. Шендерович рассмотрены физиологическая роль и клиническое значение одного из метаболитов норадреналина (3-метокси-4-оксифеилэтилглюколя). Определение этого соединения в крови и моче позволяет проводить лабораторную диагностику катехоламинпродуцирующих опухолей, оценивать состояние больных депрессией, судить о функциональном состоянии симпатико-адреналовой системы в клинике и эксперименте.

Обзор С. П. Анисеевой и соавт. посвящен биохимическим и регуляторным аспектам функции кетоновых тел в организме. Рассмотрены состояния, при которых происходит повышение содержания в крови кетоновых тел (ацетоацетата и β -3-оксибутирата), пути их образования и факторы, контролирующие утилизацию кетоновых тел в тканях, включая действие гормонов и других метаболитов.

Опубликованные журналом обзорные работы, отличаясь друг от друга стилем изложения, характером обсуждаемых проблем, в то же время едины в своей теоретической и практической медицинской направленности. Можно не сомневаться, что со страниц журнала в истекшем году читатель получил исчерпывающую информацию не только о состоянии того или иного вопроса, но и о перспективах развития анализируемой области медицинской химии в будущем. Публикация аналитических обзоров по медицинской химии является, по нашему мнению, очень важным разделом работы журнала и его необходимо совершенствовать и развивать.

Следует приветствовать и оперативную публикацию в одном из номеров журнала (№ 5, 1987) материалов III Всесоюзного симпозиума «Структура и функции лизосом», посвященного памяти акад. АМН СССР А. Л. Покровского.

В работе симпозиума приняли участие более 170 специалистов из 42 городов страны и 14 иностранных ученых из 7 стран (НРБ, Великобритания, ВНР, ГДР, ПНР, ЧССР, Япония). На страницах журнала нашли отражение материалы 24 пленарных докладов советских исследователей, в которых рассмотрены самые разные вопросы, связанные с функционированием лизосом в норме и при патологии. К сожалению, доклады иностранных участников симпозиума не были напечатаны, и было бы желательно восполнить этот пробел публикацией в будущих номерах хотя бы наиболее интересных докладов в виде обзорно-экспериментальных статей.

Основной объем каждого номера журнала представляют экспериментальные работы, из которых при всем их тематическом многообразии можно выделить три основных направления: а) биохимия патологического процесса; б) биохимическая диагностика; в) биохимическая фармакология.

Пожалуй, наибольшее число публикаций в 1987 г. пришлось на работы первого направления. В них мы находим данные о роли калликреин-кининовой системы в течение язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки (В. Л. Доценко и соавт.), о нарушении энергетического метаболизма мозга при

экспериментальном внутримозговом кровоизлиянии (Л. Н. Маслов), о стимуляции фрагментами фибронектина пролиферации клеток грануляционной ткани (А. Д. Златопольский и соавт.) и многие другие.

Проблемы биохимической диагностики освещены на страницах журнала в различных аспектах: распознавание болезни, дифференциальная диагностика, оценка тяжести и фазы болезни, контроль за эффективностью лечения, механизм изменения клинко-биохимического параметра. Приведем несколько примеров. В эксперименте у больных исследовано состояние калликреин-кининовой системы крови при острых легочных повреждениях (Р. А. Зарембский и соавт.), причем для анализа использовали не периферическую кровь, как делают обычно, а притекающую в легкие и оттекающую от них. С развитием реаниматологии, сосудистой хирургии, микрохирургии клиническая химия получает новый продуктивный объект исследования — кровь, оттекающую от патологического очага. Содержание эндорфинов в плазме крови больных эндогенными депрессиями и доноров не различалось (А. Д. Дмитриев и соавт.), но авторы справедливо предположили, что периферическая кровь может не отражать локальные нарушения метаболизма эндорфинов, происходящие, например, в гипоталамусе. Сравнительно новым объектом клинической химии являются также ворсинки хориона, биотат которого можно использовать для пренатальной диагностики лизосомных болезней (Н. А. Петушкова и соавт.). Эпизимодиагностика лейкозов успешно конкурирует с традиционной цитодиагностикой: определение активности ферментов метаболизма пуринов в выделенных лимфоцитах может быть использовано для дифференциальной диагностики вариантов острого лейкоза, а состояние ферментных маркеров определяет неоднозначность ответа на терапию (Л. И. Филановская и соавт.). Установлено также изменение кинетических параметров аденозиндезаминазы тромбоцитов в ответ на воздействие ряда ингибиторов, что может служить критерием начальных стадий заболевания лейкозом (Я. М. Соколовина и соавт.).

К диагностически важным находкам следует отнести также увеличение содержания фукозиллированного альбумина сыворотки при развитии опухоли в желудке (В. М. Соркин и соавт.), прогностическое значение величин экскреции полиаминов у больных с термическими ожогами (Л. Д. Ворончихина и соавт.), усиленный транспорт галактозы в эритроциты — патогенетически более информативный маркер галактоземии, чем недостаточность галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы (Н. А. Соловьева и соавт.).

Возможности коррекции патологических процессов зависят от того, насколько эффективны регуляторы нарушенных звеньев метаболизма или обходных метаболических путей будут использованы специалистами по медицинской химии. Поскольку химическая природа большинства заболеваний далеко не выяснена, попытки фармакологической коррекции, как правило, на современном этапе развития медико-биологических наук носят элемент поиска, черты фрагментарности. Исследования в области биохимической фармакологии или метаболической реабилитации имеют множество направлений: механизм рецепции и дейст-

вия лекарственных веществ (К. И. Крауляис и соавт.; Е. К. Плотникова и соавт.; В. М. Мирошников; М. И. Бушма и соавт.; Э. Г. Давлетов и соавт.; В. Я. Арион, Е. Э. Граенская и соавт.), свойства лекарственных препаратов и их биотехнология (Д. Д. Сумароков; Д. А. Опари и соавт.; К. С. Десятниченко и соавт.; Н. А. Добротина и соавт.; Э. А. Бауманис и соавт.; Н. Г. Синилова и соавт.), проблемы питания и переориентации межорганных метаболических отношений (И. Н. Сергеев и соавт.; Е. Я. Стан; А. П. Екимовский; В. В. Федуров) и др.

По всем названным выше направлениям исследований в медицинской химии продолжает поступать информация, относящаяся к проблеме свободнорадикальной патологии, что нашло свое отражение в более чем 20 публикациях годового выпуска журнала. Универсальный механизм патологии, возникающий при нарушении метаболизма активированных форм кислорода и как следствие при развитии перекисного окисления липидов, окислительной деструкции белков, других молекул и их структурных ансамблей, привлекает внимание исследователей перспективами раскрытия патогенеза, создания новых диагностических подходов и способов антиоксидантной терапии. Работы такого плана встречаются на страницах журнала при исследовании стресса (П. П. Голиков и соавт.; Ф. А. Звершхановский и соавт.; Л. С. Колесниченко и соавт.; Э. М. Микасян и соавт.; И. А. Горюшницкая и соавт.; В. В. Соколовский и соавт.), нефритов (В. А. Жмуров и соавт.), эндокринопатий (Р. С. Тишенина), пародонтитов и гингивитов (А. П. Левицкий), инфаркта миокарда (Б. В. Давыдов и соавт.), кардиомиопатии на почве умеренной недостаточности витамина Е (Ю. В. Архипенко и соавт.), экспериментальной язвы желудка (И. Г. Кузнецов и соавт.), глазных заболеваний (И. А. Богданова и соавт.), ишемии печени (С. А. Козлов и соавт.), реанимации (В. Т. Долгих) и др. Методический уровень этих работ далеко не равноценен, и следует приветствовать решение редакции журнала опубликовать серию статей по важному в практическом отношении, но пока дискуссионному вопросу — о правильности постановки и информативности реакции с тиобарбитуровой кислотой (Р. С. Тишенина; В. Б. Гаврилов и соавт.; В. А. Костюк; И. А. Потапович) — методу, наиболее часто используемому для исследования перекисного окисления липидов.

Весьма важным является раздел журнала «Методы биохимических исследований». В этом разделе постоянно публикуются методические работы из самых различных областей медицинской химии. Часть из них представляет собой оригинальные методические подходы, другие являются модификациями известных методик, приспособленных к использованию в клинической практике.

Из других разделов журнала заслуживают внимания «Дискуссии», «Хроника», «Рецензии», а также раздел, включающий рефераты статей, направленных на депонирование в ВИНИТИ.

В 1987 г. в этих разделах журнала были опубликованы дискуссионные материалы о преподавании биохимии в медицинских институтах и о нерешенных проблемах в этой области (Т. Т. Березов и С. И. Табагари; М. С. Кокучавили; № 3), хроника I Всесоюзной

конференции «Нейропептиды: их роль в физиологии и патологии» (В. Д. Слепушкин), о 8-м пленуме Научного совета по биологической и медицинской химии (В. М. Иншакова; И. С. Агабабова) и о III Всесоюзном симпозиуме «Структура и функции лизосом» (А. В. Васильев). В разделе «Рецензии» были представлены такие монографии, как «Молекулярные основы лизосомных болезней накопления» под ред. Дж. Барранджера и Р. Брэди, «Биологическая химия Е. А. Строева, «Эпилептология и патохимия мозга» К. И. Погодаева, «Метаболические аспекты проблемы стресса в космическом полете» Р. А. Тиграняна, «Холинэргическая регуляция биохимических систем клетки» С. Н. Голикова и соавт.

Наше время, по-видимому, требует появления в журнале новой рубрики, посвященной проблемам перестройки. Осмелимся высказать убеждение, что оптимальные формы перевода научных отраслей, учреждений и отдельных подразделений (отделов, лабораторий, проблемных групп) на новые рельсы планирования, финансирования и организации могут существенно различаться в зависимости от их специфики. Вероятно, для медицинской химии, учитывая ее фундаментально-прикладной характер, необходимо разработать не одну, а несколько организационных моделей перевода исследовательских работ на самофинансирование, самоокупаемость или хозрасчет. Организация широкой дискуссии «Экономика в медицинской химии» с активным привлечением не только ученых-естествоиспытателей, но и экономистов, специалистов по проблемам управления, зарубежных корреспондентов и «пользователей продукта» медицинской химии — врачей и технологов — представляется задачей, в решении которой журнал «Вопросы медицинской химии» мог бы сыграть заметную роль. Проведение таких дискуссий, по-видимому, было бы наиболее эффективным при встречах редколлегии журнала со своими читателями при условии очень тщательной подготовки таких читательских конференций и оповещения о них заранее в ежемесячных планах московского отделения Всесоюзного биохимического общества.

Обсуждение предлагаемых проблем, как нам кажется, ни в коем случае не должно произойти за счет сокращения перечисленных выше разделов журнала, которые полностью себя оправдывают. Напротив, необходимо поставить вопрос об увеличении объема журна-

ла, по крайней мере вдвое, что позволит сделать его ежемесячным, существенно сократить сроки прохождения статей, которые составляют иногда 1½—2 года. Возможно, частичная финансовая помощь журналу может быть оказана за счет более широкой рекламы продукции отечественных и зарубежных химических, фармацевтических и приборостроительных фирм, будущих исследовательских, диагностических, химико-технологических кооперативов и т. д. Дополнительное финансирование позволило бы улучшить качество оформления журнала, которое на сегодняшний день представляется весьма скромным. Было бы, например, желательным не только сопровождать каждую статью резюме на английском языке, но и помещать его русский вариант.

Отмечая значение журнала «Вопросы медицинской химии» в развитии теоретической и практической медицины в нашей стране и ту большую работу, которую он проводит, можно надеяться, что в ближайшем будущем журнал обогатится новыми формами, способствующими дальнейшему прогрессу медицинской химии.

Докт. биол. наук Г. Я. Видершайн,
докт. мед. наук, проф. А. М. Герасимов
(Москва)

От редакционной коллегии журнала «Вопросы медицинской химии»

Редакционная коллегия благодарит рецензентов, доктора биол. наук Г. Я. Видершайна и доктора мед. наук проф. А. М. Герасимова за их большой труд и ценные замечания по дальнейшему совершенствованию работы журнала. Учитывая высказанные в рецензии замечания, редакционная коллегия планирует заказать иностранным участникам симпозиума «Структура и функции лизосом» обобщающие сообщения по материалам их докладов и открыть на страницах журнала обсуждение проблем перестройки деятельности научных учреждений медико-биологического профиля.

Редколлегия полностью согласна с мнением рецензентов о необходимости увеличения объема журнала и восстановлении принятой во всем мире практики публикации кратких резюме на языке оригинала статьи.

Редколлегия обратится с соответствующими предложениями в издательство «Медицина» и примет зависящие от нее меры по сокращению сроков публикации статей.

ИСТОРИЯ МЕДИЦИНЫ

ЮЛИЯ МАРКОВНА ГЕФТЕР (К 100-летию со дня рождения)

19 июля 1988 г. исполняется 100 лет со дня рождения профессора Юлии Марковны Гефтер, отдавшей более 60 лет своей жизни беззаветному служению науке.

В 1904 г. по окончании женской гимназии Юлия Марковна поступает на физико-математический факультет Московских высших

женских курсов. Все другие пути к высшему образованию в то время были для нее закрыты, в том числе Женский медицинский институт в Петербурге, в который принимали лишь в возрасте не моложе 20 лет.

Закончив Высшие женские курсы, Юлия Марковна сразу поступает на III курс меди-



цинского факультета Московского университета, став одной из трех студенток среди 300 мужчин — слушателей факультета. Поскольку в 1910 г. царским правительством был введен запрет на обучение женщин в университетах, завершить высшее образование ей пришлось за рубежом. В 1911 г. она закончила Мюнхенский университет. Сдав экзамены и представив диссертацию, посвященную обмену пуринов, она получает звание доктора медицины. В том же году Юлия Марковна с отличием сдает государственные экзамены на звание лекаря в Московском университете.

Давняя тяга к медицине и возникшая во время учебы на Женских курсах увлеченность органической химией привели ее в молодую тогда науку, обычно именовавшуюся в то время медицинской химией. Свои первые шаги в науке Юлия Марковна сделала под руководством акад. Н. Д. Зелинского еще в годы обучения на Высших женских курсах и в Московском университете. По окончании университета она в течение ряда лет сочетала работу в клиниках с исследованиями в химических лабораториях, в частности в Московском университете, где с 1915 по 1931 г. работала под руководством акад. В. С. Гулевича сначала научным сотрудником, преподавателем, а затем приват-доцентом и доцентом.

С 1931 г. вся жизнь и деятельность Юлии Марковны связаны в основном с кафедрой биохимии I Ленинградского медицинского института, хотя многие годы она в той или иной форме сотрудничала и в других научных и учебных заведениях. Лишь однажды пришлось ей вернуться к непосредственной врачебной работе. Это было в начале Великой Отечественной войны, когда Юлия Марковна некоторое время работала в госпитале.

Отличительной чертой научной деятельности Ю. М. Гефтер было стремление соединить теоретические исследования в области биохимии с потребностями практической ме-

дицины. Уже в первые годы Советской власти она начала изучать влияние условий труда на обмен веществ у рабочих различных профессиональных групп. Так, ею были исследованы биохимические сдвиги при тяжелой мышечной работе, выявлены биохимические признаки утомления, показано благоприятное влияние на организм систематических тренировок.

В 1932 г. была опубликована работа Ю. М. Гефтер «Случай 20-дневного голодания». Кто бы мог тогда предвидеть, что спустя 9 лет эта небольшая работа получит дальнейшее и очень интенсивное развитие! В тяжелейших условиях блокады Ленинграда Юлия Марковна с сотрудниками кафедры биохимии и ряда клиник выполнила серию исследований по изучению алиментарной дистрофии. Результаты этих работ прямо трансформировались в практические рекомендации врачам, помогли выжить и выстоять многим ленинградцам.

В послевоенные годы были продолжены исследования по вопросам питания, в том числе лечебного питания при тяжелых ожогах. Эти исследования в немалой степени способствовали формированию нового представления о тяжелых ожогах не как о локальных повреждениях кожи, а как о сложном поражении всего организма, что нашло отражение в термине «ожоговая болезнь».

Еще в военные годы были начаты работы по изучению обмена веществ при таких заболеваниях человека, как травматический остеомиелит, гипертония, язвенная болезнь. Позднее много усилий было приложено к выяснению биохимических сдвигов при гипоксии, поиску путей коррекции этих сдвигов.

Утверждая всей своей деятельностью единство теоретических и прикладных аспектов научного исследования, Ю. М. Гефтер горячо пропагандировала необходимость развития клинической биохимии, добивалась специального преподавания этой дисциплины на старших курсах медицинских вузов.

В общей сложности перу Юлии Марковны принадлежит более 100 работ, около 20 работ вышло из возглавлявшихся ею лабораторий. Под ее руководством выполнено более 60 кандидатских и 9 докторских диссертаций. Много сил и внимания она уделяла научно-организационной работе: входила в состав редакционной коллегии БЭМ, редакционных советов журналов «Вопросы медицинской химии» и «Лабораторное дело», ряда библиотечных советов.

Ю. М. Гефтер была не только крупным ученым, но и талантливым педагогом. Более 30 лет возглавляя кафедру биохимии, она внесла весомый вклад в подготовку и воспитание многих поколений советских врачей. Ее глубокие по содержанию и доходчивые по форме лекции посещали не только студенты, но и врачи различных клиник и других медицинских учреждений. По инициативе Ю. М. Гефтер в 1931 г. на кафедре биохимии I Ленинградского медицинского института был создан студенческий научный кружок, который стал одним из лучших в институте и до сих пор пользуется большой популярностью среди студентов. Многие участники кружка стали в последующем биохимиками, сотрудниками кафедры.

В 1969 г. Юлия Марковна передала институту значительную сумму из личных сбережений для поощрения за лучшие студен-

ческие научные работы в области биохимии и физиологии. Ежегодное присуждение премии им. Ю. М. Гефтер стало доброй традицией в I Ленинградском медицинском институте.

Заслуги Ю. М. Гефтер высоко оценены правительством СССР. Она была награждена орденом Ленина, орденом «Знак Почета» и

медалями, среди которых медаль «За оборону Ленинграда».

В благодарной памяти соратников и многочисленных учеников образ Ю. М. Гефтер живет как пример честности, бескорыстия, высокой гражданственности настоящего ученого и педагога.

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

- Оглоблина О. Г.* Биохимические механизмы участия нейтрофилов в реакциях острого воспаления (обзор) 2
- Плецитый К. Д.* Активные метаболиты витамина D как регуляторы процессов клеточной пролиферации и дифференцировки. Сообщение 1. Лимфоциты 9
- Котловский Ю. В., Гришанова А. Ю., Мишин В. М., Бачманова Г. И.* Роль микросом печени крыс в метаболизме метилметакрилата до формальдегида 14
- Минченко А. Г.* Особенности действия гидрокортизона на биосинтез митохондриальных белков в печени тиреоидэктомизированных крыс 17
- Щербаклова Л. А., Татарин Ю. С., Калашников В. В., Мурашов В. А., Олефиренко Г. А., Петрунин Д. Д.* Сравнительный иммуноферментный анализ α_2 -микροглобулина фертильности у здоровых доноров и при онкогинекологических заболеваниях 23
- Надольник Л. И., Галицкий Э. А., Белуга В. Б., Виноградов В. В.* Выделение и сравнительная характеристика транскортина крысы в норме и при экспериментальной недостаточности кровообращения 25
- Симхович Б. З., Мейрена Д. В., Шутенко Ж. В., Хази Х. Б., Бриеде Я. Л., Калвинш И. Я., Лукевиц Э. Я.* Влияние D,L-карнитина и ингибитора γ -бутиробетанингидроксилазы 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата на вызываемые изопротеренолом изменения в метаболизме миокарда крыс 30
- Гуринович И. Ф., Грубина Л. А., Некрашевич С. Ф., Ремизова Р. М., Шিশпоренок С. И.* Количественный и качественный состав порфиринов в эритроцитах онкологических больных 34
- Жизневская Н. Г., Макаренко В. С.* Обмен белков в почках при острой почечной недостаточности 37
- Божко Г. Х., Волошин П. В., Чурсина В. С.* Изменение содержания и связывания холестерина в тканях морских свинок при этаноловой интоксикации и холестеринозе 39
- Кузнецов В. А., Мордвинцев П. И., Данк Е. Х., Юркив В. А., Ванин А. Ф.* Низкомолекулярные и белковые динитрозильные комплексы негемового железа как ингибиторы агрегации тромбоцитов 43
- Селиванов Е. А., Вязьменская М. М., Быстрова И. М.* О составе и некоторых свойствах
- Ogloblina, O. G.* Biochemical mechanisms of participation of neutrophils in the reactions of acute inflammation (a survey)
- Pleisity, K. D.* Active metabolites of vitamin D as the regulators of processes of cellular proliferation and differentiation. Communication 1. Lymphocytes
- Kotlovsky, Yu. V., Grishanova, A. Yu., Mishin, V. M., Bachmanova, G. I.* Role of rat liver microsomal fraction in metabolism of methyl methacrylate to formaldehyde
- Minchenko, A. G.* Effect of hydrocortisone on biosynthesis of mitochondrial proteins in liver tissue of thyroidectomized rats
- Scherbakova, L. A., Tatarinov, Yu. S., Kalashnikov, V. V., Murashov, V. A., Olefirrenko, G. A., Petrunin, D. D.* Immunoenzymatic analysis of the fertility α_2 -microglobulin in various diseases and under normal state
- Nadol'nik, L. I., Galitsky, E. A., Beluga, V. B., Vinogradov, V. V.* Isolation and characterization of transcortin from healthy rats and the animals with experimental circulatory insufficiency
- Simkhovich, B. Z., Meirena, D. V., Shutenko, Zh. V., Hagi, H. B., Briede, Ya. L., Kalvinsh, I. Ya., Lukevics, E. Ya.* Effects of D,L-carnitine and 3-(2,2,2-trimethyl hydrazinium)-propionate as inhibitor of γ -butyrobetaine hydroxylase on isoproterenol-induced alterations in myocardium metabolism
- Gurinovich, I. F., Grubina, L. A., Nekrashevich, S. F., Remizova, R. M., Shishporenok, S. I.* Quantitative and qualitative composition of porphyrins in erythrocytes of oncologic patients
- Zhiznevskaya, N. G., Makarenko, V. S.* Metabolism of proteins in kidney with acute insufficiency
- Bozhko, G. Kh., Voloshin, P. V., Tchursina, V. S.* Changes in content and the rate of cholesterol binding in tissues of guinea pigs with ethanol intoxication and cholesterolosis
- Kuznetsov, V. A., Mordvintsev, P. I., Dank, E. Kh., Yurkiv, V. A., Vanin, A. F.* Low molecular and protein dinitrosyl complexes of non-hem ferrum as inhibitors of thrombocytes aggregation
- Selivanov, E. A., Vязьmen'skaya, M. M., Bystrova, I. M.* On the composition and

- ствах препарата ацетилхолинэстеразы эритроцитов человека.
- 46 *Селевич М. И.* Метаболические эффекты этанола и обмен липидов в печени крыс
- 49 *Зорин Н. А.* Комплексный анализ углеводных компонентов ассоциированного с беременностью α_2 -гликопротеина
- 53 *Панин Л. Е., Поляков Л. М., Розуменко А. А., Биушкина Н. Г.* Транспорт стероидных гормонов липопротеидами сыворотки крови
- 56 *Меерсон Ф. З., Явич М. П., Рожицкая И. И.* Влияние эмоционально-болевого стресса на скорость синтеза ДНК в клетках сердца и печени
- 59 *Осипович В. К., Тупилова З. А., Матвеевко А. В., Крайник И. В.* Синдром липидной гиперпероксидации у обожженных и его коррекция методом АУФОК
- 62 *Кендыш И. Н., Братцев В. А., Гольтыпин Ю. В., Климова Т. В., Смирнова Т. Н.* ^{125}I -п-йодфенамин как прототип средства исследования микросомального окисления
- 66 *Комов В. П., Спасенкова О. М., Стрелкова М. А.* Изучение протиназ в бронхолегочном аппарате крыс с бронхиальной анафилаксией
- 72 *Архипова Л. В., Куликов А. В., Озолин О. Н.* РНК-синтезирующая способность хроматина мозговой ткани крыс с экспериментальным аллоксановым диабетом
- 76 *Дажис А. И., Тoleykis А. И., Прашкьявичус А. К.* Изучение целостности мембранных структур клеток сердца при ишемии
- 80 *Ржанинова А. А., Требухина Е. Л., Прозоровский В. Н.* Получение и характеристика высокоочищенной креатинфосфокиназы из мозга свиньи
- 84 *Бондарев Д. П., Козлов Н. Б.* Соотношение энергетического обмена, содержания Na^+ и K^+ , активности Na^+ , K^+ -АТФазы в эритроцитах с их объемом и формой в условиях перегревания организма
- 87 *Галкин Б. Н., Ершова О. Н., Головенко Н. Я., Жилина З. И., Олешко Т. И., Водзинский С. В.* Ингибирование цитохром Р-450-зависимых ферментов микросом печени крыс тетрафенилпорфирином и его металлокомплексами
- 91 *Сторожук П. Г., Складар В. А., Быков И. М.* Изменение активности глицеральдегидфосфатдегидрогеназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, супероксиддисмутазы и каталазы в эритроцитах в зависимости от скорости утилизации глюкозы
- 93 *Микаелян Н. П.* Изучение взаимодействия инсулина с его рецепторами в плазматических мембранах лимфоцитов при ожоговой травме у крыс
- 96 *Прозоровская Н. Н., Глиняная С. В., Герасченко Л. П., Рудаков С. С., Солониченко В. Г., Дельвиц А. А.* Влияние терапии В-адреноблокатором и комплексом витаминов на показатели экскреции оксипролина при некоторых наследственных болезнях соединительной ткани
- 99 *Герасимов А. А., Баканов М. И., Балаболкин И. И., Бершова Т. В.* Корреляционные взаимоотношения лизосомных ферментов и циклических нуклеотидов при аллергических заболеваниях у детей
- 104 *Карелин А. А., Алексеев А. А., Глоба А. Г., Демидова В. С., Цветков В. О.* Энзиматическая продукция супероксида поли-
some properties of acetylcholinesterase from human erythrocytes
- Selevich, M. I.* Metabolic effects of ethanol and lipid metabolism in rat liver tissue
- Zorin, N. A.* Complex analysis of carbohydrate components in α_2 -glycoprotein, related to pregnancy
- Panin, L. E., Polyakov, L. M., Rozumenko, A. A., Biushkina, N. G.* Transport of steroid hormones by means of blood serum lipoproteins
- Meerson, F. Z., Yavich, M. P., Rozhitskaya, I. I.* Effect of emotional-painful stress on the rate of DNA synthesis in heart and liver cells
- Osipovich, V. K., Tupikova, Z. A., Matvienko, A. V., Krainik, I. V.* Syndrome of lipid peroxidation in patients with burns and its correction using autotransfusion of UV-irradiated blood
- Kendysh, I. N., Bratsev, V. A., Gol'tyapin, Yu. V., Klimova, T. V., Smirnova, T. N.* ^{125}I -p-iodophenamine as a prototype compound for studies of microsomal oxidation
- Komov, V. P., Spasenkova, O. M., Strelkova, M. A.* Proteinases in bronchopulmonary system of rats with bronchial anaphylaxis
- Arkhipova, L. V., Kulikov, A. V., Ozolin, O. N.* RNA synthesizing ability of brain chromatin in rats with alloxane diabetes
- Dagis, A. I., Toleykis, A. I., Prashkyavichus, A. K.* The state of heart cells membrane structures in ischemia
- Rzhaninova, A. A., Trebukhina, E. L., Prozorovsky, V. N.* Obtaining and characterization of highly purified creatinphosphokinase from the brain of a pig
- Bondarev, D. P., Kozlov, N. B.* Relation between energy metabolism, content of Na^+ and K^+ , activity of Na^+ , K^+ -ATPase in erythrocytes and the cells form and volume under conditions of overheating
- Galkin, B. N., Ershova, O. N., Golovenko, N. Ya., Zhilina, Z. I., Oleshko, T. I., Vodzinsky, S. V.* Inhibitory effect of tetraphenyl porphyrine and of its metal complexes on cytochrome P-450 dependent enzymes in rat liver microsomes
- Storozhuk, P. G., Sklyar, V. A., Bykov, I. M.* Alterations in activities of glyceraldehyde phosphate- and glucose-6-phosphate dehydrogenases, superoxide dismutase and catalase depending on the rates of glucose consumption in erythrocytes
- Mikaelyan, N. P.* Interaction of insulin and its receptors in lymphocyte plasmatic membranes of rats with burns trauma
- Prozorovskaya, N. N., Glinyanaya, S. V., Geraschenko, I. P., Rudakov, S. S., Solonichenko, V. G., Del'vig, A. A.* Effect of therapy involving a beta-adrenoblocator and complex of vitamins on patterns of hydroxyproline excretion in some hereditary diseases of connective tissue
- Gerasimov, A. A., Bakanov, M. I., Balabolkin, I. I., Bershova, T. V.* Correlation between lysosomal enzymes and cyclic nucleotides in children with allergic impairments
- Karelin, A. A., Alexeev, A. A., Globa, A. G., Demidova, V. S., Tsvetkov, V. O.* Enzymatic production of superoxide anion by

морфно-ядерными лейкоцитами человека при ожоговой болезни
Табагари С. И., Шубитидзе Т. М., Абдуше-лишвили Г. В. Влияние силимарина на активность лизосомальных протеиназ печени и почек при введении тетраметилтиурамдисульфида

107
110

human polymorphonuclear leukocytes in burns disease
Tabagari, S. I., Shubitidze, T. M., Abdushe-lishvili, G. V. Effect of silimarine on activity lysosomal proteinases in liver and kidney tissues of rats treated with tetra-methylthiuram disulfide

Методы биохимических исследований

Methods of Biochemical Investigations

Менявцева Т. А., Ратнер Г. М., Лимарева Т. Д., Масенко В. П. Применение иммуноферментного анализа для контроля специфической активности антитысывороток к вазопрессину

Menyavtseva, T. A., Ratner, G. M., Limareva, T. D., Masenko, V. P. Immunoenzyme assay in estimation of specific activity of the antiserum against vasopressin

Крылова С. М., Сахаров И. Ю., Слинкин М. А., Савицкий А. П., Клибанов А. Л., Торчилин В. П., Березин И. В. Метод флюоресцентного иммуноанализа с временным разрешением с использованием европисвой метки и полимерного комплекса

114
116

Krylova, S. M., Sakharov, I. Yu., Slinkin, M. A., Savitsky, A. P., Klibanov, A. L., Torchilin, V. P., Berezin, I. V. Fluorescent immunoassay involving temporal distinction as well as Eu label and polymeric complexone

Стукалов Ю. В., Орлов Е. И. Определение ретинола, α -токоферола, β -каротина и суммы каротиноидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

116
121

Stukalov, Yu. V., Orlov, E. N. Estimation of retinol, α -toxopherol, β -carotene and total carotinoids using highly effective liquid chromatography

Ротт Г. М., Лапшина Г. М., Рожинская И. В., Летова О. А., Блинова Т. В., Поверенный А. М. Разработка и сопоставление информационной значимости методов определения миоглобина: твердофазный иммуноферментный анализ и гемагглютинационный тест

121
124

Rott, G. M., Lapshina, G. M., Rozhinskaya, I. V., Letova, O. A., Blinova, T. V., Poverenny, A. M. Informative importance of the myoglobin estimation by means of solid phase immunoenzyme assay and hemagglutination test

Шишкин С. Н., Островский Ю. М., Пронько П. С. Оптимизация техники определения уровня эндогенного этанола в крови и тканях человека и экспериментальных животных

124
129

Shishkin, S. N., Ostrovsky, Yu. M., Pron'ko, P. S. Optimal conditions for endogenous ethanol estimation in human and animal blood and tissues

Вагенкнехт К., Барлебен Х., Хайне Х. Значение изоферментов для диагностики инфаркта миокарда и способы их исследования

129
133

Vagenkhert K., Barmben, H., Haine, H. Significance of isoenzymes for the diagnosis of myocardial infarction and ways of their investigation

Рецензия

Book Reviews

История медицины

Medicine

Техн. редактор *Н. К. Евсти*

Х. Яшина.

Сдано в набор 22.07.88.
Гарнитура литературная.
Уч. изд. л. 15

а тип. № 1.
р. отт. 13,13.

Издательство

ВО «Со
по де